



Софийски университет “Св. Климент Охридски”

Физически факултет

Катедра “Атомна физика”

МАЯ ВАЛЕРИЕВА ТАНОВСКА

**Взаимодействие на липидни моделни системи с
биологично важни молекули**

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН

“ДОКТОР”

Редовна докторантура по професионално направление 4.1. Физически науки
(Биофизика) към катедра „Атомна физика“

Научен ръководител: Доц. д-р Борислав Павлов

Научен консултант : Гл. ас. Лилия Владимирова - Михалева

София

2019

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения

Въведение

I ОБЗОРНА ЧАСТ

ГЛАВА 1 Обзор на научната литература

1.1. Взаимодействие на липидни моделни системи с биологично важни молекули

1.2. Влияние на еруфозина върху мембранните структури

1.3. Методики за изследване на взаимодействието на липидни моделни системи с биологично важни молекули

1.3.1. Електрохимична импедансна спектроскопия

1.3.2. Елипсометрия

1.3.3. Атомно- силова микроскопия

1.4. Цели и задачи на изследването

II СПЕЦИАЛНА ЧАСТ

ГЛАВА 2 Материали и методи

2.1. Материали и реактиви

2.2. Еруфозин

2.3. Получаване на липиден филм върху твърда подложка

2.4. Методи на изследвания

2.4.1. Електрохимична импедансна спектроскопия

2.4.1.1. Измерване на температурата върху повърхността на субстрата.

2.4.2. Елипсометрични изследвания

ГЛАВА 3 Резултати и обсъждане

3.1. Импедансно изследване на филми от чист лецитин при различна температура

3.2. Импедансно изследване на лецитинови филми съдържащи холестерол.

3.3. Елипсометрично изследване на взаимодействието на лецитин и холестерол

3.4. Елипсометрично изследване влиянието на антитуморния агент - еруфозин върху липидна моделна система

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ИЗВОДИ

ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Списък на публикациите, включени в дисертацията.

Използвани съкращения:

- ADP – adenosine diphosphate ribose / аденозин дифосфатна рибоза
- AFM / ACM – atomic force microscopy / атомно силова микроскопия
- ALL – acute lymphocytic leukemia / остра лимфоцитна левкемия
- AML - acute myeloid leukemia / остра миелоидна левкемия
- APCs – alkylphosphocholines / алкилфосфолини
- APLs – alkylphospholipids / алкилфосфолипиди
- БЛМ – бислойни липидни мембрани
- CML – chronic myeloid leukemia / хронична миелоидна левкемия
- CLL - chronic lymphocytic leukemia / хронична лимфоцитна левкемия
- CT, CTP - phosphocholine cytidyltransferase / фосфохолин цитадилтрансфераза
- ДНК - дезоксирибонуклеиновата киселина
- EIS / ЕИС – electrochemical impedance spectroscopy / електрохимична импедансна спектроскопия
- ErPC - еруцилфосфохолин
- ErPC3 – erufosine / еруфозин
- ФИР (FTIR) - Фурие инфрачервен резонанс
- HDL – липопротеини с висока плътност
- in situ* - на място
- in vivo* - на живо
- LDL – липопротеини с ниска плътност
- MM – multiple myeloma / множествена миелома
- n - показател на пречупване
- PARP – poly (ADP – ribose) polymerase
- PCSA - нулев елипсометър, работещ по схема поляризатор – анализатор – компенсатор
- SFM – scanning force microscopy / сканираща силова микроскопия
- p* - паралелно поляризирана светлина
- R - съпротивление
- RA - конфигурация на елипсометър с въртящ се анализатор
- s* - перпендикулярно поляризирана светлина

VASE - спектроскопична елипсометрия с променлив ъгъл

VLDL – липопротеини с много ниска плътност

Γ - повърхностната концентрация

PC - фосфатидилхолин

PG – фосфатидилглицерол

PS – фосфатидилсерин

SLBs – Supported lipid bilayers

SM – сфингомиелин

TAG - триацилглицероли

Въведение:

Биологичните мембрани имат изключително значение не само за клетъчната морфология, но и за множество от важни, клетъчни процеси като сливане и делене, транспорт на вещества, участие в метаболизма, информационни процеси и т.н. Всички тези дейности се осъществяват благодарение на асоциираните с мембраната белтъци. Натрупаните в последно време познания показват обаче, че липидният бислой не е просто пасивна структура, а има активно отношение към вградените в него белтъци като по този начин се осигурява функционалното многообразие на биологичните мембрани

Един от най-важните аспекти в тази насока е взаимодействието на асоциираните полипептиди с липидното си обкръжение. Липид-белтъчните взаимодействия са особено интересни за начините на вграждане в мембраната, а следователно и за тяхното нормално функциониране.

В изследванията на взаимодействието на нативни и моделни липидни мембрани с биомакромолекули се прилагат различни биофизични и биохимични методи, към които се прилагат някои изисквания, произтичащи от характера на процесите. Те трябва да не повлияват процеса взаимодействие на мембраните с биомакромолекулите и едновременно с това да са достатъчно чувствителни, за да регистрират функционалната активност на белтъка в първоначалния момент. Като такъв може да се посочи елипсометрията. Тя е информативна и високочувствителна при изследване на свързването и включването на макромолекули в липидни фази. Може да се извлече информация за механизмите, по които се осъществяват вгражданията на биомакромолекули в липидния бислой и поведението им в мембраните *in situ*. От друга страна, експериментите с реконструирани мембрани *in vitro* позволяват да се променя и дебелината на бислоя [1].

Изследването на взаимодействието на нативни и моделни липидни мембрани с биомакромолекули е особено актуално и от изключителен интерес за изследванията на биоматериали, биосензори, производство на устройства, използващи органични слоеве.

I. ОБЗОРНА ЧАСТ

Глава 1. ОБЗОР НА НАУЧНАТА ЛИТЕРАТУРА

1.1. Взаимодействие на липидни моделни системи с биологично важни молекули

Биологичните мембрани или биомембрани са пропускливата бариера на всички живи същества. Включени са в почти всички биологични процеси. Мембраните не са с произволна форма и не са хаотично разпръснати. Дебелина им е не повече от ($<100 \text{ \AA}$), представляват двумерни пространствени формирания [5]. Вътреклетъчните мембрани позволяват компартментализацията на биомолекулите и биологичните процеси с различни части на клетката. Състоят се от липиди, белтъци, (в това число гликолипиди и гликопротеини), съотношението им варира от 20 до 80 %. Пропорцията на двата основни компонента отразява особеностите в предназначението на даден вид мембрани. Например: в миелиновите слоеве (те осигуряват електрическа изолация на невроните) там в по – голямо количество са липидите, докато при митохондриите и хлоропластите преобладават белтъците, участващи активно в метаболизма [6]. Свързват се с различни ензими с биомембраните, участващи в метаболизма или изпълняващи регулаторна роля, (например: поддържане на рН). Явяват се „вместилище“ за много макромолекулни агрегати с определени функции. Олигомерни белтъци с по няколко субединици се грижат за пасивния и активен пренос на веществата през клетката. Транспортът на йони осигурява мембранната потенциална разлика важна за организма както в енергетичен (синтез на АТФ), така и в комуникационен аспект (генериране на потенциал на действие при невроните). Както споменахме по – нагоре относно метаболизма, мембраните се свързват с различни ензими, играещи регулаторна роля (в поддържане на рН). Хлорофил – белтъчни комплекси в тилакоидите хващат светлинната енергия нужна им за фотосинтезата. Натоварени са и с рецепторните функции и представляват сами по себе си фазовата гранична зона, контактен регион.

Като заключение можем да кажем, че изключителната им биологична значимост произтича до голяма степен от техните уникални физико-химични свойства, като гъвкавост, самовъзстановяване и самосборка, селективна пропускливост и т.н..

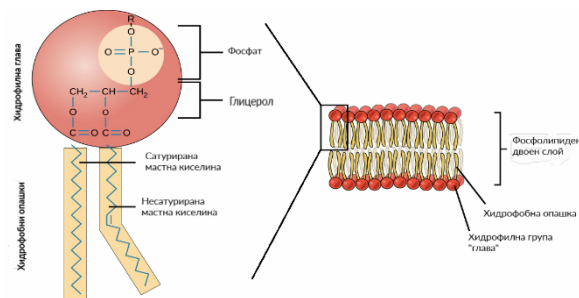
През 1925 год. Гортер и Грендел правят първи стъпки в изследването на структурата на биологичните мембрани [7]. Извличайки липиди от еритроцити от видове организми, използвайки ацетон и везна Лангмюир, достигат до извода, че площта на моделните мембранни системи е два пъти по – голяма от тази на еритроцитната мембрана. Счита се, че липидния бислой е този, който е в основата на изграждането на мембраната. При експеримента се забелязват две основни грешки. Едната, че ацетонът не извлича всички липиди и втората - площта на еритроцитите е оценявана за сухи образци, което води до занижени стойности [8].

През 1972 год. флуидо-мозаичен модел е предложен от Сингер и Николсън [8]. За първи път този модел има голямо влияние върху областта на мембраните и техните динамични аспекти [9]. Той предполага значителна “течливост” на бислоя, към който са прикрепени по различен начин множество белтъчни компоненти. Някои от тях са частично или изцяло потопени в бислоя (интегрални белтъци), докато други (периферни белтъци) са заловени отвън към полярните глави, предимно чрез електростатични сили. Всички мембранни съставки са в непрекъснато движение и взаимовръзки помежду си. Теоретичният мозаичен модел разглежда биомембраната като вид двуизмерна течност, при която както липидите, така и протеините могат да дифундират повече или по-малко [8]. Въпреки това, страничната структура на мембраната в този модел се счита за произволно организирана и този възглед доминира в областта на мембраните до постулатията на хипотезата на сала [9].

Това предполага, че съществуват елементи на мембраната, плаващи повече или по-малко свободно около двуслойния мембранен слой като един вид сал. Тези салове са по-подредени и съдържат високи нива на сфинголипиди, холестерол и наситени фосфолипиди [7].

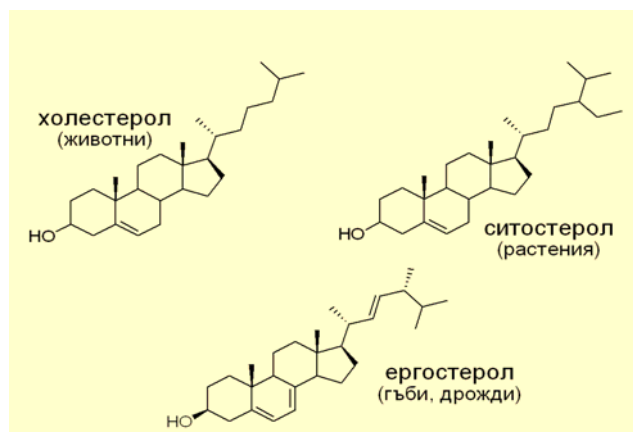
Полярните липиди, се състоят от хидрофилна глава и хидрофобни опашки, амфифилни молекули. Основната група полярни липиди са фосфолипидите. Хидрофилните глави на фосфолипидите са от глицерол и техни представители са фосфатидилхолин (PC), фосфатидилсерин (PS) и фосфатидилглицерол (PG). PC е неутрален, но PS и PG могат да бъдат електрически заредени и това прави голяма разлика, когато липидите са включени в мембраните, включително колко добре се свързват с протеините. Друга група са сфинголипидите, чиито групи са получени от сфингозин вместо глицерол. Важен пример за тази група е сфингомиелина (SM) [7]. Схематичното представяне на тези видове полярни липиди, които имат хидрофобна

глава и хидрофилна верига, състояща се от два въглерода. Веригите са показани на фигура 2.



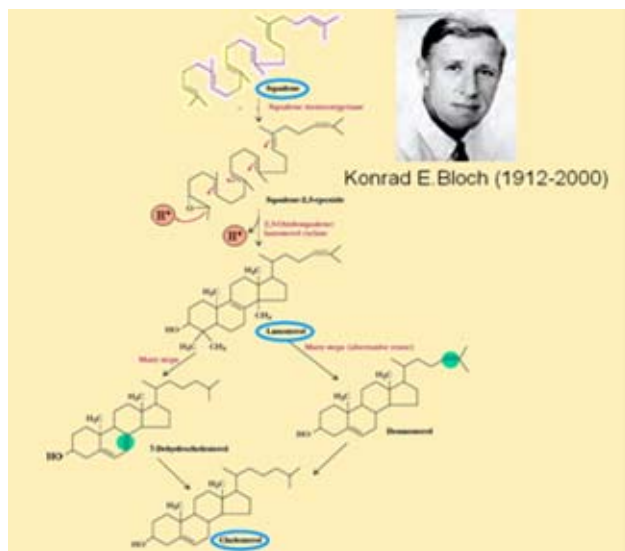
Фиг. 2 Схематично представяне на полярни липиди с хидрофилна глава и хидрофобна опашка съдържащи 2 въглеродни вериги

Холестеролът има доста по-различна структура от останалите липиди. Той също е амфибилна молекула, но вместо ацилни вериги хидрофобната му част е изградена от слята стероидна пръстенова система с къса въглеродна верига в края, а полярната му зона се състои само от една проста хидроксилна група ($-OH$) в началото на стероидната система. Това го определя като липид с обемиста твърда опашка и малка глава. Подобен строеж имат и другите стероли срещащи се в еукариотните мембрани (Фиг.3), а също и неговите производни като витамин D, хормони и т.н.. Формата на холестеролната молекула заслужава специално внимание във връзка с вътрешната (спонтанна) кривина на бислоя. Очевидно, нейният параметър на опаковане ще бъде над единица и поради това холестеролът ще показва тенденция към поддържане на обратни неламерарни фази [13].



Фиг. 3. Структурни формули на основните висши стероли срещащи се в еукариотите.

Разгадаването на холестеролната синтеза е плод на дългогодишните усилия на много учени, чиито логически завършек е разработената от К. Блох през 1953 год. схема (Фиг.4) с която той спечели Нобеловата награда по Физиология и Медицина за 1964 год.. Въпреки, че още от 20-те години е било известно, че сквалена (един линеен изопреноид) е прекурсор на холестерола, изминали са още 30 години, за да се уточнят подробностите в получаването на сквалена от ацетат, механизмите на неговата циклизация до ланостерол и последващите видоизменения на ланостерола до холестерол. В една ретроспекция на научната си кариера, Блох дава представа за големите трудности пред които са били изправени едни от най-добрите биохимични изследователски екипи при решаването на този проблем [10].



фиг. 4. Схема на биохимичните превръщания при синтезата на холестерола.

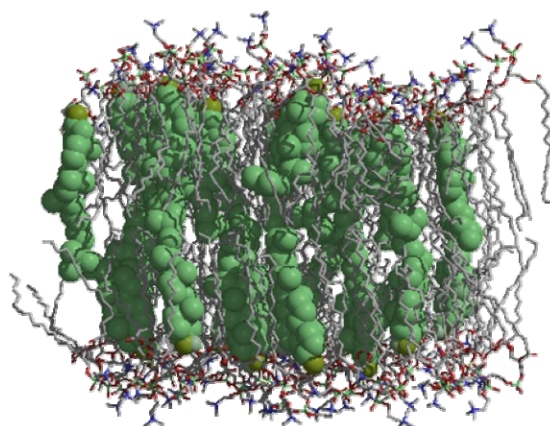
Конрад Блох недвусмислено показва, че в отсъствието на молекулен кислород няма обясним начин за циклизацията на сквалена, да не говорим за останалите етапи от ланостерола до холестерола. Независимо, че химичните структури на тези две молекули много си приличат, допълнително трябва още 20 стъпки за трансформацията на ланостерола през основния път с междинно звено 7-дехидростерол. Всички действащи ензими са съсредоточени в ендоплазматичния ретикулум (ER). Съществува и един алтернативен път, също съставен от много стъпки, в който междинен продукт е дезмостерола. И в двата случая, холестеролът се получава последно в резултат на редукцията на една двойна връзка – C-7 за 7-дехидростерола и C-24 за дезмостерола [11][12]. В крайна сметка, се изискват 11 молекули O₂ за действието на съответните четири ензима при изграждането на една

молекула холестерол [14] не съм му сложила литература. Може да се каже, че етапите от ланостерола до двата междинни продукта се характеризират с последователно „изглаждане” на хидрофобната стеролна повърхност посредством отстраняване на стърчащите метилни ($-\text{CH}_3$) групи. Цялостният окислителен процес, продуциращ холестерола, бе наречен от Блох „еволюционно усъвършенстване на една малка молекула”, с което бе отбелязано, че не само гените, но и други молекули (напр. липидите, в частност стеролите) са се променяли в хода на еволюцията. Така, той изрично обръща внимание, че не сляпата случайност, а напасването, пригодяването към една специфична биологична функция е движещата сила за структурната модификация[10].

Нещо повече, разглеждайки съвременните метаболитни пътища за синтез на холестерола като живо „изкопаемо” (фосил) на еволюционното развитие на висшите стероли, ние бихме могли да считаме, че етапите в биосинтезата маркират еволюционната последователност. С това концепцията за „молекулните фосили” се превръща в мощно средство за изследване на оптимизацията по време на развитието, без да се сблъскваме с неразрешимия проблем за поставяне на експерименти в огромни времеви мащаби [9].

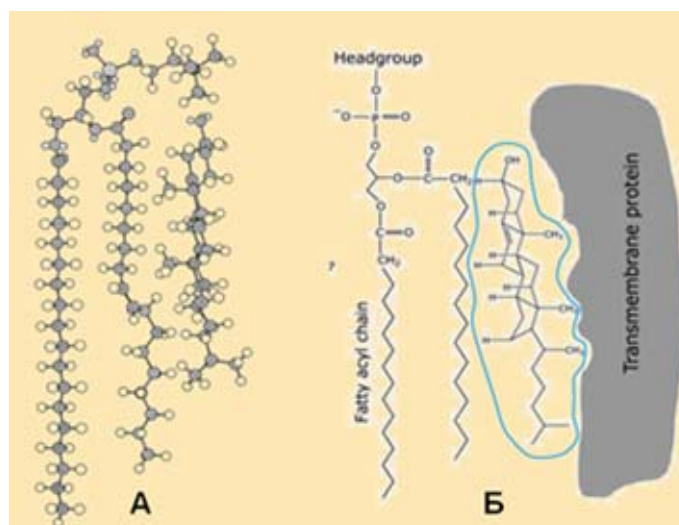
Роля на стеролите в организацията на липидния бислой

Наличието на холестерол в големи количества в плазматичните мембрани на всички животински (ситостерола в растителните) клетки е универсално. Обратно, съдържанието му в мембраните на субклетъчните органели е оскъдно. Налице е ясно изразен градиент на концентрацията от ендоплазмения ретикулум (ER), през апарата на Голджи (TGN) към плазмалемата (PM) [Sprong et al.,2001; Lodish et al.,2003], който увеличава ширината на мембраните. Този шокиращ градиент следва секреторния маршрут на белтъците през вътреклетъчното пространство до PM загатвайки, че холестеролът най-вероятно е въввлечен в сортирането и трафика на новосинтезираните полипептиди [Simons and van Meer,1988].



Фиг.5. Участък от течен DPPC липиден бислой „натоварен ” с 20% холестерол. Картината е получена от MD симулации. DPPC молекулите са показани като модел с ковалентни връзки, а холестеролът е даден с вандерваалсовите радиуси [Mouritsen and Zuckermann,2004].

Като амфифилна молекула, холестеролът лесно се вгражда в липидните мембрани с хидроксилната си група на нивото на водния интерфейс и стероидният скелет потопен в хидрофобната сърцевина (Фиг.5,6). Заради по-малките си размери обаче, той едва заема една монослойна дължина (Фиг.6).



Фиг.6. Разположение на холестеролната молекула в бислоя: (А) в съседство с фосфолипид [Ohvo-Rekilä et al.,2002]; (Б) между липиди и белтъци [Paila and Chattopadhyay,2010].

При включването си в мембраната холестеролът обикновено се разполага почти перпендикулярно на нейната равнина (*канонична ориентация*) въпреки, че има докладвани и други възможности. Хидроксилната му група попада в близката околност на естерната връзка на глицерофосфолипидите (или amidната връзка на сфинголипидите), а стероидните пръстени застават успоредно на ацилните липидни вериги между 2 и 10 въглероден атом (Фиг.6). Това затруднява ротамеризацията им и

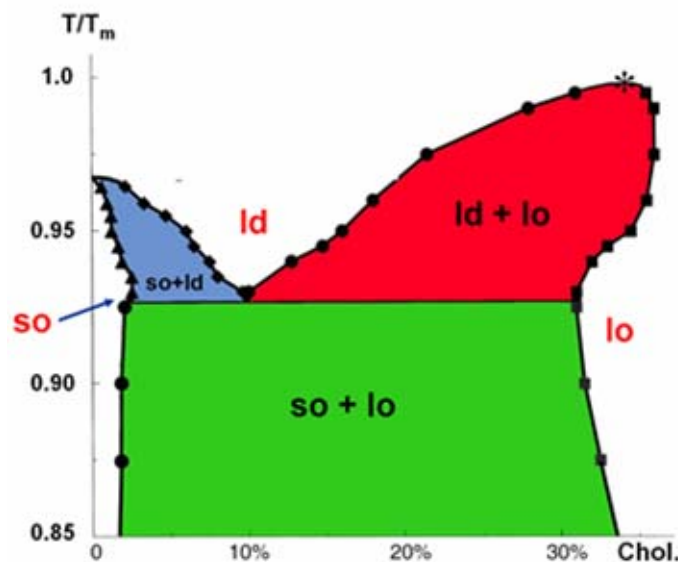
увеличава дебелината на бислоя. Ефективната дължина на холестерола се оценява на около 17 C-атомна, опъната (*all-trans*) въглеродородна верига и тъй като късата му опашка е подвижна, то крайните групи на липидните вериги (към центъра на бислоя) са по-слабо повлияни. В чист вид, полярните глави на фосфатидилхолина (PC) и сфингомиелина са ориентирани почти успоредно на водния интерфейс и вмъкването на холестерола между тях не променя конформацията им. Взаимодействията се дължат главно на вандерваалсови сили и хидрофобния ефект. По-големият афинитет към сфинголипидите (SM) и анионните липиди се обяснява с образуването на допълнителни водородни връзки с ОН групата. Същевременно обаче, тази група екранира (отслабва) електростатичните взаимодействия между полярните глави, което повишава тяхната подвижност [Ohvo-Rekilä et al.,2002].

Добре известно е, че флуидитет на мембраните, който играе централна роля в модела Сингър-Никълсън [Singer, and Nicolson,1972], не е стриктно дефинирана физична величина. Той по-скоро е свободен термин, с който се визира динамиката на течно-кристалните фази. Причината за това е, че тази динамика има както междумолекулен, така и вътрешномолекулен характер. Нейното адекватно описание предполага познаването на степените на свобода и на трансляционната дифузия и на конформацията на веригите [Mouritsen,2005]. Още от концепцията за "противодействащите сили" [Tanford,1978,1980] се вижда, че различните молекулни движения не са независими и докато онези определящи се от силите на привличане (дължащи се на междуфазовото напрежение γ [Адамсон,1979]) са добре охарактеризирани, то другите, произхождащи от взаимодействията на главите, са по-слабо изучени. Тези сили на отблъскване съдържат разнородни съставки (като кулонови, дисперсионни, стерични и т.н.), поради което са твърде сложни за експлицитно формулиране. Именно от тази перспектива са интересни измененията във физикохимичното статукво на мембраните, породени от присъствието на холестерола.

Имайки предвид различните възможности за структуриране на липидите в бислоя става ясно, че холестеролът ще бъде раздвоен в такова обкръжение. От една страна, той предпочита конформационния порядък, защото изпънатите ацилни вериги осигуряват силно вандерваалсово взаимодействие с плътната му хидрофобна стероидна система. Това съответства на твърдо-подредената гелна фаза. От друга страна, специфичната му химична природа и размери изискват по-голяма свобода на движение, което му предлага течно-неподредената фаза. Така, изправен пред лицето

на двете основни фази, холестеролът изпада в едно потиснато състояние на осуетена подреденост (англ. packing frustration). Именно начинът по който той успява да се „измъкне“ от тази ситуация дава представа не само за действието му върху бислоя, но и както ще видим за ролята на стеролите изобщо в еволюцията на еукариотите и техните мембрани [Mouritsen,2005].

Холестеролът се освобождава от структурното напрежение като интродуцира един нов тип фаза, *течно-подредената* l_o фаза. Тя е предложена за пръв път от датския биофизик Джон Хьорст Ипсен с цел да се обясни специфичния ефект от съдържанието на холестерол в мембраните [Ipsen et al.,1987,1990]. l_o фазата представлява нещо средно между двете нормални фази на бислоя – гелната и флуидната течнокристална. Тя е течна в смисъл, че в нея не съществува трансляционна подредба и латералната подвижност на молекулите е висока. В същото време, холестеролът предизвиква изпъване на ацилните вериги и по-висок конформационен порядък, което води до нарастване на дебелината на бислоя съизмеримо с това на гелната фаза. Това придава здравина на мембраната без да я превръща в кристална форма. С други думи, холестеролът упражнява двойко въздействие – той прави мембраната механично стабилна като осигурява функционално необходимия й флуидитет.



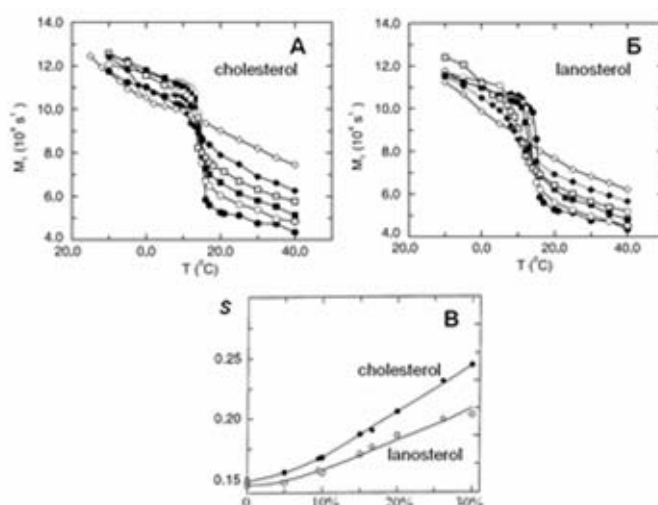
Фиг.7. Фазова диаграма на РС липиден бислой с холестерол (в mol%). T – температура на сместа, T_m точка на топене (температура на фазовия преход гел-течен кристал, $so \rightarrow ld$) на липида. Критичната точка е отбелязана с (*) [Mouritsen and Zuckermann,2004]; so е твърдо-подредената фаза („solid“ в двете латерални посоки и ориентационно „ordered“ ацилни вериги), ld е течна-неподредената фаза („liquid“ в плоскостта на мембраната и „disordered“ по отношение на веригите), а lo е течна-подредената фаза [Bloom and Mouritsen,1995].

Съответната обобщена фазова диаграма, илюстрираща поведението на холестерол–липидните смеси, е показана на Фиг.7. Тя е построена като резултат от експериментални данни подобни на горните, термодинамични измервания и споменатите теоретични разглеждания на Ипсен и сътр., взимащи предвид първоначалните оригинални работи на Вист и Дейвис [Vist and Davis,1990]. Диаграмата показва, че холестеролът поддържа l_0 фазата в широк диапазон от температури и композиции на бислоя като завършва в горната си част с критична точка на смесване, отвъд която l_0 и l_d са неразличими. В околността на тази точка се очакват драстични флуктуации в плътността и състава на бислойната смес, които евентуално биха могли да доведат до появата на съществени микроскопични латерални хетерогенности [Mouritsen,2005].

Концепцията на Каи Саймонс за *липидните салове* (ЛС) [Simons and Ikonen 1997], се появи под натиска на необходимостта за усъвършенстване на модела Сингър-Никълсън. В светлината на голямото количество най-нови експериментални данни обаче се вижда, че в първоначалния си вариант (нейните ранни дефиниции) тя не издържа критика. Това послужи за основа на съвременните формулировки от конференцията в Кийстоун 2006 и не случайно впоследствие той самият промени много детайли в нея. Ценното в идеята му, въпреки всичко, е ролята отредена на една конкретна молекула – **холестерола**, за латералната организация на бислоя с произтичащите от това функционални последствия. По наше мнение, просто няма как тази идея да не е била повлияна от гениалната хипотеза на Конрад Блох (Konrad Emile Bloch, 1912-2000) относно значението на молекулната еволюция на стеролите за развитието на мембраните и клетките. Възгледите за връзката между филогенезата и онтогенезата разбира се не са нови, но основополагащите работи на Блох върху биохимичните пътища за синтез на висшите стероли [Bloch,1965,1983,1985] предопределиха една съвършено нова насока за осмисляне на причините за възникване на еукариотите с тяхната фрапиращо богата вътрешна мембранна система.

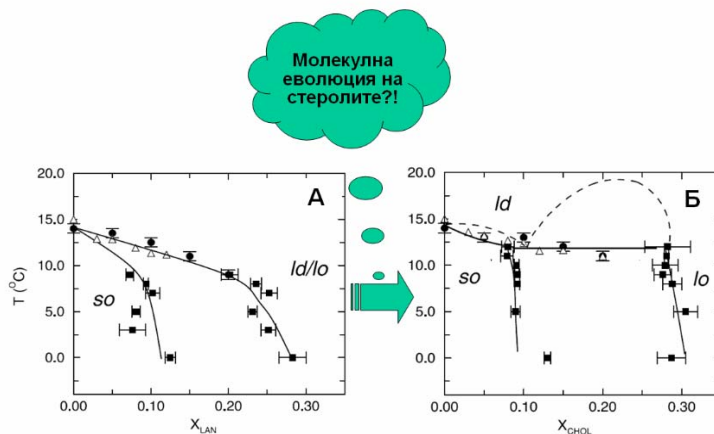
Очевидно, големият успех на холестерола на сцената на живота, е свързан с промените които стават в бислоя при смесването на тази по-особена молекула с другите липиди. Изключителната му реализация в биосферата беше разглеждана още от Блох като следствие от изменение в параметрите на мембраните със синтезата на висшите стероли. Като продължение на тези идеи, Майер Блум, Оле Моуритсен и техни сътрудници предложиха отговор на въпроса точно кои характеристики на

бислюа зависят от съдържанието на холестерола [Bloom and Mouritsen, 1988, 1995; Mouritsen,2005,2010]. Оказа се, че на способността му да придава на мембраните някои много специфични физични свойства се дължи тяхното по-гъвкаво поведение, водещо до увеличаване на структурното и функционалното им разнообразие. Регулирайки фазовото състояние на бислюа, холестеролът осигурява здравина и еластичност, задължителни за възпроизвеждането на по-сложни форми с по-голяма кривина. Според споменатата група учени, това се постига именно чрез стабилизиране на течно-подредената фаза l_0 , която е отговорна за механичната якост на мембраните и точно холестеролът е най-деен в процесите на нейното поддържане.



Фиг.8. Конформационен порядък на въглеводородните вериги, оценен по първия момент $M1$ на квадруполния деутериев ЯМР спектър на *1-palmitoyl-2-petroselinoyl-3-phosphocholine (PPet-PC)* в присъствието на холестерол (А) и ланостерол (Б). Точката на топене T_m на липида е 16.8°C . Концентрацията на стеролите в $\text{mol}\%$ е съответно: (\bullet – 0), (\circ – 5), (\blacksquare – 10), (\square – 15), (\blacklozenge – 20), (\blacklozenge – 30); (В) Сравнение на експериментални (кръг) и теоретични (ромб) данни за коефициента на конформационен порядък $S \sim M1$ при различни концентрации (в $\text{mol}\%$) на холестерол и ланостерол. Експерименталните данни са получени при 40°C , а теоретичните при $T = 1.0359T_m$, което отговаря на течно състояние [Miao et al.,2002].

Действително, многобройни сравнителни изследвания показват съществената разлика в ефекта предизвикан от холестерола и от по-нисшите стероли върху състоянието на липидите. Най-често за пример се дава ланостерола – главният прекурсор след циклизацията на сквалена. Въпреки, че ланостеролът също засилва порядъка над точката на топене и го потиска под нея (Фиг.8), той все пак се оказва по-слаб индуктор на подреждане в ацилните вериги (Фиг.8В). Освен това, докато холестеролът почти не променя T_m (Фиг.8А), то ланостеролът уширява областта на преход и я отмества към по-ниските температури [Mouritsen and Zuckermann,2004; Mannock et al.,2006



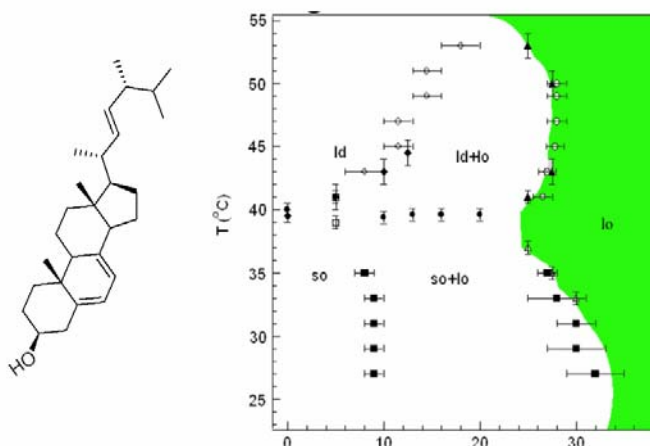
Фиг.9. Изменение на фазовото поведение на мембраните с еволюцията на стеролите. Фазови диаграми получени с диференциална сканираща калориметрия, DSC (Δ) и ЯМР (\blacksquare , \bullet) за: (А) системата PPEt-PC/ланостерол; (Б) системата PPEt-PC/холестерол. Концентрацията на стеролите е в моларни части. Линиите са прекарани за удобство и следват общата картина получена по метода Монте Карло (MC) за взаимодействията в липид-стеролни мембрани [Miao et al.,2002; Vist and Davis,1990].

На Фиг.9 са изложени съответните фазови диаграми, построени въз основа на експериментални резултати получени с различни техники. Те ярко демонстрират качествените различия в съотношението на фазите за двата типа липид/стеролни системи. Освен стандартните гелна (твърдо-подредена, **so**) и течнокристална (течно-неподредена, **ld**), в PPEt-PC/холестерол мембраните с над $\sim 30\%$ холестерол, се среща и течно-подредената **lo** фаза. Тя е стабилна за широк температурен интервал под и над точката на топене на основния липид. Доказателството за нейната термодинамична устойчивост се заключава в добре изразените двуфазни граници, определящи съвместното съществуване на **so/lo**, а също и наличието на трифазна линия (Фиг.9Б). Независимо, че за липид/ланостеролните мембрани при ниски температури и високи стеролни концентрации не са изключени **lo** състояния, трифазна линия не се наблюдава което показва, че при високи температури тези състояния са неразличими от **ld** фазата. Такова фазово поведение на двете липид/стеролни системи се подкрепя и от теоретичните разглеждания на същата група [Miao et al.,2002]. По-нови данни, получени с рентгенова дифракция под малки (SAXS) и големи (WAXS) ъгли за сфингомиелин/холестеролни смеси, също са в съзвучие с диаграмата от Фиг.9Б [Quinn and Wolf,2009].

Имайки предвид тези диаграми, изкушаващо е да приемем гледището на Блум, Моуритсен и сътр., че те отразяват биохимичната еволюция на стеролите. Наистина, по-богатото фазово поведение на липид/холестеролните мембрани е

очевидно. Възникването на отчетливо дефинирана нова *течна* фаза (**l_o**), при това *механично подсилена*, дава на тези мембрани предимството да заемат по-разнообразни форми и оттам да участват в по-широк кръг клетъчни дейности. Напълно в съгласие с идеите на Блох е тяхното мнение, че причините за такова поведение се крият в структурата на стеролите. При отработването на синтетичните пътища на този клас биомолекули, Блох е изключително впечатлен от „избирателното деметилиране на едната страна от пръстеновата система, което заобля стеролната структура”. Той пише, че „последователното отстраняване на метилни групи под натиска на селекцията непрекъснато усъвършенства и в крайна сметка прави тази структура оптимално компетентна за действие в мембраната” като „...биосинтезата завършва с холестерола, една молекула оформена да оптимизира вандерваалсовите сили на привличане с фосфолипидните вериги в мембрания бислой” [Bloch,1983].

Така се налага убеждението, че разликата в отношението на ланостерола и холестерола към мембраните се дължи главно на техния строеж. От сравнението на химичната им конфигурация (Фиг.4) става ясно, че холестеролът е чувствително по-обтекаем. За разлика от него, ланостеролът притежава три вместо две аксиални метилни групи, стърчащи откъм едната страна на планарната стероидна система (т.нар. β лице) и една метилна група навън откъм другата (т.нар. α лице), където холестеролът е напълно „гладък”. Това придава на молекулата на ланостерола по-груба и обемиста форма, което не е от полза за образуването на **l_o** фазата [Bloom and Mouritsen,1995].



Фиг.10. Фазова диаграма за смес от 1,2-palmitoyl-3-phosphocholine (DPPC) и ергостерол. Концентрацията на ергостерола е в mol%. Района който обхваща течна-подредената фаза **l_o** е даден в зелено [Hsueh et al.,2005].

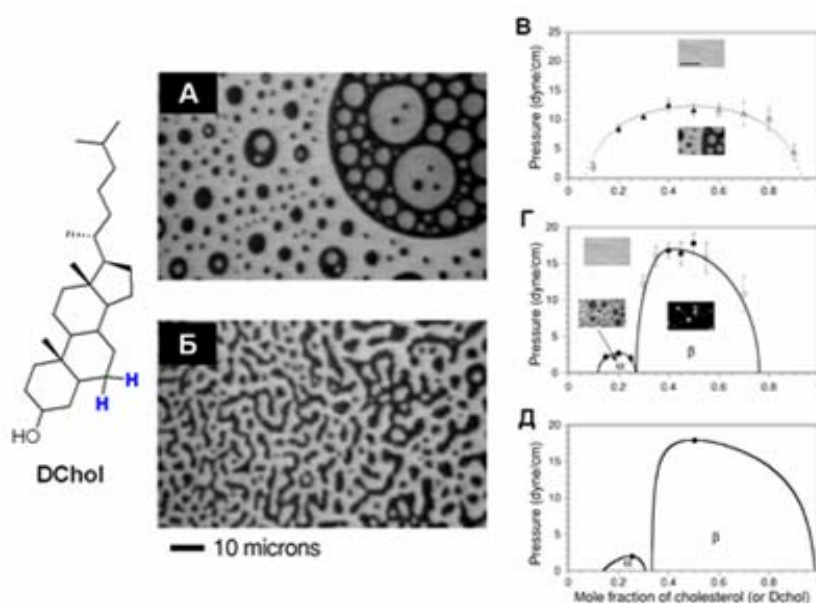
По силата на тези съображения би могло да се очаква, че един друг висш стерол – ергостеролът (срещащ се в по-низшите еукариоти) ще се държи подобно на холестерола. При ергостерола отново имаме налице една гладка страна на пръстеновата система, а двете допълнителни метилни групи са в опашката, която е подвижна и може да се подстройва (напасва) в зависимост от обкръжението. Действително, неговата експериментално получена фазова диаграма (Фиг.10) потвърждава тези предположения, тъй като приликата с диаграмите на холестерола не подлежи на съмнение. Допълнителна поддръжка на горната теза идва от опитни данни получени с лангмюирова техника. Те показват, че за разглежданите три стерола най-стабилни се очертават тези монослое в които участва холестерола (в концентрации 30mol% за DPPC и 50mol% за DMPC), особено при налягания от 30 до 35mN/m. Понеже такива налягания са именно характерни за естествените мембрани, това навежда на мисълта, че по този начин холестеролът осигурява подходящо микро-обкръжение за правилното функциониране на някои сложни белтъчни ансамбли в бислоя [Sabatini et al.,2008].

Огромното количество лабораторен материал, събран през последните двайсетина години, неизбежно бе съпътстван от множество теоретични модели за обяснение на механизмите на действие на стеролите. Тяхното развитие се базира както на макроскопични термодинамични съображения, така и на микроскопични статистически предпоставки за междумолекулните взаимодействия в бислоя. Повечето от моделите са феноменологични, в което разбира се няма нищо лошо, стига да обясняват задоволително фактите (всички претендират за това). Тук ще се опитаме да се спрем накратко на по-широко известните подходи.

В модела на кондензираните комплекси, разработен от Хардън МакКонел и Арун Радхакришнан се предполага, че холестеролът образува с фосфолипидите обратими комплекси с определена стехиометрия [Radhakrishnan and McConnell,1999a,b]. Този възглед води началото си от изследвания на разтворимостта на холестерола в мономолекулни липидни слоеве върху интерфейса вода/въздух. Още по времето когато Гортер и Грендел показват, че гръбнакът на мембраните представлява бислой от „липоидни” молекули [Gorter and Grendel, 1925], става ясно, че холестеролът не се смесва напълно с другите липиди. Използвайки същата техника (везна на Лангмюир), Лийтс открива, че филмите образувани от бинарни разтвори на яйчен лецитин и холестерол имат по-малка средна молекулна площ отколкото очакваната за идеална

смес. Така се ражда понятието за уплътняващия ефект на холестерола (англ. condensing effect of cholesterol), едно явление което по-късно многократно е засвидетелствано с различни експериментални методи както за монослойни, така и за бислойни моделни мембранни системи. Нещо повече, подобни ситуации се наблюдават изобщо в случаите когато има две въглеродородни структури, едната от които е сравнително твърда, а другата е по-раздвижена и гъвкава.

В 1986 година опитно е потвърдено очакваното разслоение на фазите в холестерол-фосфолипидни Лангмюирови филми [Subramaniam & McConnell, 1987], а по-късно е построена и първата фазова диаграма за бинарни смеси в бислой. Според авторите на модела за комплексите тя може да се тълкува не само в термини на фазова сепарация, но и като потвърждение за кооперативни взаимодействия водещи до агрегация на молекулите. Епифлуоресцентното наблюдение на бинарни смеси от липиди и стерол ясно показва присъствието на две несмесващи се течни фази – едната богата на липид, а другата на стерол. На Фиг11Б са дадени характерните картини възникващи при различни повърхностни налягания за монослой от DMPC и дихидрохолестерол (dihydrocholesterol, DChol) различаващ се от холестерола по двата водородни атома в синьо. Визуализацията става с помощта на флуоресцентната сонда TR-DHPE (Texas Red dihexanoyl-phosphatidylethanolamine) с ниска моларна концентрация (0.2 mole%). Тя се разпределя преимуществено в DMPC-фазата която изглежда светла, а другата фаза тъмна.



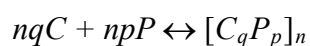
Фиг.11. Неразтворимост на течните фази в липидни монослое. (А) Епифлуоресцентна снимка на две различни течни фази в бинарна смес от DMPC (69.8 mol%) и DChol (30 mol%) при 23°C и повърхностно налягане 2 дупе/см; (Б) Същият монослой при налягане 9.4 дупе/см (близко до

критичната точка на смесване) демонстрира свръхструктурирана ивичеста фаза. С повишаване на налягането ивиците изтъняват и над критичното 9.5 дупе/см остава само една хомогенна течна фаза; (B) Фазова диаграма за бинарна смес от DPOPC и Dchol. Чертата в горната снимка съответства на 10μm; (Г) Фазова диаграма за псевдобинарна смес от яйчен сфингомиелин (SM), холестерол и Dchol; (Д) Теоретична диаграма за бинарна смес с две горни критични точки на смесване (●).

За тези смеси, фазови диаграми от типа налягане-състав се получават като се измерва налягането при което двете фази се появяват (изчезват) с нарастването (намаляването) му за различен състав на монослоя. Такава типична диаграма е дадена на Фиг.11В. Тя е симетрична и е подобна на добре известните диаграми за обемни течни смеси. В случая, с нея се описва поведението на стерол и дипалмитолеоилфосфатидилхолин (dipalmitoleoyl-PC, DPOPC) с две ненаситени вериги. Критичната точка на смесване отговаря на върха на кривата. Над тази точка съществува само една фаза и както се вижда от снимката флуоресценцията на сондата е хомогенна.

През 1999, групата на МакКонел открива малко по-необичайни фазови диаграми за стерол и определени липиди, които не са наблюдавани преди това нито за 2D, нито за 3D течни смеси [Radhakrishnan and McConnell, 1999ab]. Оказва се, че те съдържат не една, а две горни критични точки на смесване разположени рамо до рамо. Значимостта на тези диаграми се дължи на това, че подсказват някаква кооперативна реакция между стеролите и някои липиди, по-специално сфингомиелините или други фосфолипиди с наситени ацилни вериги. Така, Фиг.11Г илюстрира наличието на три течности – едната обогатена на фосфолипид, другата на стерол и третата с междинен състав (~28 mol% DChol). Според авторите, третата течност е изградена от кондензирани комплекси и е съществено различна от другите две, тъй като не се смесва с тях при ниско налягане. Във фазовата област означена с **α** съществуват съвместно фосфолипидно богата (светла) и богата на комплекси (тъмна) фаза, докато в двуфазната област **β** се срещат несмесващите се стеролно богата (тъмна) и комплексно богата (светла) фаза.

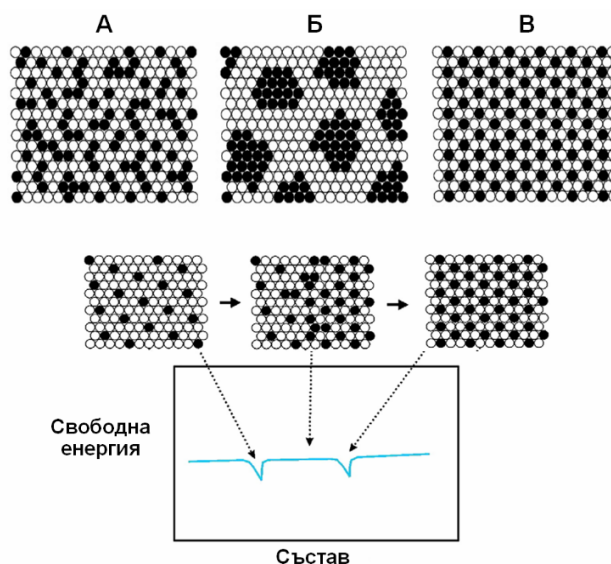
Разглежданите диаграми могат да бъдат теоретично изчислени с използването на термодинамичен модел в който стеролните (C) и фосфолипидните (P) молекули реагират обратимо (с равновесна константа K_0) като формират комплекс с дефинирана стехиометрия:



където коефициентите q и p са сравнително малки цели числа, а n е параметър на кооперативност. Фракцията на холестерола в комплекса ще бъде $q/(q + p)$ и се определя от състава на сместа в точката в която се срещат двете области α и β на фазовата диаграма (Фиг.11Г). В този случай стеролната фракция е ~ 28 mol%, но за други смеси лежи в диапазона 25 – 60 mol%, като по-високите стойности се отнасят за по-къси или ненаситени ацилни вериги поддаващи се трудно на плътно подреждане [Radhakrishnan and McConnell,1999b,2000].

В края на миналия век, един друг нашумял модел на холестеролната организация в мембраните е този на *свръхрешетките* (англ. Superlattices, SL). Той е познат още като *модел на равномерното разпределение* (англ. Regular distribution model). Идеята за правилно симетрично подреждане на молекулите в равнината на бислоя се заражда още през 80-те години вследствие на експерименти с пирен-маркирани липидни сонди (с пиренил ацилни вериги) [Somerharju et al.,1985]. Наблюдавайки характерни спадове в интензитета на флуоресценцията, Сомерхарджу и сътр. отбелязват, че тяхното местоположение (но не и големината) съответства на точно зададени концентрации на сондата. Понеже флуоресценцията на пирена се гаси в резултат на междумолекулните сблъсъци, това подсказва, че при тези критични концентрации маркираните липиди (по-точно пиренил ацилните им вериги) се стремят да заемат позиции във възлите на латерално подредена решетка, чиито вид (в случая хексагонална) може да бъде предсказан от прости геометрични съображения. Така се стига до извода, че мембранните липиди притежават тенденцията да възприемат по-скоро регулярно подредено, отколкото хаотично разпределение в плоскостта на мембраната, което е изходната предпоставка на SL моделите [Somerharju et al.,1999].

По принцип, съставките на една мултикомпонентна мембрана могат да бъдат организирани латерално по три начина (Фиг.12, горе): 1) случайно разпръснати, 2) сегрегирани в области с определен състав, 3) симетрично подредени. В последния случай, от самата основополагаща идея на SL модела по необходимост следва, че е възможен само ограничен набор от концентрации за всеки компонент.



Фиг.12. Горе: Алтернативно латерално разпределение на липидите в мембраната: (A) случайно подредени (флуидо-мозаичен модел на Сингър-Никълсън); (Б) обособени в домени; (B) подредени правилно в решетка (SL модел). Долу: [Somerharju et al.,2009].

Счита се, че свръхрешетките се формират защото представляват най-благоприятното опаковане на мембранните компоненти, т.е. с минимум на свободната енергия (Фиг.12, долу). Една и съща SL не покрива напълно мембраната по всяко време, а е в динамично равновесие с области от други SL и с области от случайно разпределени компоненти. Площта заемана от дадена SL зависи от липидния състав, големината на минимума в свободната енергия и преобладаващата температура. Това означава, че трябва да съществуват граници между отделните области, което е от значение за регулацията на мембранното липидно съдържание. Като следствие от свиваемостта на липидите, свръхрешетките са по-скоро „меки“, а не застинали твърди образувания. Тяхната динамична природа позволява обяснение на значителната латерална дифузия на мембранните компоненти, а също и на конформационните изменения на интегралните белтъци, в рамките на SL модела.

Възможните SL могат да бъдат конструирани с използването на ротационна и транслационна симетрия, като съответният им състав се определя от прости формули. Например, за бинарни хексагонални SL критичните моларни фракции X_g на липидите образувачи SL (guest) се дават с уравнението:

$$X_g = h/(P + h - g)$$

където P е размерът на единичната клетка, g е броят на молекулите (guest) от SL, а h е броят на останалите (host) липиди от приемащата матрица. Ако една g молекула е разположена в началото на хексагонална SL система и (a, b) са координатите на най-близката съседна g молекула, то $P = a^2 + ab + b^2$ [Somerharju et al.,2009]. Този

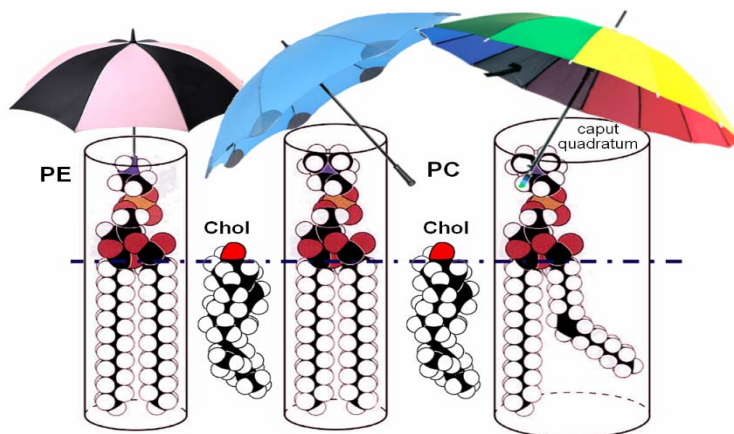
принцип може да бъде разширен за смес от три вида липиди и тогава най-удачната единична клетка се състои от 9 елемента, а критичните моларни фракции са пропорционални на 0.111. Тъй като естествените мембрани съдържат огромен брой различни компоненти, налага се да се правят опростяващи предположения. Като най-целесъобразно в тази насока е подобните (в смисъл на молекулна форма или заряд) липиди да се считат за еквивалентни.

Очевидно, в изграждането на SL са въввлечени многобройни фактори. Най-често се дискутират следните няколко: 1) електростатично отблъскване, 2) комплементарност на молекулните форми и стерични ограничения, 3) диполни взаимодействия и 4) хидрофобния ефект.

Много мембранни елементи имат значителен диполен момент, който предизвиква отблъскване на едноименните молекули. Взаимодействията на тази база обаче, е трудно да бъдат правилно оценени поради наличието на множество други диполи с неизвестна ориентация и големина и заради неясната диелектрична проницаемост на средата около тях. Известно е, че максималната разтворимост на холестерола в PC бислоеве достига 67 моларни % и над тази граница полярните PC глави не са в състояние да го предпазят от контакта му с водата и излишния холестерол преципитира под формата на кристали от монохидрат [Huang et al.,1999]. За съжаление, приносят на този хидрофобен ефект към формирането на SL при ниски концентрации не е добре изяснен, въпреки предложените в последно време модели [Chaudhuri and Chattopadhyay,2011].

В края на 90-те години Хуанг и сътр., с помощта на рентгенова дифракция и усъвършенствана процедура за получаване на образците, установяват границите на разтворимост на холестерола в двата основни типа фосфолипиди – 67 моларни % за PC и 51 моларни % за PE. За разлика от силния ефект на размерите на главите, вариациите в ацилните вериги нямат особено влияние върху така получените стойности [Huang et al.,1999]. За обяснение на тези резултати Хуанг и Фейгенсон прибягват до SL модела, като използват Монте Карло (MC) симулации на междумолекулните сили в бислоя. Според тях хамилтониан базиращ се на двучастично взаимодействие между най-близките съседи се оказва неподходящ за описание на всичките дискретни стойности на холестеролните моларни части X_c в които решетките са стабилни. Въвеждането на многочастични взаимодействия позволява стръмни изменения в химичния потенциал на холестерола в зависимост от концентрацията, което води до изкристализирането му извън бислоя. Това явление е

силно изразено при $X_c = 0.50, 0.57$ и 0.67 , съответстващи на холестерол/фосфолипид моларни отношения $1/1, 4/3$ и $2/1$. В тези точки мембраните се отличават с високо подредено липидно разпределение (т.е. SL), минимизиращо преките контакти между холестеролните молекули. Същевременно авторите подчертават, че при такива високи концентрации, неблагоприятната свободна енергия на холестерола, а не някакви специални връзки, доминира неговото поведение. Тя се сочи като главната причина за драстичните структурни и термодинамични промени съпътстващи прословутия кондензиращ ефект на холестерола и се отхвърля възможността за съществуването на комплекси. В хода на тези разсъждения Хуанг и Фейгенсон лансират идеята за ролята на хидрофобния ефект чрез качествения *модел на чадърите* (Фиг.13).



Фиг.13. Модел на чадърите които пазят холестерола „сух“. Големоглавите фосфатидилхолини (PC) и сфингомиелини (SM) екранират по-ефективно холестерола от контакт с водата, отколкото фосфатидилетаноламините (PE). Липидите са представени с модел „ядра и връзки“ – въглеродните атоми са в сиво, водородните в бяло, кислородните в червено, азотните в синьо, а фосфорът е в циклама. При вандерваалсовия модел на холестерола въглеродните атоми са в черно.

Хуанг и Фейгенсон първоначално въвеждат „модела на чадърите“ за да отговорят на въпроса за границите на разтворимост на холестерола в PC и PE. Впоследствие се разбра, че той също така илюстрира физичния произход на силите между холестерола и липидите. Едно равномерно разпределение на обемистите стероли в региона на ацилните вериги позволява максимално разтоварване на структурното напрежение породено от несъответствието в ефективното сечение на главите и опашките [Sommerharju et al., 1999]. Според този модел, хидрофобният ефект

е онази движеща сила която диктува поведението на разтворимост. При високи концентрации тя доминира над всички останали взаимодействия.

Холестеролът е доволно неполярна молекула – единствената хидроксилна група дава <5% от масата му и ~1/4 от повърхността която е изложена на водно-липидния интерфейс [Privalov and Gill,1988]. Ето защо, в бислойната липидна среда холестеролът трябва да бъде „покрит” от съседните полярни глави за да се избегне нежелателното му съприкосновение с водата. Фосфолипидните глави действат като „чадъри”, а пространството под тях е заето от стеролите и ацилните вериги (Фиг.13). С нарастване на холестеролното съдържание, главите се преориентират и „чадърите” се разпъват за да осигурят по-голяма покривна площ. В същото време, ацилните вериги и стеролните молекули се подреждат по-плътено (condensing effect). За дадена стеролна молекула, добавянето на всеки нов холестерол става за сметка на загубата на контакт с ацилна верига, принадлежаща на някакъв „чадър”, което е съпроводено с рязко нарастване на свободната енергия. Продължавайки в тази насока, „чадърите” се разтягат до своите пределни възможности и оттам нататък повече не могат да укриват стеролите от водата. Излишните холестеролни молекули напускат билоя като образуват кристална фаза от монохидрат.

Най – ниското ниво на организация на живите системи, клетката онази най – малка частица, която носи по-голямата част от основните свойства на живата материя. Именно те я правят различна от неживата. Затова клетката се нарича още „най-малката единица на живота“. Един от най-важните атрибути, които определят клетките като фундаментални градивни единици на живите организми са биологичните мембрани с огромното им морфологично разнообразие. Както казахме, единството на автономност спрямо заобикалящата среда и едновременно с това на тясна връзка с нея, е необходимо условие, както за съществуването на клетката, така и на живота изобщо. А това се постига именно поради нормалното функциониране на биологичните мембрани, играещи ролята на сложен интерфейс между живото и неживото. Те определят инфраструктурата и цялостния облик на клетката, задават онези характерни белези, които ѝ отреждат мястото на квант на биологичната форма на материята [15].

Биологичните мембрани или биомембрани са пропускливата бариера на всички живи същества. Включени са в почти всички биологични процеси. Мембраните не са с произволна форма и не са хаотично разпръснати. Дебелина им е не повече от (<100 Å), представляват двумерни пространствени формирания [3].

Вътреклетъчните мембрани позволяват компартментализацията на биомолекулите и биологичните процеси с различни части на клетката. Състоят се от липиди, белтъци, (в това число гликолипиди и гликопротеини), съотношението им варира от 20 до 80 %. Пропорцията на двата основни компонента отразява особеностите в предназначението на даден вид мембрани .

Биохимичните и клетъчно биологичните експерименти определят холестерола като играещ важна роля компонент на липидните „салове“ и свързаните с тях структури. Проучванията използващи холестерол, като моделни системи, ни осигуряват важни прозрения, че холестеролът е от значение при определянето на поведението на липидния „сал“. Разгледани са два аспекта на взаимодействията на липид – холестерол, които в последно време са интересни за разбирането, образуване и определяне на свойствата на липидните „салове“. На първо място холестеролът взаимодейства с различни мембранни липиди, асоциира се силно с наситени, високотопящи се фосфо- и сфинголипиди и особено слабо с високо ненаситени липидни видове. Текущият напредък при възстановяването и наблюдението на сегрегирани салове (подредени в течно състояние) домени в моделни мембрани, имитиращи липидни състави на естествени мембрани, включващи салови домени.

И в двата случая погледът е върху последните събития и нерешени въпроси в тези области. Съществуват предизвикателства, които усложняват изследването на стерол/липидните взаимодействия. Взаимодействията на липидите и стеролите в липидния бислои са изследвани широко в продължение на повече от 40 години, като се използват различни спектроскопични и термодинамични методи [16]. Различни методи са използвани за да се проучат физическите последици от включването на холестерола в липидните бислоеве. Ранни посочвания, че холестеролът взаимодейства различно с различни видове липиди са представени от калориметрични експерименти.

Холестеролът силно разширява термотропните преходи на гел – течна – кристална фаза на различни фосфо – и сфинголипиди [30][31]. Внимателния анализ разкрива количествени и дори качествени разлики в ефектите на холестерола върху фазовите преходи на фосфолипидите различаващи се с тяхната ацилна верига и структурата на главата [32]. Обсъждат се два типа изследвания на холестерол – липидните взаимодействия, чиито открития са важни за разбирането произхода, организацията на липидните салове. Разглеждат се резултатите от термодинамичните и спектроскопски изследвания, които подкрепят дългогодишните предложения, че

холестеролът взаимодейства диференциално с различни видове липиди и сред естеството срещащи се липиди показва афинитет към сфинголипидите. Тези открития са важни не само за тяхното потенциално значение за образуване на липидни салове, но и за други физиологични контексти, като например в разбиране енергията на липидното сортиране и транспортиране между различни клетъчни мембрани.

Транспорта на лекарства или системи за доставяне на лекарства през клетъчната мембрана е сложен процес, който често трудно се разбира поради динамичния му характер. В тази връзка, моделните липидни мембрани, имитиращи много аспекти на клетъчно – мембранните липиди, са били много полезни в подпомагането на изследователите да разпознават ролите на липидите в клетъчните взаимодействия. Може да се използва лекарствено – липидни взаимодействия, за да се предскаже фармакокинетичните свойства и техния транспорт, биоразпределение, натрупване и следователно ефикасност. Тези взаимодействия може да се използват и за изследване механизмите на транспортиране/транспорт, базирани на структурата и хидрофилност / хидрофобност на лекарствени молекули. През последните години се правят изследвания на моделните липидни мембрани, за да се разбере механизма на взаимодействие с пептиди, полимери и наноносители /nanocarriers/. Тези проучвания могат да се използват за проектиране и разработване на ефикасни системи за доставка на лекарства. Промените в липидния състав на клетките и тъканите при определени болестни състояния могат да променят биофизичните взаимодействия, които могат да бъдат изследвани за разработване на целеви специфични лекарства и системи за доставяне на лекарства. В този преглед се обсъждат различните моделни мембрани, взаимодействия лекарство-липид и тяхната значимост, изследвания на взаимодействията на моделни мембрани с наноносители и как изследванията на биофизичните взаимодействия с мембраните на липидния модел могат да играят важна роля в откриването на лекарство и доставянето на лекарства. Биологичните мембрани съдържат липидни бислоеве като основна структурна единица. Такива бислоеве формират границата между вътреклетъчната цитоплазма и външната среда на клетката, както и между вътрешността на много от органелите на клетката и тяхната цитоплазма.

Мембранните липиди могат да бъдат разделяни на три групи въз основа на тяхната химическа структура: липиди на базата на глицерин (фосфолипиди), сфинголипиди, включват аминокиселини - алкохол сфингозин, както и остатък от мастни

киселини, придават по-голяма хидрофобност на ядрото на липидния бислой и холестерол. Фосфолипидите се делят на различни групи на базата на техните хидрофилни главни групи : фосфатидилхолин (PC), фосфатидилетаноламин (PE) и фосфатидилсерин са преобладаващите липиди в клетъчната мембрана, докато фосфатидилинозитолът и кардиолипинът присъстват в по-малки количества. Холестеролът има хидрофилна, хидроксилна група взаимодействаща с хидрофилните главни групи на фосфолипидите, а групите с по-голям обем взаимодействат с хидрофобните ацилни вериги на липидите. Тези взаимодействия влияят върху течливостта и опаковането на липидната мембрана. Известно, е че мембранните съставки не винаги са хомогенно разположени в бислойната мембрана на биологичните клетки, а по-скоро са организирани в комплексни странични микродомени. Тази полиморфна природа на липидно подреждане, в допълнение към значителното разнообразие от липиди със значително различни физични свойства (т.е. площ на напречното сечение, течливост, електрически заряд, молекулно тегло), е причината, поради която липидните мембрани са изключително сложни структури. Освен това ковалентната асоциация на протеини и въглехидрати допринася за сложността на структурата на тази мембрана. Тази сложност на структурата на клетъчната мембрана, заедно със силно динамичната природа на липидните и липид-протеинови взаимодействия в клетъчната мембрана, правят биофизичните взаимодействия с лекарства и системи за доставяне на лекарства много трудни за изследване. Ето защо са разработени опростени изкуствени мембранни системи, които имитират естествената бислойна липидна мембрана.

За първи път Мюлер с група сътрудници получават през 1962 год. изкуствена бислойна фосфолипидна мембрана. Главата на фосфолипидната молекула притежава силно изразен диполен момент, това е основната причина за нейното притегляне към диполните молекули на водата. Опашката на фосфолипида има различно поведение и поради тези “вътрешномолекулни” противоречия амфифилната молекула във всяка среда ще се чувства “неуютно”. Решението на този не малък проблем е да се разположи на границата между двете фази, по такъв начин, че всяка фаза да бъде благоприятно разположена. Основно правило за мембраната на клетката е, че тя е заобиколена от вода, затова амфифилните молекули се „покриват“ във вътрешната фаза на структурата, а хидрофилните глави са „обърнати“ към водното обкръжение. Това амфифилно поведение на фосфолипидните молекули е следствие за самосъбирането на биологичната мембрана.

Разглеждали са как изследванията на биофизичните взаимодействия с липидните мембранни системи разясняват ролята на липидите в клетъчното поемане на различни лекарства и системи за доставяне на лекарства. Такива взаимодействия са изследвани през последните години, за да се предскаже токсичността свързана с лекарства и системи с наночастици. Обсъждани са и разликите в състава на липидите между болните и нормалните клетъчни мембрани и как тази разлика може да повлияе на биофизичните взаимодействия на системите за доставяне на лекарства и лекарства с клетъчната мембрана. Промените в структурата, морфологията и повърхностната химия на поддържани двуслойни липиди / supported lipid bilayers (SLBs) след взаимодействие с лекарства или системи за доставяне на лекарства могат да бъдат изследвани с помощта на различни техники, като X-ray разсейване, сканиращ електронен микроскоп, AFM/АСМ (атомно силов микроскоп), трансмисионен електронен микроскоп, Фурие инфрачервен резонанс (ФИР), (FTIR) и X-ray фотоелектрон спектроскопия. Изследванията на биофизичните взаимодействия с моделната мембрана могат да осигурят прост, но все пак ефективен подход към разбирането на ролята на мембранните липиди при транспортирането на лекарства и системи за доставяне на лекарства през биологичните бариери. С по-доброто разбиране на механизмите на взаимодействия, изследванията на биофизичните взаимодействия с моделни мембрани биха могли да осигурят рационален подход за откриване и развитие на лекарства, както и за разработване на ефективни системи за доставяне на лекарства. Авторите проучват поддържани липидни бислоеве / поддържани двуслойни липиди / supported lipid bilayers (SLBs), липиден монослой, лизозоми и взаимодействията на моделни липидни мембрани с лекарства и системи за доставяне на лекарства и са разгледани различни техники за изследване [33].

Въпреки, че повечето лекарства се свързват с протеините и регулират тяхната активност, някои лекарства действат чрез нов терапевтичен подход, наречен мембранно-липидна терапия и се свързват с липиди, като по този начин се модулира структурата на мембраните.

1.2. Влияние на еруфозина върху мембранните структури

Алкилфосфолипидите/Alkylphospholipids (APLs) представляват нов клас лекарства, които не взаимодействат директно с ДНК, но действат върху клетъчната мембрана, където се натрупват и взаимодействат с липидния метаболизъм и сигналните пътища. Този преглед обобщава теорията за действието на това вещество

на тези съединения. В този смисъл е предложено разнообразие от механизми, което обяснява действията на клинично значимите алкилфосфолипиди, по-специално при лечението на рак. Едно от откритията е, че алкилфосфолипидите / *alkylphospholipids* (APLs) намаляват биосинтезата на фосфатидилхолин (PC) чрез инхибиране на скоростно-ограничаващ ензим СТР : фосфохолин цитидилтрансфераза (CT). APLs също променят вътреклетъчния холестерол и метаболизмът на човешките туморни клетъчни линии, което води до натрупване на холестерол вътре в клетката. Увеличаването на биосинтезата на холестерола, свързано с намаляването на синтеза на холин - съдържащи фосфолипиди и холестеролна естерификация води до промяна в съотношението свободен холестерол: PC в клетките, изложени на алкилфосфолипидите / *alkylphospholipids* (APLs). Активният фосфорилиращ статус след алкилфосфолипидите / *alkylphospholipids* APLs експозиция показва, че този критичен регулатор за оцеляване на клетките е модулиран чрез промени в холестеролните нива, индуцирани в плазмената мембрана чрез тези липидни аналози [34].

Синтетичните алкилфосфолипиди (APL) са нови противоракови лекарства с антитипролиферативни свойства, които са химически разделени на два основни класа: алкил-лизофосфолипиди и алкилфосфохолини. Групата от антитуморни липиди включва също гликозилираните антитуморни етерни липиди и гликозидираните фосфолипиди, като двете се отличават с присъствието на захарна група. Молекулните механизми на противоракова активност на тези съединения са описани и са разгледани в работата на множество автори през последните години [35][36][37][38][39][40][41]. Предложено е тези химиотерапевтични средства да взаимодействат с липидната хомеостаза, поради сходството им с ендогенни фосфолипиди, насочени към мембранни липидни рафтове и променящи се липидно сигнализиране, което води до апоптоза. Този преглед актуализира основните изследвани APL приложения досега и текущата оценка на предложените механизми за действие, за да се обясни техният широк спектър от фармакологични ефекти. Уникалният начин на действие на APL върху клетъчните мембрани дава на тези липидни аналози предимство пред конвенционалните ДНК-взаимодействащи химиотерапевтични средства. Действието на липидните аналози изглежда е специфично за туморните клетки и както клетъчното поемане, така и APL-индуцираната апоптоза се увеличават в злокачественото състояние на клетките [41],

което в момента се изследва в комбинирана терапия за преодоляване или предотвратяване на механизми на резистентност при лечение на рак.

Освен това, тези нови APLs показват антитуморна активност в мозъчно туморни клетъчни линии и показват способността да преминават през кръвно-мозъчната бариера, така че те са нова терапевтична възможност за мозъчни тумори [45][46]. Многобройни клетъчни и предклинични изследвания са проведени с тези агенти, например в човешки карцином на пикочния мехур, карцином на гърдата, глиобластома, множествена миелома и клетки на остра или хронична лимфоцитна / миелоидна левкемия, демонстриращи цитотоксични ефекти и индуциране на апоптоза [44][45][46][47][48][49][50][51]. Следователно, противораковият терапевтичен потенциал на тези APLs изисква по-нататъшна оценка при клинични изпитвания фаза I [43][52][53].

Алкилфосфохолините (APC) са нов клас антинеопластични средства. APC са структурно свързани с алкилсифосфолипиди (енелфозин и илмофозин) с изключение на глицероловия скелет, което се счита за ненужно за цитотоксичната активност [75][76]. За разлика от класическите химиотерапевтици, APCs се насочват към клетъчната мембрана вместо към ДНК. При клинично значими дози те пречат на обогатяването на фосфолипидите; следователно с клетъчна сигнализация и пътища за оцеляване [77]. Такива отличителни характеристики могат да улеснят тяхната терапевтична ефикасност и да ги превърнат в потенциални кандидати за комбинирани__терапии [78]. Прототипът на APC, хексадецилфосфохолин (милтефозин), не отговаря на очакванията поради ниски честоти на реакция и висока гастроинтестинална токсичност. Днес употребата на милтефозин се ограничава до локално лечение на метастази на кожата и лечение с перорална лейшманиаза [77].

APCs показаха, че инхибират миграцията на човешки ретинални пигментни епителни клетки / retinal pigment epithelial (RPE) с > 90% по зависим от концентрацията начин. Инхибирането на миграцията корелира с дължината на въглеродната верига на APC. За APCs с повече от 20 въглеродни атома (> C20) стойността на IC₅₀ на RPE клетъчна миграция варира между 0.1 и 1 μM, но се увеличава до 10 μM за дължина на веригата 18C [115]. Анализът за лекуване на рани показва, че IC₅₀ на еруфозин (22C) варира от 1.56 до 3.1 μM в двете клетъчни линии. Задържащите ефекти на антинеопластичните лекарства при заздравяване на рани са добре известни, но те променят тяхната ефикасност, за да инхибират синтезата на колаген. Единствено ДНК алкилиращият агент цисплатин силно и специфично инхибира синтезата на колаген в колоновите фибробласти [116]. Подобно, беше показано, че алкилиращото средство ET-743 редуцира нива на COL1A1 mRNA до

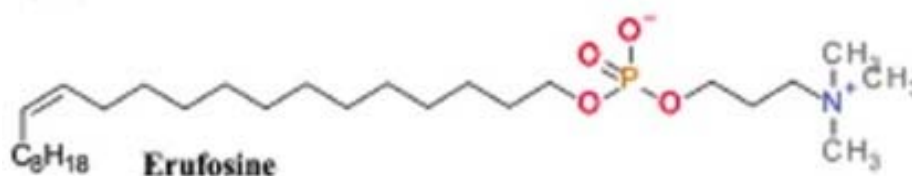
80% в склеродермалните фибробласти [117]. Изследвали са ефекта на еруфозин върху експресията на COL1A1 и COL1A2 (два гена, кодиращи веригата на тип I проколаген, съотв, COL1A1 – за $\alpha 1$ – веригата и COL1A2 – за $\alpha 2$ - веригата) в клетките CC531. Резултатите им показват, че еруфозин намалява интензитета на COL1A2 до неоткриваемо ниво, но няма никакво влияние върху експресията на COL1A1.

Чрез структурни модификации на APC, много от тези висящи пречки биха могли да бъдат преодоляни. Най-новите APC, еруцилфосфохолин (ErPC) и неговият хомолог erufosine (еруцилфосфо-N, N, N-триметилпропаноламин еруфозин (ErPC3)) са доста обещаващи с добри фармакокинетични и фармакодинамични свойства. Те имат значителна цитотоксична ефикасност и причиняват по-малка стомашно-чревна токсичност. Те притежават способността да преминават кръвно-мозъчната бариера и да се натрупват в мозъчната тъкан, което показва техния потенциал за лечение на мозъчни тумори [79]. Благодарение на тяхната структура с 22-въглеродна верига и ω -9 цис-двойна връзка, те имат намалени миелотоксични и хемолитични ефекти [80][81][82] и поради последното свойство агентите са също първите интравенозно приложими APCs.

In vitro антипролиферативният ефект на еруфозин е демонстриран в различни клетъчни линии от човешки произход, като хронична миелоидна левкемия/chronic myeloid leukemia (CML, самостоятелно и когато се комбинира с иматиниб) [83], остра миелоидна левкемия / acute myeloid leukemia (AML) [84,85], хронична лимфоцитна левкемия/chronic lymphocytic leukemia (CLL) [86], множествена миелома / multiple myeloma (MM) [80][81][82][83][84][85][86][87], карцином на пикочния мехур [88], карцином на гърдата [89] и рак на сквамозните клетки от устната кухина [90]. Карцином на пикочния мехур, AML и множествени миеломни клетъчни линии са по-чувствителни към еруфозин in vitro и стойностите на IC₅₀ варират между 4 и 14 μ M [85][87][88]. Въпреки това, по-високи стойности на инхибиращата концентрация / inhibitory concentration IC₅₀ (22-41 μ M) бяха открити в клетъчни линии CLL, гърда и перорална плоскоклетъчна карцинома [86][89][90]. Еруфозинът също така намалява образуването на колонии в човешки MM, клетки на гърдата и панкреаса [82] и инхибира миграцията в човешки MM клетки [80].

Първоначални усилия са направени за синтезиране на метаболитно стабилни аналози на лизофосфатидилхолина, които действат като имуномодулатори с потенциална антинеопластична активност. Досега, съединения като еделфозин,

илмофозин, милтефозин и перифозин са тествани за тяхната селективна антитуморна активност във фаза I и II клинични изпитания при някои видове напреднали ракови заболявания. Етерният липид еделфозин (1-О-октадецил-2-О-метилглицеро-3-фосфохолин) се счита за прототип на алкил-лизофосфолипид, докато милтефозин (хексадецилфосфохолин, HePC) е прототип на алкилфосфохолини. Илмофозин (1-хексадецилтио-2-метоксиметил-рак-глицеро-3-фосфохолин) е тиоетерен вариант на еделфозин, и по-кандидат за лекарство на перифозин [octadecyl- (1,1-диметил-piperidinio-4-ил) фосфат] на cholinemoiety на алкилфосфохолините е заместен с хетероциклична група пиперидин. Наблюдавани са убедителни резултати с всички тези съединения и новите перспективни аналози като еруцилфосфохолин (ErPC) и неговият хохолинов аналогов ерофузин (ErPC3) (Фигура 5).



Фиг. 14 Химична структура на синтетични алкилфосфолипиди. Структурите са взети от Nitulescu et al. [140].

Разработените нови две молекули, едната - еруфозин, като следващо поколение алкилфосфохолини за системна терапия за лечение на рак, имащи общо дълго верига 22 въглеродни атома с ω-9 цис-двойна връзка. Тази химична модификация доведе до понижена хемолитична активност и миелотоксичност, както е тествано *in vitro* и в предклинични анализи, като по този начин позволява интравенозно приложение при по-високи дози, които не са възможни при предишни APLs [42–44].

Еруфозин (еруцилфосфо-N, N, N, -триметилпропиламоний, ErPC3) е антитуморен липид, който принадлежи към групата на синтетичните алкилфосфолини (APCs). За разлика от класическите противотуморни средства, APCs се насочват към клетъчната мембрана вместо към ДНК. Еруфозин има полярна глава и ненаситена въглеводородна верига, която се намира в домените на пластовете на мембраната, променяйки тяхната течливост и функции [61]. Това е първото инжектирано средство, което губи своите хемолитични свойства и показва повишени терапевтични характеристики *in vivo*. За разлика от другите антитуморни липиди, еруфозин преминава през кръвно-мозъчната бариера и може да се натрупва в мозъка [62]. ErPC3 засяга различни пътища на сигнална трансдукция, като се започне от

клетъчната мембрана. Ето защо, ERPC3 модулира туморната пролиферация и миграция. Той има високи нива на цитотоксичност, които влияят върху различни типове тумори: стомашно-чревни, цервикални, мозъчни, гърди и т.н. Агентът има благоприятни стойности на IC50 (полу-максималната инхибиторна концентрация) за различни туморни клетъчни линии. Тъй като туморът става по-злокачествен, увеличава се антитуморният ефект на еруфозин, IC50 намалява съответно. Потискащият ефект върху високите метастатични ракови клетки се комбинира със стимулиращ ефект върху хематопоезата [63]. Забелязано е, че еруфозинът проявява антитуморна активност в широкообхватни ракови клетъчни линии като MDA-MB 435 и MDA-MB 231 по време на предклиничните проучвания [64]. Потискането на туморната пролиферация и миграция се дължи на разрушаването на контактите с фокална адхезия, съдържащи $\beta 1$ интегрини и последващото инхибиране на протеин киназа В (PKB) [65][66]. В допълнение, беше установено, че антипролиферативният ефект на еруфозин се дължи на инхибиране на PI3K / Akt / mTOR трансдукционен път [66], който впоследствие води до задържане във фаза G2 / M на клетъчния цикъл [67]. Поради блокирането на клетъчния цикъл се получава образуване на гигантски клетки, които след това се подлагат на апоптоза [68].

Алкилфосфохолините представляват нов клас цитостатични лекарства с нов начин на действие. Еруфозин (ErPC3), първото съединение от този клас, което може да бъде приложено интравенозно, наскоро се оказва, че е активно срещу човешки туморни клетъчни линии. Алкилфосфохолините представляват нов клас липофилни лекарства, които взаимодействат с клетъчната мембрана [54][55][56], така наречените "мембранни активни липиди". Те също така модулират пътищата за вътреклетъчна сигнална трансдукция [57].

Ракът на гърдата и колоректалния карцином са силно злокачествени заболявания с ниска 5-годишна преживяемост (<21%) на напредналите етапи, което подчертава необходимостта от намиране на нови терапевтични възможности. Имайки предвид това, [Asim Pervaiz][58] изследват противораковия потенциал на еруфозин, мембрана, насочена към синтетичен липиден аналог, принадлежащ към клас антинеопластични агенти, известни като алкилфосфохолини (APC). Свойства като интравенозно приложение и значително намалена хемолитична активност в сравнение с предишни APC поколения и ефективни цитотоксични ефекти срещу злокачествени клетки го правят привлекателно противораково съединение [58].

Авторите [57][59][60] казват, че еруфозинът/ erufosine (ErPC3) упражнява висока анти – левкемична активност в остра миелоидна левкемия / acute myeloid leukemia (AML) клетъчна линия. Като се изключи опита измерване в ex vivo на лекарството в AML [59][60], концентрацията на експозицията, както и времето на експозиция са (почти) еднакво важни за това лекарство [57].

Направено е проучване на противораковата активност на еруфозина върху клетъчна линия MDA-MB 231 по отношение на цитотоксичността, индуциране на апоптоза и инхибиране на клетъчната миграция. Антипролиферативният ефект се определя чрез МТТ тест. Индуцираната клетъчна смърт се открива чрез оцветяване на жива клетка на акридин оранжево / етидиев бромид (АО / EtBr). Ефектът върху клетъчната миграция се оценява чрез изследване за излекуване на рани. Показано е, че IC50 доза за лечение с ErPC3 на MDA-MB231 клетки е получена-20 µM, 13 µM и 8 µM за 24, 48 и 72 часа, съответно. Данните сочат, че лечението с еруфозин предизвиква инхибиране на клетъчната пролиферация, увеличаване на ранните и късните стадии на апоптотични клетки и полиплоидните клетки, които са знак за митотична катастрофа. Продължителното лечение с еруфозин прави клетките по-чувствителни и апоптозата е видима при по-ниска концентрация на лекарството. В същото време антитуморният агент предизвиква по-бавно затваряне на "раната" в сравнение с нетретирани контролни клетки. Взети заедно, резултатите показват, че еруфозинът има дозо- и време-зависими инхибиторни ефекти върху клетъчната смърт и миграцията и може да бъде ефективен като противотуморен агент срещу рак на гърдата.

Алкилфосфохиолинът, еруцилфосфо-N, N, N - триметилпропаноламин (еруфозин) демонстрират противоракови ефекти в различни клетъчни линии, включително левкемия, множествена миелома, пикочен мехур, рак на гърдата и перорални сквамозноклетъчни карциномни клетки. Авторите целят с настоящото изследване да изследват неговите антипролиферативни, антимиогенни и про-апоптотични ефекти в клетъчните линии за колоректален рак, SW480 и CC531.

Колоректален рак / Рак на дебелото черво е сред водещите 25 причини за глобална смъртност [69][70]. Стандартните възрастови проценти за честотата на рак на дебелото черво и смъртността са на четвърто място, както се съобщава от проекта на Световната здравна организация „Globocan“.

В момента използваните антинеопластични лекарства срещу рак на дебелото черво, включват антиметаболити [71][72], алкилиращи агенти [73] и камптотецинови

аналози [74]. Антиметаболитите, 5-флуороурацил (5-FU) и капецитабин се използват в различни комбинирани режими.

Еруфозина индуцира апоптозата при CLL [86], AML [84][85], остра лимфоцитна левкемия / acute lymphocytic leukemia (ALL) [91], човешка глиобластома [91][92][93], простатна [94] и ортопедична карциномна [90], Неговият цитотоксичен ефект е значително понижен от инхибиторите на каспазата [94][95][96]. По тази причина част от нейната антинеопластична активност е свързана с апоптоза [95]. Активирането на експресията на прокаспаза-3 и разцепването на неговата субстрат поли (ADP-рибоза) полимераза (PARP) са добре документирани зависими от времето и концентрацията ефекти на еруфозин [84][85][86][91][92][93][94]. Еруфозин-индуцираната апоптоза беше модулирана чрез JNK 1/2, Raf / MEK / ERK и PI3K / Akt / mTOR сигнални пътища [85][87][90][94].

Противотуморните ефекти на APCs върху клетъчни линии на колоректален рак са били докладвани по-рано от авторите [96][97]. Милтефозина е по-ефективен в клетъчната линия на аденокарцинома на дебелото черво, HT29 (IC₅₀, 3,1 μmol / l) в сравнение с клетъчните линии на карцином на млечната жлеза (IC₅₀, 29,4-69,9 μmol / l) [96]. Срещу тази колоректална клетъчна линия, милтефозин е по-ефективен в сравнение с други APC конгенери (вещества с подобни свойства) като октадеценил-(транс-9,10) -фосфохолин, октадеценил-(цис-9,10) -фосфохолин и октадецилфосфохолин (IC₅₀, 5,8, 17,8 и 4,4 μmol/, съответно) [97]. Антинеопластичният ефект на еруфозин в клетъчните линии на колоректален рак все още не е докладван. Следователно, целта на тяхното изследване е да изследват и сравнят антипролиферативните, антимигранторните и про-апоптотичните ефекти на еруфозин в колоректални клетъчни линии на човек (SW480) и плъх (CC531).

Това е един от първите доклади за активността на еруфозин в колоректални клетъчни линии, SW480 и CC531, съответно с човешки и животински произход. *In vitro* резултатите им показват концентрационни и време-зависими антипролиферативни ефекти и в двете клетъчни линии. След 72 часа, подобни инхибиторни ефекти на растежа се наблюдават при концентрация от 100 μM в двете клетъчни линии, но при по-ниски концентрации еруфозинът е значително по-ефективен в SW480 човешки клетки. Стойността на IC₅₀ намалява прогресивно с продължителни инкубационни времена в SW480 клетките, но такъв спад не се наблюдава при клетките на плъхове CC531. След 72 часа експозиция на еруфозин, IC₅₀ стойността за CC531 клетките е почти 4 пъти по-висока от тази на SW480

клетките. Авторите на тази статия показват антипролиферативен ефект на еруфозин в различни човешки клетъчни линии. В сравнение с други видове човешки ракови заболявания, еруфозинът проявява изразена антипролиферативна активност в SW480 клетки, подобни на карцинома на пикочния мехур и няколко (OPM- 2 и RPMI-8226) ММ клетъчни линии. Еруфозинът обаче не успява да покаже същата степен на ефикасност в клетките CC531 и неговата ефикасност в SW480 клетки е сравнима с перорален сквамозен карцином и хронична лимфоцитна левкемия / chronic lymphocytic leukemia (CLL) клетки. CC531 клетките също са показали, че са по-малко чувствителни към алкилиращия агент мелфалан, в сравнение с SW480 клетките [40]. Техните резултати демонстрират значителни разлики между преживяванията в двете клетъчни линии. Рамото има по-голяма величина и по-широка ширина в клетките CC531. Размерите на рамото и крайните наклони на кривите на преживяемост могат да бъдат променени от дозово - зависими механизми за възстановяване на ДНК и / или взаимозависимост от летални или мутационни отговори [101]. Клетките показват различен капацитет за натрупване и репарирание на сублетални увреждания.

Клетъчната преживяемост зависи от равновесието между механизмите за сигнализиране срещу анти-апоптоза [Ras-Raf-MAPK / ERK и фосфатидилинозитол 3'-киназа (PI3K) / Akt] и про-апоптотични (SAPK / JNK). Инхибирането на различните пътища за оцеляване е документирано при APCs. Съответно, про-апоптотичният ефект на еруфозин е демонстриран в различни клетъчни линии [84][85][86][87][90][91][92][93][94][95]. Еруфозин-индуцираната апоптоза корелира с хипофосфорилирането (активирането) на ретинобластомния (Rb) протеин, който инхибира Abl и JNK киназите, както и E2F транскрипционните фактори [95][108]. Митохондриалната смърт е друг механизъм при апоптозата, индуцирана от еруфозин [91][92][93][109]. Каспаза-3 също се предлага като един от основните детерминанти на еруфозин-индуцираната апоптоза [110]. Зависимостта от концентрацията на активираната каспаза-3 и разделянето на субстрата на : каспаза-3 PARP се откриват в клетки от рак на простатата (PC3 и LNCaP) в отговор от лечението с еруфозин (12.5-25 μ M) [94]. В друго проучване лечението с еруфозин (10 μ M) в продължение на 6-12 часа води до изчерпване на прокаспазите и индуцирано разделянето на PARP (92%) в ММ клетки (OPM-2) [87]. В прясно изолирани CLL клетки еруфозинът (1-100 μ M) разделя PARP напълно след 24 часа по зависим от концентрацията начин и инхибиторът на пан-каспаза напълно отменя апоптозата [86]. Еруфозинът в концентрации от 30 и 50 μ M повишава активността на каспаза-3 / -7 и разделя на

PARP по зависим от концентрацията начин в перорални сквамозни карциномни клетки [90]. Резултати им, показват подобрена активност на каспаза-3 / -7 в двете клетъчни линии. Индуцираната активност на каспаза-3 / -7 е зависима от концентрацията в SW480 клетки, но се наблюдава само при висока (100 μ M) концентрация в CC531 клетки. Допълнително, контролната активност на каспаза-3 / -7 е по-висока (2 пъти) в CC531, отколкото тази активност в SW480 клетките и тази разлика нараства значително (8 пъти) след експозицията на еруфозин (100 μ M). Въпреки това, еруфозинът (100 μ M, 72 часа) проявява същия антипролиферативен ефект в двете клетъчни линии. Активирането на каспазата не е задължително свързано с апоптозата в колоректалните ракови клетки [111]. Отвъд клетъчната смърт, каспазите участват в много функции като клетъчно образуване и диференциация. Според резултати им е малко вероятно апоптозата да бъде основният път за програмирана клетъчна смърт в CC531 клетки при тествани концентрации, подкрепени от характеристичната крива на приживяемост (широко рамо, висока амплитуда и стръмен наклон) и липса на апоптотични признаци по време на нарастването на рани [93].

В светлината на съвременните открития, еруфозин изглежда обещаващ химиотерапевтичен агент при колоректален рак. Авторите са наблюдавали значителни разлики в апоптотичния ефект между SW480 и CC531 клетъчни линии. Бъдещите изследвания трябва да включват различни клетъчни линии с различен произход, за да се изяснят механизмите им за оцеляване срещу еруфозин [118].

1.3. Методики за изследване на взаимодействието на липидни моделни системи с биологично важни молекули

Биохимичните и клетъчно-биологичните експерименти идентифицират холестерола като важен компонент на липидните "салове" и свързаните с тях структури в клетъчните мембрани на бозайници и нивата на мембрания холестерол, като ключов фактор за определяне на стабилността и организацията на плавателните съдове. Проучванията, използващи бислоеве съдържащи холестерол като моделни системи, осигуряват важни прозрения в ролите, които холестеролът играе при определянето на поведението на липидния сал. Този преглед обсъжда и скорошния напредък в разбирането на два аспекта на взаимодействията между липидите и холестерола, които са особено важни за разбирането на образуването и свойствата на липидните салове [167].

Първо, разглеждат доказателства, че холестеролът взаимодейства диференциално с различни мембранны липиди, асоциира се особено силно с наситени, високотопящи се фосфо- и сфинголипиди и особено слабо с високо ненаситени липидни видове [168][169][170]. Второ, те разглеждат скорошния напредък при възстановяването и директното наблюдение на сегрегирани тела (подредени в течно състояние) домейни в моделни мембрани, които имитират липидните състави на естествените мембрани, включващи салови домейни [171][172][173][174][175][176][177][178][179]. В тази статия авторите са разгледали два вида изследвания на холестерол – липидните взаимодействия, чиито констатация са от особено важно значение за разбирането на произхода и организацията на липидните салове [180]. Първоначално разглеждат резултатите от термодинамични и спектроскопски изследвания, които подкрепят дългогодишни предложения, че холестеролът взаимодейства диференциално с различни мембранны липиди и показва специфичен афинитет към сфинголипидите.

Тези открития са от биологичен интерес, не само за тяхното потенциално значение за образуване на липидни рафтове, но и в други физиологични контексти.

Взаимодействията на липидите и стеролите в липидните двойни слоеве са изследвания широко, използвайки различни спектроскопски и термодинамични методи, в продължение на повече от 40 години, въпреки тези интензивни усилия, остават фундаментални пропуски в разбирането ни за естеството и последиците от взаимодействията между холестерола и липидите. Тази ситуация отчасти отразява

някои отличителни черти на холестерол – липидните системи, които усложняват анализа им.

До този момент са разгледани различни изследвания на холестерол – фосфолипидните отношения в естествените и моделни мембрани. Използвани са различни техники за оценка локализацията на холестерол в бислоя, включително рентгенова и неутронна дифракция, импедансен анализ, диференциална сканираща калориметрия и флуоресценция

Все повече доказателства сочат, че физикохимичните свойства на клетъчните мембрани са тясно свързани с техните биологични функции. Съставът на мембраната, дебелината, флуидността, фазовите преходи, полиморфизмът и кривините са замесени в много мембранни биологични функции [143][144][145]. Тези функции обхващат широка гама, включително разпознаване, транспорт и сигнализация на клетъчни повърхности [146][147][148][149], както и междуклетъчни адхезии, синтез и синтактични процеси [150][151][152]. Количествено разбиране на тези отношения едва започва да се появява. Две критични изисквания за систематично разработване на подробно разбиране на тези структурно-функционални връзки включват наличието на 1) молекулно пригодени и структурно характеризирани моделни мембрани и 2) допълнителен набор от количествени методи за тяхното физикохимично охарактеризиране.

В тази връзка, поддържаните липидни бислоини мембрани се оказват доста полезни [153]. Образуват се обикновено на интерфейса твърдо-течно състояние, когато везикуларните микрофази на липидите и техните смеси се разкъсват и се разпространяват спонтанно върху хидрофилните повърхности [154]. Два последователни трансфера на липидни монослоеове от интерфейса въздух-вода върху равнинни повърхности в схемите Langmuir-Blodgett също се оказват много полезни [155][156]. Когато се оформят по подходящ начин, те по същество се отделят от повърхността на подложката през хидратиращ слой от $\sim 4-15 \text{ \AA}$ [157][158][159] и проявяват двумерна непрекъснатост и флуидност, напомнящи на липидните мембрани на везикули и живи клетки [150][153]. Тези синтетични конструкции осигуряват моделни мембрани на систематично приспособени молекулни състави, плътности, фазово състояние и течливост [158].

Поддържащата мембранна конфигурация подлежи на количествена характеристика чрез широк спектър от аналитични методи, базирани на повърхностни науки [159]. В действителност рентгеновото отражение [160][161],

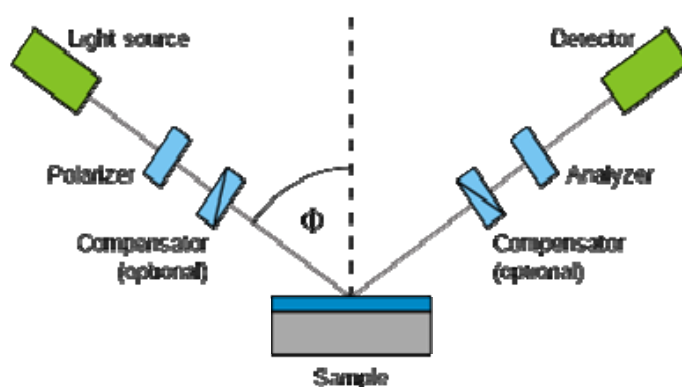
неутронната отразяваща способност (NR) [157], оптичната елипсометрия [162], повърхностен плазмонен резонанс (SPR) [163], методите на флуоресцентната микроскопия [161], кварц-кристалната микрогравиметрия [164], Фурие трансформации - инфрачервената спектроскопия [165] и ядреният магнитен резонанс [166] са доказали, че са много ценни методики за изследване на различни видове образци. Заедно те осигуряват подробно количествено разбиране на много физически качества на липидните мембрани, включващи дебелина на двойните слоеве, плътността, молекулярна ориентация, хомогенност, дефекти, флуидна трансляция и делене на фазите, както и тяхното термично и времево поведение. Успехът на тези техники предвещава значително постижение, но също така подчертава някои ключови ограничения, като по този начин потвърждава необходимостта от непрекъснато разработване на допълнителни методики за характеризирание [142].

1.1. Елипсометрия

Елипсометрията е експериментален метод, който характеризира измервания образец чрез определяне на изменението на поляризацията на светлината при взаимодействие с него. Терминът „елипсометрия“ за пръв път е употребен от Александър Ротен в 1945 год. [119], първото пък елипсометрично измерване е проведено от Пол Друде още през 1887 г. [120]. Въпреки тази вековна история методът продължава да се развива и усъвършенства и интересът към него не стихва [121][122].

Методът намира широко приложение в различни области на науката и техниката – физика [123][124][125], микроелектроника [126], материалознание и нанотехнологии [127][128], биология [129][130], медицина [131] и др. Основната причината за това е, че той е безразрушителен, високо чувствителен, не изисква вакуум и специална предварителна подготовка на образца (за разлика от други техники за анализ на повърхността) и позволява *in situ* измервания. Към това трябва да добавим по-голямата му информативност в сравнение с експериментални техники, базирани само на интензитет, и че е абсолютен (саморефериращ се) метод.

Елипсометрията е оптичен метод, който позволява да се определят оптичните характеристики на изследваните обекти, от които могат да се правят заключения относно произтичащите в тях физични, химични и биологични процеси [83][84]. Особено е важна ролята на елипсометрията свързана с това че: 1) тя практически не влияе на изследваната система (при правилен избор на дължината на вълната интензивността на светлинния лъч), което дава възможност за приложението ѝ при *in situ* измервания; и 2) тя е много чувствителна към слаби ефекти на граничната повърхност.



Фиг. 15 Елипсометрична схема

Разработките, насочени към диагностични приложения и сензорни системи в клиничната медицина и за директен биохимичен скрининг са мотивация за приложение на елипсометрията.

Предизвикателство е използването на елипсометрията за по-детайлно разкриване на свойствата и динамичното поведение на макромолекули върху гранични повърхности (естествени и изкуствени). Граничната повърхност в биологични системи, т. е. повърхност от имплантиран материал в меки тъкани са теми, по които работят в тясна колаборация колективи от физици и химици, биолози и медици [91].

Специфика на елипсометрия на течна повърхност

Наред със специфичните трудности, свързани с измерване върху течна повърхност, елипсометричното изследване на свръхтънки слоеве само по себе е голямо предизвикателство. Въпреки че елипсометрично могат да се детектират

изменения на субмонослойно ниво на повърхностния слой то определянето на параметрите на слоя е друга, по-тежка задача. Ако показателят на пречупване на слоя е известен, то определянето на дебелината в нанометровия диапазон от елипсометрични данни не представлява проблем. Влиянието на грешките в елипсометричните ъгли ψ и Δ и ъгъла на падане върху резултата от решаването на обратната задача нараства с намаляване на дебелината на слоя, като най-тежка е ситуацията на непоглъщащ слой върху непоглъщаща подложка.

За съжаление, тази ситуация е често срещана при много изследвания в биологията [182][183], медицината [184][185], хранителната [186][187][188], козметичната промишленост [189] и др. Например адсорбцията на различни вещества (протеини [190], колоидни наночастици [191] и др.) на различни течни повърхности (вода, масло и т.н.) е от голям интерес за тези области и елипсометрията е един от най-често използваните методи за изследване. Обикновено дебелините на адсорбираните слоеве са в нанометровия диапазон, а контрастът между показателите на пречупване на слоя и подложката е сравнително малък.

Елипсометрията е висококачествената техника, която е подходяща за количествено характеризирание на липидните бислоини покрития върху оксидни субстрати и такива потопени във водна среда. Статията ни демонстрира гъвкавостта на метода в количественото охарактеризиране на структурните и функционалните свойства на поддържаните фосфолипидни мембрани. Те включват едноетапно определяне на дебелината на бислоини слоеве до 0.2 nm точност. Сравнението с предишни проучвания потвърждава, че елипсометрията предоставя прост и удобен инструмент за рутинно, количествено характеризирание на тези свойства на мембраната. Резултатите показват също така, че той допълва по-широко използваните флуоресцентни и сканиращи микроскопи, като комбинира големи измервания с висока вертикална разделителна способност без използване на етикетирани липиди [142].

Едно от най-преките приложения на елипсометрията е измерването на повърхностното покритие, страничната еднородност (при микроскопични скали за дължина) и дебелината на филма. Също така елипсометрията може да се използва и за изследване на динамични системи.

Приложенията, представени в тази статия, илюстрират универсалността на елипсометрията за количествено, рутинно и лесно определяне на много физико-химични свойства на поддържаните мембрани. По-специално, са показали, че ключови структурни атрибути на поддържаните мембрани, включително дебелини

на бислойните (или молекулни области), странична равномерност, разделяне на фазите и взаимодействия на свързване на лиганд-рецептор, могат да бъдат количествено определени като се използва елипсометрия. Способността на метода да позволи мащабно изобразяване на изображения, измервания в реално време, субнанометрична мащабна разделителна способност, умерена пространствена разделителна способност, безконтактни оптични измервания, висока чувствителност към малки относителни разлики в оптичните свойства. От гледна точка на приложенията могат да се включат лесно допълнителни характеристики, включително променливи ъгли, спектроскопични приложения, температурен контрол, възможности за потока и по-точно моделиране на данните, включващи структурни анизотропии и хетерогенности, за да се подобри точността на елипсометричните измервания и да се извлече много полезни структурни и динамични тънкости на поддържаните мембрани.

Висококачествената техника за елипсометрията е подходяща за количествено характеризиране на липидните бислойни покрития върху оксидни субстрати и потопена във водна среда. Демонстрира се и гъвкавостта на метода в количественото охарактеризиране на структурните и функционалните свойства на поддържаните фосфолипидни мембрани, използвайки преди това добре характеризирани примери. Те включват 1) едноетапно определяне на дебелината на двуслойни слоеве до 0.2 nm точност и голяма равновесна странична равномерност с използване на фотохимично моделирани единични 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин бислоеве; 2) индуцирана от хидратация кинетика на еднофункционални 1-палмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин двойни слоеве, за да илюстрират способността *in situ* и скоростта на получаване на изображение; 3) широкообхватна морфологична характеристика на фазова разделящи бинарни смеси на 1,2-дилаурил-sn-глицеро-3-фосфохолин и галактозилцерамид; и 4) свързване на субединиците на холера-токсин В с GM1-включващи двойни слоеве. Допълнителни прозрения, получени от тези елипсометрични измервания, също се обсъждат за всяко от тези приложения. Споразумението с предишни проучвания потвърждава, че елипсометрията предоставя прост и удобен инструмент за рутинно, количествено характеризиране на тези свойства на мембраната. Резултатите им показват, че елипсометрията допълва по-широко използваните флуоресцентни и сканиращи микроскопи, като комбинира големи измервания с висока вертикална разделителна способност без използване на етикетирани липиди [142].

1.2. Електрохимична импеданска спектроскопия

Електрохимичната импеданска спектроскопия (ЕИС) е общоприет метод в много области на електрохимията. Методът може да се използва, за моделиране на електрохимична клетка чрез еквивалентни елементи (съпротивления, кондензатори, др.), всеки от който отговаря на специфичен химичен процес или преход в клетката. Анализът може да се потвърди като се променят условията на експеримента. Едно от предимствата пред традиционните постоянно токови методи е, че информацията за омовите загуби, електрохимичната кинетика и преноса на маса може да се получи от един единствен експеримент. ЕИС е полезен както за изследванията така и при контрола на качеството.

Непрекъснато засилващият се интерес към електрохимичните методи за изследване в областта на биологията и медицината се определя на първо място от изключителната роля, която играят биоелектрохимичните процеси в субклетъчната физиология. От друга страна, бурното развитие на аналитичната електрохимия в последно време снабди учените с нови мощни средства за извличане на информация за тези процеси на молекулно ниво. Поради редица свои преимущества, като чувствителност, неинвазивност, сравнително проста и евтина апаратура, тя си извоюва едно много широко приложение, особено в интердисциплинарните научни направления. В редица случаи електрохимичните методи за анализ съществено се обогатяват с прилагането на импеданския подход. Възможността честотата да се мени по време на измерването определя този подход като спектроскопичен, т.е. при електрохимичната импеданска спектроскопия (англ. Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS) се следи честотно зависимото поведение на образеца при облъчването му посредством електродите с електромагнитна енергия. Веднага трябва да се обърне внимание, че изследването на импеданса на химични и биологични системи изисква по-специално отношение най-малко поради две причини – стремежа към „непертурбиращо” въздействие (за да не се променят параметрите в хода на измерването) и съществено нелинейния отговор на системата. Напоследък се видя, че такива измервания са прелюдия към модерните техники на сканираща EIS и импеданска томография. Както при много други експериментални методи, изследването на една електрохимична система обикновено се извършва като се поддържат постоянни определени нейни параметри и се следи поведението ѝ при промяната на една контролирана величина. За аналитичната електрохимия, освен външните параметри на системата (като температура, обем, налягане), очевидно от

първостепенен интерес ще бъдат електричните параметри, свързани с промяната на състоянието на системата – заряд, потенциал, ток, импеданс и т.н. Останалите величини касаят електродите (материал, площ, форма), средата в която те се намират (електролит, обемни концентрации на електроактивни и допълнителни вещества, реакциите между тях и техните движения) и фазовата граница на електродите (състояние на повърхността, адсорбция, повърхностни реакции). От комбинациите на връзките между всички тези величини се ражда голямо разнообразие от методи и техники, с които в момента борави електрохимията [Bard and Faulkner, 2001].

Електрохимичните методи за анализ се оказват особено подходящи за изследване на моделните мембранни системи (ММС) поради няколко причини [201]. Първо, както казахме, те са сравнително неинвазивни, т.е. системата, която се тества, е подложена на действието на слаби електрични полета, които не пертурбират състоянието ѝ като цяло. Второ, тези методи са изключително чувствителни към всякакви структурни промени в интерфейсните зони, а повечето ММС, както знаем, представляват съвкупност именно от такива преходни области. Трето, що се отнася до липидните филми върху твърд субстрат, в много случаи е удобно самата подложка да се използва като работен електрод, което дава предимството за пряк достъп до интересуващите ни процеси. Като се добавят и лесните за обслужване технически средства, които се използват, става ясно защо електрохимичните методи добиват все по-голяма популярност при проучване на свойствата на ММС.

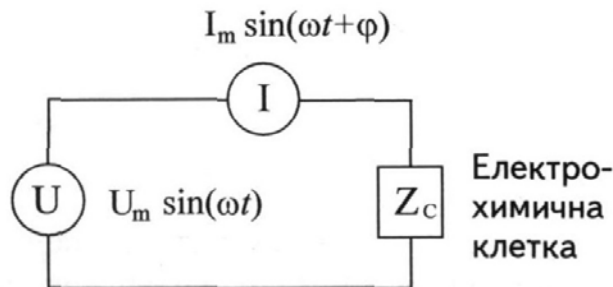
При редица проучвания електрохимичните методи могат да бъдат разширени с използването на техники, базиращи се върху концепцията за импеданса. В повечето случаи е удобно той да бъде определян, като на електрохимичната клетка с образеца се подава променливотоково възбуждане. Едно голямо преимущество на метода е възможността честотата да се мени по време на измерването, като това сканиране по същество представлява вече някаква форма на спектроскопия. С други думи, аналогично на оптичната спектроскопия, при *електрохимичната импедансна спектроскопия* (EIS), пробата се “облъчва” посредством електродите с електромагнитна енергия с честоти, вариращи в доста широк обхват – от микрохерци (μHz) до гигахерци (GHz). По този начин могат да се изследват честотно зависимите пасивни електрични свойства (т.е. импеданса или комплексната проводимост) на различни системи. Такъв подход се оказва мощно средство както за определяне на структурата им, така и за следене на процесите, протичащи в тях.

При редица биохимични изследвания, използването на електрохимични методи е възможно подаване на променливотоково възбуждане. Голямото преимущество на този подход е възможността честотата да се мени по време на измерването, като това сканиране представлява форма на спектроскопия. С други думи, аналогично на оптичната спектроскопия при импедансометрията, пробата се "облъчва" чрез електродите с електромагнитна енергия с честоти, достигащи до радиодиапазона. По този начин могат да се изследват честотно зависимите пасивни електрични свойства (т.е. импедансът или комплексната проводимост) на различни системи в контакт с електрода [108]. Това е мощно средство за следене на процесите, протичащи в непосредствена близост до работния електрод [109, 110], където се намират интересуващите ни моделни системи.

Регистрацията на импеданса в разтвори на макромолекули е свързан с образуването на: 1) двоен слой на границата на разделяне електрод /електролит, в размер на неговата молекулна дебелина, значителен капацитет ($C \sim$ няколко $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ от работната повърхност на електрода, която трябва да бъде заредена преди протичането на Фарадеевия ток); 2) скоростта на протичащата реакция може да се лимитира от преноса на заряд, дифузията на електроактивното вещество (макромолекулите) в реакционния слой; 3) при много високи честоти остатъчното съпротивление съответства на съпротивлението на обема на разтвора между електродите; 4) дифузият импеданс (импеданс на Варбург) може да се представи като последователно свързани съпротивление (R) и капацитет (C).

Импедансната електрохимична спектроскопия (ИС) дава възможност да се наблюдава взаимодействието на биологично важни молекули с липидни моделни системи. върху повърхността на работните електроди. Методът позволява да се проследява равновесието и динамиката на тези процесите. При този вид електрохимично изследване състоянието на изследваната система се смущава (пертурбира) чрез подаване на синусоиден сигнал и се регистрира предизвиканият от него отговор на изхода. По този начин се изследват различни електрохимични процеси, свързани с формиране на двойния електричен слой на повърхността на работния електрод, кинетичните закономерности на дадената електрохимична реакция, процесите свързани с адсорбция на веществата и др.

Импеданс и комплексна проводимост



Фиг. 16 Импедансът на изследваната система зависи от нейните пасивни електрични свойства и определя връзката между протичащия ток и приложеното променливо напрежение $Z=U/I$.

Добре известно е, че при прилагане на променливо синусоидално напрежение (U) към някаква пасивна електрична верига, протичащият ток (I) има също синусоидална форма и е отместен по фаза спрямо напрежението. В зависимост от компонентите на веригата, това отместване може да бъде положително (чисто капацитивно съпротивление), отрицателно (чисто индуктивно съпротивление), или нула (чисто омично съпротивление). Тъй като изследваните химични и биологични системи много рядко съдържат индуктивна компонента, разглежданията обикновено се ограничават до вериги с капацитивно и омично съпротивление. В комплексно представяне, импедансът ($Z_C=U/I$) и комплексната проводимост - адмитанс ($Y_C = 1/Z_C$) се дават във вида:

$$Z = \text{Re } Z + i \text{Im } Z \qquad Y = \text{Re } Y + i \text{Im } Y \qquad (1.8)$$

Често импедансът се представя като еквивалентни последователно или паралелно свързани съпротивление и кондензатор.

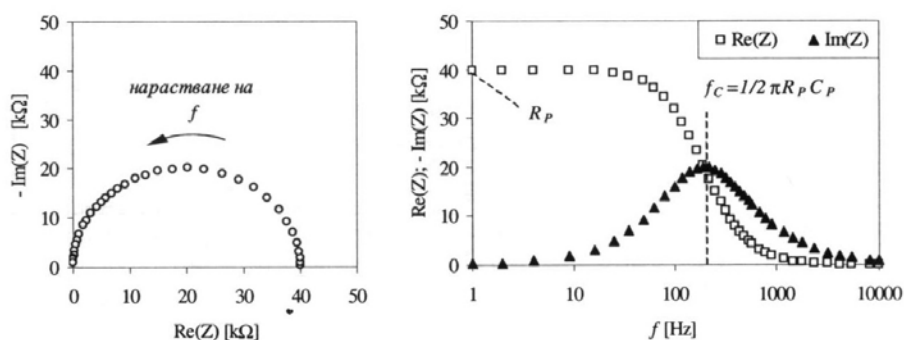
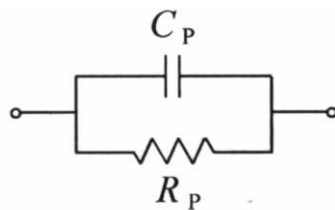
Трябва да се отбележи, че при пасивните вериги импедансът Z_C по определение не зависи от приложеното напрежение, но зависи от честотата ($f=\omega/2\pi$), т.е. $Z_C=Z_C(f)$. Реалните химични и биологични системи, обаче, могат да променят свойствата си при прилагане на по-високи напрежения, ето защо използваните за измерване сигнали трябва да бъдат достатъчно слаби (без това да пречи на регистрацията им). Зависимостта на импеданса от честотата може да се използва за описание на пасивните електрични свойства на изследваните системи, като им бъде

приписана еквивалентна схема от съпротивления и кондензатори. Те от своя страна се съпоставят на различните структури и процеси в системата.

Един удобен начин за представяне на връзките между отделните компоненти на еквивалентната схема и намиране на техните стойности са т.нар. **импедансни диаграми** [111,112]. Както видяхме $Z_C(f)=\text{Re}(Z_C(f))+i\text{Im}(Z_C(f))$. Съответно $Z_C(f)$ може да се изобрази като радиус-вектор или точка в тримерното пространство $(\text{Re}(Z_C),\text{Im}(Z_C),f)$ [113]. С промяната на честотата Z_C описва крива в това пространство. Импедансните диаграми представляват ортогоналните проекции на Z_C в трите равнини $(\text{Re}(Z_C),\text{Im}(Z_C))$, $(\text{Re}(Z_C),f)$ и $(\text{Im}(Z_C),f)$. От конкретния вид на кривите може да се съди за еквивалентната схема, породила такова импедансно поведение, както и да се определят нейните параметри.

Ще илюстрираме метода, показвайки теоретично получени импедансни диаграми [128] на няколко прости комбинации от съпротивления (R) и кондензатори (C).

а) Паралелно свързани R_P и C_P . ($R_P=40\text{ k}\Omega$ и $C_P=20\text{ nF}$):



А)

Б)

Фиг. 18 Импедансни диаграми на паралелно свързани R_P и C_P . А) Зависимост на имагинерната от реалната част на импеданса; Б) Зависимост на имагинерната и реалната част на импеданса от честотата.

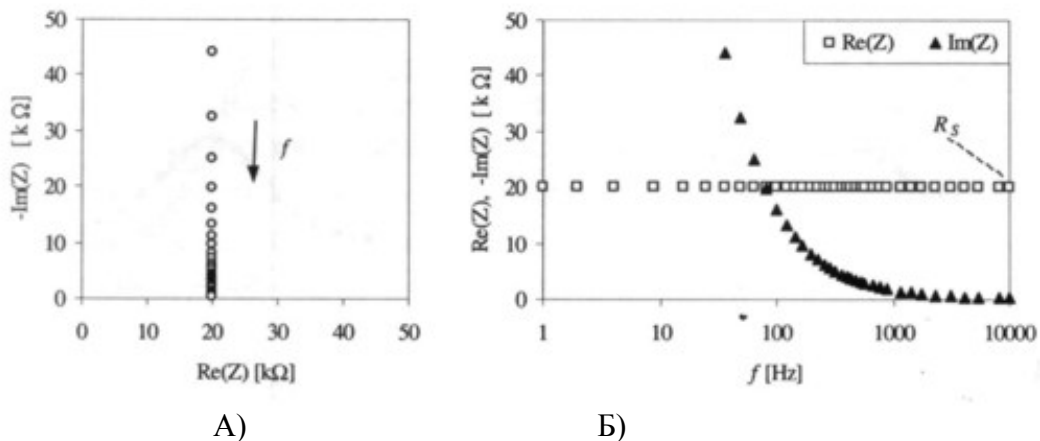
Стойностите за импеданса $\text{Re}(Z_C)$ и $\text{Im}(Z_C)$ са получени по формулите със зададени $R_P=40\text{ k}\Omega$ и $C_P=20\text{ nF}$. Както се вижда от фиг. 3А, в този случай

импедансната диаграма в комплексната равнина ($\text{Re}(Z_C), \text{Im}(Z_C)$) представлява полуокръжност с диаметър R_p . Действително, използвайки същите равенства не е трудно да се покаже, че двете части на импеданса удовлетворяват уравнение на окръжност с център върху абцисата на разстояние $R_p/2$ от нулата и радиус $R_p/2$:

$$\left[\text{Re}(Z_c) - \frac{R_p}{2} \right]^2 + [\text{Im}(Z_c)]^2 = \left[\frac{R_p}{2} \right]^2 \quad (1.9)$$

Кривите в другите две диаграми (фиг. 3Б), също имат характерна форма и дават възможност за определяне на R_p и C_p . R_p се определя от стойността, към която клони $\text{Re}(Z_C)$ при ниски честоти, а C_p от максимума на $\text{Im}(Z_C)$ и инфлексната точка на $\text{Re}(Z_C)$, които се проявяват на честотата на полупрехода $f_c = 1/2\pi R_p C_p$, наричана още *характеристична* или *критична честота*.

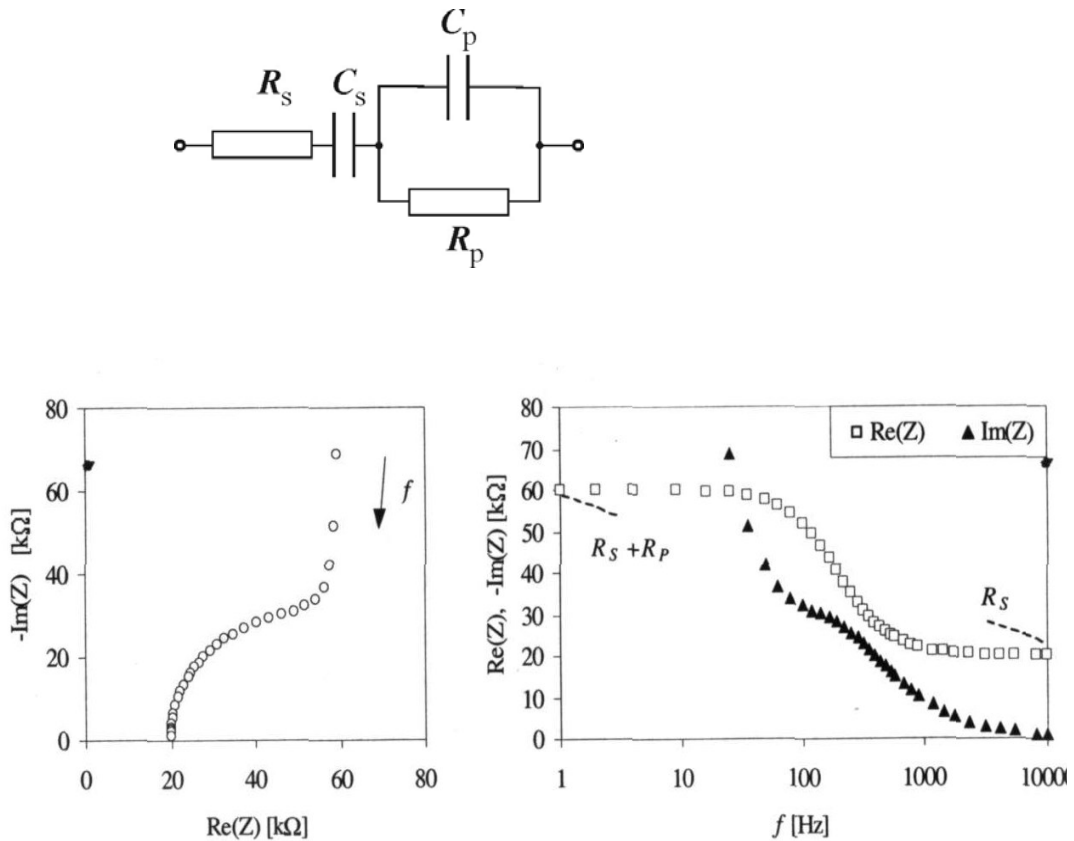
б) Последователно свързани R_S и C_S : $R_S = 20 \text{ k}\Omega$, $C_S = 100 \text{ nF}$



Фиг. 19 Импедансни диаграми на последователно свързани R_S и C_S

В този случай импедансната диаграма в комплексната равнина (фиг. 4А) е права перпендикулярна на абцисата, пресичаща я в точката $\text{Re}(Z_C) = R_S$. Правата започва от безкрайност при ниските честоти и клони към нула при високите, както може да се види и от (1.11). Съответно на другата диаграма (фиг. 4Б) реалната част на импеданса е постоянна за всички честоти $\text{Re}(Z_C) = \text{const} = R_S$, а имагинерната е от вида $1/x$.

в) Съпротивление R_S и капацитет C_S последователно свързани към паралелен $R_P C_P$ кръг ($R_S = 20 \text{ k}\Omega$, $C_S = 100 \text{ nF}$, $R_P = 40 \text{ k}\Omega$ и $C_P = 20 \text{ nF}$).



Фиг. 20 Импедансни диаграми на схема от съпротивление R_S и капацитет C_S , последователно свързани към паралелен $R_P C_P$ кръг.

В този случай имаме сумиране на импедансите от по-горе описаните ситуации а) и б), така че кривите са комбинация от тези на фиг. 19 и 20. В комплексната равнина правата на $R_S C_S$ се наслажда към полуокръжността на $R_P C_P$. Разграничаването на двата участъка зависи от стойностите на C_S , C_P и R_P . При фиксирано R_P разделянето се подобрява с нарастване на отношението C_S/C_P .

Освен, че илюстрират метода, дадените примери са твърде сходни с реално получаваните импеданси при електрохимичните изследвания. Например при идеално поляризуеми електроди и отсъствие на електроактивни вещества в разтвора, импедансът е като този на фиг.20 - R_S е съпротивлението на електролита, а C_S е капацитета на двойния електричен слой на междуфазовата повърхност електрод/разтвор. Пренос на заряд през тази повърхност при наличие на

електроактивни вещества се проявява като съпротивление, паралелно свързано на капацитета, и импедансът е подобен на този от фиг. 3.

Намирането на адекватен модел, който задоволително да обяснява експерименталните резултати получени с помощта на електрохимичната импедансна спектроскопия (EIS) не винаги е лесна задача. Данните от измерването на импеданса трябва да се напасват с подходящ модел. За тази цел има разработени програми осигуряващи тяхната комплексна апроксимация (едновременно и на реалната и на имагинерната част). Еквивалентната схема сама по себе си обаче, не е в състояние да отговори еднозначно на въпроса какви са конкретните механизми и структури лежащи в основата на модела. Във всички случаи са необходими допълнителни съображения за изясняване на неговата физическа същност. Тук ще представим две от най-често използваните еквивалентни схеми при изучаване на биологични образци, които сме използвали и в нашата работа.

Известно е, че не винаги е възможно поведението на една реална система да бъде моделирано с еквивалентна схема съдържаща само краен брой честотно независими елементи (идеални R и C). Обикновено импедансът на химичните и биологични образци е силно нелинеен, т.е. може да зависи от честотата както пряко така и косвено (когато самите му компоненти зависят от f). Това налага въвеждането на нелинейни елементи с характерна честотна зависимост. Един от най-популярните е т.нар. *елемент с постоянна фаза* (Constant Phase angle Element, CPE). Той се дефинира с израза:

$$Z_{CPE} = A(i\omega)^{-a}$$

където **A** и **a** са параметри независещи от f. Очевидно, за $a = 0$ CPE представлява идеален резистор $R = A$, докато за $a = 1$ той е идеален кондензатор $C = 1/A$.

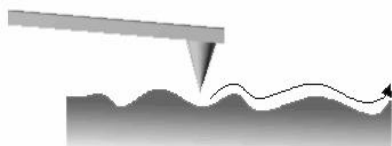
От равенството на Ойлер, можем да намерим реалната и имагинерната част на Z_{CPE} :

$$Z_{CPE} = A(i\omega)^{-a} = A\omega^{-a} e^{-ia\pi/2} = A\omega^{-a} \cos(a\pi/2) - iA\omega^{-a} \sin(a\pi/2)$$

т.е. модулът и фазовият ъгъл са съответно $|Z_{CPE}| = A\omega^{-a}$ и $\theta = a\pi/2$. От тук е ясно, че в логаритмичен мащаб зависимостите на $|Z_{CPE}|$, $\text{Re}Z_{CPE}$ и $-\text{Im}Z_{CPE}$ от честотата ще дават прави линии. При това положение, очевидно и диаграмата в равнината $[\text{Re}Z, -\text{Im}Z]$ ще бъде права.

1.3. Атомно силова микроскопия (AFM)

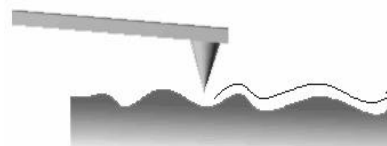
По-общото наименование на Атомно-силовия микроскоп е Микроскоп със сканиращо острие (Scanning Probe Microscope). Това наименование отразява факта, че общото в този тип уреди е наличието на тънко (типичен радиус на кривина около 10 nm)



Статичен режим

Пластинката с острие сканира с постоянна сила повърхността на изследвания образец.

Фиг. 21 а.

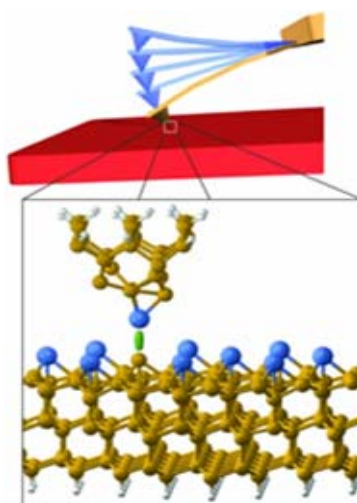


Статичен режим

Пластинката с острие сканира с постоянна сила повърхността на изследвания образец.

Фиг. 21 б.

Фиг. 21. Двата работни режима на АСМ - статичен и динамичен



Фиг.22 АСМ - кантиливър, работа

На Фиг. 22 е показано схематично принципът на най-разпространеният режим на работа на АФМ - динамичният режим. Основният чувствителен елемент в него използва съществено резонансните свойства на акустичните вълни на огъване, разпространяващи се в тънки пластинки с крайни размери. На фиг. 18 е показана тънка пластинка, здраво заловена в единия си край с висок Q-фактор на резонансната си крива. В другия край на тънката пластинка е поставено здраво заловено към нея тънко прецизно изработено триъгълно острие, което заедно с пластинката трепти близко над изследваната повърхност, оцветена на Фиг.18 в червено. Амплитудата

на трептене на пластиката с острието е особено чувствителна към силите, които могат да действуват върху нея в режим на резонанс или на такъв близък до него, защото в този режим генерираната амплитудата на трептене се усилва Q-пъти. Обикновено качественият фактор Q варира в интервала от няколко стотици до десетки хиляди пъти и повече.

Атомно-силова микроскопия (AFM) и използването ѝ като експериментална техника за изследване на организацията на мономолекулни слоеве, молекулни филми, биологични мембрани и структури, ензимо-каталитични реакции и при охарактеризиране с нанометрична разделителна способност на наночастици, наноструктури и различни материали. Атомно-силовата микроскопия (АСМ) / (AFM), известна още като сканираща силова микроскопия (СКМ) / (SFM), тридесет години след изобретяването ѝ се усъвършенства като експериментална техника и понастоящем представлява един от най-мощните инструменти за наблюдаване, „снимане” и охарактеризиране с нанометрична разделителна способност на топографията (релефа) на различни повърхности.

SPR и AFM предлагат пространствена разделителна способност, но също имат специфични ограничения. За използване с поддържани мембрани SPR изисква метални подложки (напр. Au и Ag) и специализирана химия за стабилизиране на липидните бислоеве [192][193]. AFM е податлив на по-широк диапазон от субстрати, но може да страда от смущения, предизвикани от върха, особено когато се работи със сгъваеми, течни липидни мембрани [194][195][196]. Например, прилагането на сили на обхвата на пико, върху сгъстяващи се, течни мембрани е хипотетично да индуцира молекулярни пренареждания и двуслойни деформации [197]. Как тези фактори влияят за определянето на дебелината въз основа на AFM остава неразбираемо.

* * *

Анализът на оптичните и електрохимичните методи показва, че всички те дават сведения за изследваното взаимодействие на липидни моделни системи с биологични важни молекули, но нито един от тях не може да даде пълна информация и е необходимо провеждане на комплексни изследвания, като обектът трябва да е максимално опростен, но в същото време близък към реалните системи.

Отчитайки достъпността на различни методи и апаратура, като основните методи в предстоящите експерименти се очертават елипсометрия, електрохимичните методи - импедансна спектроскопия, атомно-силова спектроскопия.

Цел и задачи на изследването

Цел на изследването е да се изучи взаимодействието на липидни моделни системи с биологично важни молекули - холестерол и еруфозин (антитуморен агент).

За разкриването на целта се поставиха следните задачи:

1. Да се изследва зависимостта от температурата на липиден филм чрез импедансна спектроскопия.

2. Да се изследват поведението на липидни филми/холестеролни филми при промяна съдържанието на холестерол чрез импедансна спектроскопия.

3. Елипсометрично изследване на взаимодействието на холестерол и при изменение концентрацията на лецитин .

4. Да се изследва влиянието на антитуморния агент - еруфозин върху липидна моделна система (холестерол/свингомиелин/фосфотидинхолин) чрез спектрална елипсометрия.

II. СПЕЦИАЛНА ЧАСТ

Глава 2 МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

2.1. Материали.

За получаване на образците са използвани следните химикали: холестерол (cholesterol, 5-cholesten-3 β -ol, C₂₇H₄₅OH, Sigma Chemical Co. USA); соев Лецитин (lecithin, Walmark, Чехия) без допълнително пречистване. Фосфолипид, разтворен в n-хексан и стерол, разтворен в хлороформ / метанол (9/1, обем / обем) се смесват в подходящи количества да се приготвят изходни разтвори с желано съдържание.

Тук трябва да обърнем внимание, че терминът лецитин се използва в литературата за смес от L- α -фосфатидилхолини (PC) с не дотам стриктно дефиниран състав. Това зависи от източника на получаване, от метода на изолиране и от пречистването, все параметри избрани от фирмата производител. Поради тези причини сместа може да съдържа PC с хидрофобни опашки, различаващи се както по дължина, така и по наситеност (количество двойни връзки).

Фосфатидилхолин (PC) от яйчен жълтък, Вид XVI – E, ≥ 99 % (TLC), лиофизиран праз закупен от Sigma Aldrich, Австралия и Сфингомиелин (SM), пилешки яйчен жълтък ≥ 95 %, Sigma Aldrich, Австралия се използват като липиден материал за приготвяне на филмите в това изследване. Холестерол (cholesterol, 5-cholesten-3 β -ol, C₂₇H₄₅OH, Sigma Chemical Co. USA) аналитичен клас също не се пречиства допълнително. Фосфолипидът, разтворен в n – хексан и стеролът, разтворен в хлороформ / метанол (9/1, об./об.) бяха смесени в подходящи количества за приготвяне на stock/сток разтвор с желаното съдържание. Експериментите бяха проведени при съотношенията на PC и SM, но с промяна на съответната процентна концентрация (5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % и 60 %) на холестерола. 20 μ l липиден разтвор се инжектира на златната и мета – повърхности.

Дебелината на стъклената подложка е 170 μ m, покрита с дебелина на златното покритие 200 nm. Дебелина на титановия (Ti) филм 1,5 nm, първоначално отложен чрез изпаряване на електронни снопове върху подложките, за да се увеличи адхезията на златото, последвани от 200 nm Au филм.

Еруфозина - е синтезиран в института Max Plank Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany, и беше най – благосклонно предоставен от проф. Hans – Jörg Eibl. EPC3 се разтваря в PBS (phosphate buffered saline) –

фосфатно буфериран физиологичен разтвор, рН 7.4 и също се използва в различни концентрации.

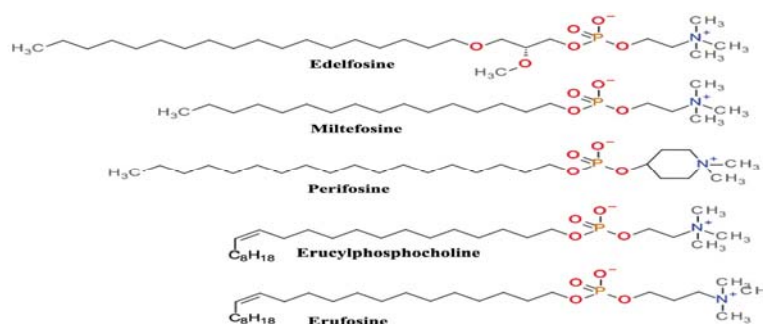
2.1.1. Еруфозин

Алкилфосфохолините представляват нов клас цитостатични лекарства с нов начин на действие. Еруфозин (ErPC3), първото съединение от този клас, което може да се приложи интравенозно, наскоро се оказва, че е активно срещу човешки туморни и левкемични клетъчни линии.

Алкилфосфохолините (АФХ) са нова група антитуморни агенти, които показват цитотоксична активност срещу различни туморни клетъчни линии *in vitro* и антинеопластична активност *in vivo*. За разлика от конвенционалните химиотерапевтични лекарства, които действат директно на ниво ДНК, АФХ действат на ниво клетъчна мембрана. Тъй като са повърхностно активни вещества, във високи концентрации те могат да предизвикат лизиране на клетките. При по-ниски концентрации метаболитно стабилните алкилфосфохолини се намесват в обмяната на фосфолипидите и сигнално-трансдукционните пътища. Намесата в липидните метаболитни пътища предизвиква стрес в клетката, който може да задейства - 7 - програмирана клетъчна смърт (апоптоза), като се повлияват специфично само раковите клетки, докато немодифицираните клетки остават незасегнати от действието им. Някои левкемични клетъчни линии отговарят на действието на интравенозно инжектираните алкилфосфохолини с конверсия към адхерентност, фибробласт-подобен клетъчен фенотип.

Еруфозинът има висока активност срещу левкемични клетки, без да засяга нормалната хематопоеза. Принадлежи към групата на алкилфосфохолините (АРС), които са инхибитори на протеин киназа С. Това е химиотерапевтично средство принадлежащо към група вещества наричани алкилфосфохолини (АРС). Тези синтетични съединения, получени от етер – липиди, показват силна проапоптична активност върху различни злокачествени клетъчни линии и първични туморни клетки. Трябва да се отбележи, че АРС не са миелотоксични (не увреждат костния мозък) и дори стимулират хематопоеза в костния мозък, за разлика от конвенционалните противоракови лекарства. Еруфозина е нов етер – липид алкилфосфохолин, показващ висока ефективност върху туморни модели *in vivo* и *in vitro*. Доказано, е че индуцира апоптоза в много левкемични и глиомни клетъчни линии. Той не миелотоксичен, дори стимулира нормалната хематопоеза (процес на

образуване на кръвни клетки). Тези функции се дължат на неговата химическа структура, която има дълъг алкил, верига от 22 въглеродни атома с една цис – двойна връзка. Това се базира на ниския еруфозинов хемолитичен потенциал (предизвикващ хемолиза, например : хемолитична анемия), което е предпоставка за системното му приложение и на свой ред позволява високи плазмени нива. Наблюдавано, е че еруфозина модулира различни пътища на сигнална трансдукция чрез взаимодействие с мембранны компоненти, обаче неговият точен механизъм на действие не е разбран.



Фиг. 23 Структура на еруфозина [G. M. Nitulescu, et all, Int. J. of oncology, 48: 869-885, 2016]

2.1.3. Получаване на липиден филм върху твърда подложка

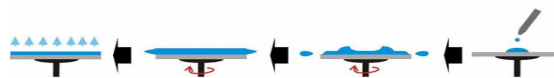
Най-елементарният начин за получаване на липидни филми върху твърда подложка е чисто емпиричен. Той се състои просто в нанасяне (с четка или пипета) на формирация разтвор от липиди в хидрофобен разтворител върху субстрата, изчакване да се изпари разтворителя (в эксикатор под вакуум) и хидратация (най-често пряко потапяне във вода). Разчита се на липидната самоорганизация под действие на хидрофобния ефект, което в крайна сметка довежда до образуването на ориентиран бислои или мултислоеве. Разбира се, ако идеята е изградена на двоен молекулен слой, повърхността на подложката трябва да бъде достатъчно хидрофилна за да може прилежащият липиден монослой да се ориентира с полярните глави към нея (Фиг. 24).

Такива филми са известни като “намазани” (англ. lipid painting, paint brush technique), или “излети” (англ. cast films). Като стъпка в подобрението на методиката бе предложено т.нар. ротационно покриване (англ. spin-coating, Фиг. 25),

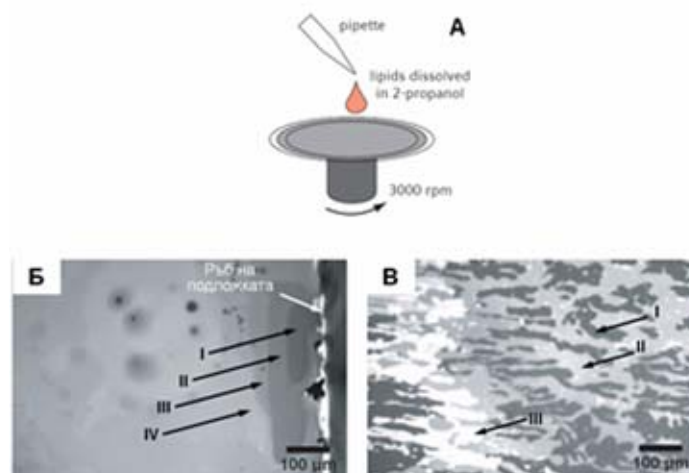
при което се извършва центробежно разстилане на липидния разтвор по повърхността на субстрата (обикновено слюда, метал, стъкло, SiO₂). В общи линии, техниката е разработена отдавна за най-различни полимерни покрития на повърхности. Макар в случая на липидите да е била предвидена за изследване на бислойни стекове с рентгенова дифракция, в последно време тя широко се практикува и за изучаване на ефектите на фазова сепарация. Това се дължи на благоприятното обстоятелство, че прилежащият към твърдотелния интерфейс бислой, който остава след отмиването на по-горните слоеве с буфер, е стабилен и хомогенен [Mennicke and Salditt,2002].



Фиг.24. Приготвяне на “излети” липидни филми.

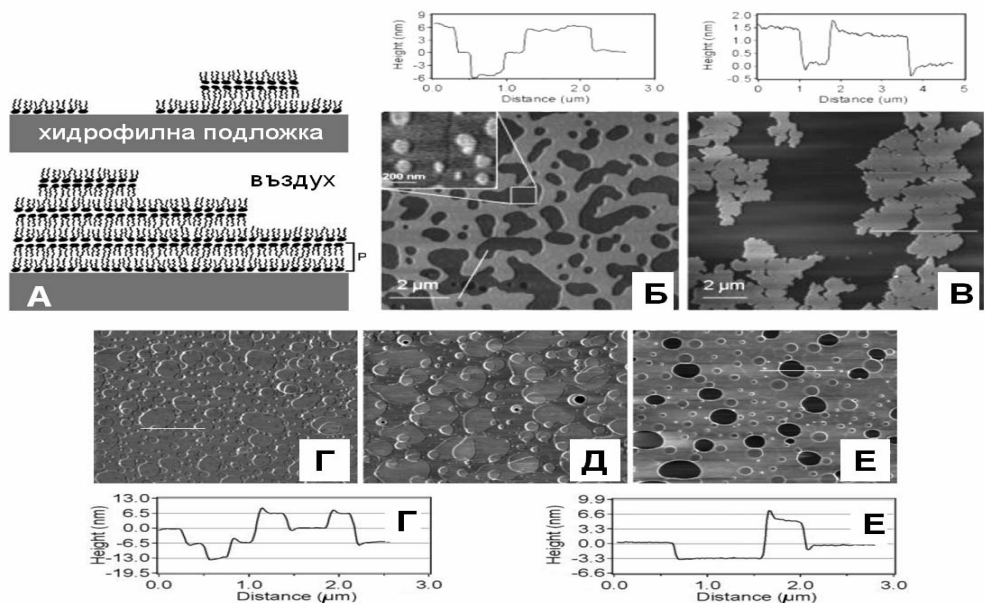


Фиг. 25. Получаване на сух липиден филм с помощта на ротационната техника „spin – coating”



Фиг.26. Ротационно покриване на твърдотелен субстрат с липиден филм. (А) Депозиране на липидния материал върху въртящата се подложка (в случая силицев окис, SiO_x); (Б) Мултислоеви от 1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, SOPC (5 mg/mL) изложени на въздух. Отделните бимолекулни слоеве са означени с римски цифри; (В) Промиването с воден разтвор последователно отстранява горните слоеве [Reich,2007].

Едно изследване с помощта на флуоресцентни микроскопски методи и AFM, проведено в групата от MEMPHYS (Дания), до голяма степен изясни структурата на липидните слоеве продуцирани с ротационната техника [Simonsen and Bagatolli,2004]. Очевидно, много важно условие за правилното отлагане на липидния филм е доброто омокряне на подложката от разтворителя. Ето защо той се подбира в зависимост от материала на субстрата. Степента на покриване обаче, зависи силно и от липидната концентрация (Фиг.23 А), като под някаква критична стойност (в случая 3mg/ml) започва да се забелязва характерна картина на нарушено омокряне (англ. dewetting) с открити области от субстрата (тъмните петна, Фиг.27). След хидратацията в буфер, по-горните слоеве от липида се “отмиват” и се получава равномерен хомогенен бислои, както за едно- (POPC) така и за двукомпонентни системи (POPC/DPPC, Фиг.27 Б,В). Авторите обръщат внимание, че методът коренно се различава от другите (сливане на липозоми и Лангмюир-Блоджет, LB) по това, че образуването на домени става след като бислоят вече е отложен върху субстрата, което е важно, тъй като “пренасянето” на бислои с формирани домени крие рискове от разрушаването им.



Фиг.27. Морфология на липидното покритие получено с ротационно отлагане. (А) Предполагаема ориентация на слоевете на въздух, след депозиране на разтвор с ниска (горе) и висока (долу) липидна концентрация. Прилежащият към субстрата стабилен бислой е отбелязан с P; (Б) AFM изображение (долу) и профил (горе) на сух (на въздух) филм от смес POPC/DPPC (1:1); (В) AFM изображение (долу) и профил (горе) на същия филм след хидратация [Simonsen and Bagatolli,2004].

За част от липидните филми сме използвали техниката на „излети“ филми, тъй-като ротационното отлагане е неудобно предвид на геометрията на работния електрод с поставката му (Фиг. 28). А за другата част от липидните филми сме използвали техниката на ротационното завъртане „spin – coating“. Липидният разтвор, приготвен предварително с желаната концентрация, се нанася с микропипета върху повърхността на субстрата за всеки опит в еднакви количества. След изпарение на разтворителя върху останалия сух филм се накапва електролит (0,1 М KCl) и се изчаква хидратирането на слоя. В така образуваната електролитна капка се потапя спомагателния „точков“ платинов електрод. Импедансът се измерва между този електрод и златното покритие с формирания липиден филм.

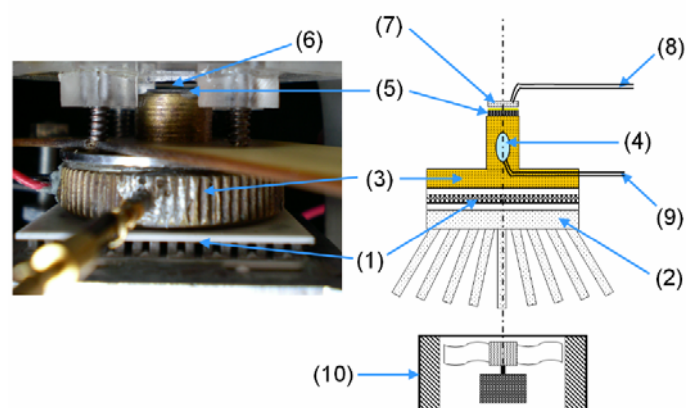
2.2. Методи на изследвания

2.2.1. Електрохимична импедансна спектроскопия

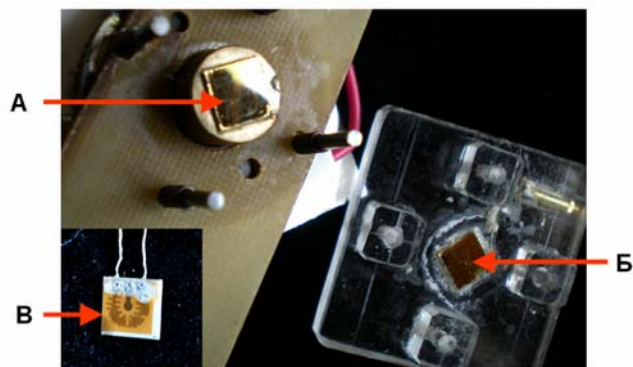
Разнообразните техники на електроаналитичната химия вече са спечелили репутацията на надеждни инструменти за изследване на биомембранни и липидни моделни системи. Сред тях, електрохимичната импедансна спектроскопия (EIS) изглежда е един от най-обещаващите по отношение на интерфейса изследвания.

2.2.1.1. Измерване на температурата върху повърхността на субстрата. Калибриране на вградения температурен датчик.

Установката за измерване на импеданса на липидните филми (Фиг.25) се състои от два работни електрода – горен и долен (силициеви подложки с изпарено златно покритие, Фиг.26), топлопроводна месингова поставка с вграден терморезистор и Пелтие елемент с радиатор (обдухван от вентилатор). Поддържането на температурата в долния електрод става с промяна на тока през Пелтие елемента

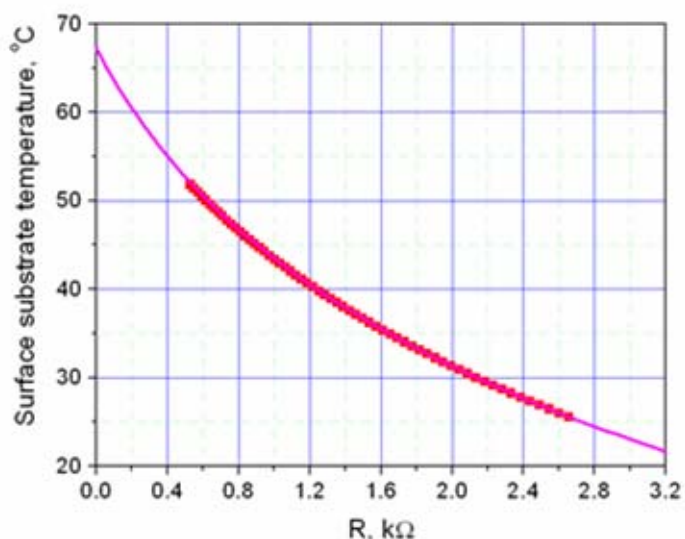


Фиг.25. Общ изглед и схема на установката за термостатиране и измерване на импеданса: (1) – Пелтие елемент с радиатор (2); (3) – топлопроводна месингова поставка с вграден терморезистор (4); (5) – долен работен електрод (силициева подложка с изпарено златно покритие); (6) – горен работен електрод; (7) – ситалова подложка с нанесена платинова нишка играеща ролята на термосъпротивление (поставена на мястото на горния електрод при калибриране на температурата); (8) – изводи на Pt термосъпротивление; (9) – изводи на вградения терморезистор (4); (10) – вентилатор.



Фиг.26. Снимка отблизо на работните електроди – долен (А) и горен (Б) и ситаловата подложка (В).

Вграденият в месинговата поставка терморезистор очевидно не може да отчита истинската температура на депозираните върху долния златен електрод филми поради съществуването на температурен градиент между тях и Пелтие елемента. Ето защо бе направено калибриране, позволяващо измерването на температурата *in situ* върху златното покритие. Калибрирането бе проведено с помощта на ситалова подложка с фотолитографски нанесена платинова нишка, служеща за термосъпротивление. Подложката се поставя върху долния работен електрод като контакта се осъществява с вода (Фиг.25). Температурата се променя с помощта на Пелтие елемента. Получените данни са показани на Фиг.27

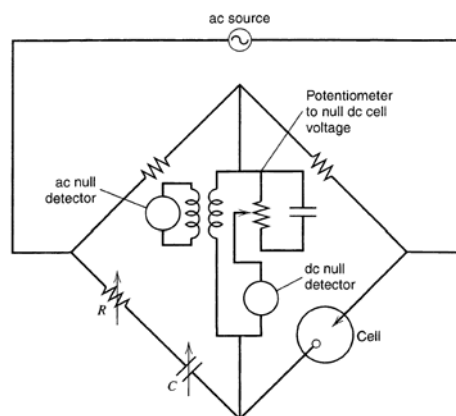


Фиг.27. Крива на калибриране показваща температурата на повърхността на образеца в зависимост от съпротивлението на вградения терморезистор. Със символи са отбелязани експериментално измерените

данни, а непрекъснатата линия е напасването им по метода на най-малките квадрати

Методите за измерване на импеданса най-общо могат да бъдат разделени на три големи групи.

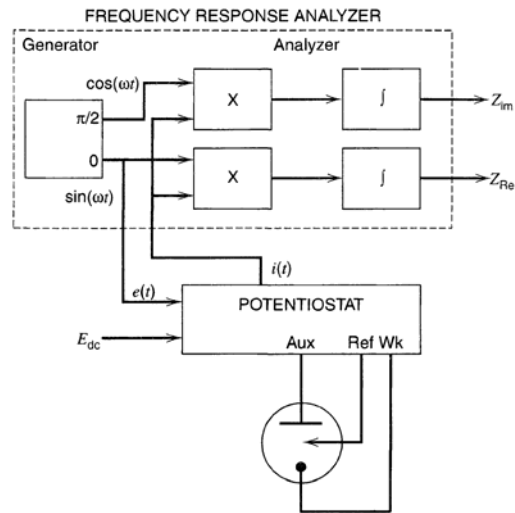
1. *Мостова схема* (автобалансиращ метод). Това е един от най-точните методи, позволяващ измерване на импеданса в широк честотен обхват – 5Hz-40MHz. В ранните години на EIS се използва променливотоковият мост изобретен от сър Чарлз Уитстоун (C.Wheatstone, 1843; Фиг.28). При него електрохимичната клетка (с неизвестен импеданс) е поставена в едното рамо на моста, който за всяка честота се балансира (нулираща техника) чрез променливите R и C в другото рамо. Така от тези ефективни, честотно-зависими R и C може да бъде намерен импедансът на клетката. Естествено, понастоящем такива мостове са реализирани на базата на съвременни електронни схеми. Този подход обаче е неподходящ за по-високи честоти и е относително сложен за изпълнение. Като някои технически трудности могат да се посочат: 1) мостът не може да бъде балансиран ако честотата е много висока или кабелът до пробата много дълъг; 2) обхватът на измерване е ограничен от нивото на шума и нелинейните изкривявания в системата (при двуелектродния вариант пробата не е заземена); 3) при висока чувствителност смяната на обхват води до нестабилност и грешка при измерване (на границата между два обхвата).



Фиг.28. Принципно схемата на променливотоков мост измерващ импеданса на електрохимична клетка.

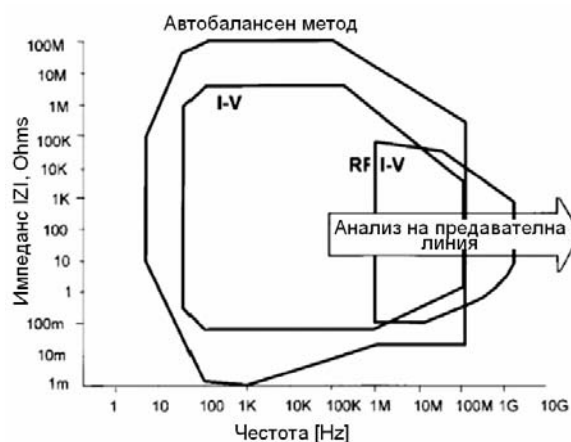
2. *Метод I-V* (ток–напрежение). При него се анализира амплитудата и фазата на тока протичащ през пробата в зависимост от честотата чрез съответен прибор FRA (frequency response analyzer). FRA се състои от генератор, който подава

променливотоков сигнал на потенциостата и от анализатор на тока течащ през клетката (Фиг.29). Подходящ за честотен обхват 100Hz – 2GHz. Трудно се постига висока точност за честоти под 100Hz. Предлага по-лесни схемни решения, тъй-като не изисква високопрецизни елементи, за разлика от балансният метод. В търговски вариант се предлагат уреди работещи в диапазона от 10^{-6} до 2^6 Hz.



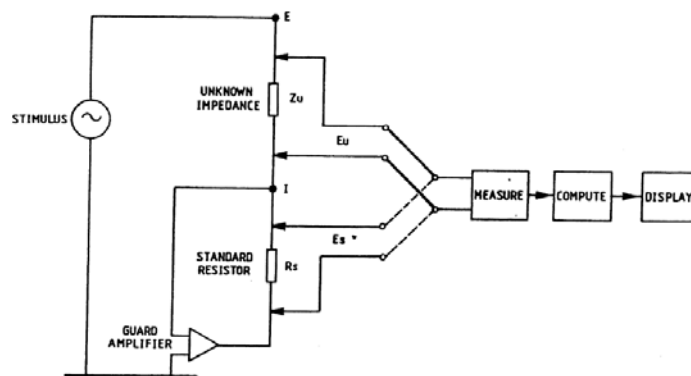
Фиг.29. Блок-схема на апаратура за измерване на електрохимичния импеданс чрез анализ на зависимостта на тока от честотата.

3.Модел на предавателна линия. В този случай, импеданса се получава от коефициентите на отражение в линията. Обикновено се правят по 3 измервания за дадена честота - отворена линия, късо съединение и проба от които се определят параметрите на линията. Той е предназначен за много високи честоти (над 100KHz) и естествено изисква прецизно изпълнение.



Фиг.30. Обхвати на различните методи за измерване на импеданса.

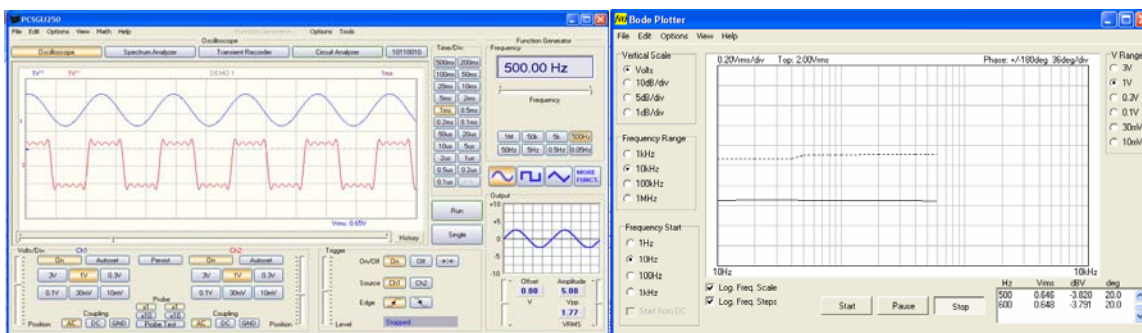
В нашата работа импедансът на образците е изследван с първите два метода. Като автобалансиращ мост е използван уредът Wayne Kerr 6425 (производство на фирмата Farnell Instruments Ltd, UK). Вторият метод е реализиран с помощта на две устройства – двуканален цифров осцилоскоп PCSGU250 със спектрален анализатор и Bode плотер (производство на фирмата Velleman Instruments, Белгия) и програма за звуковата карта на персонален компютър PhysLab 5.0 (автор, С.П.Палто, Институт кристаллографии, Руская академия наук, Москва).



Фиг.31. Блок-схема на принципа за измерване на импеданса с моста Wayne Kerr 6425.

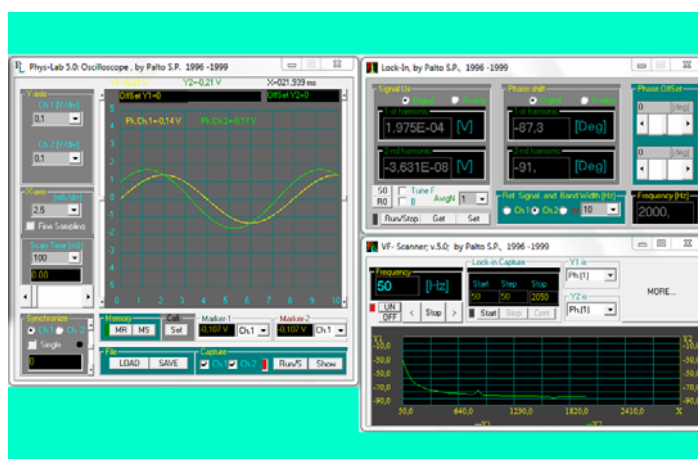
Автобалансиращият мост Wayne Kerr 6425 измерва импеданса по схемата показана на Фиг.31. Той представя данните за всяка честота в няколко формата – 1) като успоредно свързани съпротивление R_p и кондензатор C_p , 2) като последователно свързани съпротивление R_s и кондензатор C_s , 3) като модула на импеданса $|Z|$ и фазовия ъгъл θ . От тези величини, чрез съответните преобразувания, могат да бъдат получени Найкуист и Бод е плот на зависимостта на импеданса от честотата.

Цифровият осцилоскоп PCSGU250 с Bode плотер (Фиг.32) е в състояние да измерва пада на напрежение върху неизвестния импеданс и фазовата разлика между това напрежение и сравнителния сигнал, подаван от генератора на устройството. От тези данни лесно могат да бъдат намерени реалната и имагинерната част на импеданса.



Фиг.32. Общ вид на виртуалните прибори от програмата *Pc-Lab2000LT*, използвани за измерване на импеданса на образците с помощта на устройството *PCSGU250*.

Въпреки, че *PCSGU250* предлага големи възможности (спектрален диапазон 1Hz – 1MHz), по-задоволителни се оказаха резултатите получени с моста *Wayne Kerr 6425* (спектрален диапазон 20Hz – 300kHz) и с програмата *PhysLab 5.0* (спектрален диапазон 10Hz – 10kHz).



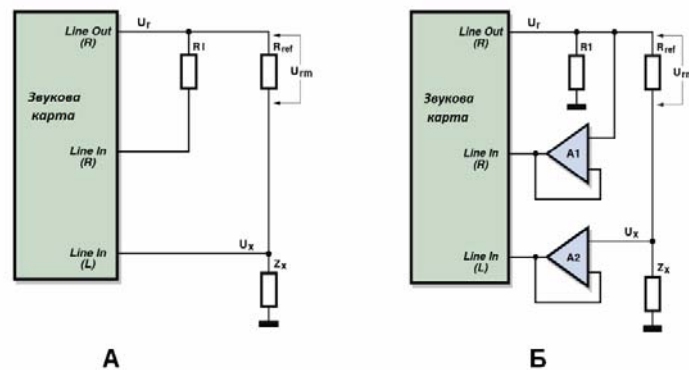
Фиг.33. Общ вид на виртуалните прибори от програмата *PhysLab*, използвани за измерване на импеданса на образците [Palto,1998].

Принципът на работа на *PhysLab 5.0* работеща със звуковата карта е следният : (Фиг.34). Разликата в нивата на напрежението U_r върху сравнителния резистор и напрежението U_x върху образеца, и фазовата разлика между двата сигнала, дават възможност да се определи импеданса на изследвания образец. Съпротивлението R_1

задава изходът на звуковата карта спрямо земята. Двата операционни усилвателя LM358, вградени в един корпус (всеки с усилване единица), действат като буфер с висок входен и нисък изходен импеданс. Синусоидалното напрежение U_r , идващо от изхода на звуковата карта, което се подава на образеца, се измерва посредством десния входен канал. Падът на напрежение върху образеца U_x се измерва посредством левия входен канал. Точността на измерването зависи от това доколко прецизно е определена стойността на R_{ref} . За намирането на търсения импеданс се имат предвид следните прости релации свързващи Z_x с измеряемите U_r и U_x :

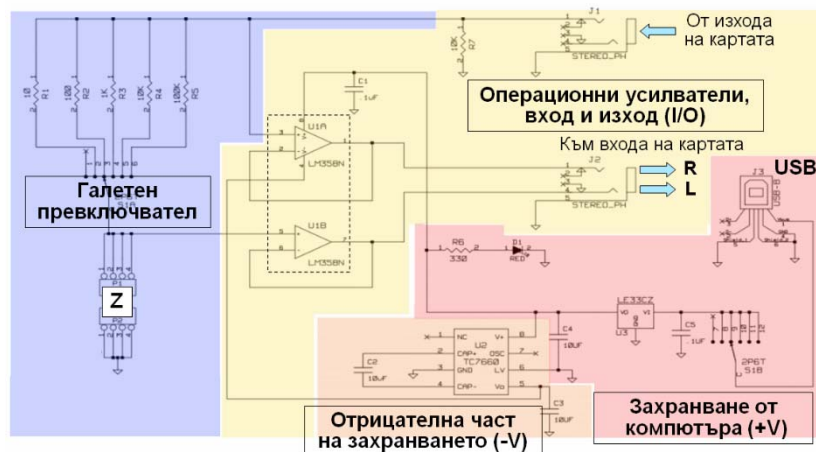
$$U_x = I_{Ref} \cdot Z_x = \frac{U_{rm}}{R_{ref}} \cdot Z_x$$

$$U_{rm} = U_r - U_x$$

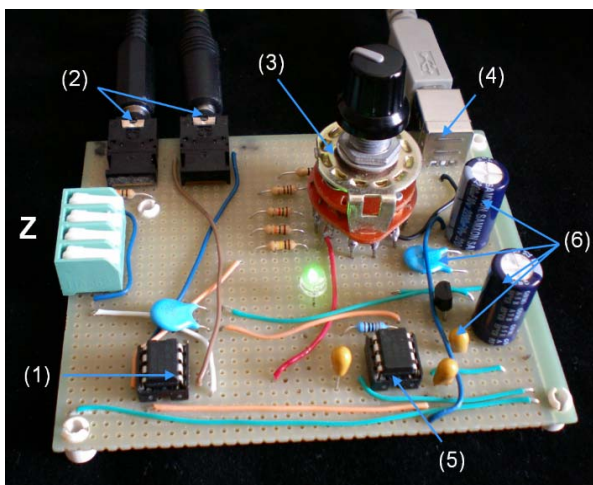


Фиг.34. Принципни схеми за измерване на импеданс чрез компютърната звукова карта. (А) Директно, чрез сравнение на сигналите подавани на двата входни канала; (Б) Посредством предусилвател за преодоляване на проблема с ниското входно съпротивление на картата.

Тъй като входния импеданс на звуковата карта е сравнително нисък, налага се да се използва допълнителна схема за съгласуване (Фиг.34Б). Тя съдържа двоен операционен усилвател LM358 (Фиг.36) за поддържане на висок входен импеданс, което позволява да се измерват с по-висока точност неизвестни импеданси на различни RLC вериги, тъй като двата операционни усилвателя (Фиг.36) вградени в един корпус (всеки с усилване единица) действат като буфер с висок входен и нисък изходен импеданс.

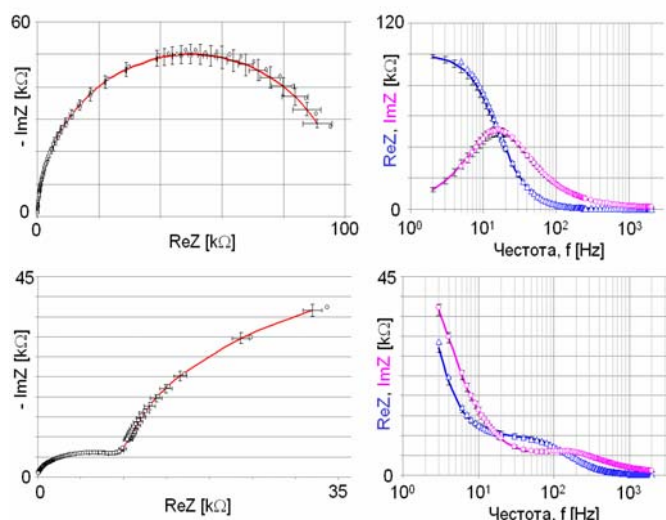


Фиг.35. Електронна схема на предусилвателя със захранването му от компютъра.



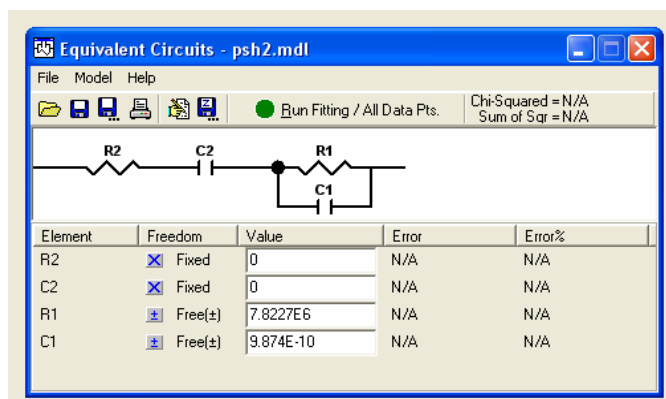
Фиг.36. Външен изглед на предусилвателя за съгласуване на импеданса на образците и входа на звуковата карта. (1) – двоен операционен усилвател LM358N; (2) – конектори на кабелите за свързване със звуковата карта; (3) – галетен превключвател на товарните съпротивления; (4) – куплунг USB за захранването от компютъра; (5) – конвертор на напрежение TC7660; (6) – кондензатори на захранващата част [Симеонов,2012].

Резултатите от измерването на две еквивалентни схеми са показани на Фиг.37, откъдето се вижда много доброто съвпадение с теоретичните модели.



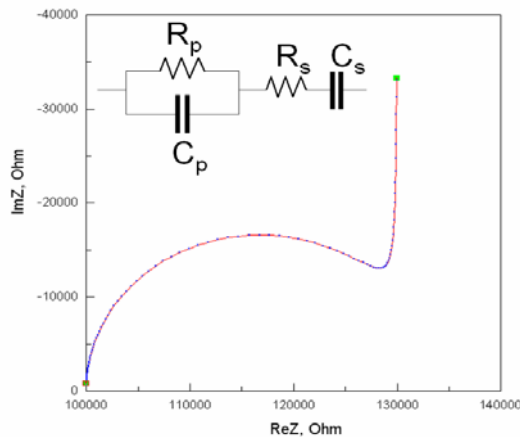
Фиг.37. Импедансни диаграми на Найкуист (вляво) и Боде (вдясно) за еквивалентни схеми от един RC кръг (горе) и два последователни RC кръга (долу), получени със схемата на Фиг.34Б. Точките са експерименталните данни, а кривите са получени от съответните теоретични модели [Симеонов,2012].

Експерименталните данни за импеданса на образците са обработвани с програмата за електрохимична импедансна спектроскопия ZView2. Анализът на неизвестния импеданс става като се зададе еквивалентен модел и този модел се напасва с опитните данни. Програмата позволява построяването на широка гама от модели, включващи не само комбинации от честотно независими компоненти, но и от много често срещани характерни елементи с разпределени параметри (Фиг.38).



Фиг.38. Работен прозорец на програмата ZView2 за построяване на еквивалентна схема на изследвания импеданс.

Освен това, програмата ZView2 дава възможност за симулиране на импеданското поведение на различни модели (Фиг.39), което е едно безсъмнено удобство когато еквивалентната схема на образеца не е отнапред известна.



Фиг.39. Симулация на импеданското поведение (диаграма на Найкуист) на еквивалентна схема от успоредно и последователно свързани R и C ($R_s = 100k\Omega$, $C_s = 1\mu F$, $R_p = 30k\Omega$, $C_p = 50nF$), получена с програмата ZView2 (за всички показани тук Найкуист-диаграми честотата нараства от дясно на ляво, докато за Бодe-диаграмите е обратно!).

Изграждане на липидни слоеве върху силициев субстрат покрит със злато.

В съгласие с общоприетите техники за формиране на течни липидни филми върху твърда подложка, в нашата работа сме получавали и изследвали два вида филми:

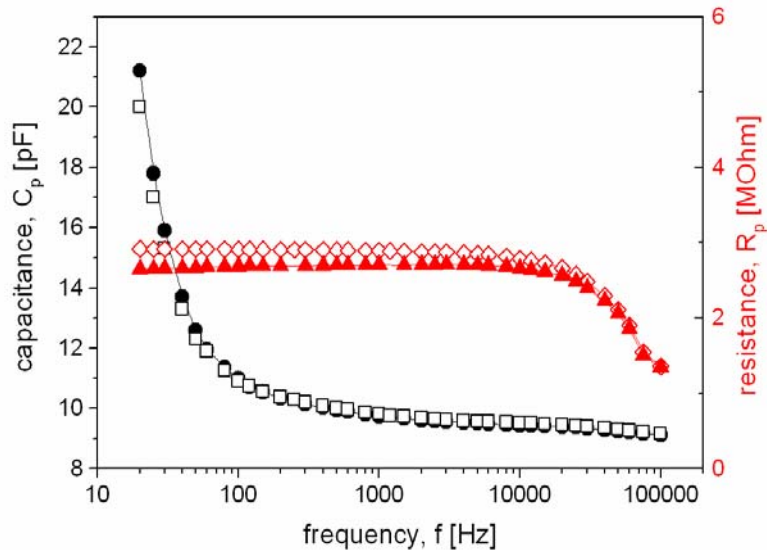
– Нехидратирани слоеве от чист лецитин между два еднакви електрода при различна температура;

– Нехидратирани слоеве от лецитин и холестерол с различно съдържание на съставките - 1/0.5, 1/1 и 1/1.5 тегловни съотношения (wt/wt);

Тук е редно да вметнем една забележка. Под „нехидратирани слоеве” имаме предвид, че филмите не са специално насищани с вода. От друга страна обаче, не са полагани усилия и за дехидратирането им, т.е. поради околната влага, те съдържат някакво минимално количество вода, което е от съществено значение за организацията им на молекулно ниво, както ще видим по-нататък.

Анализ на импеданското поведение на липидните филми.

Най-напред трябва да подчертаем, че представените по-надолу резултати са само една репрезентативна извадка от голям брой измервания, включващи проверка на повтаряемостта на данните. Тъй като резултатите от различни измервания на един и същ образец почти съвпадат (Фиг.40), специална статистическа обработка не е правена.



Фиг.40. Зависимост на еквивалентните успоредно свързани R_p и C_p от честотата за две различни измервания в диапазона 20 Hz – 100 kHz.

2.4. Елипсометрия – работна установка

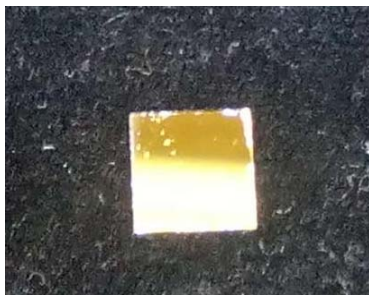
Елипсометрията измерва промяната в състоянието на поляризация на светлината, отразена от (или предавана през) повърхността на пробата. По принцип, елипсометрията се отнася само до измерването на състоянието на поляризация на светлинния лъч. Обаче, елипсометричните измервания обикновено се извършват, за да се опише "оптична система", която променя състоянието на поляризация на светлинния лъч. За проба с тънък филм "оптичната система" е просто пробата. Измерените стойности се изразяват като пси (Ψ) и делта (Δ). Тъй като елипсометрията измерва съотношението между две стойности, тя може да бъде много точна и много възпроизводима. Тъй като съотношението е сложно число, то съдържа и информация за "фаза" (Δ), което прави измерването много чувствително.

Елипсометрията може да определи оптични константи, дебелини на слоя и много физически величини, които влияят на оптичните константи. Елипсометрията обикновено се използва за характеризиране както на тънки филми, така и на насипни материали. Най-честото приложение е измерване на дебелина на тънък слой и оптични константи. За много проби елипсометрията е чувствителна към дебелината на филма на подмонопластово ниво. Доказано е също, че това е

основната техника за определяне на оптични константи в UV, видимата и инфрачервената област на дължината на вълната. Елипсометрията е много гъвкава и чувствителна към много микроструктурни свойства на материала.



Фиг. 41. The J. A. Woollam Co., Inc. M-2000[□] спектроскопичен елипсометър



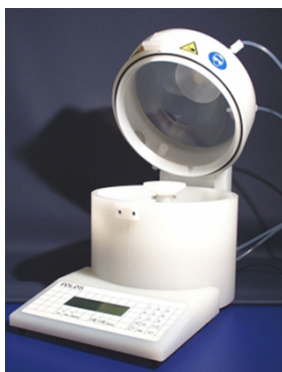
Фиг. 42 Златна повърхност

На фигура 42 сме показали подложките, които използваме за измерванията. Златна повърхност с дебелина на златното покритие на подложката е около $d = 200$ nm.

Метода spin - coating.

Спин-покритието е техника, използвана за нанасяне на равномерни тънки филми върху плоски субстрати. Проба, разредена в материал с умерена точка на кипене, се нанася върху субстрат, който се подлага на въртене.

Спин-нагревателите могат да се използват за нанасяне на тънки полимерни филми към силициеви пластини при разработването на меки съпротивителни сили в фотолитографския процес. Дебелината на приложените филми може да бъде по-малка от 10 nm и се регулира от концентрацията на прилагания полимерен разтвор и скоростта на въртене.



Фиг. 43. ANFF QLD имат APT-POLOS spin-coater, което заема различни геометрии от 2 инча, 8 инча или микроскопски слайдове. Системата разполага с автоматична система за подаване на разтворител и вакуум за по-безопасни операции и е изработена от PTFE части за по-голяма универсалност с различни системи разтворители.

За нанасяне на липидните филми върху повърхността на субстрата се използва техниката spin - coating. Течен материал с различна концентрация на РС, холестерол и SM се изпуска директно върху повърхност (златна, мета – повърхност) [12–14].

Разтворът се разпределя по повърхността и веднага след като разтворът е омокрял подложката, пробата се ускорява с въртене. Обикновено въртенето се извършва на две стъпки. Докато първото по-бавно въртене позволява решението да покрива повърхността хомогенно, втората стъпка налага бързо изсъхване и подхвърляне на резервния разтвор. За разтвори с хлороформ е доказано, че е полезно да прескочите първата стъпка и да започне въртенето с крайната честота от 3000 rpm веднага след като разтворът е пипетиран върху повърхността. След бързо изпаряване на разтворителя, добре дефиниран брой бислоеве се образуват на повърхността на субстрата.

Процедурата в нашия случай е следната: накапваме 20 μ l различна моларна концентрация на холестерол, съответно върху повърхностите (Au) въртим с spin – coating – Program 4 (1 step), edit mode \rightarrow step 001/001; vac req / Time 00:40:00; rpm 00; Rpm + 03000; Loop 000; Acel 00500; Go to 001.

След процедурата на spin – coating се измерват чрез елипсометрия от 45° - 75° през 2° .

2.5. Атомно-силова спектроскопия

С атомно-силова спектроскопия се изследваше взаимодействието на липидни моделни системи - разтвор на лецитин с холестерол. Максималната сканираща област е 2 μ m, а резолюцията по “x” и “y” е 4.5 \AA , а по “z” е 0.78 \AA .

Глава 3 Резултати и обсъждане

При изследване на взаимодействието на липидни моделни системи с холестерол и еруфозин върху златна повърхност съществуват някои ограничения при използването на дадените методи, произтичащи от характера на процеса. Те трябва да не повлияват процеса на взаимодействие и едновременно с това да са достатъчно бързи. Като такива методи се използваха: елипсометрията, електрохимичните методи: импедансна спектроскопия и атомно силовата микроскопия.

3.1. Импедансно изследване на филми от чист лецитин при различна температура.

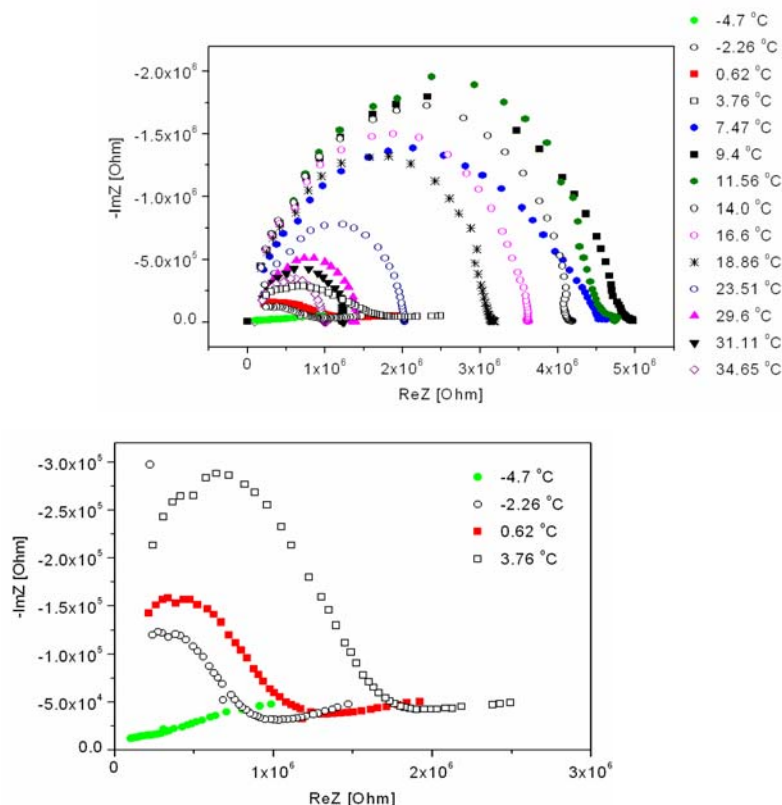
Както казахме, една от целите на исертационната работа е да се проследят измененията които настъпват в липидните филми, с промяна на температурата им. Това е постигнато с използването на лецитинови филми, разположени между двата еднакви работни електрода показани на Фиг.17. Разстоянието между електродите е постоянно, фиксирано с помощта на тефлонов спейсър с дебелина 30 μm , в средата на който има отворстие с диаметър 4 mm. Течният лецитин (без разтворител) се нанася в отворстието и електродите се притискат един към друг. В този параграф измерванията на импеданса са проведени с автобалансиращия мост Wayne Kerr 6425 в спектрален диапазон 20Hz – 200kHz. Избран е формат на представяне на импеданса като успоредно свързани съпротивление $R_p(f)$ и кондензатор $C_p(f)$ зависещи от честотата. От получените данни за $R_p(f)$ и $C_p(f)$, за всяка честота се пресмятат реалната $\text{Re}Z$ и имагинерната $\text{Im}Z$ част на импеданса по формулите:

$$\text{Re}Z = \frac{R_p}{1 + (\omega R_p C_p)^2}$$

$$\text{Im}Z = \frac{-R_p (\omega R_p C_p)}{1 + (\omega R_p C_p)^2}$$

От представените на Фиг.35 резултати (във вид на Найкуист диаграми) се вижда, че импеданското поведение на филмите от чист лецитин с промяна на температурата е сложно. Докато за по-високите температури (приблизително от 7°C нагоре) то има характерния вид на част от полуокръжност (описваща се с ARC елемента), то за ниските температури Найкуист диаграмите (Фиг.35, вдясно) са доста

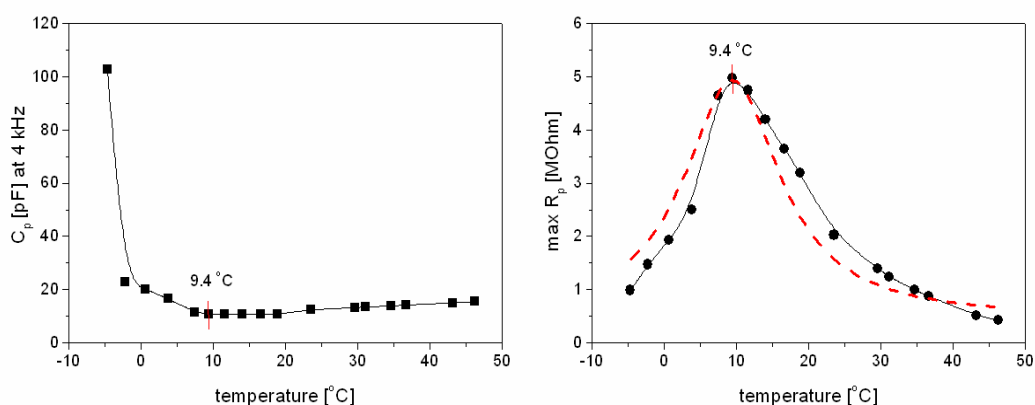
по-различни. Тук няма да се впускаме в задълбочена дискусия относно вида на кривите, а само ще отбележим, че „изправената” линия (в зелено), наблюдаваща се при най-ниските в нашия случай температури (-4.7°C), отговаря на по-подредено състояние на липидните молекули. Такова състояние е характерно за гел фазата. Този резултат, който интуитивно можеше да се очаква, се съгласува с по-рано получени данни за тънки (от порядъка на ангстръми, Å) течни филми върху подложка [Карабалиев,2001].



Фиг.35. Найкуист диаграми за лецитинов слой при различни температури. Вижда се сложното поведение (вдясно) при ниските температури ($-4.7 \div 3.76^{\circ}\text{C}$), което не може да бъде апроксимирано с еквивалентна схема само от един ARC елемент.

Имайки предвид трудностите с напасването на данните и намирането на адекватен модел за описание на промените във филмите, в ще се използват на отделни съставки от импеданса. Така, за анализ на изменението на импеданса с температурата, се оказва удачно да се проследят поотделно промените в $R_p(f)$ и $C_p(f)$. Наистина, беше намерено, че и двете величини се влияят от температурата, като съпротивлението в края на честотния диапазон $\max R_p$ показва ясно изразен максимум при

9.4 °C (Фиг.36). Тъй като и C_p има макар и слабо изразен минимум за тази температура, логично е да предположим наличие на фазов преход от гел към течно-кристална фаза. В зависимост от дължината и наситеността на веригите си, фосфатидилхолините имат най-различни точки на топене, простиращи се от -20 до $+50$ °C (табл.1). Трябва да се каже, че поради големия разброс в състава на срещашите се лецитини, в литературата няма данни за твърдо установен интервал на техния фазов преход. Както споменахме по-горе, това зависи от източника и условията за извличането им. Ето защо, така получената стойност звучи напълно правдоподобно.



Фиг.36. Зависимост на електричните параметри на лецитинов слой от температурата. Като индикаторни величини са избрани капацитета C_p при 4 kHz (■, ляво) и максималното съпротивление R_p (●, дясно). И на двете графики се забелязва екстремум при 9.4 °C. Непрекъснатите криви са бета-сплайн, прекаран за удобство, а пунктираната червена линия е апроксимация с лоренцова функция.

Phase Transition Temperatures for Phospholipids in Water

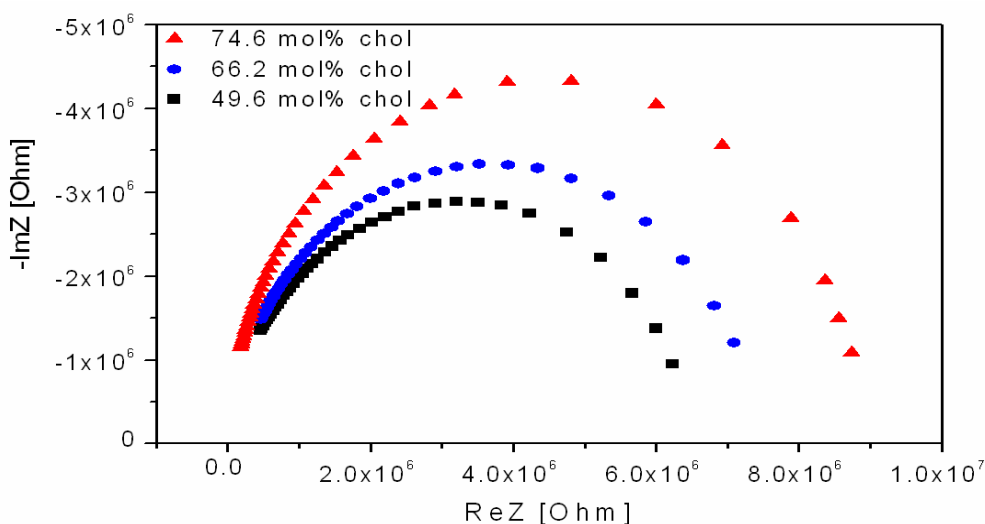
Phospholipid	Transition Temperature (T_m), °C
Dipalmitoyl phosphatidic acid (Di 16:0 PA)	67
Dipalmitoyl phosphatidylethanolamine (Di 16:0 PE)	63.8
Dipalmitoyl phosphatidylcholine (Di 16:0 PC)	41.4
Dipalmitoyl phosphatidylglycerol (Di 16:0 PG)	41.0
Dilauroyl phosphatidylcholine (Di 14:0 PC)	23.6
Distearoyl phosphatidylcholine (Di 18:0 PC)	58
Dioleoyl phosphatidylcholine (Di 18:1 PC)	-22
1-Stearoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine (1-18:0, 2-18:1 PC)	3
Egg phosphatidylcholine (Egg PC)	-15

Таблица 1. Температура на преход за някои от по-разпространените липиди [Garrett and Grisham,1998].

Освен това, прави впечатление, че графиката на зависимостта на $\max R_p$ от температурата е несиметрична. Това най-вероятно се дължи на хистерезис в пътищата на покачване и намаляване на температурата. Измервания са правени през няколко минути. Може би е необходим малко по-дълъг период на изчакване след смяна на температурата за да се даде възможност на филмите да се еквилибрират при новите условия.

3.2. Импедансно изследване на лецитинови филми съдържащи холестерол.

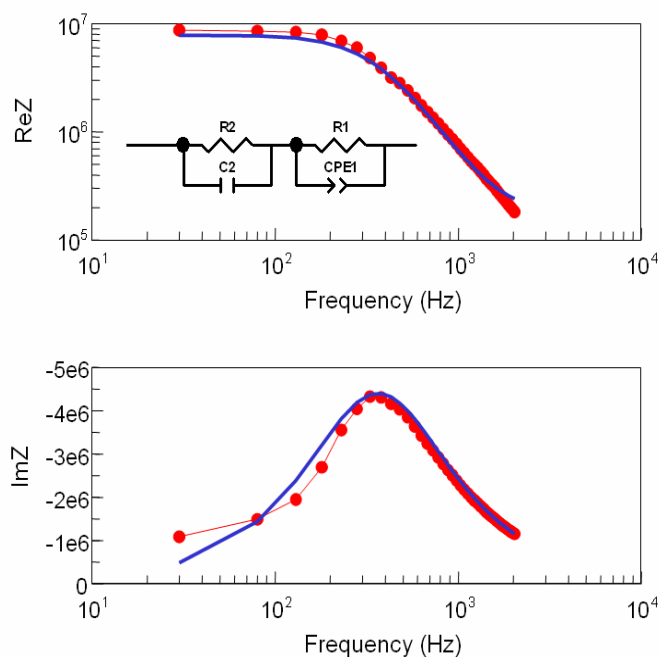
В съответствие със задачите на дисертацията, в настоящия параграф са разгледани резултатите от импедансното изследване на липидни филми съставени от лецитин и холестерол в различно теглово (wt/wt) съотношение – 1/0.5, 1/1 и 1/1.5. Като се вземат предвид молекулните тегла на веществата, се получават съответните моларни съдържания на холестерол – 49.6, 66.2 и 74.6 mol% респективно. Те са подбрани така, че първото от тях съответства на едно нормално (до високо) съдържание в плазмалемата, второто отговаря на границите за разтворимост на холестерола в мембранните фосфатидилхолини (PC), а третото е свръхвисоко, аномално.



Фиг.37. Найкуист диаграми на липидни филми с различно съдържание на холестерол. Измерванията са направени с програмата PhysLab в диапазона 130 Hz – 2 kHz (честотата нараства от дясно наляво!).

На Фиг.37 са показани данните получени за трите вида филми. В съзвучие с концепцията за уплътняващия ефект на холестерола (вж. по-горе condensing effect),

максималният импеданс нараства съвсем отчетливо с увеличаване на концентрацията на холестерола в сместа. Еквивалентният електричен модел на импеданса се състои от ARC елемент и независещ от честотата R,C кръг.

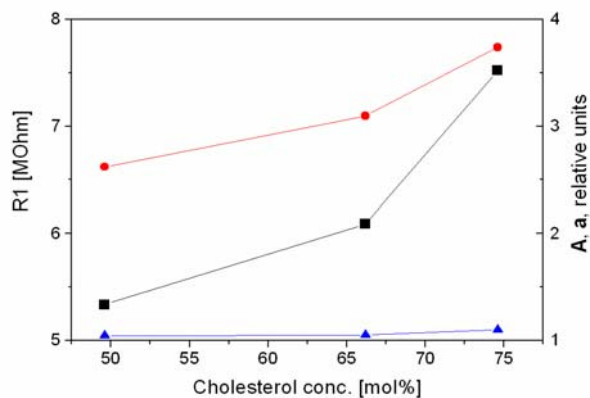


Фиг.38. Диаграми на Боде за липиден филм с 74.6 mol% съдържание на холестерол. Точките отговарят на експерименталните данни, а непрекъснатата синя линия на апроксимацията с посочения модел.

Таблица 2

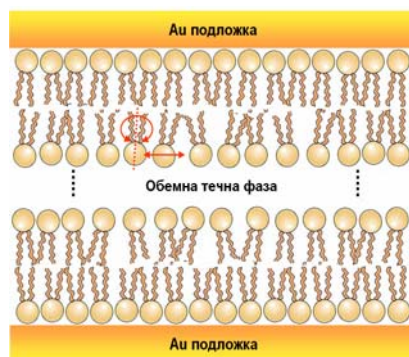
конц. chol. mol%	R2 [MΩ]	C2 [pF]	R1 [MΩ]	A .10 ¹⁰	a
49.6	0.283	7	5.335	2.62	1.043
66.2	0.302	7	6.089	3.097	1.051
74.6	0.248	7	7.519	3.737	1.1

Резултатите от напасването с посочения на фигурата модел са дадени като диаграми на Фиг.38 и в цифров вид в Таблица 2. Видно е, че параметрите на кръга **R2** и **C2** не се менят силно (**C2** дори е фиксиран за удобство), докато параметрите на ARC елемента **R1** и **A** съществено зависят от холестеролната концентрация (Фиг.39). Другият ARC параметър **a**, също не нараства много, а се колебае около единица което както знаем означава, че CPE клони към кондензатор.



Фиг.39. Зависимост на параметрите на еквивалентния модел от съдържанието на холестерол.

За съжаление обаче, не бихме могли да изберем по-простия модел, съставен от два обикновени R,C кръга защото в този случай процедурата на апроксимация силно се затруднява. Независимо от това е ясно, че изследваните филми са съставени от две подобласти, зависещи по различен начин от холестеролното съдържание. На базата на по-ранни изследвания, ние вече имаме изградени някакви представи за тях [Кочев, Карабалиев,2003]. Едната област (или по-точно двете върху двата електрода) представлява първият мономолекулен слой адсорбиран към металната повърхност, плюс евентуално още няколко прилежащи слоя, ориентирани съобразно първия. Подредеността в тези слоеве силно намалява от плътно опаковани молекули в контакт с метала, до напълно хаотично разположени при прехода към обемната течна фаза, която всъщност може да се счита за втората характерна област на филма (Фиг.40).

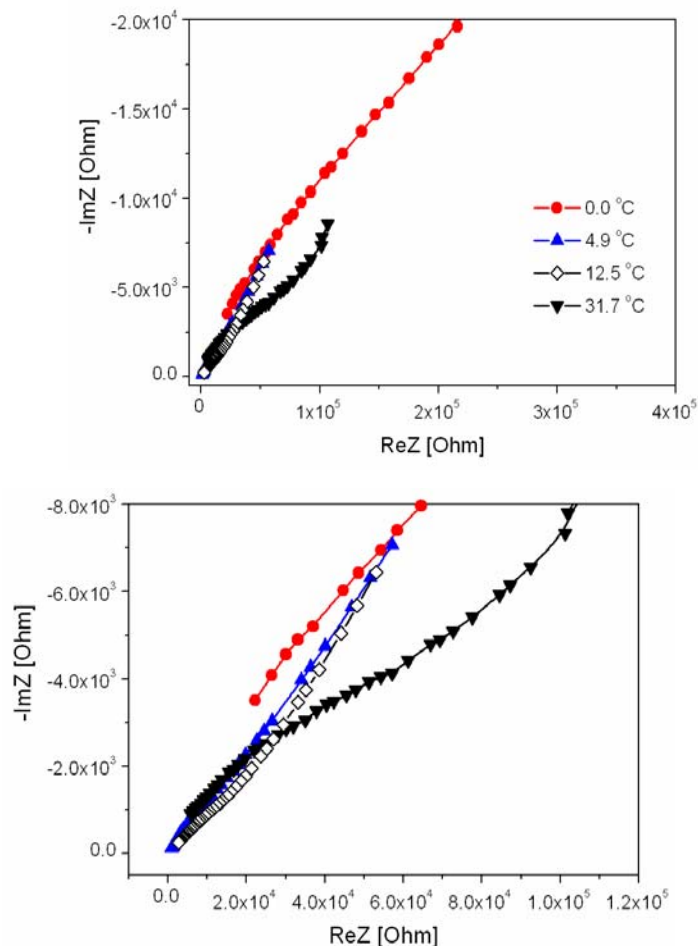


Фиг.40. Схематично представяне на подреждането на липидните молекули в близост до електродите.

Очевидно, подвижността (ротационна и латерална дифузия) на молекулите в слоя прилепен до подложката е затруднена поради силните адхезионни

взаимодействия с твърдата фаза. Характерно за тази зона с намалена мобилност е, че нейният импеданс в Найкуист формат представлява леко огъната линия, преминаваща в полуокръжност за обемната фаза [Karabaliiev and Kochev,2001,2003]. Това поведение се потвърждава и от резултатите показани на Фиг.35 (вдясно), откъдето се вижда, че с нарастване на температурата (увеличаване на подвижността) видът на диаграмите се променя от права (зелената линия) към полуокръжност. Ефектът на повишаване на холестеролната концентрация е подобен, но за съжаление това не се забелязва на Фиг.37 поради не дотам ниските честоти (130 Hz) от които започват измерванията.

Като още едно доказателство за направените дотук разсъждения могат да служат данните за импеданса на холестерол съдържащите филми при различни температури (Фиг.41).



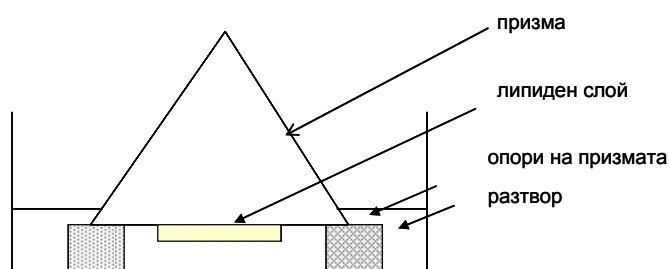
Фиг.41. Найкуист диаграми за липиден филм с 66.2 mol% съдържание на холестерол, получени при различни температури. Вдясно е показано увеличение за високите честоти от което по-добре се вижда типичната форма на кривите, която е характерна за всички температури от 0 до 40°C.

От представените на Фиг.41 резултати е явно, че в широк диапазон на температурата, поради уплътняващия ефект на холестерола, видът на Найкуист графиките е подобен на този за ниски температури на чисти лецитинови филми. Това показва, че при тези условия филмите се намират в твърда гел фаза. Температурата на преход към течно-кристално състояние е над 50 °С, тъй като холестеролът подрежда ацилните вериги в изпънато „транс” положение (Фиг.5А) и затруднява ротамеризацията и конформационното топене. Независимо от това се наблюдава, как с покачване на температурата кривите все по-отчетливо придобиват специфичната огъната форма, която е прекурсор на полуокръжност и права (Фиг.35, вдясно).

След направените дотук разглеждания, се надяваме, че получените резултати ще хвърлят допълнителна светлина върху изключително важния въпрос за стратификацията на дискутираните филми. Въпреки, че тяхната организация в субслоеве с характерна подредба на молекулите не буди съмнение и е потвърдена и с други методи [Mouritsen,2005], съвсем сигурно е, че са необходими допълнителни задълбочени изследвания за уточняване на финната структура на филмите и на механизмите които я пораждат.

3.3. Елипсометрично изследване на взаимодействието на лецитин и холестерол

Промените в поляризацията, измерени чрез елипсометрия, са изключително чувствителни към дебелината на филма (до нивото на монослоя), оптичните константи и микроструктурата на филма (като грапавост на повърхността, индексирание и смесване). Тази чувствителност на монослоя е полезна за изследване в реално време на слоево-слоино отлагане на филми, включително биологични монослоеве върху различни субстрати [14].

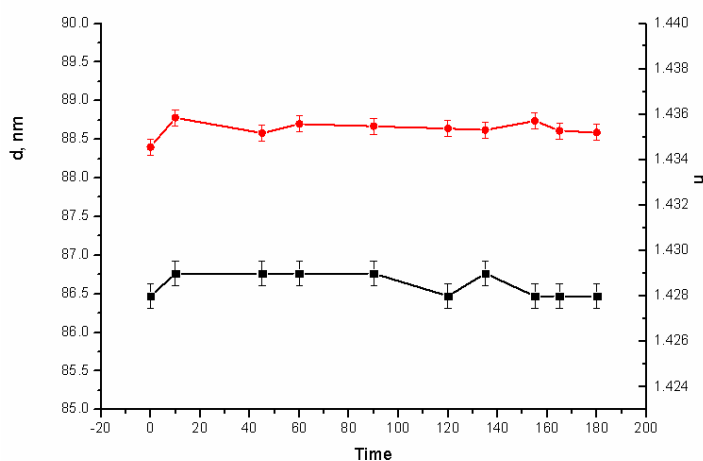


Фиг. 42 Изследване динамичните промени на липидния филм в среда (0,1 М КСl)

За изследване динамичните промени на липиден филм (лецитинов) чрез елипсометрия се използва 4 - слоен модел (Фиг. 42). Липидният слой адсорбира върху златната повърхност.

След измерване на дебелината и коефициента на пречупване на сухия липиден филм в клетката се вкарва 5 мл (0.1 М) KCl (Фиг 5). Изследва се кинетиката на образуване на липидния слой. Получените резултати за n и d на липидния филм са представени на Фиг. 43. Вижда се, че след първоначалното „набъбване” филмът не се променя с времето. Пресметнато е средно квадратичното на отклонението на истинската стойност от измерената:

$$\delta d = 0,011, \delta n = 2 \cdot 10^{-3}$$



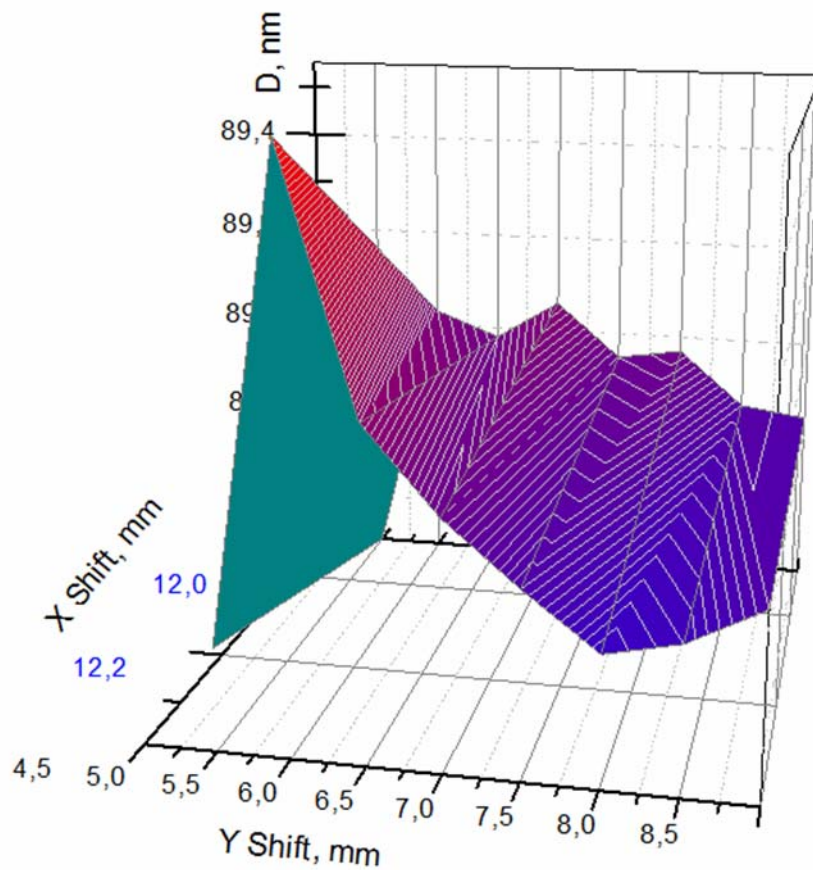
Фиг. 43 Получени резултати за кинетиката на образуване на липидния филм

Извън съмнение е изключителното значение на биомембраните не само за клетъчната морфология, но и за множество от важни, клетъчни процеси като сливане и делене, транспорт на вещества, участие в метаболизма, информационни процеси и т.н. Всички тези дейности се осъществяват благодарение на асоциираните с мембраната белтъци. Натрупаните в последно време познания показват обаче, че липидният бислой не е просто пасивна структура, а има активно отношение към вградените в него белтъци като по този начин се осигурява функционалното многообразие на биологичните мембрани.

Един от най-важните аспекти в тази насока е взаимодействието на асоциираните полипептиди с липидното си обкръжение. Липид-белтъчните взаимодействия са

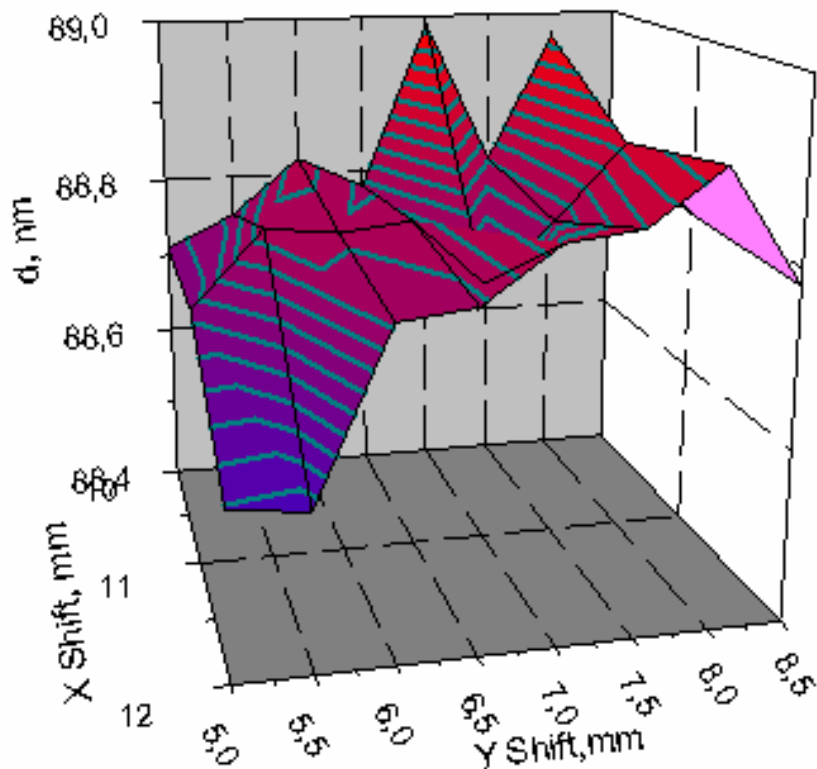
особено интересни за начините на вграждане в мембраната, а следователно и за тяхното нормално функциониране.

Тънките течни филми представляват много полезен модел за изучаване на специфичните молекулни взаимодействия в непосредствена близост до междуфазовите повърхности[12]. Те обединяват положителните характеристики на BLM (Bilayer Lipid Membrane) и LB-филмите (Lengmuir - Volget) и се явяват един добър компромис за изискванията при изграждането на биомембранните аналози – простота на получаването, стабилност и латерална подвижност на молекулите. Нехомогенността в профила на филма и развитието ѝ в процеса на изтъняване са изследвани елипсометрично [13] за случая на кварцова подложка. Представените експериментални резултати представляват зависимостите на показателя на пречупване и дебелината от разстоянието по дължината на диаметъра на филма. Те показват, че след приключил процес на изтъняване дебелината е почти еднаква навсякъде. В същото време, показателят на пречупване не се мени съществено, както по дължина на профила, така и с времето. Той е близък до 1.44, стойност получена и от други автори за липидни филми [14, 15]. Елипсометрията се явява сигурен и удобен метод за изучаване на повърхнинната динамика на биологични системи. Това е главното му преимущество, т.к. биологичните системи рядко са в покой – живата система по дефиниция е в движение и се основава на химични реакции, транспорт, синтез и деградация. Важно е също специфичността на взаимодействията между макромолекулите и техните функционални повърхнини. Следователно, ключов момент е контролът на отлагането и имобилизацията на биомолекулите.



Фиг.44 Взаимодействие на холестерол 20% с липид (лецитин – 80 мг/мл)

Тънкият филм получен от разтвор на 8 мг/мл лецитин и 20% холестерол се отлага по схемата на Фиг. 3.. Елипсометричните измервания започват след изчакване на 2 два часа за „набъбването” на слоя.

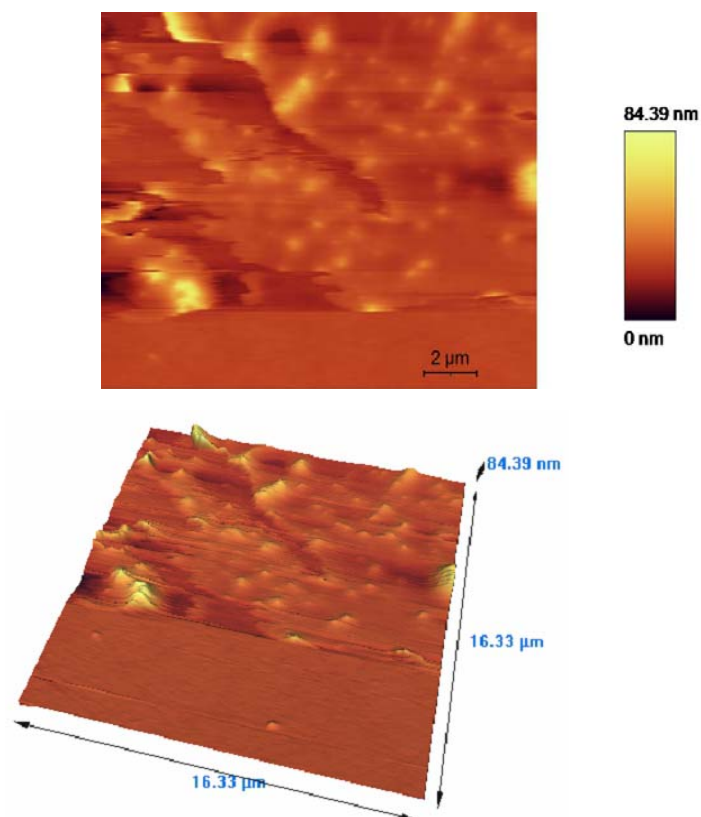


Фиг.45 Взаимодействие на холестерол 20% с липид (лецитин – 8 мг/мл)

Получаването на елипсометричните стойности се ограничава от размерите на петното на He-Ne лазер. Неговите параметри са по голямата ос 1 mm, а по малката ос 0,5 mm. Това са съответно X и Y осите.

Стойностите на елипсометричните ъгли Ψ и Δ са получени чрез използване на специализираната програма ELLI3M. За графичното представяне е използван OriginPro8.

Получените резултати за две концентрации на липида са представени на Фиг. 44 и Фиг. 45. Резултатите показват топологията на моделния филм. Началната стойност на образувания филм (липид/холестерол) съвпада с получените резултати за образуването на липидния филм, т.е. дебелината на филма в началното е 88,4 nm. Ясно се очертават холестеролните молекули над липидния слой.



Фиг. 46. AFM изследване на липиден филм (lecithin - 80 mg/ml) и 20% mol холестерол.

За сравнение получените резултати от АСМ изследването, потвърждава получените чрез елипсометрията резултати.

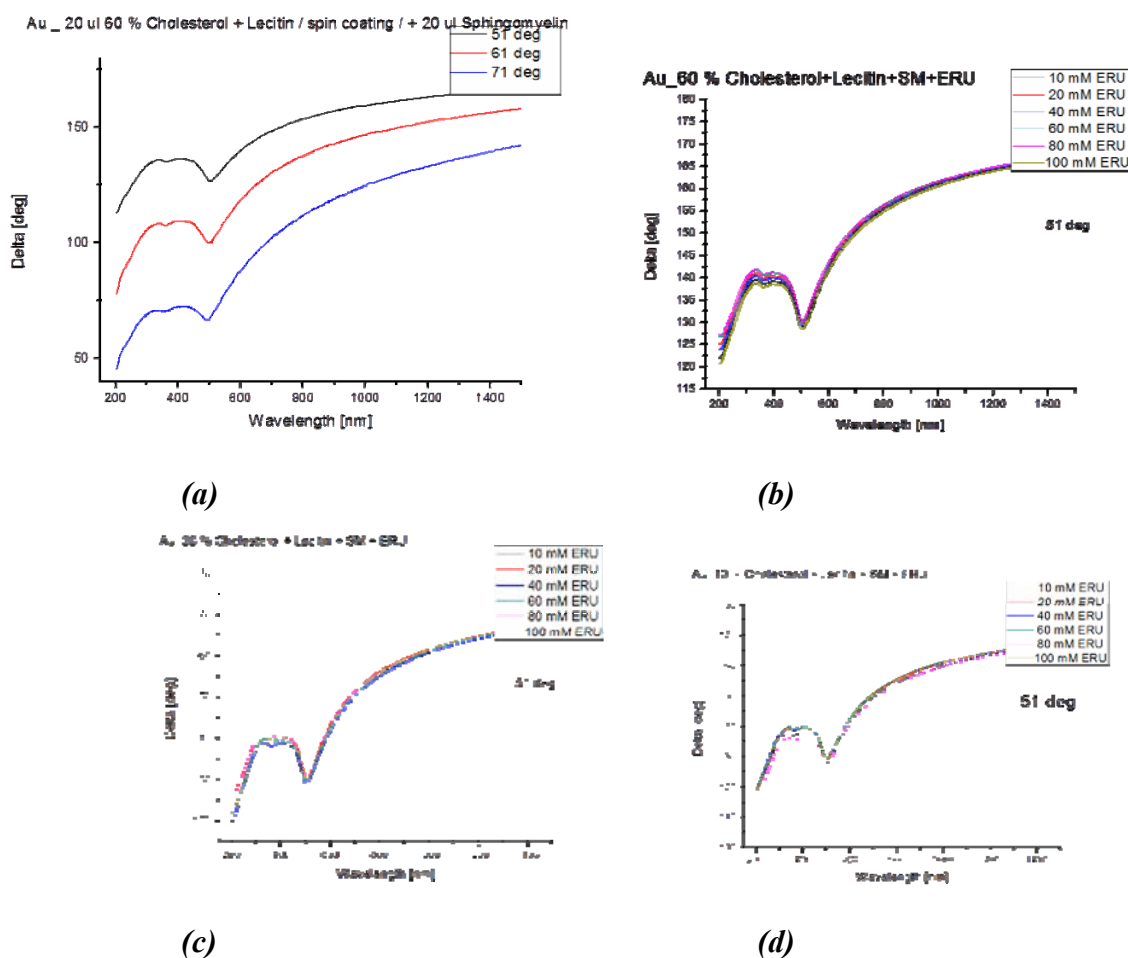
Взаимодействието на холестерола с липидната мембрана е от голямо значение за разбиране на причините за обществено важните неврологични заболявания като Алтцхаймер и Паркинсон. Поради това работа разглежда адсорбционните свойства на моделните липидни мембрани с биологично важни молекули – холестерол.

Получена е кинетиката на образуване на липидния слой върху подложка (призма) като резултатите от теоретичното и експериментално изследване са с много добро съвпадение (20 монослоя). За сравнение водещите изследователи в областта получават 80 моно слоя.

Топологията на адсорбционните повърхнини на холестерол и липид са получени чрез нулева елипсометрия. Ярко се очертават холестеролните образувания в липидния слой. Наблюдава се зависимост между концентрацията на липид и големината на нарастване на холестерол/липидния филм.

3.4. Елипсометрично изследване влиянието на антитуморния агент - еруфозин върху липидна моделна система.

В тази работа фокусът е върху влиянието на антитуморен агент еруфозин и промени, които създава в липидните бислоеве. Получените резултати са представени в липиди - лецитин и свингомиелин и 60 %, 30 % и 10% съотношения на холестерола при различни концентрации на EPC3 (10 - 100) μ M) (Фиг.46).



Фиг.46 Спектрална характеристика на елипсометричните параметри за елипсометрични ъгли Ψ и Δ и техните промени при различни условия: (a) показан е 60% холестерол + PC + SM в различни ъгли; (b) 10% холестерол + PC + SM + EPC3 в различни концентрации само за един ъгъл 51 °. (в) 30% холестерол + PC + SM + EPC3 в различни концентрации само за един ъгъл 51 °; (d) 60% холестерол + PC + SM + EPC3 в различни концентрации само за един ъгъл 51 °.

Експерименталните данни на спектралната елипсометрия показват двустепенна реорганизация на липидния слой. Дебелината на слоя се увеличава с

процент на холестерола. Добавянето на антитуморно средство в системата води до растеж на слоя до 60 μ M еруфозин.

За да се анализират резултатите и определи дебелините на получените слоеве чрез четислойния модел се използват данните за дължина на вълната 632 nm. Това се налага за по-точно определяне поради липса на заложен модел за изследване на биологични проби в софтуера на използвания спектрален елипсометър. Данните са представени в Таблица 3.

	Експериментално определяне на дебелината на липидния слой без EUR (nm)	Експериментално определяне на дебелината на липидния слой с EUR (nm)
<u>Златна подложка</u>		
60% Chol + Lec +SM +10mM EUR	78	82
30% Chol + Lec +SM +10mM EUR	77	79
10% Chol + Lec +SM +10mM EUR	76	78

Таблица 3 : Образованите липидни слоеве и влиянието на еруфозина

Получените данни показват, че повишената концентрация на еруфозин в системата води до по-дебел слой, който е показан с по-голям елипсометричен Δ ъгъл. Елипсометрията е удобен и бърз метод за изследване на свойствата и взаимодействията на биологичните моделни системи.

През последните години все повече изследователи обръщат поглед към изследване взаимодействието на моделни липидни мембрани в биологично важни молекули.

Получените резултати са едно много добро начало в изследване на взаимодействието на моделни липидни мембрани с биологично важни молекули.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационната работа изучава взаимодействието на холестерол и антитуморния агент еруфози в различни моделни системи, а така също и зависимостта на холестерол-липид от температурата.

Обобщавайки получените резултати от импедансната спектроскопия за лецитинов слой при различни температури се наблюдава фазов преход от гел към течно-кристална фаза при $9,4^{\circ}\text{C}$.

Импедансно изследване на лецитинови филми, съдържащи холестерол в съответните моларни съдържания на холестерол – 49.6, 66.2 и 74.6 mol% респективно потвърждава уплътняващата роля на холестерола. Максималният импеданс нараства съвсем отчетливо с увеличаване на концентрацията на холестерола в сместа. Предложен е модел - подвижността (ротационна и латерална дифузия) на молекулите в слоя прилепен до подложката е затруднена поради силните адхезионни взаимодействия с твърдата фаза. Потвърждение на хипотезата са получените резултати за импеданса на холестерол-съдържащите филми при различни температури

В дисертационната работа чрез елипсометрия се определя на дебелината и коефициента на пречупване на сухия и омокрен липиден филм. Направена е топология на липид-холестерол филм. Ясно се очертават холестеролните молекули над липидния слой. Резултатите са в съответствие с получените от АСМ.

Чрез спектрална елипсометрия е изяснено влиянието на антитуморния агент - еруфозин върху липидна моделна система. Експерименталните данни показват двустепенна реорганизация на липидния слой. Дебелината на слоя се увеличава с процента на холестерола. Добавянето на антитуморно средство в системата води до растеж на слоя до $60\ \mu\text{M}$ еруфозин.

ИЗВОДИ

Резултатите от дисертационния труд позволяват да се проследи взаимодействието на липидни моделни системи с биологично важни молекули - холестерол и антитуморния агент - еруфозин и да се направят следните изводи:

1. Елипсометричните изследвания на кинетиката на адсорбция на лецитинов филм показват, че след първоначалното „набъбване“ филмът не се променя с времето. Теоретичното и експериментално изследване са с много добро съвпадение (20 монослоя).

2. Началната стойност на образувания липид/холестеролен филм съвпада с получените резултати за образуването на липидния филм чрез елипсометрия.

3. Изследванията от спектралната елипсометрия показват увеличаване на слоя - холестерол/свингомиелин/фосфотидинхолин и еруфозин с увеличаване концентрацията на холестерола. Предлага се *двустепенен механизъм на реорганизация: бърза адсорбция и нарастване на линейните сегменти към повърхността.*

4. Чрез импедансните изследвания *е наблюдаван фазов преход от гел към течнокристална фаза при 9,4 ° C за лецитинов слой.*

5. Потвърдена е уплътняващата роля на холестерола за лецитинови филми, съдържащи холестерол за 49.6, 66.2 и 74.6 mol% респективно. Предлага се електрехимичен модел и хипотеза за обяснение резултатите. А именно *подвижността (ротационна и латерална дифузия) на молекулите в слоя прилепен до подложката е затруднена поради силните адхезионни взаимодействия с твърдата фаза.*

6. Импедансните изследвания на холестерол - съдържащите филми при различни температури потвърждават предложената хипотеза. В широк диапазон на температурата, поради уплътняващия ефект на холестерола, видът на Найкуист графиките е подобен на този за ниски температури на чисти лецитинови филми, следователно при тези условия филмите се намират в твърда гел фаза.

ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. За първи път е наблюдаван *фазов преход* от гел към течно-кристална фаза за лецитинен филм чрез импедансна спектроскопия при 9,4 ° C.

2. В широк температурен диапазон са изследвани холестерол - съдържащите филми. Потвърждава се чрез импедансни изследвания уплътняващият ефект на холестерола, а следователно и предложената хипотеза.

3. Изследването на кинетиката на адсорбция на лецитинен филм показва, че дебелината на филма не се променя с времето след първоначалното омокряне.

4. Показано е, че дебелината на липидния филм съвпада с началната стойност на образувания липид/холестерол филм.

5. За първи път се изследва влиянието на противотуморния агент еруфозин върху липидната моделна система- холестерол/свингомиелин/ хосфотидинхолин. Влиянието на холестерола върху липидната моделна ситема показва увеличаване на дебелината на слоя с нарастване на концентрацията му.

6. Влиянието на противотуморния агент еруфозин върху изследваната липидната моделна система води до допълнително нарастване дебелината на слоя.

Списък на публикациите, включени в дисертацията:

А) Статии в реферирани научни списания:

1. **V. Kochev**; Lilia Vladimirova; K. Bachev; M. Tanovska, „Electrochemical analysis of phase behavior of solid-supported lipid films. Influence of cholesterol”, *Electrochimica Acta*, 2014, 148, 244–248. (IF:5,01)
2. M. Tanovska, L. Vladimirova – Mihaleva, K. Bachev, **V. Kochev** “Electrochemical impedance investigation of cholesterol enriched supported films of lipids”, *Bulg. Chem. Commun.* 47(4) 2016, 30-33. (IF: 0,238)
3. Maya Tanovska, Mohsen Rahmani, Lilia Vladimirova - Mihaleva, Martin R Berger, Dragomir Neshev, Albena Momchilova, Rumiana Tzoneva., "An Ellipsometric Study of Interaction of Anti-cancer Agent Erufosine on Lipid Model Systems," **accepted**

Б) Доклади на научни конференции:

1. **10th International Symposium on Electrochemical Impedance Analysis (EIA)** (Borovetz, Bulgaria, 2014): “Electrochemical impedance investigation of cholesterol enriched supported films of lipids”, M. Tanovska, L. Vladimirova – Mihaleva, K. Bachev, **V. Kochev**
2. **19th International Scientific Conference of Young Scientists and Specialists of JINR AYSS-015 Dedicated to the 100th Anniversary of the birth of F.L.Shapiro** (Dubna, Russia, 2015): Influence of gamma radiation on the homeostasis of iron", L. Vladimirova–Mihaleva, M. Tanovska, At. Papucharov.
3. **5th Regional Symposium on Electrochemistry – South East Europe (5thRSE-SEE)** (June 7-11, 2015, Pravets, Bulgaria): "An impedance study of the influence of anti-cancer agent Erufosine on breast cancer cells", L. Vladimirova-Mihaleva, M. V.Tanovska, P.Tsonev, S. Apostolova, V. Uzunova and R. Tzoneva.
4. **Photonica 2015** (August 2015, Belgrade, Serbia): "Ellipsometric and AFM Study of Adsorption Properties of Model Lipid Membranes with Biological Molecules", M. V. Tanovska, L.S.Vladimirova -Mihaleva, A. Andreeva, N, Zografov and M. Mihalev.
5. *Pavlin Tsonev, Maya Tanovska, Ulia Vinogradova, Lilia Vladimirova-Mihaleva, Evgenii Krasavin, Mihail Ostrovskii, A Study of Functional Activity of the Retina after Irradiation with Visible Light and Ionizing Radiation from 60Co* , Научна сесия „Биомедицина и качество на живот – младите в науката“, България/София 2017

6. *Maya Tanovska, Lilia Vladimirova-Mihaleva, Dragomir N. Neshev*, **Detection of ferritin adsorption with plasmonic and dielectric nanostructures**, 16th Annual Workshop, Австралия/Wyong NSW 2259 2017

7. *Maya Tanovska, Marika Niihori, Mohsen Rahmani, Lilia Vladimirova - Mihaleva, Dragomir Neshev*, **Ellipsometric Detection of Ferritin Adsorption on Gold after UV Irradiation**, BPU10, България/София 2018

8. *Maya Tanovska, Mohsen Rahmani, Lilia Vladimirova - Mihaleva, Martin R Berger, Dragomir Neshev, Albena Momchilova, Rumiana Tzoneva.*, **An Ellipsometric Study of Interaction of Anti-cancer Agent Erufosine on Lipid Model Systems**, BPU10, България/София 2018

В) Статии извън дисертацията:

1. Pavlin Tsonev, Maya Tanovska, Ulia Vinogradova, Lilia Vladimirova-Mihaleva, Evgenii Krasavin, Mihail Ostrovskii, "A Study of Functional Activity of the Retina after Irradiation with Visible Light and Ionizing Radiation from ^{60}Co ", **accepted**

ЛИТЕРАТУРА:

- [1] М. Тановска, В. Кочев, Проучване на възможностите за използване на импедансния анализ за изследване на липид-холестеролни филми върху твърда подложка
- [2] O.G.Mouritsen and M.J.Zuckermann, (2004), What's so special about cholesterol?, *Lipids*, 39: 1101-1113.
- [3] K.Bloch, (1965), The biological synthesis of cholesterol, *Science*, 150: 19–28.
- [4] M.S.Brown and J.L.Goldstein, (1999), A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 11,041–11,048.
- [5] Yee-Hung M Chan and Steven G Boxer, *Model Membrane Systems and Their Applications*, *Curr Opin Chem Biol*. 2007 December ; 11(6): 581–587
- [6] Mark Norman Mahadeo, *Impact of Lipid Based Anticancer Drugs on Biomimetic Lipid Models and Eukaryotic Membranes* ; 2017 September
- [7] E. Gorter and F Grendel. On biomolecular layers of lipoids on chromatocytes of blood. *J. Exp. Medicine*, 41:439–443, 1925
- [8] Singer S. J. and Garth L. Nicolsen. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023):720–731, 1972.
- [9] Ole G Mouritsen. *Life - as a matter of fat*. Springer, 2005.
- [10] K.Bloch, (1987), Summing up, *Annual Review of Biochemistry*, 56: 1–19.
- [11] R. H. Garrett and C. M. Grisham, *Biochemistry*, 2nd ed. Orlando: Saunders, 1998.
- [12] D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed., W. H. Freeman and Company, New York, 2005.
- [13] O. G. Mouritsen, *Life as a Matter of Fat. The emerging science of lipidomics*, Springer Verlag, Heidelberg, 2005.
- [14] Summons et al., 2006
- [15] Р. Маринова, Ф. Симеонов, В. Кочев, „Моделни мембранни системи“, изд. “Парадигма”, София, 2012
- [16] John R. Silvius*, *Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1610 (2003) 174– 183
- [17] Yee-Hung M Chan and Steven G Boxer, *Model Membrane Systems and Their Applications*, *Curr Opin Chem Biol*. 2007 December ; 11(6): 581–587
- [18] В. Кочев, Кратки теми за студенти по биофизика и медицинска физика
- [19] [6] [7] Louis A. Bagatolli. To see or not to see: Lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758:1541–1556, 2006.
- [20] [4] D. Fennell Evans. *The colloidal domain where physics, chemistry and biology meet*. Wiley-VCH, Second ed., 1999.
- [21] Adam Cohen Simonsen. *Biomembrane frontiers: Nanostructures, models, and the design of life (handbook of modern biophysics)*. Humana Press, 2009.
- [22] European Commission Health and Consumer Protection Directorate – General. *Report of the Scientific Committee on Food on composition and specification of food intended to meet the expenditure of intense muscular effort, especially for sportsmen*, 2001
- [23] *The Science of Biology*, biology.org.ua/files/lib/Raven_Johnson_McGraw-Hill_Biology.pdf
- [24] W.C.Griffin, (1949), Classifications of surface- active agents by hydrophilicity lipophilicity balance, *J. Soc. Cosmetic Chemists* 1; 311 – 326.
- [25] W. Kauzmann, (1959), Some factors in the interpretation of protein denaturation, *Adv. Protein Chem.*, 14: 1 – 63.
- [26] J.M.Seddon, (1990), Structure of inverted hexagonal (HII) phases and non-bilayer phase transition of lipids, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1031: 1-69
- [27] G. Pabst, (2006), Global properties of biomimetic membranes, perspectives on molecular features, *Biophys. Rev. Lett.*, 1(1): 57 – 84.
- [28] R.H.Templer, J.M.Seddon, N.A.Werrender, A.Syrykh, Z.Huang, R.Winter, J.Erbes (1998), Inverse bicontinuous cubic phases in 2:1 fatty acid phosphatidylcholine mixtures. The effect of chain length, hydration, and temperature, *J. Phys. Chem. B*. 102 : 7251 – 7261.

- [29] D.Marsh, (1996), Lateral pressure in membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1286: 183-223.
- [30] B.D. Ladbrooke, R.M. Williams, D. Chapman, *Biochim. Biophys. Acta* 150 (1968) 333– 340.
- [31] S. Mabrey, P.L. Mateo, J.M. Sturtevant, *Biochemistry* 17 (1978) 2464– 2468.
- [32] 32. John R. Silvius*; Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems; *Biochimica et Biophysica Acta* 1610 (2003) 174– 183.
- [33] 33. Chiranjeevi Peetla, Andrew Stine, and Vinod Labhasetwar*; Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery; *Mol Pharm. Author manuscript*; available in PMC 2010 September 1; 1264–1276. doi:10.1021/mp9000662.
- [34] 34. Pablo Ríos-Marco, Carmen Marco, Xiomara Gálvez, José M. Jiménez-López, María P. Carrasco; Alkylphospholipids: An update on molecular mechanisms and clinical relevance; *Biochimica et Biophysica Acta* 1859 (2017) 1657–1667.
- [35] 35. W.J. van Blitterswijk, M. Verheij, Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects, *Curr. Pharm. Des.* 14 (2008) 2061–2074.
- [36] 36. W.J. van Blitterswijk, M. Verheij, Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids, *Biochim. Biophys. Acta* 1831 (2013) 663–674.
- [37] 37. K. Danker, W. Reutter, G. Semini, Glycosidated phospholipids: uncoupling of signalling pathways at the plasma membrane, *Br. J. Pharmacol.* 160 (2010) 36–47.
- [38] 38. J. de A. Pachioni, J.G. Magalhães, E.J. Lima, L. de M. Bueno, J.F. Barbosa, M.M. de Sá, C.O. Rangel-Yagui, Alkylphospholipids—a promising class of chemotherapeutic agents with a broad pharmacological spectrum, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 16 (2013) 742–759
- [39] 39. G. Arthur, R. Bittman, Glycosylated antitumor ether lipids: activity and mechanism of action, *Anti Cancer Agents Med. Chem.* 14 (2014) 592–606.
- [40] 40. C. Marco, P. Ríos-Marco, J.M. Jiménez-López, J.L. Segovia, M.P. Carrasco, Antitumoral alkylphospholipids alter cell lipid metabolism, *Anti Cancer Agents Med. Chem.* 14 (2014) 545–558.
- [41] 41. A. Kostadinova, T. Topouzova-Hristova, A. Momchilova, R. Tzoneva, M.R. Berger, Antitumor lipids-structure, functions, and medical applications, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 101 (2015) 27–66.
- [42] 42. M.R. Berger, S. Sobottka, S.M. Konstantinov, H. Eibl, Erucylphosphocholine is the prototype of i.v. injectable alkylphosphocholines, *Drugs Today* 34 (1998) 73–81.
- [43] 43. R.G. Bagley, L. Kurtzberg, C. Rouleau, M. Yao, B.A. Teicher, Erufosine, an alkylphosphocholine, with differential toxicity to human cancer cells and bone marrow cells, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68 (2011) 1537–1546.
- [44] 44. D.Y. Yosifov, P.T. Todorov, M.M. Zaharieva, K.D. Georgiev, B.A. Pilicheva, S.M. Konstantinov, M.R. Berger, Erucylphospho-N,N,N-trimethylpropylammonium (erufosine) is a potential antimyeloma drug devoid of myelotoxicity, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 67 (2011) 13–25.
- [45] 45. B. Erdlenbruch, V. Jendrossek, M. Marx, A. Hunold, H. Eibl, M. Lakomek, Antitumor effects of erucylphosphocholine on brain tumor cells in vitro and in vivo, *Anticancer Res.* 18 (1998) 2551–2557.
- [46] 46. V. Jendrossek, K. Hammersen, B. Erdlenbruch, W. Kugler, R. Krügener, H. Eibl, M. Lakomek, Structure-activity relationships of alkylphosphocholine derivatives: antineoplastic action on brain tumor cell lines in vitro, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 50 (2002) 71–79.
- [47] 47. S.M. Konstantinov, M.R. Berger, Human urinary bladder carcinoma cell lines respond to treatment with alkylphosphocholines, *Cancer Lett.* 144 (1999) 153–160.
- [48] 48. A. Rübél, R. Handrick, L.H. Lindner, M. Steiger, H. Eibl, W. Budach, C. Belka, V. Jendrossek, The membrane targeted apoptosis modulators erucylphosphocholinem and erucylphosphohomocholine increase the radiation response of human glioblastoma cell lines in vitro, *Radiat. Oncol.* 1 (2006) 6–23
- [49] 49. M. Fiegl, L.H. Lindner, M. Juergens, H. Eibl, W. Hiddemann, J. Braess, Erufosine, a novel alkylphosphocholine, in acute myeloid leukemia: single activity and combination with other antileukemic drugs, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 62 (2008) 321–329.
- [50] 50. S.K. Königs, C.P. Pallasch, L.H. Lindner, J. Schwamb, A. Schulz, R. Brinker, J. Claasen, A. Veldurthy, H. Eibl, M. Hallek, C.M. Wendtner, Erufosine, a novel alkylphosphocholine, induces apoptosis in CLL through a caspase-dependent pathway, *Leuk. Res.* 34 (2010) 1064–1069

- [51] 51. I.K. Dineva, M.M. Zaharieva, S.M. Konstantinov, H. Eibl, M.R. Berger, Erufosine suppresses breast cancer in vitro and in vivo for its activity on PI3K, c-Raf and Akt proteins, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 138 (2012) 1909–1917.
- [52] 52. L.H. Lindner, H. Eibl, M. Hossann, M. Vogeser, Quantification of erufosine, the first intravenously applicable alkylphosphocholine, in human plasma by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a deuterated internal standard, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 869 (2008) 16–19.
- [53] 53. M.M. Zaharieva, M. Kirilov, M. Chai, S.M. Berger, S. Konstantinov, M.R. Berger, Reduced expression of the retinoblastoma protein shows that the related signaling pathway is essential for mediating the antineoplastic activity of erufosine, *PloS One* 9 (2014), e100950.
- [54] 54. Langen P, Maurer HR, Brachwitz H, et al (1992) Cytostatic effects of various alkyl phospholipid analogues on different cells in vitro. *Anticancer Res* 12:2109–2112.
- [55] 55. Modolell M, Andreesen R, Pahlke W, Brugger U, Munder PG (1979) Disturbance of phospholipid metabolism during the selective destruction of tumor cells induced by alkyllysophospholipids. *Cancer Res* 39:4681–4686.
- [56] 56. Unger C, Fleer EA, Kotting J, Neumuller W, Eibl H (1992) Antitumoral activity of alkylphosphocholines and analogues in human leukemia cell lines. *Prog Exp Tumor Res* 34:25–32.
- [57] 57. Michael Fiegl Æ Lars H. Lindner Æ Matthias Juergens Æ Hansjoerg Eibl Æ Wolfgang Hiddemann Æ Jan Braess; Erufosine, a novel alkylphosphocholine, in acute myeloid leukemia: single activity and combination with other antileukemic drugs; *Cancer Chemother Pharmacol* (2008) 62:321–329; DOI 10.1007/s00280-007-0612-7.
- [58] 58. Asim Pervaiz, Saqib Mahmood and Martin R. Berger; Erufosine, a third-generation alkylphosphocholine with cytotoxic and cytostatic effects in breast and colorectal cancer cells; *Proceedings: AACR Annual Meeting 2017; April 1-5, 2017; Washington, DC; DOI: 10.1158/1538-7445.AM2017-116* Published July 2017
- [59] 59. Braess J, Fiegl M, Lorenz I, Waxenberger K, Hiddemann W (2005) Modeling the pharmacodynamics of highly schedule; dependent agents: exemplified by cytarabine-based regimens in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 11:7415–7425
- [60] 60. Fiegl M, Juergens M, Hiddemann W, Braess J (2007) Cytotoxic activity of the third-generation bisphosphonate zoledronic acid in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 31:531–539.
- [61] 61. Henke G, Lindner LH, Vogeser M, Eibl H, Wörner J, Müller AC, et al. Pharmacokinetics and biodistribution of Erufosine in nude mice implications for combination with radiotherapy. *Radiat Oncol.* 2009; 4: 46.
- [62] 62. Erdlenbruch B, Jendrossek V, Gerriets A, Vetterlein F, Eibl H, Lakomek M. Erucylphosphocholine: pharmacokinetics, biodistribution and CNS—accumulation in the rat after intravenous administration. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1999; 44: 484–490.
- [63] 63. Hilgard P, Klenner T, Stekar J, Nössner G, Kutscher B, Engel J. D-21266, a new heterocyclic alkylphospholipid with antitumour activity. *Eur. J. Cancer.* 1997; 33: 442–446.
- [64] 64. Sobottka SB and Berger MR. Assessment of antineoplastic agents by MTT assay: Partial underestimation of antiproliferative properties. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology.* 1992; 30: 385–393.
- [65] 65. Chometon G, Cappuccini F, Raducanu A, Aumailley M, Jendrossek V. The Membrane targeted Alkylphosphocholine Erufosine Interferes with Survival Signals from the Extracellular Matrix. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.* 2014; 14: 578-591.
- [66] 66. Dineva IK, Zaharieva MM, Konstantinov SM, Eibl H, Berger MR. Erufosine suppresses breast cancer in vitro and in vivo for its activity on PI3K, c-Raf and Akt proteins. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.* 2012; 138: 1909–1917.
- [67] 67. Kapoor V, Zaharieva MM, Das SN, Berger MR. Erufosine simultaneously induces apoptosis and autophagy by modulating the Akt-mTOR signaling pathway in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2012; 319: 39–48.
- [68] 68. Stoyanova T., Uzunova V., Popova D, Hadzhilazova M., Berger M., Momchilova A, Toshkova R., and Tzoneva R; Effect of Erufosine on MDA-MB 231 Breast Cancer Cells; *Journal of Oncology Research Forecast; Rapid Communication* Published: 26 Jan, 2018.
- [69] 69. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al: Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 380:2095–2128. 2012.

- [70] 70. Siegel R, Naishadham D and Jemal A: Cancer Statistics 2013. *CA Cancer J Clin.* 63:11–30. 2013. View Article : Google Scholar.
- [71] 71. Buyse M, Thirion P, Carlson RW, Burzykowski T, Molenberghs G and Piedbois P: Relation between tumour response to first-line chemotherapy and survival in advanced colorectal cancer: a meta-analysis. *Lancet.* 356:373–378. 2000. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI.
- [72] 72. Hoff PM, Ansari R, Batist G, et al: Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first-line treatment in 605 patients with metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase III study. *J Clin Oncol.* 19:2282–2292. 2001.
- [73] 73. Porschen R, Arkenau HT, Kubicka S, et al: Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and leucovorin plus oxaliplatin in metastatic colorectal cancer: a final report of the AIO Colorectal Study Group. *J Clin Oncol.* 25:4217–4223. 2007. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI.
- [74] 74. Fuchs CS, Marshall J, Mitchell E, et al: Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C Study. *J Clin Oncol.* 25:4779–4786. 2007. View Article : Google Scholar.
- [75] 75. Hilgard P, Klenner T, Stekar J and Unger C: Alkylphosphocholines: a new class of membrane-active anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 32: 90-95, 1993.
- [76] 76. Berkovic D: Cytotoxic ether-phospholipid analogues. *Gen Pharmacol* 31: 511-517, 1998
- [77] 77. Vink SR, van Blitterswijk WJ, Schellens JHM and Verheij M: Rationale and clinical application of alkylphospholipid analogues in combination with radiotherapy. *Cancer Treat Rev* 33: 191-202, 2007.
- [78] 78. Van Blitterswijk WJ and Verheij M: Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1831: 663-674, 2013.
- [79] 79. Van Blitterswijk WJ and Verheij M: Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1831: 663-674, 2013.
- [80] 80. Yosifov DY, Todorov PT, Zaharieva MM, Georgiev KD, Pilicheva BA, Konstantinov SM and Berger MR: Erucylphospho-N,N,N-trimethylpropylammonium (erufosine) is a potential antimyeloma drug devoid of myelotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* 67: 13-25, 2011
- [81] 81. Georgieva MC, Konstantinov SM, Topashka-Ancheva M and Berger MR: Combination effects of alkylphosphocholines and gemcitabine in malignant and normal hematopoietic cells. *Cancer Lett* 182: 163-174, 2002.
- [82] 82. Bagley RG, Kurtzberg L, Rouleau C, Yao M and Teicher BA: Erufosine, an alkylphosphocholine, with differential toxicity to human cancer cells and bone marrow cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 68: 1537-1546, 2011.
- [83] 83. Zaharieva MM, Konstantinov SM, Pilicheva B, Karaivanova M and Berger MR: Erufosine - a membrane targeting antineoplastic agent with signal transduction modulating effects. *Ann NY Acad Sci* 1095: 182-192, 2007.
- [84] 84. Fiegl M, Lindner LH, Juergens M, Eibl H, Hiddemann W and Braess J: Erufosine, a novel alkylphosphocholine, in acute myeloid leukemia: single activity and combination with other antileukemic drugs. *Cancer Chemother Pharmacol* 62: 321- 329, 2008.
- [85] 85. Martelli AM, Papa V, Tazzari PL, et al: Erucylphosphocholine, the first intravenously applicable alkylphosphocholine, is cytotoxic to acute myelogenous leukemia cells through JNK- and PP2A-dependent mechanisms. *Leukemia* 24: 687- 698, 2010
- [86] 86. Königs SK, Pallascha CP, Lindnerb LH, et al: Erufosine, a novel alkylphosphocholine, induces apoptosis in CLL through a caspase-dependent pathway. *Leuk Res* 34: 1064-1069, 2010.
- [87] 87. Yosifov DY, Reufsteck C, Konstantinov SM and Berger MR: Interleukin-6, osteopontin and Raf/MEK/ERK signaling modulate the sensitivity of human myeloma cells to alkylphosphocholines. *Leuk Res* 36: 764-772, 2012.
- [88] 88. Konstantinov SM and Berger MR: Human urinary bladder carcinoma cell lines respond to treatment with alkylphosphocholines. *Cancer Lett* 144: 153-160, 1999.
- [89] 89. Dineva IK, Zaharieva MM, Konstantinov SM, Eibl H and Berger MR: Erufosine suppresses breast cancer in vitro and in vivo for its activity on PI3K, c-Raf and Akt proteins. *J Cancer Res Clin Oncol* 138: 1909-1917, 2012.

- [90] 90. Kapoor V, Zaharieva MM, Das SN and Berger MR: Erufosine simultaneously induces apoptosis and autophagy by modulating the Akt-mTOR signaling pathway in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 319: 39-48, 2012.
- [91] 91. Lemeshko VV and Kugler W: Synergistic inhibition of mitochondrial respiration by anticancer agent erucylphosphocholine and cyclosporin A. *J Biol Chem* 282: 37303-37307, 2007.
- [92] 92. Rübél A, Handrick R, Lindner LH, et al: The membrane targeted apoptosis modulators erucylphosphocholine and erucylphosphohomocholine increase the radiation response of human glioblastoma cell lines in vitro. *Radiat Oncol* 1: 6, 2006.
- [93] 93. Veenman L, Alten J, Linnemannstöns K, et al: Potential involvement of F0F1-ATP(synthase) and reactive oxygen species in apoptosis induction by the antineoplastic agent erucylphosphohomocholine in glioblastoma cell lines: a mechanism for induction of apoptosis via the 18 kDa mitochondrial translocator protein. *Apoptosis* 15: 753-768, 2010.
- [94] 94. Rudner J, Ruiner CE, Handrick R, Eibl HJ, Belka C and Jendrossek V: The Akt-inhibitor erufosine induces apoptotic cell death in prostate cancer cells and increases the short term effects of ionizing radiation. *Radiat Oncol* 5: 108, 2010.
- [95] 95. Berger MR, Tsoneva I, Konstantinov SM and Eibl H: Induction of apoptosis by erucylphospho-N,N,N-trimethylammonium is associated with changes in signal molecule expression and location. *Ann NY Acad Sci* 1010: 307-310, 2003.
- [96] 96. Sobottka SB and Berger MR: Assessment of antineoplastic agents by MTT assay: partial underestimation of antiproliferative properties. *Cancer Chemother Pharmacol* 30: 385-393, 1992.
- [97] 97. Sobottka SB, Berger MR and Eibl H: Structure-activity relationships of four anti-cancer alkylphosphocholine derivatives in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 53: 418-425, 1993.
- [98] 98. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63, 1983.
- [99] 99. Liang CC, Park AY and Guan JL: In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method or analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2: 329-333, 2007.
- [100] 100. Rothbarth J, Koevoets C, Tollenaar RA, Tilby MJ, van de Velde CJ, Mulder, GJ and Kuppen PJ: Immunohistochemical detection of melphalan-DNA adducts in colon cancer cells in vitro and human colorectal liver tumours in vivo. *Biochem Pharmacol* 67: 1771-1778, 2004.
- [101] 101. Haynes RH, Eckardt F and Kunz BA: The DNA damage-repair hypothesis in radiation biology: comparison with classical hit theory. *Br J Cancer* 49: 81-90, 1984.
- [102] 102. Orr JS: Concepts, problems and the role of modifying agents in the relationship between recovery of cells' survival ability and mechanisms of repair of radiation lesions. *Br J Cancer (Suppl)* 49: 1-6, 1984.
- [103] 103. Hall EJ and Brenner DJ: Radiobiology of low- and high-dose-rate brachytherapy. In: *Technical Basis of Radiation Therapy*. 4th edition. Levitt SH, Purdy JA, Perez CA and Vijayakumar S (eds). Springer Verlag, Berlin, pp291-307, 2008.
- [104] 104. Miura K, Fujibuchi W, Ishida K, et al: Inhibitor of apoptosis protein family as diagnostic markers and therapeutic targets of colorectal cancer. *Surg Today* 41: 175-182, 2011.
- [105] 105. Berger MR: The insulin-like growth factor binding proteins 3 and 7 are associated with colorectal cancer and liver metastasis. *Cancer Biol Ther* 12: 69-79, 2011.
- [106] 106. Kawamura M, Toiyama Y, Tanaka K, et al: CXCL5, a promoter of cell proliferation, migration and invasion, is a novel serum prognostic marker in patients with colorectal cancer. *Eur J Cancer* 48: 2244-2251, 2012.
- [107] 107. Kabra N, Li Z, Chen L, et al: SirT1 is an inhibitor of proliferation and tumor formation in colon cancer. *J Biol Chem* 284: 18210-18217, 2009.
- [108] 108. Yosifov DY, Dineva IK, Zaharieva MM, Konstantinov SM and Berger MR: The expression level of the tumor suppressor retinoblastoma protein (Rb) influences the antileukemic efficacy of erucylphospho-N,N,N-trimethylpropylammonium (ErPC3). *Cancer Biol Ther* 6: 930-935, 2007.
- [109] 109. DeGregori J: The Rb network. *J Cell Sci* 117: 3411-3413, 2004.
- [110] 110. Kugler W, Buchholz F, Köhler F, Eibl H, Lakomek M and Erdlenbruch B: Downregulation of Apaf-1 and caspase-3 by RNA interference in human glioma cells: consequences for erucylphosphocholine-induced apoptosis. *Apoptosis* 10: 1163-1174, 2005.
- [111] 111. Yang SY, Bolvin C, Sales KM, Fuller B, Seifalian AM and Winslet MC: IGF-I activates caspases 3/7, 8 and 9 but does not induce cell death in colorectal cancer cells. *BMC Cancer* 9: 158, 2009.

- [112] 112. Nhan TQ, Liles WC and Schwartz SM: Physiological functions of caspases beyond cell death. *Am J Pathol* 169: 729-737, 2006.
- [113] 113. Bröker LE, Kruyt FAE and Giaccone G: Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 11: 3155-3162, 2005.
- [114] 114. Naumann U, Wischhusen J, Weit S, Rieger J Wolburg H, Massing U and Weller M: Alkylphosphocholine-induced glioma cell death is BCL-XL-sensitive, caspase-I independent and characterized by massive cytoplasmic vacuole formation. *Cell Death Differ* 11: 1326-1341, 2004.
- [115] 115. Eibl, KH, Kook D, Priglinger S, Haritoglou C, Yu A, Kampik A and Welge-Lüssen U: Inhibition of human retinal pigment epithelial cell attachment, spreading, and migration by alkylphosphocholines. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 364-370, 2006.
- [116] 116. Hendriks T, Martens MF, Huyben CM and Wobbes T: Inhibition of basal and TGFJ-induced fibroblast collagen synthesis by antineoplastic agents. Implications for wound healing. *Br J Cancer* 67: 545-550, 1993.
- [117] 117. Louneva N, Saitta B, Herrick DJ and Jimenez SA: Transcriptional inhibition of type I collagen gene expression in scleroderma fibroblasts by the antineoplastic drug ecteinascidin 743. *J Biol Chem* 278: 40400-40407, 2003.
- [118] 118. Ferda Kaleagasioglu and Martin R. Berger; Differential effects of erufosine on proliferation, wound healing and apoptosis in colorectal cancer cell lines; Toxicology and Chemotherapy Unit, German Cancer Research Center, D-69120 Heidelberg, Germany; Received October 22, 2013; Accepted November 21, 2013; ONCOLOGY REPORTS 31: 1407-1416, 2014; DOI: 10.3892/or.2013.2942
- [119] 119. A. Rothen, "The ellipsometer, an apparatus to measure thicknesses of thin surface films," *Review of Scientific Instruments* 16, 26-30 (1945).
- [120] 120. P. Drude, "Ueber die Gesetze der Reflexion und Brechung des Lichtes an der Grenze absorbirender Krystalle," *Annalen der Physik* 268, 584-625 (1887).
- [121] 121. C. Cobet, "Ellipsometry: A Survey of Concept," in *Springer Series in Surface Sciences*(2014), pp. 1-26.
- [122] 122. M. Canepa, "A surface scientist's view on spectroscopic ellipsometry," in *Springer Series in Surface Sciences*(2013), pp. 99-135.
- [123] 123. H. Fujiwara, *Spectroscopic ellipsometry, Principles and applications* (John Wiley & Sons Ltd., 2007).
- [124] 124. J. A. Woollam, B. Johs, C. M. Herzinger, J. Hilfiker, R. Synowicki, and C. L. Bungay, "Overview of variable angle spectroscopic ellipsometry, Part I. Basic theory and typical applications," *Proceeding of the 44th SPIE meeting CR72*, 3-28 (1999).
- [125] 125. J. A. Woollam, B. Johs, C. M. Herzinger, J. Hilfiker, R. Synowicki, and C. L. Bungay, "Overview of variable angle spectroscopic ellipsometry, Part II. Advanced applications," *Proceeding of the 44th SPIE meeting CR72*; , 29-58 (1999).
- [126] 126. J. Li, N. J. Podraza, and R. W. Collins, "Real time spectroscopic ellipsometry of sputtered CdTe, CdS, and CdTe1-xSx thin films for photovoltaic applications," *physica status solidi (a)* 205, 901-904 (2008).
- [127] 127. S. Dligatch, R. P. Netterfield, and B. Martin, "Application of in-situ ellipsometry to the fabrication of multi-layer optical coatings with sub-nanometre accuracy," *Thin Solid Films* 455 - 456, 376-379 (2004).
- [128] 128. M. Losurdo, and K. Hingerl, *Ellipsometry at the Nanoscale* (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
- [129] 129. H. Arwin, "Spectroscopic ellipsometry and biology: Recent developments and challenges," *Thin Solid Films* 313-314, 764-774 (1998).
- [130] 130. H. Arwin, "Ellipsometry on thin organic layers of biological interest: characterization and applications," *Thin Solid Films* 377-378, 48-56 (2000).
- [131] 131. R. M. A. Azzam, and N. M. Bashara, *Ellipsometry and polarized light* (North-Holland Pub. Co. , 1977).
- [132] 132. H. Arwin, "Spectroscopic ellipsometry and biology: Recent developments and challenges," *Thin Solid Films* 313-314, 764-774 (1998).
- [133] 133. D. Marinkova, M. Bivolarska, L. Ahtapodov, L. Yotova, R. Mateva, and T. Velinov, "Plasmon microscopy and imaging ellipsometry of *Artrobacter oxydans* attached on polymer films," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 65, 276-280 (2008).

- [134] 134. C. Werner, and H. Jacobasch, "Surface characterization of polymers for medical devices," *The International journal of artificial organs* 22, 160-176 (1999).
- [135] 135. G. Jin, Z.-H. Wang, Y.-H. Meng, and Z.-Y. Zhao, "Imaging ellipsometry for the visualization of bio-molecular layers," in *Engineering in Medicine and Biology Society, Proceedings of the 20th Annual International Conference of the IEEE(IEEE1998)*, pp. 581-584.
- [136] 136. A. Joiner, D. Muller, U. M. Elofsson, M. Malmsten, and T. Arnebrant, "Adsorption from black tea and red wine onto in vitro salivary pellicles studied by ellipsometry," *Eur. J. Oral Sci.* 111, 417-422 (2003).
- [137] 137. D. S. Horne, and J. M. R. Patino, *Adsorbed Biopolymers: Behaviour in Food Applications* (Marcel Dekker, 2003).
- [138] 138. D. J. McClements, *Food Emulsions. Principles, Practices, and Techniques* (CRC Press, 2005).
- [139] 139. B. Binks, and D. Furlong, *Modern characterization methods of surfactant systems* (CRC Press, 1999).
- [140] 140. H. Arwin, "Adsorption of Proteins at Solid Surfaces," in *Springer Series in Surface Sciences*, K. Hinrichs, and K. J. Eichhorn, eds. (2014), pp. 29-46.
- [141] 141. B. P. Binks, and T. S. Horozov, *Colloidal Particles at Liquid Interfaces* (Cambridge University Press, 2006).
- [142] 142. Michael C. Howland,* Alan W. Szmodis, Babak Sanii and Atul N. Parikh; Characterization of Physical Properties of Supported Phospholipid Membranes Using Imaging Ellipsometry at Optical Wavelengths; *Biophys J.* 2007 Feb 15; 92(4): 1306–1317; Published online 2006 Dec 1. doi: [10.1529/biophysj.106.097071]
- [143] 143. Mouritsen, O. G. 2005. *Life as a matter of fat: emerging science of lipidomics.* Springer, Berlin.
- [144] 144. Lipowsky, R., and E. Sackmann. 1995. *Structure and dynamics of membranes.* North-Holland, Amsterdam.
- [145] 145. McIntosh, T. J., and S. A. Simon. 2006. Roles of bilayer material properties in and distribution of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35:177–198. [PubMed]
- [146] 146. Anderson, R. G. W., and K. Jacobson. 2002. Cell biology—A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science.* 296:1821– 1825. [PubMed]
- [147] 147. McMahan, H. T., and J. L. Gallop. 2005. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature.* 438:590–596. [PubMed] 6. Simons, K., and E. Ikonen. 2000. Cell biology—How cells handle cholesterol. *Science.* 290:1721–1726. [PubMed]
- [148] 148. Simons, K., and D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:31–39. [PubMed]
- [149] 149. Brian, A. A., and H. M. McConnell. 1984. Allogeneic stimulation of cyto-toxic T-cells by supported planar membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:6159–6163. [PMC free article] [PubMed]
- [150] 150. Groves, J. T., and M. L. Dustin. 2003. Supported planar bilayers in studies on immune cell adhesion and communication. *J. Immunol. Methods.* 278:19–32. [PubMed]
- [151] 151. Cohen, F. S., and G. B. Melikyan. 2004. The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement. *J. Membr. Biol.* 199:1–14. [PubMed]
- [152] 152. Sackmann, E. 1996. Supported membranes: Scientific and practical applications. *Science.* 271:43–48. [PubMed]
- [153] 153. Johnson, J. M., T. Ha, S. Chu, and S. G. Boxer. 2002. Early steps of supported bilayer formation probed by single vesicle fluorescence assays. *Biophys. J.* 83:3371–3379. [PMC free article] [PubMed]
- [154] 154. McConnell, H. M., T. H. Watts, R. M. Weis, and A. A. Brian. 1986. Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune-system. *Biochim. Biophys. Acta.* 864:95–106. [PubMed]
- [155] 155. Tamm, L. K., and H. M. McConnell. 1985. Supported phospholipid-bilayers. *Biophys. J.* 47:105–113. [PMC free article] [PubMed]

- [156] 156. Ajo-Franklin, C. M., P. V. Ganesan, and S. G. Boxer. 2005. Variable incidence angle fluorescence interference contrast microscopy for z-imaging single objects. *Biophys. J.* 89:2759–2769. [PMC free article] [PubMed]
- [157] 157. Kiessling, V., and L. K. Tamm. 2003. Measuring distances in supported bilayers by fluorescence interference-contrast microscopy: Polymer supports and SNARE proteins. *Biophys. J.* 84:408–418. [PMC free article] [PubMed]
- [158] 158. Koenig, B. W., S. Kruger, W. J. Orts, C. F. Majkrzak, N. F. Berk, J. V. Silverton, and K. Gawrisch. 1996. Neutron reflectivity and atomic force microscopy studies of a lipid bilayer in water adsorbed to the surface of a silicon single crystal. *Langmuir.* 12:1343–1350.
- [159] 159. Boxer, S. G. 2000. Molecular transport and organization in supported lipid membranes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:704–709. [PubMed]
- [160] 160. Parthasarathy, R., and J. T. Groves. 2004. Optical techniques for imaging membrane topography. *Cell Biochem. Biophys.* 41:391–414. [PubMed]
- [161] 161. Puu, G., and I. Gustafson. 1997. Planar lipid bilayers on solid supports from liposomes - factors of importance for kinetics and stability. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1327:149–161. [PubMed]
- [162] 162. Salamon, Z., Y. Wang, G. Tollin, and H. A. Macleod. 1994. Assembly and molecular-organization of self-assembled lipid bilayers on solid substrates monitored by surface-plasmon resonance spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes.* 1195:267–275. [PubMed]
- [163] 163. Keller, C. A., and B. Kasemo. 1998. Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophys. J.* 75:1397–1402. [PMC free article] [PubMed]
- [164] 164. Yuan, C., and L. J. Johnston. 2002. Phase evolution in cholesterol/DPPC monolayers: atomic force microscopy and near field scanning optical microscopy studies. *J. Microsc.(Oxford).* 205:136–146. [PubMed]
- [165] 165. Tamm, L. K., and S. A. Tatulian. 1997. Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. *Q. Rev. Biophys.* 30:365–429. [PubMed]
- [166] 166. Linseisen, F. M., M. Hetzer, T. Brumm, and T. M. Bayerl. 1997. Differences in the physical properties of lipid monolayers and bilayers on a spherical solid support. *Biophys. J.* 72:1659–1667. [PMC free article] [PubMed]
- [167] 167. John R. Silvius; Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems; *Biochimica et Biophysica Acta* 1610 (2003) 174– 183;
- [168] 168. D.A. Brown, J.K. Rose, *Cell* 68 (1992) 533– 544.
- [169] 169. R. Schroeder, E. London, D.A. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 12130–12134.
- [170] 170. M. Ge, K.A. Field, R. Aneja, D. Holowka, B. Baird, *Biophys. J.* 77 (1999) 925– 933.
- [171] 171. R. Schroeder, S.N. Ahmed, Y. Zhu, E. London, D.A. Brown, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 1150– 1157.
- [172] 172. S. Ilangumaran, D.C. Hoessli, *Biochem. J.* 335 (1998) 433– 440.
- [173] 173. T. Furuchi, R.G. Anderson, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 1099– 1104.
- [174] 174. L.J. Pike, J.M. Miller, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 22298–22304.
- [175] 175. J.M. Green, A. Zhelesnyak, J. Chung, F.P. Lindberg, M. Sarfati, W.A. Frazier, E.J. Brown, *J. Cell Biol.* 146 (1999) 673– 682.
- [176] 176. S. Roy, R. Luetterforst, A. Harding, A. Apolloni, M. Etheridge, E. Stang, B. Rolls, J.F. Hancock, R.G. Parton, *Nat. Cell Biol.* 1 (1999) 98–105.
- [177] 177. E.D. Sheets, D. Holowka, B. Baird, *J. Cell Biol.* 145 (1999); 877– 887.
- [178] 178. P.S. Kabouridis, J. Janzen, A.I. Magee, S.C. Ley, *Eur. J. Immunol.* 30 (2000) 954– 963.
- [179] 179. H.A. Anderson, E.M. Hiltbold, P.A. Roche, *Nat. Immunol.* 2 (2000) 156– 162.
- [180] 180. E. London, *Curr. Op. Struc. Biol.* 12 (2002) 480– 486.
- [181] 181. Mouritsen, O. G. 2005. *Life as a matter of fat: emerging science of lipidomics.* Springer, Berlin.
- [182] 182. Lipowsky, R., and E. Sackmann. 1995. *Structure and dynamics of membranes.* North-Holland, Amsterdam.
- [183] 183. McIntosh, T. J., and S. A. Simon. 2006. Roles of bilayer material properties in and distribution of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35:177–198. [PubMed]

- [184] 184. Anderson, R. G. W., and K. Jacobson. 2002. Cell biology—A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science*. 296:1821–1825. [PubMed]
- [185] 185. McMahon, H. T., and J. L. Gallop. 2005. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*. 438:590–596. [PubMed]
- [186] 186. Simons, K., and E. Ikonen. 2000. Cell biology—How cells handle cholesterol. *Science*. 290:1721–1726. [PubMed]
- [187] 187. Simons, K., and D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:31–39. [PubMed]
- [188] 188. Brian, A. A., and H. M. McConnell. 1984. Allogeneic stimulation of cyto-toxic T-cells by supported planar membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81:6159–6163. [PMC free article] [PubMed]
- [189] 189. Groves, J. T., and M. L. Dustin. 2003. Supported planar bilayers in studies on immune cell adhesion and communication. *J. Immunol. Methods*. 278:19–32. [PubMed]
- [190] 190. Cohen, F. S., and G. B. Melikyan. 2004. The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement. *J. Membr. Biol.* 199:1–14. [PubMed]
- [191] 191. Michael C. Howland,* Alan W. Szmodis,† Babak Sani,‡ and Atul N. Parikh†‡; Characterization of Physical Properties of Supported Phospholipid Membranes Using Imaging Ellipsometry at Optical Wavelengths; *Biophys J.* 2007 Feb 15; 92(4): 1306–1317; Published online 2006 Dec 1. doi: [10.1529/biophysj.106.097071]
- [192] 192. Salamon, Z., Y. Wang, G. Tollin, and H. A. Macleod. 1994. Assembly and molecular-organization of self-assembled lipid bilayers on solid substrates monitored by surface-plasmon resonance spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*. 1195:267–275. [PubMed]
- [193] 193. Salamon, Z., and G. Tollin. 2001. Optical anisotropy in lipid bilayer membranes: Coupled plasmon-waveguide resonance measurements of molecular orientation, polarizability, and shape. *Biophys. J.* 80:1557–1567. [PMC free article] [PubMed]
- [194] 194. Benz, M., T. Gutschmann, N. H. Chen, R. Tadmor, and J. Israelachvili. 2004. Correlation of AFM and SFA measurements concerning the stability of supported lipid bilayers. *Biophys. J.* 86:870–879. [PMC free article] [PubMed]
- [195] 195. Schneider, J., Y. F. Dufrene, W. R. Barger, and G. U. Lee. 2000. Atomic force microscope image contrast mechanisms on supported lipid bilayers. *Biophys. J.* 79:1107–1118. [PMC free article] [PubMed]
- [196] 196. Zasadzinski, J. A. N., C. A. Helm, M. L. Longo, A. L. Weisenhorn, S. A. C. Gould, and P. K. Hansma. 1991. Atomic force microscopy of hydrated phosphatidylethanolamine bilayers. *Biophys. J.* 59:755–760. [PMC free article] [PubMed]
- [197] 197. Boulbitch, A. 2002. Enforced unbinding of bead adhering to a biomembrane by generic forces. *Europhys. Lett.* 59:910–915.
- [198] 198. Keller, C. A., K. Glasmar, V. P. Zhdanov, and B. Kasemo. 2000. Formation of supported membranes from vesicles. *Phys. Rev. Lett.* 84:5443–5446. [PubMed]
- [199] 199. Richter, R. P., and A. R. Brisson. 2005. Following the formation of supported lipid bilayers on mica: A study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry. *Biophys. J.* 88:3422–3433. [PMC free article] [PubMed]
- [200] 200. Nissen, J., K. Jacobs, and J. O. Radler. 2001. Interface dynamics of lipid membrane spreading on solid surfaces. *Phys. Rev. Lett.* 86:1904–1907. [PubMed]
- [201] 201. В.Кочев, *Електрохимични методи за анализ в биологията и медицината*, изд.Парадигма, София, 2010.
- [202] 202. Anthony P. F. Turner. *Biosensors: sense and sensibility*. *Chem. Soc. Rev.*, 42:3184{3196, 2013.
- [203] 203. Alexandre G Brolo. *Plasmonics for future biosensors*. *Nature Photonics*, 6(11):709{713, 2012.
- [204] 204. Nikolay I Zheludev and Yuri S Kivshar. *From metamaterials to metadevices*. *Nature materials*, 11(11):917{924,2012}.
- [205] 205. Nicolo Bontempi, Katie E. Chong, Henry W. Orton, Isabelle Staude, Duk-Yong Choi, Ivano Alessandri, Yuri S. Kivshar, and Dragomir N. Neshev. *Highly sensitive biosensors based on all-dielectric nanoresonators*. *Nanoscale*, 9:4972{4980, 2017}.

- [206] 206. Reuben M Bakker, Dmitry Permyakov, Ye Feng Yu, Dmitry Markovich, Ramon Paniagua-Domnguez, Leonard Gonzaga, Anton Samusev, Yuri Kivshar, Boris Lukyanchuk, and Arseniy I Kuznetsov. Magnetic and electric hotspots with silicon nanodimers. *Nano Letters*, 15(3):2137{2142, 2015.
- [207] 207. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, in: A. Leitmannova-Liu (Ed.), Elsevier Inc., Amsterdam, 2006.
- [208] 208. L. Hodgkin, A.F. Huxley, Action potentials recorded from inside a nerve fibre, *Nature* 144 (3651) (1939) 710.
- [209] 209. E. Neher, B. Sakmann, Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres, *Nature* 260 (5554) (1976) 799.
- [210] 210. P. Weerakoon, F. Sigworth, E. Culurciello, Integrated patch-clamp biosensor for high-density screening of cell conductance, *Electronics Letters* 44 (2) (2008) 1.
- [211] 211. K.S. Cole, Electrical phase angle of cell membranes, *J. Gen. Physiol.* 15 (1932) pp. 641.
- [212] 212. K.S. Cole, *Membranes ions and impulses*, University of California Press, Los Angeles, 1972.
- [213] 213. A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*, 1st ed., John Wiley & Sons, New York, 1980.
- [214] 214. J.J. Ackmann, M.A. Seitz, Methods of complex impedance measurement in biological tissue, *CRC Crit Rev Biomed Eng* 11 (1984) 281.
- [215] 215. S. Grimnes, G. Ø. Martinsen, *Bioimpedance and Bioelectricity, Basics*, 2nd ed., Elsevier Academic Press, London, 2008, pp. 2008.
- [216] 216. T. Repo, M.I.N. Zhang, Modeling woody plant tissues using a distributed electrical circuit, *J Exp Bot* 44 (1993) 977.
- [217] 217. T. Repo, G. Zhang, A. Ryyppö, R. Rikala, The electrical impedance spectroscopy of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) shoots in relation to cold acclimation, *J Exp Bot* 51 (2000) 2095.
- [218] 218. D.A. Dean, T. Ranabathan, D. Machado, R. Sundararajan, Electrical impedance spectroscopy study of biological tissues, *J Electrostatics* 66 (2008) 165.
- [219] 219. B. Alberts, A.J. Johnson, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed., Garland Publishing, Inc., New York, 2002.
- [220] 220. H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C.A. Kaiser, M. Krieger, M.R. Scott, S.L. Zipursky, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 5th ed., W.H. Freeman and Company, New York, 2003.
- [221] 221. E. Gorter, F. Grendel, On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood, *J. Exp. Med.* 4 (1925) 439.
- [222] 222. S.J. Singer, G.L. Nicolson, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* 175 (1972) 720.
- [223] 223. O.G. Mouritsen, *Life as a Matter of Fat. The Emerging Science of Lipidomics*, Springer Verlag, Heidelberg, 2005.
- [224] 224. H.T. Tien, *Bilayer Lipid Membranes (BLM): Theory and Practice*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1974, pp. 655.
- [225] 225. E. Sackmann, Supported membranes: scientific and practical applications, *Science* 271 (1996) 43.
- [226] 226. *Structure and Dynamics of Membranes*, in: R. Lipowsky, E. Sackmann (Eds.), Elsevier/North Holland, Amsterdam, The Netherlands, 1995.
- [227] 227. J.H. Ipsen, G. Karlström, H. Wennerström, O.G. Mouritsen, M.J. Zuckermann, Phase equilibria in the lecithin-cholesterol system, *Biochim. Biophys. Acta* 905(1987) 162.
- [228] 228. O.G. Mouritsen, M.J. Zuckermann, What's so special about cholesterol? *Lipids* 39 (2004) 1101.
- [229] 229. O.G. Mouritsen, The liquid-ordered state comes of age, *Biochim. Biophys. Acta* 1798 (2010) 1286.
- [230] 230. M. Seul, M.J. Sammon, Preparation of surfactant multilayer films on solid substrates by deposition from organic solution, *Thin Solid Films* 185 (1990) 287.
- [231] 231. T. Ullr. Mennicke, Salditt Preparation of Solid-Supported Lipid Bilayers by Spin-Coating, *Langmuir* 18 (2002) 8172.
- [232] 232. A. Mangiarotti, B. Caruso, N. Wilke, Phase coexistence infilms composed of DLPC and DPPC: A comparison between different model membrane systems, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1838 (2014) 1823.
- [233] 233. *Impedance Spectroscopy. Theory, experiment, and applications*, in: E. Barsoukov, J.R. Macdonald (Eds.), 2nd ed., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2005.

- [234] 234. M.E. Orazem, B. Tribollet, p ., Electrochemical impedance spectroscopy, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2008, pp. 533.
- [235] 235. K.S. Cole, R.H. Cole, Dispersion and Absorption in Dielectrics. I. Alternating Current Characteristics, J. Chem.Phys. 9 (1941) 341.
- [236] 236. F. Simeonov, Impedance analysis of lipid liquid films with the aid of devise based on PC sound card, M.S. thesis, University of Sofia, 2012.
- [237] 237. V. Kochev, M. Karabaliev, Wetting films of lipids in the development of sensitive interfaces. An electrochemical approach, Adv. Coll. Interface Science 107 (2004) 9.
- [238] 238. M. Karabaliev, Formation and investigation of solid supported thin liquid films of lipids. Possibilities for development of sensor elements, Ph.D. thesis, University of Sofia, 2001
- [239] 239. R.H. Garrett, C.M. Grisham, Biochemistry, 2nd ed, Orlando, Saunders, 1998.
- [240] 240. M. Karabaliev, V. Kochev, Probing the interfacial and bulk characteristics of solid supported thin liquid films, Material Sci. Eng. C 14 (1–2) (2001) 11.
- [241] 241. M. Karabaliev, V. Kochev, Electrochemical investigations of cholesterol enriched glassy carbon supported thin lipid films, Biophysical Chemistry 103 (2) (2003) 157.