



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“

Биологически факултет

Катедра „Биохимия“

Ася Свиленова Цанова

**Свойства и механизми на действие на
невропептиди с моделни мембрани с оглед
приложението им във фармакологията**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователната и научна степен

„доктор“

професионално направление 4.3 Биологични науки

(Молекулярна биология)

Научен ръководител: чл. кор. проф. дбн Здравко Лалчев

София, 2014 г.

Дисертацията е изработена в лабораторията по „Моделни мембрани“ на катедра „Биохимия“ при Биологически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“. Голяма част от изследванията по дисертацията са финансирани от фонд „Научни изследвания“ към МОН (Договор № DO 02-107/08, МОН) и към СУ „Св. Климент Охридски“ (Договор № 092/2010), както и по Проект за подкрепа за развитието на докторанти, постдокторанти, специализанти и млади учени по оперативна програма "Развитие на човешките ресурси".

Дисертационният труд съдържа 137 страници, 69 фигури и 1 таблица. Списъкът на цитираната литература съдържа 262 заглавия, от които 2 на кирилица и 260 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и одобрен за защита на разширен Катедрен съвет на катедра „Биохимия“ на Биологически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“, състоял се на 18.06.2014 г.

Дисертантът е редовен асистент към катедра „Химия и биохимия, физиология и патофизиология“ на Медицински факултет, СУ „Св. Климент Охридски“.

Защитата на дисертационният труд ще се състои на от часа в Заседателната зала на Биологически Факултет, Софийски Университет „Св. Климент Охридски“.

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

GPCRs – G-протеинови рецептори

ССК – холецистокинин

АСТН – адренкортикотропен хормон

Met-enk – метионин-енкефалин

Leu-enk – левцин-енкефалин

ЦНС – централна нервна система

РОМС – про-опиомеланокортин

LDCV – големи плътни везикули

SSVs – малки синаптични везикули

NPY – неuropeптид Y

ЯМР – ядрено магнитен резонанс

SDS – натриев додецилсулфат

DMPC – димиристоилфосфатидилхолин

DCPC – дикапроилфосфатидилхолин

DMPG – димиристоилфосфатидилглицерол

Sm – сфингомиелин

Cho – холестерол

POPC – 1-палмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин

ТТФ – тънки течни филми

БАМ – Брюстър-ъглова микроскопия

СВФ – обикновен черен филм

НВФ – Нютонов черен филм

ЛТТФ – липидни тънки течни филми

Увод

За да се въведе ново лекарство в клиничната практика отнема повече от десетилетие клинични проучвания. Критична стъпка в разработването на пептид-базирани лиганди за терапевтични цели е дизайнът на съответния аналог с желаните биологични и подходящи биофизични свойства, които да позволяват достъпа им от кръвта до рецепторните им места в мозъка. Ето защо, е важно по време на предклиничните изследвания, избраните моделни системи и методи за анализ да бъдат едновременно лесни за изпълнение и високо информативни. Монослойният модел на Лангмюир, в комбинация с Брюстър-ъгловата микроскопия и моделът на липидните тънки течни филми са именно такива и могат да се използват като първа стъпка при предклиничните изследвания на лекарства, които осъществяват биологичната си активност чрез взаимодействие с клетъчната мембрана.

Под термина „невропептиди“ се означават всички невроактивни пептиди. Невропептидите повлияват не само невроните, но и други тъкани и органи, като се оказва, че една от най-важните им функции е интегрирането на функциите на мозъка и другите системи в тялото. Дългият списък от функции, в които участват невропептидите, включва регулация на размножаването, растежа, хомеостазата, контрол върху различните системи в тялото, антиноцицепцията и т.н. Така например, след откриването на енкефалините като ендогенни лиганди на опиоидните рецептори и установяването на тяхната антиноцицептивна функция, става ясно, че те участват в разнообразни физиологични процеси: във възпалението и имунния отговор, в гастроинтестиналната физиология по отношение на йонния транспорт, в процесите на учене и запаметяване и т.н.

След откриването на енкефалините през 1975 г. ендогенните опиоидни невропептиди привличат интереса на изследователите поради тяхното антиноцицептивно действие. Изследват се механизмите на тяхното действие и се създават техни структурни аналози, за да се повиши устойчивостта им при фармакологичното им прилагане, както и, за да се засили ефекта им върху прицелните клетки. Невропептидите, свързани с контрола на преноса на болковите сигнали в организма, обикновено са къси пептиди, напр. енкефалините съдържат пет аминокиселини (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met или Leu), киоторфините са изградени само от две (L-tyrosyl-L-arginine), динорфин А – от осем и т.н. Действието им се осъществява чрез взаимодействие с рецептори, разположени по повърхността на прицелните

нервни клетки. Невропептидните рецептори принадлежат към фамилията на G-протеиновите рецептори (GPCRs) със седем трансмембранни сегмента. Известно е, че тези рецептори се разполагат в участъци от мембраните, известни като липидни рафтове, съставени от течно-подредени домени от сфингомиелин и холестерол в обкръжение на течно-неподредена фаза, съставена основно от фосфатидилхолин. Счита се, че невропептидите взаимодействат с липидите, за да придобият правилна конформация за взаимодействие със съответните им рецептори, като по този начин мембраната спомага за пептид-рецепторното свързване. Ето защо, в настоящата дисертация, за първи път е изследвано взаимодействието между синтетични енкефалини и техни аналози с моделни мембрани, съставени от „рафтови“ липиди в комбинации, в която те съществуват в природните мембрани.

В допълнение, от гледна точка на фармакологичната им активност, невропептидите и техните аналози при екзогенното им въвеждане в организма трябва да преминават няколко мембранни бариери (чревната мукоза, кръвно-мозъчната бариера). В следствие на това, изследването на природата на невропептид-мембранните взаимодействия (електростатични, хидрофобни и др.) от гледна точка на вида на изграждащите ги липиди, са от изключително значение за обогатяване на знанията за механизмите на невропептидното действие, както и за фармакологичните изследвания на достъпността на невропептидите и техните аналози в организма.

За да се изследва механизма на взаимодействието на невропептидите с биологичните мембрани са използвани различни моделни мембрани и най-вече липидни везикули, мицели и бицели. Тези изследвания обаче, засягат основно ролята на структурата на самите пептиди, но не дават достатъчна информация за ролята на структурната организация и хетерогеността на мембраната при сложните пептид-липидни взаимодействия. Ето защо, моделните мембрани, използвани в настоящата дисертация – Лангмюировите монослоеви и липидните тънки течни филми, в комбинация с Брюстър-ъгловата микроскопия засягат именно тези аспекти на взаимодействията.

Цел и задачи

Основна цел на настоящата дисертация е да се изследва в сравнителен аспект взаимодействието на синтетичните неuropeптиди метионин-енкефалин (Met-enk) и левцин-енкефалин (Leu-enk), както и на техните амидирани производни, с монослойни и бислойни липидни филми, съставени от различни по заряд фосфолипиди, „рафтови“ липиди и такива, изграждащи мембраните на нервните клетки.

За изпълнението на тези цели са поставени следните **задачи**:

1. Да се характеризира и направи сравнителен анализ на повърхностното поведение на нанесени монослоеви от **димиристоилфосфатидилхолин (DMPC)** и **димиристоилфосфатидилглицерол (DMPG)** преди и след добавяне на **Met-enk** на въздушно-водната фазова граница при равновесни условия.
2. Да се сравни влиянието на **Met-enk** и **Met-enk-NH₂** върху повърхностното поведение на нанесени монослоеви от **DMPC** и **DMPG** на въздушно-водната фазова граница при равновесни условия.
3. Да се изследва промяната в повърхностната морфология на нанесени монослоеви от **DMPC** и **DMPG** на въздушно-водната фазова граница след добавянето на **Met-enk** и **Met-enk-NH₂**.
4. Да се изследва вероятността за образуване, дебелината, стабилността и кинетиката на изтичане на тънки течни филми, съставени от смеси от **DMPC** и **DMPG** с **Met-enk** и **Met-enk-NH₂**.
5. Да се сравни промяната в повърхностното поведение на нанесени монослоеви от **сфингомиелин (Sm)** и **холестерол (Cho)**, и тяхна **еквимоларна смес** преди и след добавяне на **Met-enk** и **Met-enk-NH₂** на въздушно-водната фазова граница при равновесни условия.
6. Да се анализира влиянието на **Met-enk** и **Met-enk-NH₂** върху повърхностното поведение на нанесени монослоеви от **палмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (POPC)**, **Sm** и **Cho**, и техни **двойни и тройни смеси** на въздушно-водната фазова граница при динамични условия на компресия.
7. Да се изследва промяната в повърхностната морфология на нанесени монослоеви от **POPC**, **Sm** и **Cho**, и техни **двойни и тройни смеси** на въздушно-водната фазова след добавяне на **Met-enk** и **Met-enk-NH₂**.

8. Да се анализира повърхностното поведение на нанесени монослоеве от **POPC**, **Sm** и **Cho**, и техни двойни и тройна смеси на въздушно-водната фазова граница преди и след добавянето на **Leu-enk** и **Leu-enk-NH₂** при динамични условия на компресия.
9. Да се изследва влиянието на **Leu-enk** и **Leu-enk-NH₂** върху повърхностната морфология на нанесени монослоеве от **POPC**, **Sm** и **Cho**, и техни двойни и тройна смеси на въздушно-водната фазова граница.

Методични подходи

За изпълнение на поставените задачи са използвани следните **моделни системи**:

- ❖ **Лангмюирови монослоеве**: нанесени в многоямкова плака (3x5) за равновесните изследвания и в Лангмюирова вана, снабдена с подвижни бариери (при зададена скорост на придвижване 3,75 Å²/молекула/мин.) и с автоматичен запис на изотермите π/t и π/A с тензиометър MicroTrough X (Kibron Inc., Finland).
- ❖ **липидни бислойни тънки течни филми (ТТФ)**: образувани и изследвани чрез микроинтерферометричния метод на Шелудко и Ексерова.

Пептид-липидните взаимодействия са изследвани посредством следните **методи**:

- метод на Lanmuir за формиране и изследване на монослоеве
- метод на Wilhelmy за измерване на повърхностното напрежение на течности
- Брюстър-ъглова микроскопия за изследване морфологията на нанесени монослоеве от повърхностно-активни вещества
- Микроинтерферометричен метод на Шелудко и Ексерова за образуване и изследване на бислойни тънки течни филми (ТТФ)

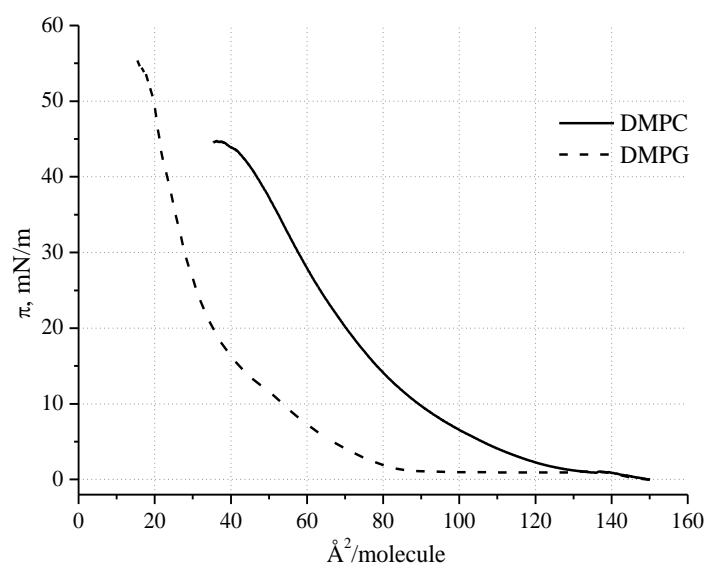
Забележка: Фигурите, представени в автореферата, следват номерацията, посочена в дисертационния труд.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Изследване на взаимодействието на синтетични метионин-енкефалини с моделни мембранни системи с оглед влиянието на заряда на липидните молекули

1.1. *Взаимодействие на синтетичен метионин-енкефалин с различни по заряд фосфолипиди посредством монослойния модел на Лангмюир и метода на Вилхелми*

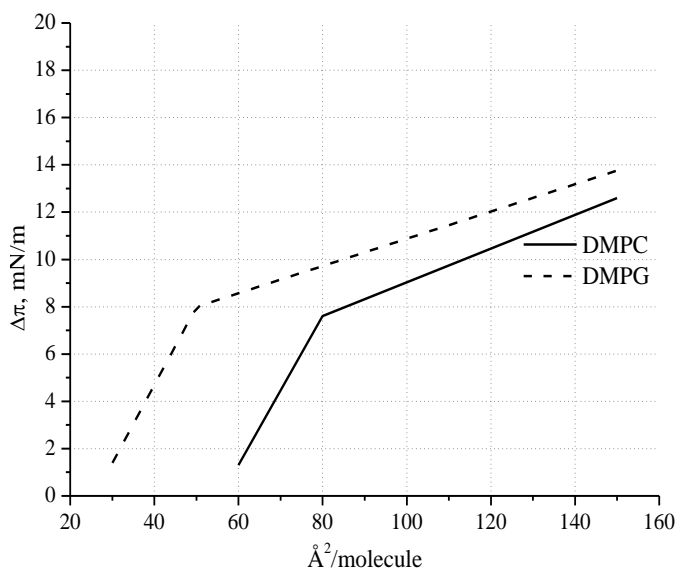
С цел да се изследва повърхностното поведение и взаимодействието между синтетичен метионин-енкефалин (с крайна обемна концентрация 1 mM) и нанесени върху субфаза от 0,15 M NaCl Лангмюирови монослоеове от DMPC и DMPG е определена промяната на повърхностното налягане на въздушно-водната фазова граница с времето. Повърхностните концентрации на двата липида са избрани така, че да съответстват на различна опаковка на липидните молекули с повърхностно налягане около 0, 10 и 30 mN/m, съотв. за фосфатидилхолина около 150, 80 и 60 Å² за липидна молекула, а за фосфатидилглицерола – 150, 50 и 30 Å²/молекула (Фиг. 19).



Фигура 19. Промяна на повърхностното налягане (π , mN/m) на монослоеове, съставени от DMPC и DMPG, в зависимост от площта за липидна молекула (Å²/молекула). DMPC-димиристоилфосфатидилхолин; DMPG-димиристоилфосфатидилглицерол.

Получените данни показват, че синтетичният невропептид взаимодейства и с двата монослоя, в зависимост от дадената площ за липидна молекула (Фиг. 20). Инжектирането на Met-enk в субфазата води до повишение в стойностите на π . Този ефект е по-ясно изразен при повърхностна концентрация 150 Å²/молекула и при двата липида ($\Delta\pi$ е около

13 mN/m), което се дължи на газовото фазово състояние на монослоевите от DMPC и DMPG при 150 Å²/молекула (Фиг. 19), поради което цвистерийонният пептид лесно прониква в монослоевите. С понижаването на дадената площ за липидна молекула, броят молекули невропептид, които могат да проникнат в монослоевите намалява, което се отразява на стойностите на повърхностно налягане.



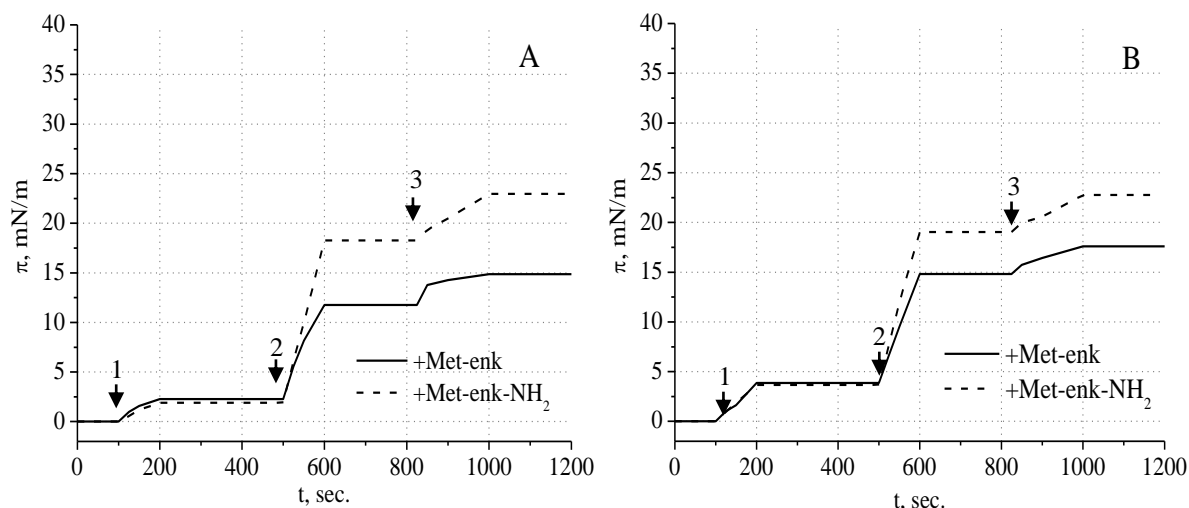
Фигура 20. Промяна на повърхностното налягане ($\Delta\pi = \pi_{\text{ФЛ} + \text{Met-enk}} - \pi_{\text{ФЛ}}$, mN/m) на монослоеве, съставени от DMPC и DMPG, в зависимост от площта за липидна молекула (Å²/молекула) след инжектиране на Met-enk в субфаза от 0,15 M NaCl до крайна обемна концентрация 1 mM. ФЛ-фосфолипид; Met-enk-метионин-енкефалин; DMPC-димиристоилфосфатидилхолин; DMPG-димиристоилфосфатидил-глицерол.

Въз основа на разликите между стойностите на π след добавянето на амфифилния Met-enk към монослоевите, съставени от DMPC и DMPG, може да се предположи, че проникването на енкефалина в монослоя е резултат както от електростатично привличане между заредените аминокиселини и карбоксилни групи на пептида, и фосфолипидните глави, особено в случая на отрицателно-заредения фосфатидилглицерол, така и от хидрофобни взаимодействия между радикалите на аминокиселините, изграждащи метионин-енкефалина и опашките на изследваните липиди. Нашите резултати са в съответствие с данните, получени от *Deber and Behnam (1984)*, които показват, че енкефалинът най-вероятно се свързва към липидите чрез страничните вериги на хидрофобните Met/Leu, Phe и вероятно Tyr, докато крайните карбоксилни групи на пептидите се локализират по повърхността на липозомите. В контекста на „мембранната катализа“ е предложен модел за взаимодействието хормон-липид, според който дълбочината на проникване се модулира от баланса между хидрофобни и електростатични взаимодействия (*Deber and Behnam 1984, Marcotte et al. 2003*). Нашите резултати са в съответствие с тези заключения, като се вземе в предвид, че проникващата способност на Met-enk нараства

от DMPC- към DMPG-монослоеве. Освен това, *Marcotte et al. (2004)* установяват, че пептидите могат само слабо да нарушат организацията на ацилните вериги в мембранната гелна фаза. При нашите експериментални условия, при по-ниските повърхностни налягания на чистите филми, както фосфатидилхолиновия, така и фосфатидилглицеролния монослоеве са в течно-разтегнато фазово състояние, при което разстоянието между молекулите е по-голямо, в сравнение с гелната фаза. Това би могло да улесни адсорбцията на въздушно-водната фазова граница и проникването на амфифилния пептид в ацилния участък на монослоеве, като по този начин да увеличи влиянието на хидрофобните взаимодействия.

1.2. Сравнителен анализ на взаимодействието на синтетичен метионин-енкефалин и негова амидирана форма с различни по заряд фосфолипиди посредством монослойния модел на Лангмюир и метода на Вилхелми

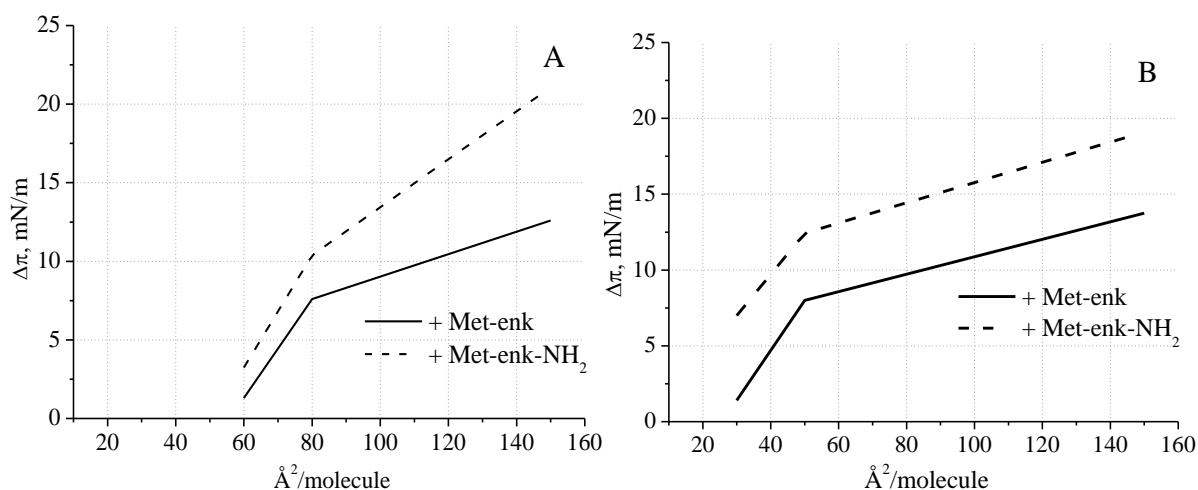
За да се определи ефекта от C-крайното амидиране на невропептида, е сравнена способността за проникване между двете форми на енкефалина в монослоеве, съставени от DMPC и DMPG, като функция от повърхностната липидна концентрация и тази на Met-enk в субфазата. С тази цел е измерена промяната на повърхностното налягане на въздушно-водната фазова граница с времето. Данните, представени на Фиг. 24 показват значително увеличение на π и на двата монослоя (при налягане на чистия липиден монослой около 0 mN/m) след добавяне на нарастващи количества от съответните енкефалини. Освен това, резултатите за взаимодействието на енкефалините (с крайни обемни концентрации 0,5 mM и 1mM) с DMPC-монослоеве показват, че Met-enk-NH₂ повишава повърхностното налягане в по-висока степен: след добавянето на немодифицирания пептид π се променя от 2 до около 15 mN/m (за 1 mM енкефалин), докато инжектирането на амида повишава π до около 18 и до около 23 mN/m за двете концентрации енкефалин, съотв. (Фиг. 24, панел А). Същият ефект се наблюдава след добавянето на двата енкефалина към монослоеве, съставени от отрицателно-заредения DMPG при същата опаковка на липидните молекули – π се променя от около 3,5 до около 17,5 mN/m за 1mM Met-enk, докато амидирането на пептида променя тези стойности до около 19 и до 23 mN/m за двете концентрации на Met-enk-NH₂ съотв. (Фиг. 24, панел В).



Фигура 24. Промяна на π (mN/m) с времето (sec) след добавянето на: 1. DMPC (панел А) и DMPG (панел В) при налягане на чистия липиден монослой около 0 mN/m. 2. Met-enk до крайна обемна концентрация 0,5 mM. 3. Met-enk до крайна обемна концентрация 1 mM. Met-enk-метионин-енкефалин; DMPC-димиристоилфосфатидилхолин; DMPG-димиристоилфосфатидилглицерол.

За да се представи степента на проникване на метионин-енкефалин и неговата модифицирана форма в монослоеве от различни по заряд фосфолипиди, са изчислени стойностите на промяната на повърхностното налягане на липидните монослоеве преди и след добавянето на пептидите ($\Delta\pi = \pi_{\text{ФЛ+Met-enk}} - \pi_{\text{ФЛ}}$, mN/m), като получените резултати са представени като функция от площта за фосфолипидна молекула (Фиг. 27). Представените данни показват, че стойностите на $\Delta\pi$ се повишават с увеличаване на площта за липидна молекула при всички изследвани модели. В допълнение, промяната на π при Met-enk/DMPC-смесените монослоеве е съизмерима с тази при Met-enk/DMPG-монослоеве, със слаб превес на последните, което показва, че проникването при фосфатидилглицерола е улеснено, заради отрицателния заряд на фосфолипидната глава. Сходна степен на проникване с малки разлики в повърхностното налягане, се установява и при Met-enk-NH₂/DMPC-, и Met-enk-NH₂/DMPG-монослоеве при по-рехавя опаковка на липидните молекули, но не и при плътна опаковка на филмите. От Фиг. 27 ясно се вижда тенденция $\Delta\pi$ -стойностите за Met-enk-NH₂/DMPC-монослоеве да се приближават до кривата за Met-enk/DMPC при уплътняване на филма от DMPC (от повърхностна концентрация 150 до 60 Å², панел А), докато при монослоеве от DMPG кривите са успоредни (панел В), т.е. при по-плътна състояние на монослоя амидираното производно прониква в по-силна степен, в сравнение с Met-enk в отрицателно-заредени монослоеве. Освен това, ясно се забелязва от Фиг. 27, панели А и В, че площта за молекула в монослоя, под която рязко се

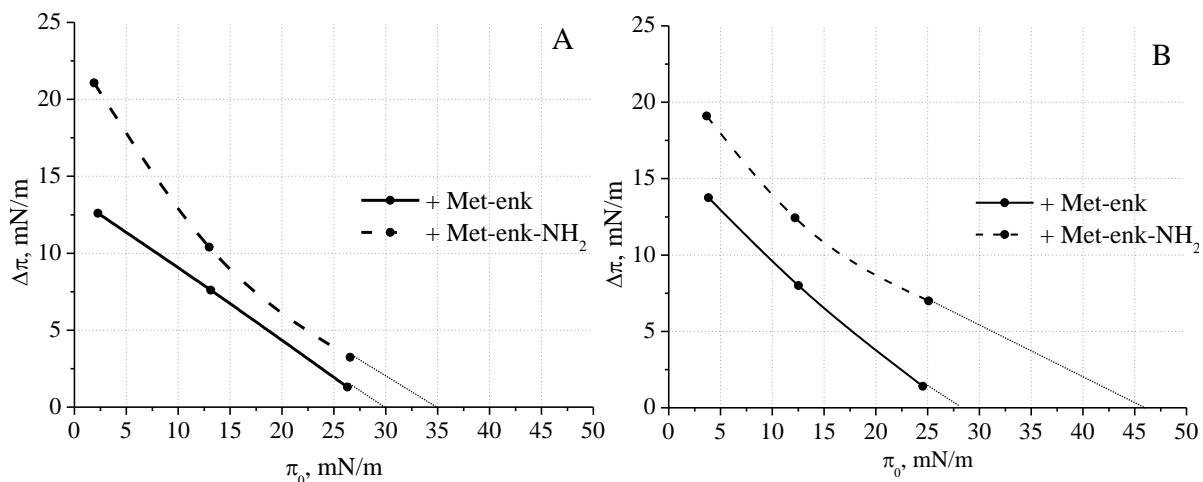
затруднява проникването на енкефалините е по-голяма за монослоевете от DMPC ($80 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$) спрямо тази за монослоевете от DMPG ($50 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$). Следователно, данните, представени на фигурата, като цяло разкриват способността на амидирания енкефалин да взаимодейства по-силно от немодифицирания пептид както с цвистерйонния DMPC, така и с отрицателно-заредения DMPG. Освен това, при по-висока повърхностна концентрация проникването му във фосфатидилглицеролния монослой е улеснено, вероятно в резултат от електростатични сили на привличане.



Фигура 27. Промяна на повърхностното налягане ($\Delta\pi = \pi_{\text{ФЛ} + \text{Met-enk}} - \pi_{\text{ФЛ}}$, mN/m) на монослоевете, съставени от DMPC (панел А) и DMPG (панел В), в зависимост от площта за липидна молекула ($\text{\AA}^2/\text{молекула}$) след инжектиране на Met-enk и Met-enk-NH₂ в субфаза от 0,15 M NaCl до крайна обемна концентрация 1 mM. ФЛ-фосфолипид; Met-enk-метионин-енкефалин; DMPC-димиристоилфосфатидилхолин; DMPG-димиристоилфосфатидилглицерол.

Накрая, за да се сравни степента на взаимодействие между двата изследвани енкефалина и фосфолипидните монослоевете, е представена зависимостта $\Delta\pi$ на монослоевите след инжектирането на Met-enk/Met-enk-NH₂ от началното повърхностното налягане на чистите липидни филми π_0 , при което са инжектирани енкефалините (Фиг. 28). Получените резултати показват, че модифицираната форма на пептида бива изключена от монослоевите и за двата липида при по-високо повърхностно налягане, в сравнение с Met-enk: стойностите на π_{critical} (екстраполираното налягане, при което не се наблюдава проникване на пептида – $\Delta\pi = 0$) за DMPC-монослоевите е 29 и 34 mN/m съотв. за Met-enk и Met-enk-NH₂ (Фиг. 28, панел А). За монослоевите, съставени от DMPG разликата между способността за проникване на двата енкефалина се увеличава, като получените стойности на π_{critical} са 27 mN/m за немодифицирания пептид и 45 mN/m за амидираното производно, което доказва способността на Met-

enk-NH₂ да прониква в значително по-висока степен в заредени монослое при по-голяма повърхностна плътност на липидите (Фиг. 28, панел В).



Фигура 28. Промяна на повърхностното налягане ($\Delta\pi = \pi_{\text{ФЛ} + \text{Met-enk}} - \pi_{\text{ФЛ}}$, mN/m) в зависимост от π_0 (mN/m) след инжектиране на Met-enk и Met-enk-NH₂ с крайна обемна концентрация 1 mM в субфаза от 0,15 M NaCl под монослое, съставени от DMPC (панел А) и DMPG (панел В). ФЛ-фосфолипид; Met-enk-метионин-енкефалин; DMPC-димиристоилфосфатидилхолин; DMPG-димиристоилфосфатидилглицерол.

От проведените анализи може да се обобщи, че изследваните невропептиди – Met-enk и Met-enk-NH₂, взаимодействат с и проникват в двата монослоя, съставени от DMPC и DMPG, в зависимост от предоставената повърхностна площ за липидна молекула и концентрацията на пептидите, като тези ефекти са по-ясно изразени в случая на Met-enk-NH₂. Повишението на повърхностното налягане след инжектирането на пептидите в субфазата е най-видимо при повърхностна концентрация 150 Å² за молекула и при двата липида и се понижава с намаляването на площта за липидна молекула. Посочените ефекти се дължат на „рехавата“ опаковка на DMPC- и DMPG-монослоеве при по-ниска повърхностна молекулна концентрация, поради което амфибилните пептиди могат лесно да се адсорбират и да проникнат в монослоеве.

В допълнение, сравнението между фосфатидилхолиновите и фосфатидилглицеролните монослоеве по отношение на промените в стойностите на π след инжектирането на Met-enk в субфазата показва малки разлики, но те са значителни по отношение на площта на липидна молекула в монослоя, под която рязко се затруднява проникването на Met-enk. Тези резултати показват, че зарядът на фосфолипидните глави най-вероятно има само слаб ефект върху взаимодействието между синтетичния метионин-енкефалин и отрицателно-заредения DMPG и цвистерйонния DMPC при

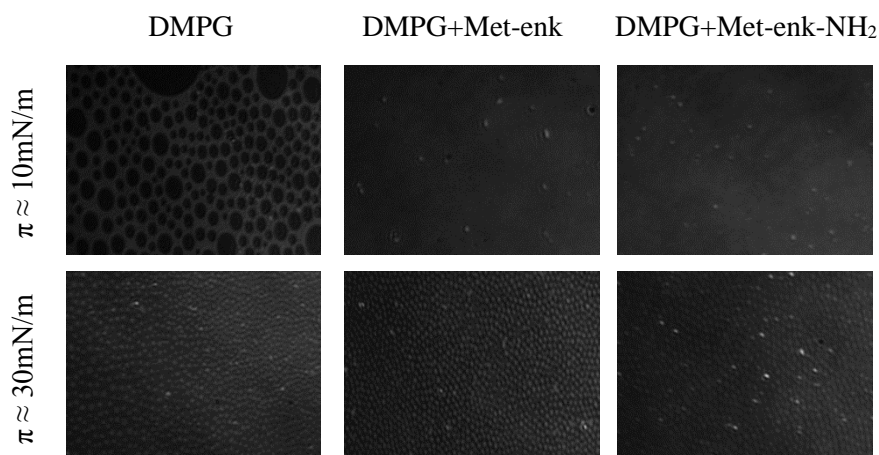
изследваното рН, както и че промяната в стойностите на π вероятно е резултат основно от неспецифична адсорбция и промяна в конформацията на пентапептидите в липидното обкръжение. За разлика от тези ефекти, модифицираното производно на Met-enk показва различно поведение към DMPC- и DMPG-монослоеве – амидираният пептид показва значително по-високи стойности на $\Delta\pi$ при фосфатидилглицероловия монослой при най-плътната изследвана опаковка, в сравнение с фосфатидилхолиновия филм. Посочените ефекти се потвърждават и от определянето на максималното повърхностно налягане, при което пептидите не могат да проникват в монослоеве. Установяват се значително по-високи стойности на $\pi_{critical}$ и способност за проникване в изследваните монослоеве при модифицирания пептид, в сравнение с Met-enk, в случая на монослоя от DMPC и особено в случая на отрицателно-заредения DMPG. Получените резултати са в съответствие с откритията на *Jaikaran et al. (1995)*, които установяват, че грамицидинови производни с С-крайни amino-групи се инкорпорират лесно и бързо променят конформацията си, когато се добавят към липидни везикули, съставени от диолеоилфосфатидилхолин. Те предполагат, че amino-групите при С-края на грамицидин взаимодействат с липидните фосфатни групи (по-силно, отколкото карбоксилните), като осигуряват някакъв вид „котва“ за С-края на пептидите при процеса на конформационна промяна. Според нашите данни, най-вероятно при най-плътната изследвана опаковка на липидните молекули се появява отблъскване между отрицателния заряд на крайната карбоксилна група и отрицателния заряд на липидните фосфатни групи, което би могло да обясни защо немодифицираната форма на Met-enk бива изключена и от двата изследвани фосфолипидни монослоя при по-ниско повърхностно налягане, в сравнение с амидираното производно. В тази връзка, прикриването на пептидния С-край с amino-група води до по-изразено проникване на модифицирания опиоид, дори и при по-високо повърхностно налягане. В допълнение, положителният заряд на амидирания Met-enk (при изследваното рН) улеснява взаимодействието му с отрицателно заредената глава на DMPG дори при високи липидни повърхностни концентрации. Нашите открития предполагат, че взаимодействието между пептидите и фосфолипидите се дължи на комбинацията между електростатични сили на привличане в случая на Met-enk-NH₂ и хидрофобни взаимодействия между хидрофобните аминокиселини на амфифилните пептиди и фосфолипидните ацилни опашки, което е в съответствие с откритията и на други автори

(Deber and Behnam 1984, Milon et al. 1990, Marcotte et al. 2003). Liu et al. (2006) показват, че при пептид-мембранното взаимодействие, въпреки че електростатичното взаимодействие и хидрофобните сили са два основни фактора за началната адсорбция на пептидните молекули по повърхността на липидните бислоеве, електростатичното привличане е доминиращо, когато пептидът е положително зареден, а липидната мембрана е отрицателно заредена.

1.3. Сравнителен анализ на взаимодействието на синтетичен метионин-енкефалин и негова амидирана форма с различни по заряд фосфолипиди посредством Брюстър-ъглова микроскопия

Разликите във взаимодействието между изследваните фосфолипиди и двете форми на метионин-енкефалин предполагат разлики в морфологията на монослоеве на въздушно-водната фазова граница, анализирани с помощта на Брюстър-ъглова микроскопия (БАМ) при повърхностна концентрация на фосфолипидите, съответстващи на π на монослоеве около 10 mN/m (рехвава опаковка на фосфолипидите) и 30 mN/m, близко до това на нативните мембрани (Evans and Skalak 1980, Seelig 1987, Marsh 1996, Ege and Lee 2004, Ishitsuka et al. 2006).

Разликата в морфологията на монослоеве преди и след добавянето на изследваните енкефалини е по-ясно изразена в случая на отрицателно-заредения фосфатидилглицерол (Фиг. 30). Чистият филм при $\pi \approx 10$ mN/m наподобява мрежа от липиди, заграждаща кръгли пространства от чиста субфаза. Добавянето на Met-enk към филма, води до значително хомогенизиране на монослоя (той добива сивкав нюанс), като се наблюдават само отделни по-плътни малки домени от липидни агрегати, докато инжектирането на Met-enk-NH₂ показва отново хомогенизиране на смесения филм, но броят на уплътнените домени се увеличава. Нашите резултати по отношение на положително-заредения модифициран невропептид са в съответствие с тези на Pérez-López et al. (2009), които заключават, че хомогенизирането на смесените пептид/липидни филми при ниско повърхностно налягане се дължи на слаби електростатични сили на привличане между катионния пептид и фосфолипидната глава на въздушно-водната фазова граница. При това пептидът придобива конформация, която улеснява привличането между положително-заредените му групи и фосфатидилглицерола. Тези взаимодействия закотвят пептида към липидната глава и го стабилизират на повърхността.



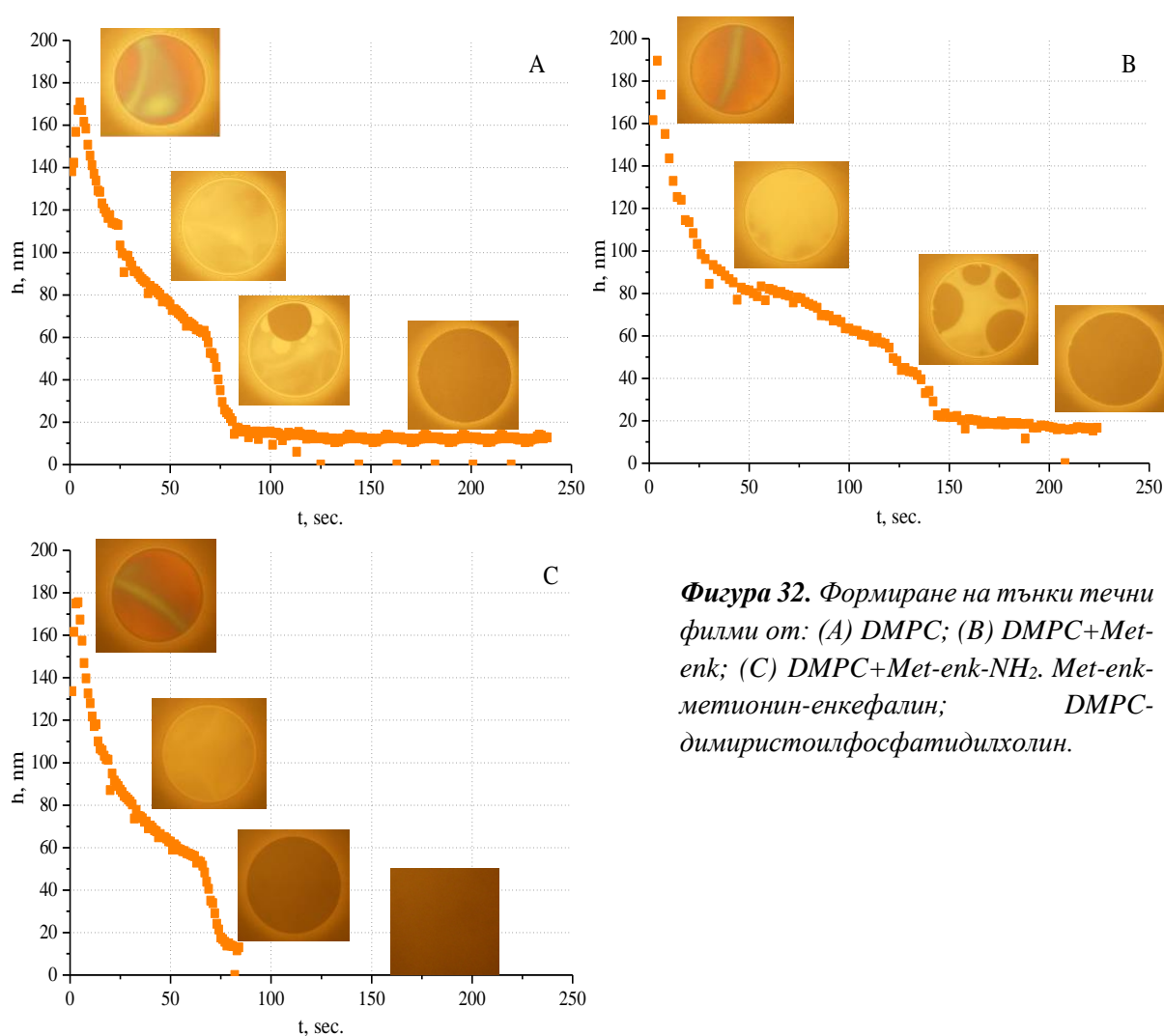
Фигура 30. БАМ-изображения на липидни монослоеве, съставени от DMPG преди и след инжектиране на Met-enk и Met-enk-NH₂ в субфаза, съставена от 0,15 M NaCl, при стойности на повърхностното налягане на чистите липидни филми около 10 и 30 mN/m. Met-enk-метионин-енкефалин; DMPG-димиристоилфосфатидилглицерол.

Повишаването на концентрацията на фосфолипида за единица площ до повърхностно налягане около 30 mN/m води до изостряне на релефа на липидния филм и появата на топчести домени в него. Тази картина не се променя и по отношение на смесения DMPG/Met-enk-филм, което е указание, че молекулите на Met-enk не проникват в него, в съгласие с нашите резултати (Фиг. 28, панел В). За разлика от него обаче, амидирането на изследвания опиоиден пептид, води до появата на ясно видими бели домени върху иначе подобната характерна повърхност на монослоя. Получените данни отново са в съответствие с измерените стойности на $\Delta\lambda$, според които Met-enk-NH₂ проявява по-силна проникваща способност в DMPG, дори и при плътна опаковка на липидните молекули, в сравнение с немодифицираната форма на пептида (Фиг. 28, панел В).

1.4. Изследване на взаимодействието на метионин-енкефалин и метионин-енкефалин-NH₂ с тънки течни филми (ТТФ), посредством микроинтерферометричния метод на Шелудко и Ексерова

На Фиг. 32 е показана кинетиката на изтичане на ЛТТФ, съставени от DMPC (панел А), DMPC/Met-enk (панел В) и DMPC/Met-enk-NH₂ (панел С). Чистият липид формира отначало дебели филми (около 180 nm), които спонтанно изтъняват и образуват единично черно петно, което се формира при локалното изтъняване в контактната област между двата повърхностни

липидни монослоя. Петното се разширява бързо и запълва цялата площ на филма, при което се детектира крайна равновесна дебелина от около 14 nm, т.е. формира се т.нар. обикновен черен филм (Фиг. 32, панел А). При смесване на DMPC с немодифицирания невропептид (1 mM концентрация) отново се получават черни филми с дебелина около 18 nm (Фиг. 32, панел В). Поведението в кинетиката на изтичане на формираните филми обаче, показва различия: изтъняването става постепенно от няколко места на локално изтъняване (няколко черни петна), като времето за образуване на стабилен филм при чистия липид е около 75 секунди, докато същото в присъствие на немодифицирания невропептид е около 150 секунди.

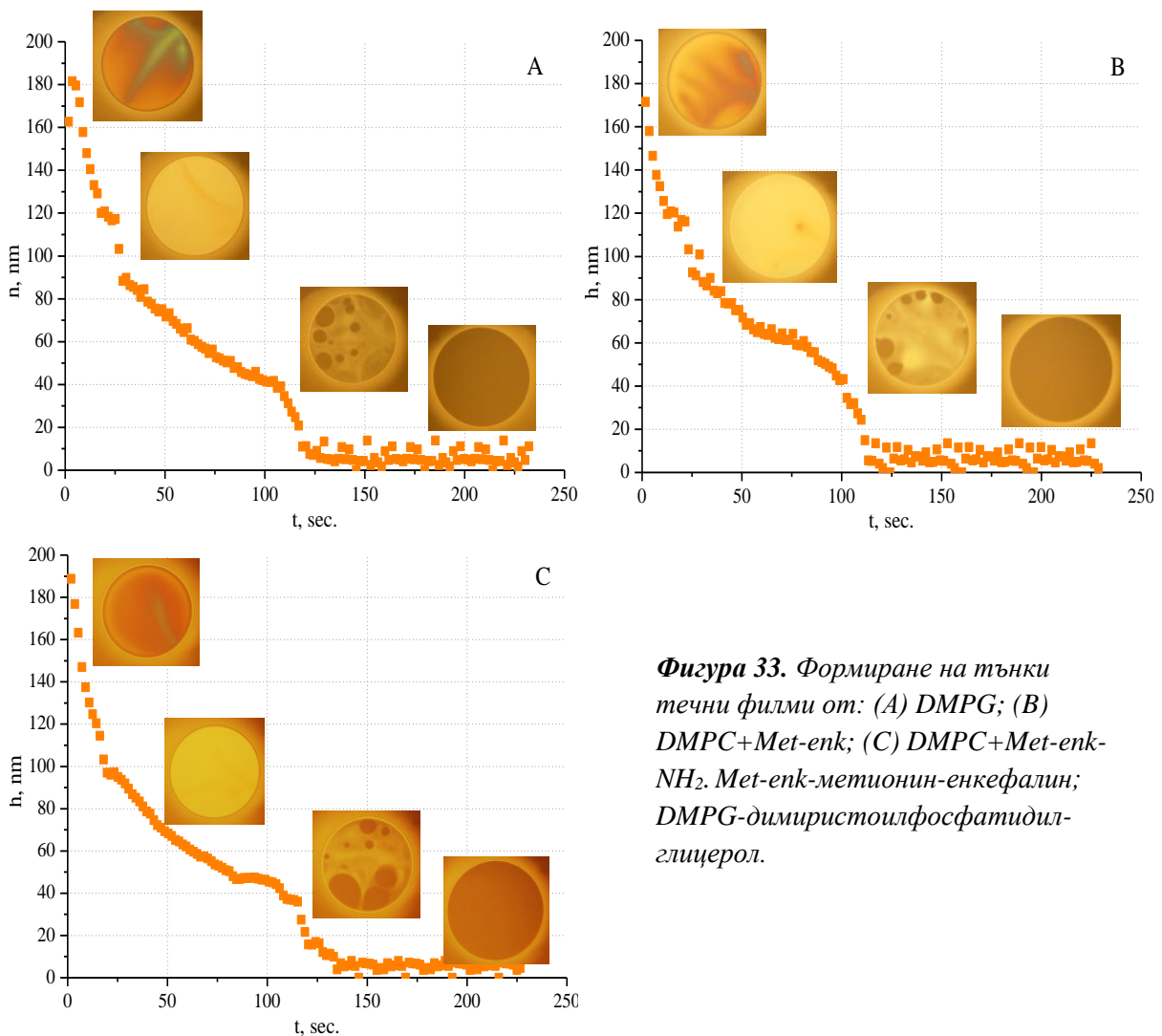


Фигура 32. Формиране на тънки течни филми от: (A) DMPC; (B) DMPC+Met-enk; (C) DMPC+Met-enk-NH₂. Met-enk-метионин-енкефалин; DMPC-димиристоилфосфатидилхолин.

За разлика от немодифицирания пептид, неговата амидирана форма показва различно поведение. Формираните филми от DMPC/Met-enk-NH₂ изтичат много по-бързо от тези в присъствие на немодифицирания енкефалин и са нестабилни като се късат при около 80-та секунда (Фиг. 32,

панел С). Очевидно е, че амидираната форма на енкефалина води до дестабилизиране на контактните монослоеви. Една възможна хипотеза за наблюдавания ефект е да допуснем, че катионната форма на модифицирания енкефалин неутрализира в известна степен отрицателните заряди на фосфатните групи в полярната глава на DMPC молекулите и по този начин намалява заряда на двете повърхности на ЛТТФ и следователно намалява отблъскването между тях. Това води до намаление на електростатичната компонента на разклинящото налягане според DLVO-теорията.

При изследване на формираните тънки течни филми от DMPG преди и след добавянето на двете форми метионин-енкефалин се наблюдава промяна в дебелината на филмите при тяхното изтичане от 180 nm до около 10 nm, т.е. отново се формират черни филми (Фиг. 33, панели А, В и С).



Фигура 33. Формиране на тънки течни филми от: (А) DMPG; (В) DMPC+Met-enk; (С) DMPC+Met-enk-NH₂. Met-enk-метионин-енкефалин; DMPG-димиристоилфосфатидил-глицерол.

В допълнение, и трите типа филми – чист липиден, DMPG/Met-enk и DMPG/Met-enk-NH₂, започват да изтъняват не от единично петно, а от

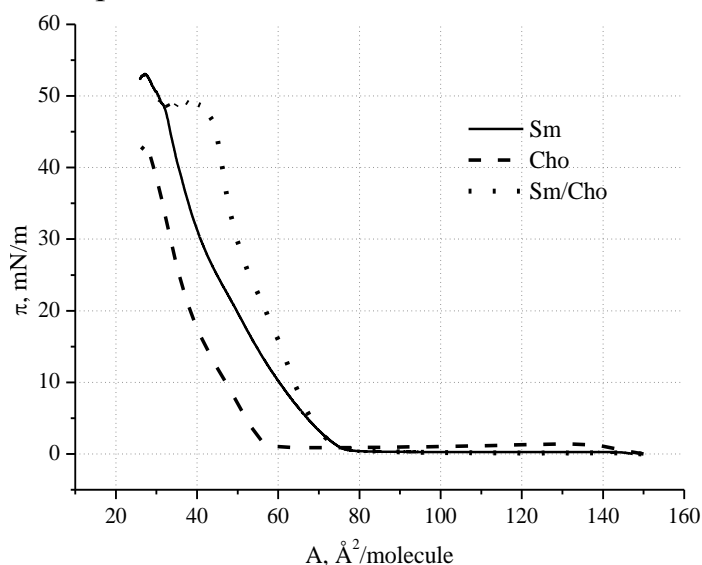
няколко и образуват стабилни филми след около 125 секунди, като в този случай не се наблюдава съществена разлика във времето за образуването им, както и не се наблюдава скъсване на филмите в присъствие на модифицирания енкефалин (сравни панел С на Фиг. 32 и 33).

Разликите в дебелините и в кинетиката на изтичане на различните по липиден състав филми най-вероятно се дължат на отрицателния заряд на главите на DMPG молекулите спрямо цвистерйонните DMPC молекули, както и на разликите в размера и хидратацията на главите им.

2. Взаимодействие на синтетични метионин-енкефалини с липиди, основни компоненти на мембраната на нервните клетки

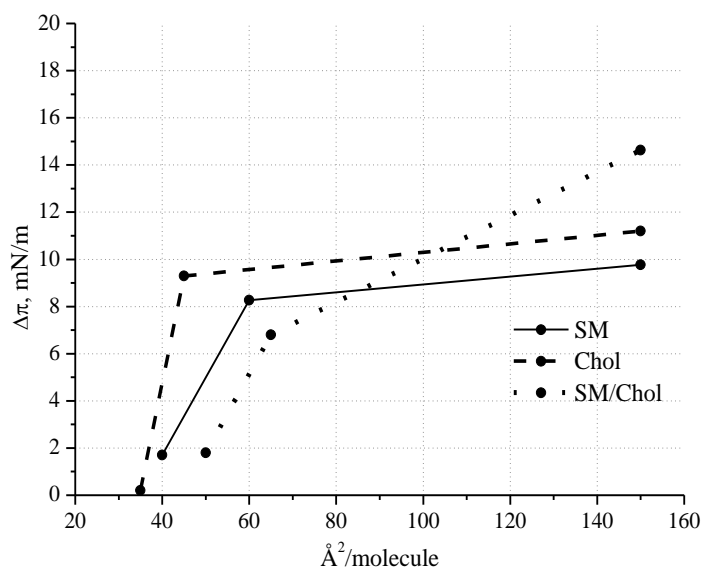
2.1. *Взаимодействие на синтетичен метионин-енкефалин със сфингомиелин и холестерол посредством монослойния модел на Лангмюир и метода на Вилхелми*

За да се изследва проникващата способност на синтетичен метионин-енкефалин и нанесени монослоеви от сфингомиелин, холестерол и тяхна еквимоларна смес (при π на чистите липидни монослоеви, съответстващи на различна опаковка на липидните молекули, съотв. около 0, 10 и 30 mN/m) върху субфаза от 0,15 M NaCl е проследена промяната на повърхностното налягане с времето преди и след добавянето на пептида на въздушно-водната фазова граница. Както и при DMPC, и DMPG, повърхностната концентрация на липидите е определена въз основа на налягане/площ-изотермите за съответните липидни монослоеви (Фиг. 34).



Фигура 34. Промяна на повърхностното налягане (π , mN/m) на монослоеви, съставени от Sm, Cho и Sm/Cho, в зависимост от площта за липидна молекула ($\text{\AA}^2/\text{молекула}$). Sm-сфингомиелин; Cho-холестерол.

Получените резултати показват, че синтетичният невропептид (1 mM концентрация) взаимодейства и с трите типа липидни монослое, в зависимост от дадената площ за липидна молекула (Фиг. 35). В допълнение се установява, че ефектът от добавянето на Met-enk към монослоеве при газово фазово състояние ($\pi \approx 0$ mN/m), е най-силно изразен при сместа Sm/Cho ($\Delta\pi$ е около 15 mN/m), в сравнение с единичните липиди – $\Delta\pi$ за Cho е около 11 mN/m, докато за Sm то е около 10 mN/m.

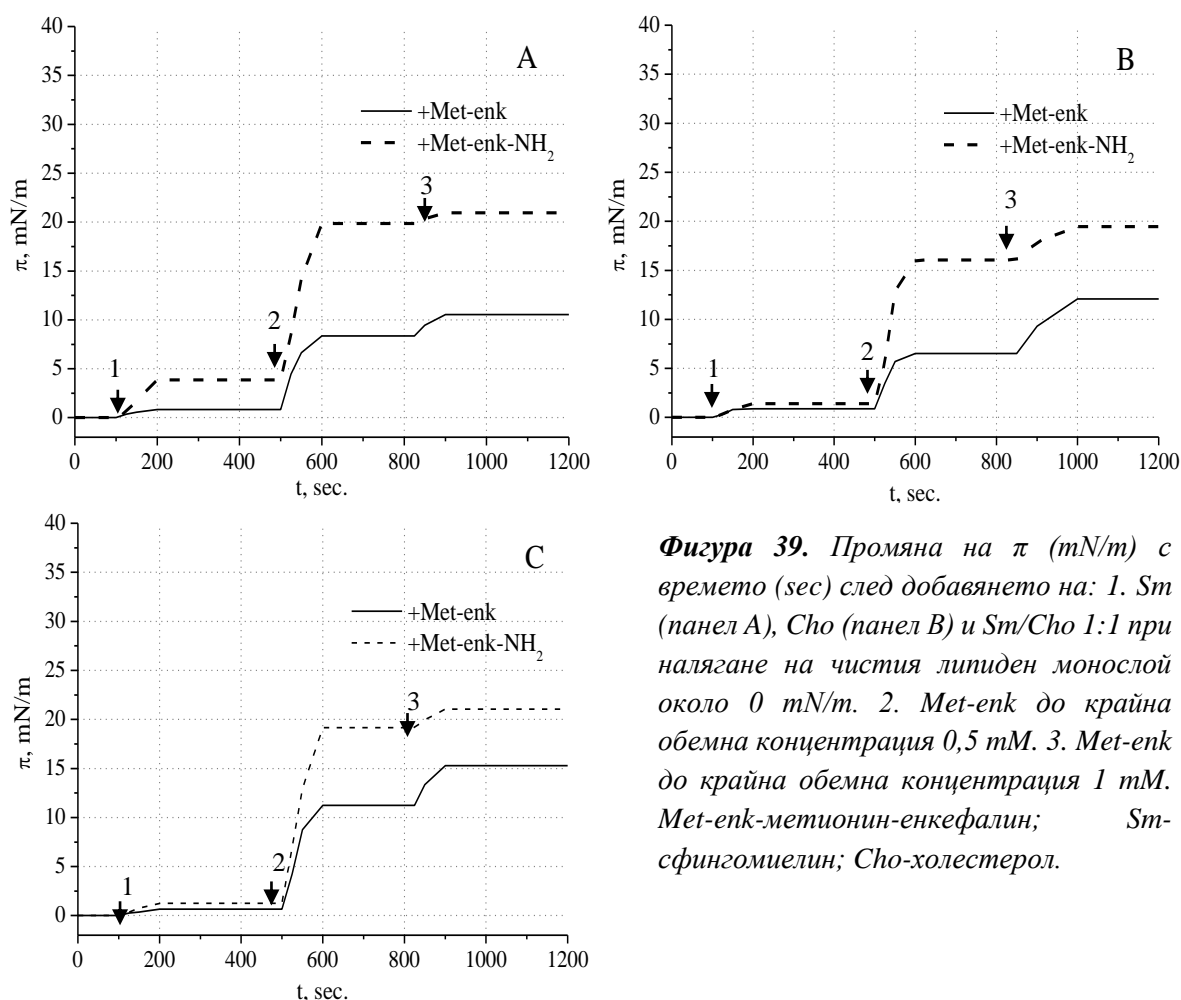


Фигура 35. Промяна на повърхностното налягане ($\Delta\pi = \pi_{L+Met-enk} - \pi_L$, mN/m) на монослое, съставени от Sm, Cho и Sm/Cho, в зависимост от площта за липидна молекула ($\text{\AA}^2/\text{молекула}$) след инжектиране на Met-enk в субфаза от 0,15 M NaCl до крайна обемна концентрация 1 mM. L-липид; Met-enk-метионин-енкефалин; Sm-сфингомиелин; Cho-холестерол.

2.2. Сравнителен анализ на взаимодействието на синтетичен метионин-енкефалин и негова амидирана форма със сфингомиелин и холестерол посредством монослойния модел на Лангмюир и метода на Вилхелми

В допълнение към изследването на взаимодействието между Met-enk с монослое, изградени от холестерол и сфингомиелин (присъстващи във висока концентрация в мембраната на нервните клетки), е определена и степента на проникване на С-крайното амидирано производно на невропептида при същата опаковка на липидните молекули. Данните, представени на Фиг. 39 показват значително повишение на повърхностното налягане и за трите липидни монослоя (при повърхностна концентрация, съответстваща на $\pi \approx 0$ mN/m) след добавянето на нарастващи количества от двата изследвани енкефалина. В допълнение, резултатите от взаимодействието на немодифицирания и амидирания Met-enk (при крайни обемни концентрации 0,5 mM и 1 mM) със Sm-, Cho- и Sm/Cho-монослоеве показват, че Met-enk-NH₂ променя повърхностното налягане в по-висока

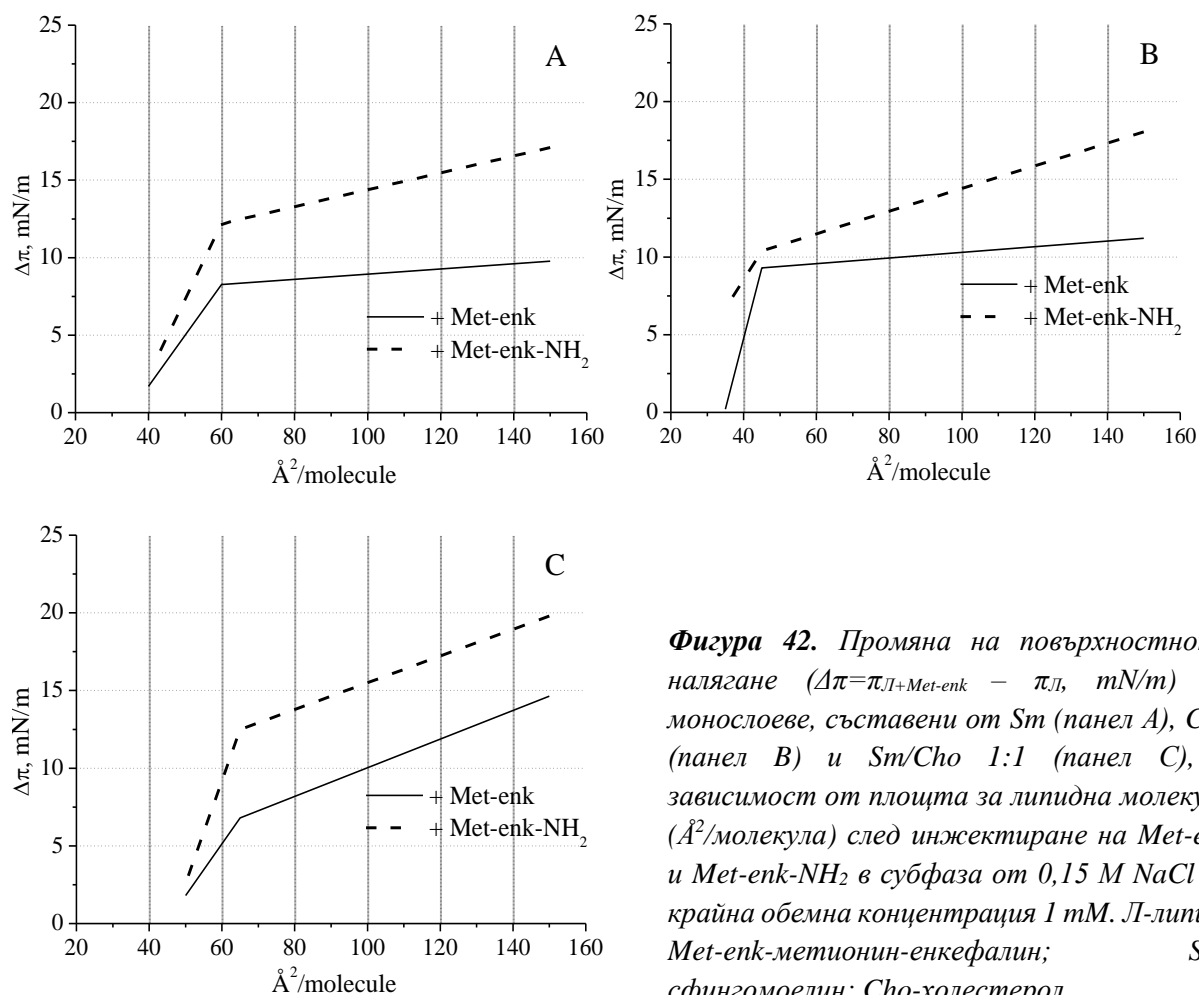
степен – π се повишава от около 1 до 8 и до 10,5 mN/m след добавянето на Met-enk (с концентрация съотв. 0,5 и 1 mM) към монослоеве, съставени от Sm и от около 2 до 12 mN/m за високата концентрация на енкефалин след инжектирането му под монослоеве от Cho, докато амидираният енкефалин повишава стойностите на π от 4 mN/m за чистия монослой от сфингомиелин до 21 mN/m и от 1,5 до 20 mN/m за монослоеве от холестерол (Фиг. 39, панели А и В). При смесения монослой амидираното производно отново променя налягането на монослоя до около 19 и 21 mN/m за двете пептидни концентрации, но разликата в ефекта между двете форми на енкефалина е по-слабо изразена, в сравнение с еднокомпонентните липидни филми (Фиг. 39, панел С).



Фигура 39. Промяна на π (mN/m) с времето (sec) след добавянето на: 1. Sm (панел А), Cho (панел В) и Sm/Cho 1:1 при налягане на чистия липиден монослой около 0 mN/m. 2. Met-enk до крайна обемна концентрация 0,5 mM. 3. Met-enk до крайна обемна концентрация 1 mM. Met-enk-метионин-енкефалин; Sm-сфингомиелин; Cho-холестерол.

За да се представи по-ясно разликата в ефекта на немодифицирания Met-enk и влиянието на С-крайното амидиране при компресия на монослоеве, получените данни за разликата в π преди и след добавянето на изследваните пептиди са представени като функция от предоставената

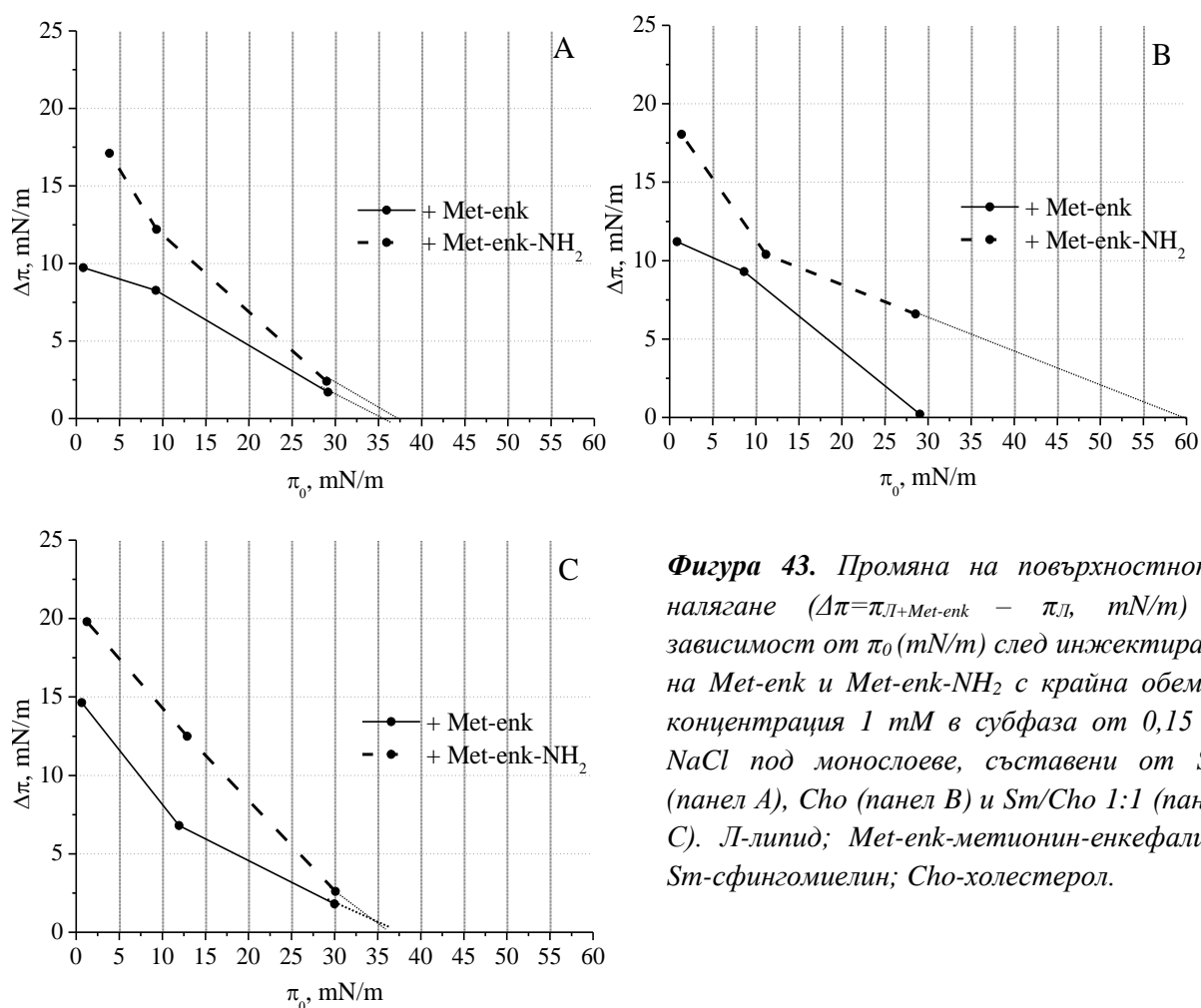
площ за липидна молекула (Фиг. 42). Вижда се, че при всички анализирани случаи проникващата способност на пептидите намалява с уплътняването на монослоеве. Освен това, добавената аминок-група към Met-enk позволява по-голяма промяна на $\Delta\pi$, което е по-ясно изразено при по-рехав опаковка на липидните молекули. Интересно е също така, че докато при чистите липидни монослоеве, разликата в ефекта на двете форми на енкефалина намалява с увеличаването на повърхностната концентрация на Sm и Cho при по-рехав филм, при смесения монослой, тя се запазва почти непроменена, което може да се отдаде на формирането на плътни домени между сфингомиелина и холестерола (Scheek et al. 1997, Simons and Harder 1997, London and Brown 2000, Abreu et al. 2004, Wydro 2012), което оставя еднаква възможност за неспецифична адсорбция и на двата типа пептидни молекули при изследваните площи за липидна молекула.



Фигура 42. Промяна на повърхностното налягане ($\Delta\pi = \pi_{L+Met-enk} - \pi_L$, mN/m) на монослоеве, съставени от Sm (панел A), Cho (панел B) и Sm/Cho 1:1 (панел C), в зависимост от площта за липидна молекула ($\text{\AA}^2/\text{молекула}$) след инжектиране на Met-enk и Met-enk-NH₂ в субфаза от 0,15 M NaCl до крайна обемна концентрация 1 mM. L-липид; Met-enk-метионин-енкефалин; Sm-сфингомиелин; Cho-холестерол.

За да получим по-пълна информация за промяната на липидните монослоеве след добавяне на Met-enk и Met-enk-NH₂, стойностите на

повърхностното налягане са представени като $\Delta\pi$ от началното π_0 на монослоя, което отразява до каква опаковка на липидните молекули двата невропептида могат да навлизат в монослоеве (Фиг. 43). Вижда се, че при Sm и смесения филм двата енкефалина проникват до еднаква плътност на липидите на повърхността, т.е. до около 35 mN/m и за двата филма. Поинтересен е ефектът при Cho – налягането, при което пептидите вече не могат да навлизат между липидните молекули за Met-enk е около 30 mN/m, докато амидирането му води до огромна промяна в проникващата му способност до около 60 mN/m. Полученият ефект ни дава основание да предположим, че добавянето на аминок-група към карбоксилния край на метионин-енкефалина вероятно позволява формирането на водородни връзки с хидроксилната група на холестеролния А-пръстен и съответно преструктуриране на формирания филм, което би обяснило ефекта на Met-enk-NH₂ при Cho-монослой.



Фигура 43. Промяна на повърхностното налягане ($\Delta\pi = \pi_{L+Met-enk} - \pi_L$, mN/m) в зависимост от π_0 (mN/m) след инжектиране на Met-enk и Met-enk-NH₂ с крайна обемна концентрация 1 mM в субфаза от 0,15 M NaCl под монослоеве, съставени от Sm (панел A), Cho (панел B) и Sm/Cho 1:1 (панел C). L-липид; Met-enk-метионин-енкефалин; Sm-сфингомиелин; Cho-холестерол.

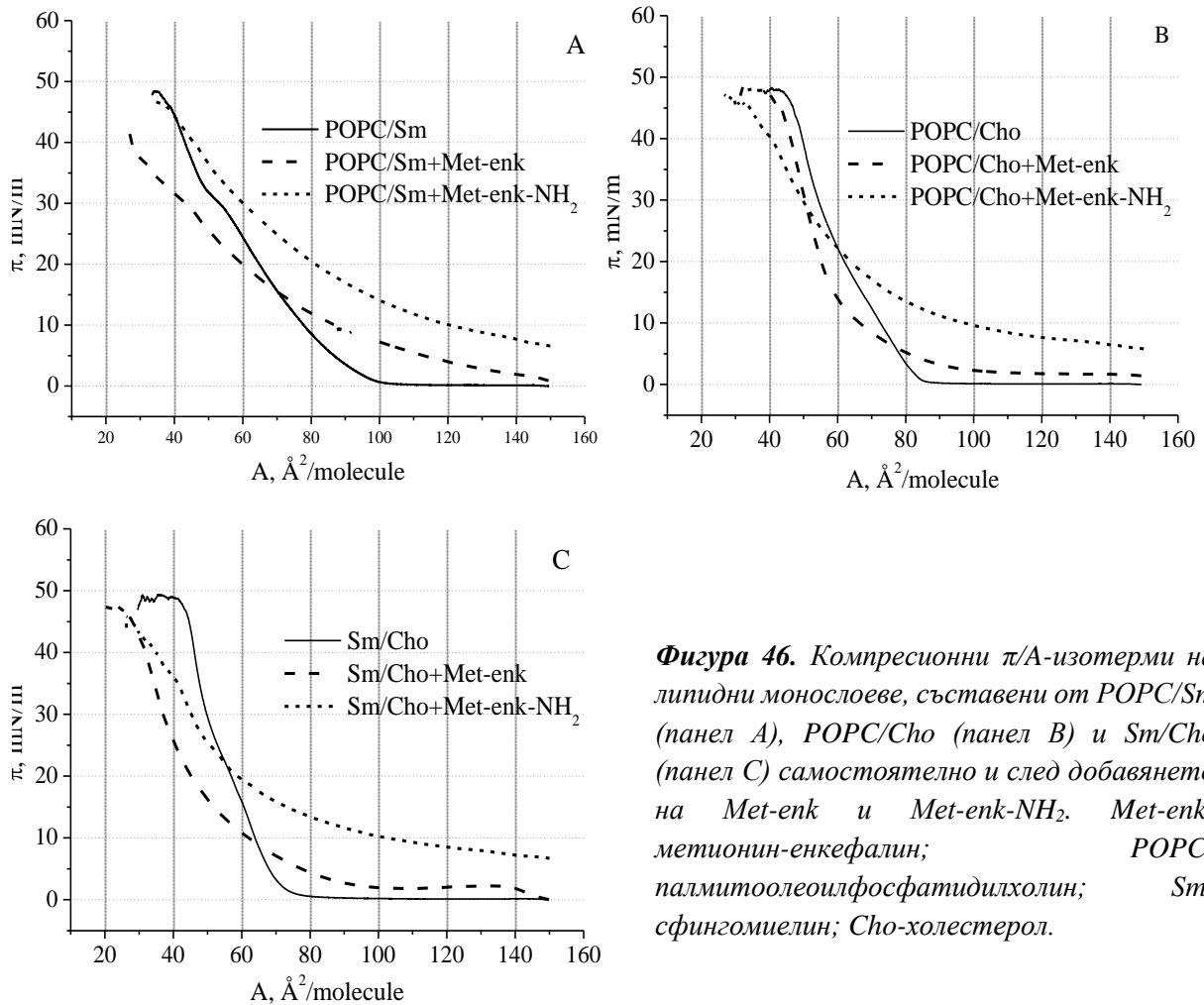
3. Взаимодействие на синтетични метионин-енкефалини с липиди, съставлящи мембранните рафтове

3.1. Взаимодействие на синтетични метионин-енкефалини с липиди, съставлящи мембранните рафтове посредством монослойния модел на Лангмюир и метода на Вилхелми

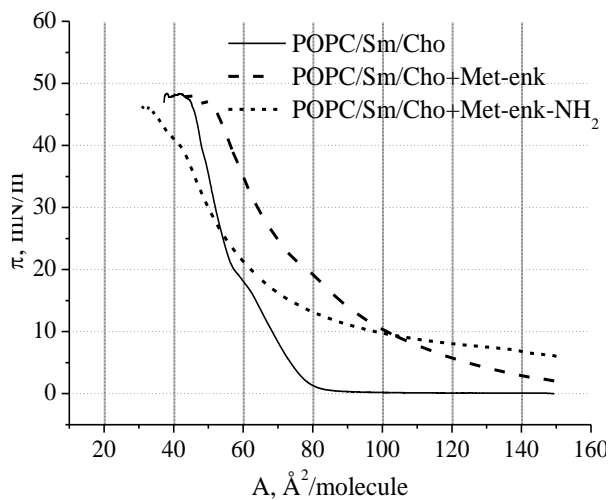
Следващата стъпка в настоящата дисертация бе изследване на взаимодействието между синтетичен Met-enk и неговата амидирана форма с монослоево, изградени от липиди, съставлящи мембранните рафтове – палмитоолеоилфосфатидилхолин (POPC), Sm и Cho, поединично, както и с техни двойни и тройни смеси. Посредством монослойната техника на Лангмюир и метода на Вилхелми са регистрирани и анализирани компресионните π/A -изотерми на липидните филми преди и след добавянето на изследваните пептиди (при крайна обемна концентрация 0,1 mM). От изотермите са изчислени модулите на компресия, за да се изследва латералната еластичност на съответните монослоево и резултатите са представени като функция от повърхностното налягане.

По-интересни ефекти се установяват при дву- и три-компонентните липидни моделни мембрани, както в π/A -изотермите, така и при модулите на компресия. Добавянето на пептидите към липидните смесени монослоево води до проникване на метионин-енкефалините при ниски стойности на повърхностно налягане (Фиг. 46), като отново този ефект е по-ясно изразен по отношение на амидираното производно. При по-плътна опаковка на липидните молекули и двата пептида водят до реориентация на молекулите във филма, изразено чрез понижаване на площта за липидна молекули в случая на двойните холестерол-съдържащи смеси и особено при Sm/Cho-монослоеве (Фиг. 46, панел С). При плътни монослоево от тройната липидна смес обаче, немодифицираният Met-enk има противоположен ефект, т.е. неговите криви лежат над тези на амидирания енкефалин, предполагайки различен тип на взаимодействие с липидните монослоево (Фиг. 46, панел А и Фиг. 47). Най-вероятно, в този случай пептидите взаимодействат с компонентите на липидните смеси по различен начин: докато цвитерйонният Met-enk се намества между цвитерйонните молекули на POPC-съдържащата течно-неподредена фаза, може да се предположи, че възможността положителната С-крайна аминок-група на модифицирания енкефалин да образува водородни връзки с ОН-групата на холестеролния

пръстен увеличава афинитета му към течно-подредените Sm/Cho-домени в монослоя.



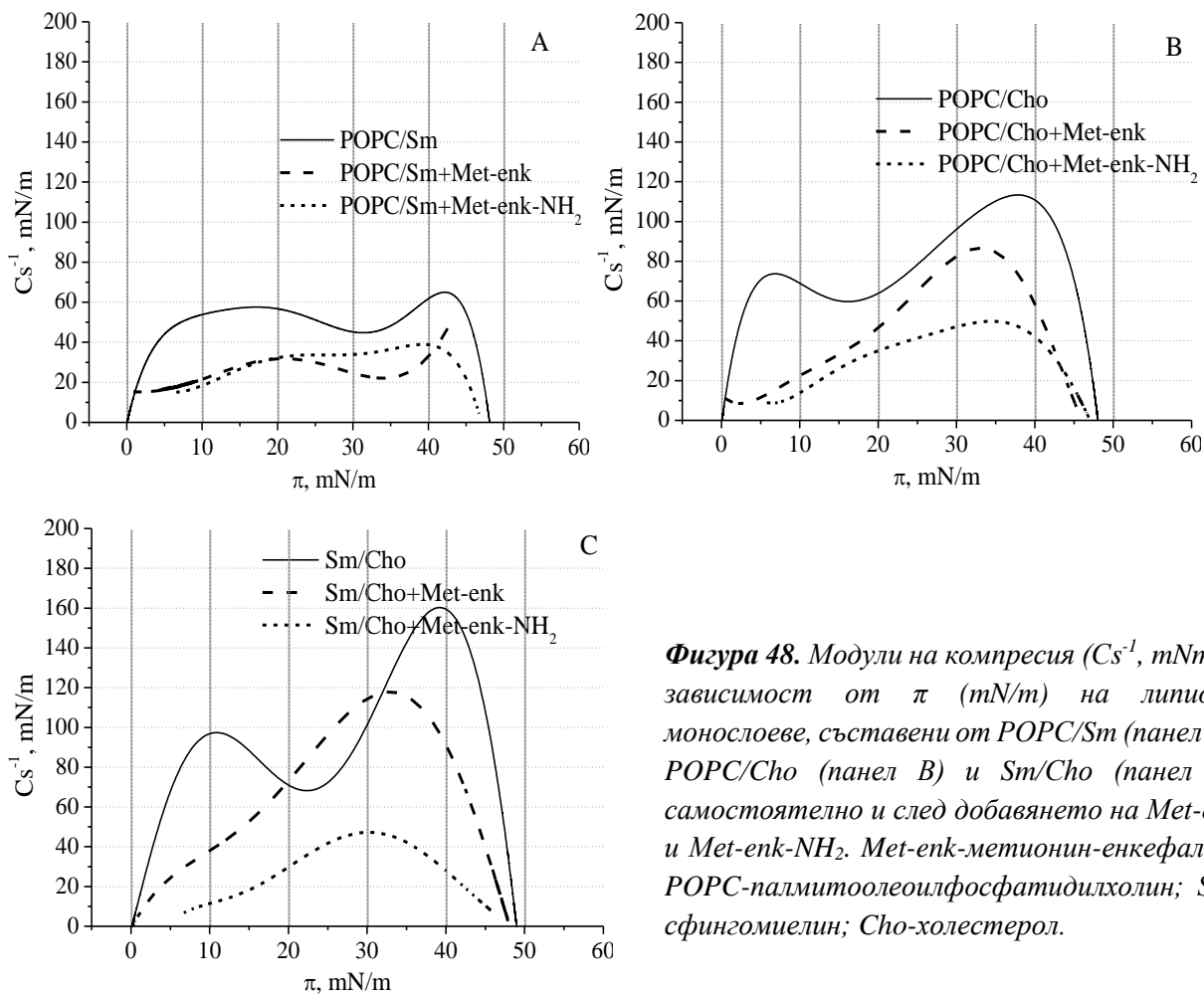
Фигура 46. Компресионни π/A -изотерми на липидни монослоеве, съставени от POPC/Sm (панел A), POPC/Cho (панел B) и Sm/Cho (панел C) самостоятелно и след добавянето на Met-enk и Met-enk-NH₂. Met-enk-метионин-енкефалин; POPC-палмитоолеоилфосфатидилхолин; Sm-сфингомиелин; Cho-холестерол.



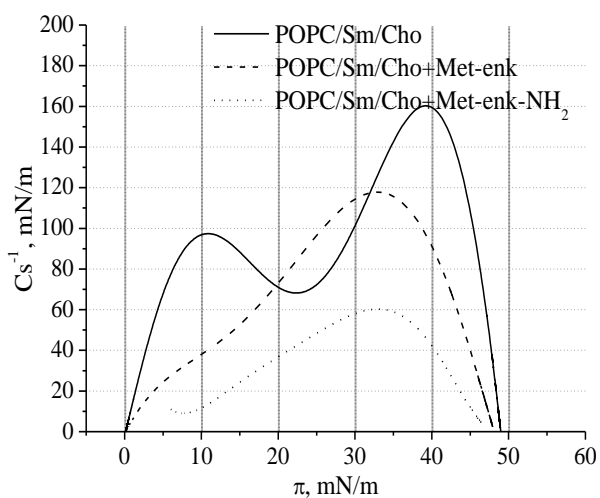
Фигура 47. Компресионна π/A -изотерма на липидни монослоеве, съставени от POPC/Sm/Cho самостоятелно и след добавянето на Met-enk и Met-enk-NH₂. Met-enk-метионин-енкефалин; POPC-палмитоолеоилфосфатидилхолин; Sm-сфингомиелин; Cho-холестерол.

Изказаната хипотеза се потвърждава и от изследванията на *Drolle et al. (2013)* и *Choi et al. (2014)*, според които мелатонинът се намества между фосфолипидите, като по този начин раздалечава молекулите им, докато присъствието на Cho води до формиране на по-плътни липидни домени сред раздалечените от мелатонина фосфатидилхолинови молекули.

По отношение на модулите на компресия на посочените липидни смеси, ефектът от инжектирането на невропептидите в субфазата под дву- и три-компонентните монослое е по-силно изразен, в сравнение с π/A -изотермите. С изключение на монослоя, състоящ се от POPC/Sm, който проявява поведение, подобно на монослоя само от POPC, Cs^{-1} -минимумите, т.е. фазовия преход, при всички холестерол-съдържащи смесени липид/енкефалинови монослое, са много слабо изразени (Фиг. 48, панели В и С, и Фиг. 49), потвърждаващо силното взаимодействие между енкефалините и липидите. От своя страна, максималните стойности на анализирания параметър са по-ниски при двойните и тройната липид-пептидни филми от тези на чистите липидни монослое. Разликата в максимумите на Cs^{-1} между чистите липидни и липид/Met-enk-NH₂-моделни мембрани е много по-голяма, в сравнение с ΔCs^{-1} между липидните и липид/Met-enk-монослое, напр. при чистата POPC/Cho-смес модулът на компресия достига стойности от 110 mN/m, докато добавянето на Met-enk ги понижава до около 90 mN/m, а С-крайното амидиране на пептида води до значителна промяна до 50 mN/m (Фиг. 48, панел В). По отношение на монослоеве, съставени от Sm/Cho и рафтовата смес с добавен POPC, се установява почти еднаква тенденция за понижаване на максималните Cs^{-1} : и в двата случая липидните филми преди добавянето на невропептидите показват стойности от около 160 mN/m; монослоеве с добавен Met-enk достигат Cs^{-1} от около 120 mN/m, докато добавянето на Met-enk-NH₂ значително променят този параметър до около 50 и 60 mN/m за дву- и три-компонентните холестерол-съдържащи липидни смеси, съотв. (Фиг. 48, панели В и С, и Фиг. 49). Смесите, съдържащи и Sm, и Cho са с най-високи Cs^{-1} -максимуми (около 160 mN/m при $\pi = 40$ mN/m), т.е. най-ниска повърхностна еластичност и отново амидираният метионин-енкефалин оказва по-силен ефект, като увеличава в по-голяма степен еластичността на смесените липид/пептидни монослое, в сравнение с Met-enk (Фиг. 48, панел С и Фиг. 49). Посочените резултати предполагат, че положителният заряд играе важна роля за взаимодействието на Met-enk-NH₂ с липидните смеси, изграждащи мембранните рафтове.



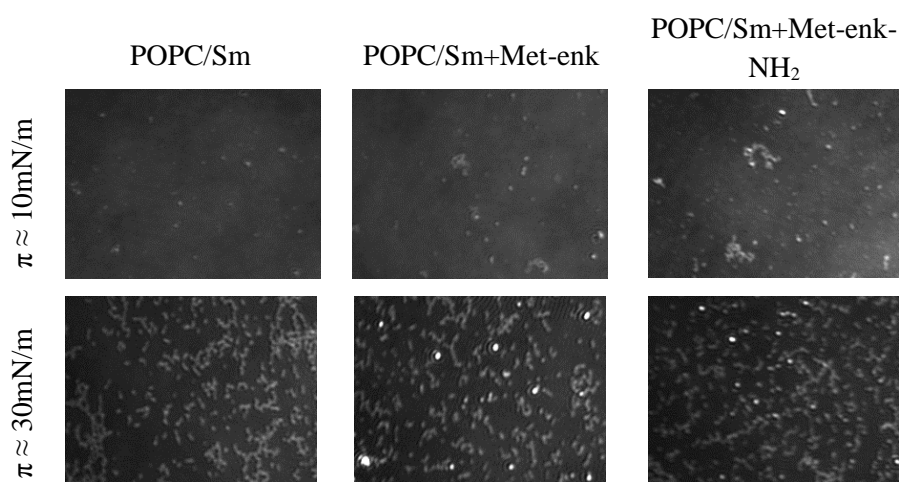
Фигура 48. Модули на компресия (Cs^{-1} , mNm) в зависимост от π (mN/m) на липидни монослоеове, съставени от POPC/Sm (панел A), POPC/Cho (панел B) и Sm/Cho (панел C) самостоятелно и след добавянето на Met-enk и Met-enk-NH₂. Met-enk-метионин-енкефалин; POPC-палмитоолеоилфосфатидилхолин; Sm-сфингомиелин; Cho-холестерол.



Фигура 49. Модули на компресия (Cs^{-1} , mNm) в зависимост от π (mN/m) на липидни монослоеове, съставени от POPC/Sm/Cho самостоятелно и след добавянето на Met-enk и Met-enk-NH₂. Met-enk-метионин-енкефалин; POPC-палмитоолеоилфосфатидилхолин; Sm-сфингомиелин; Cho-холестерол.

3.2 Сравнителен анализ на взаимодействието на синтетичен метионин-енкефалин и негова амидирана форма с липиди, съставлящи мембранните рафтове посредством Брюстър-ъглова микроскопия

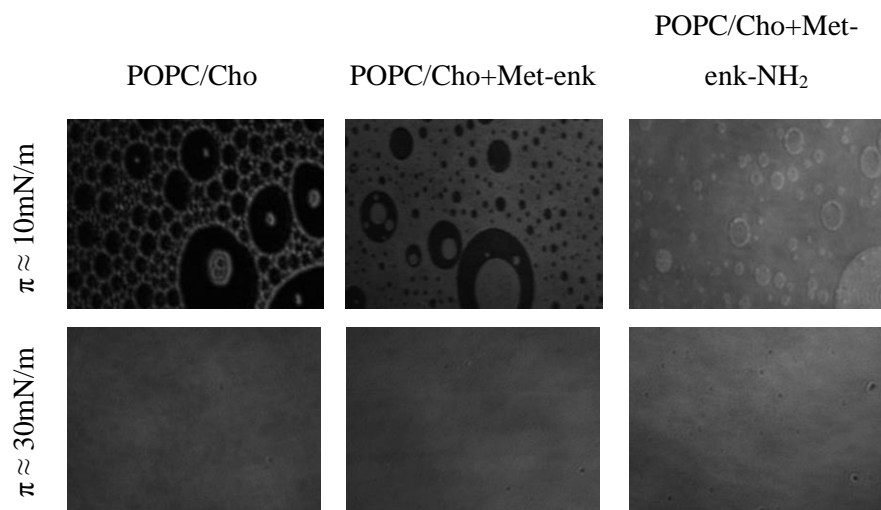
Експериментите с БАМ за визуализиране на взаимодействието на енкефалините с дву- и три-компонентните липидни смеси от POPC, Sm и Cho показват значителна промяна в морфологията на монослоеве само при повърхностно налягане от около 10 mN/m (Фиг. 53-56). Вижда се, че проникването на Met-enk в POPC/Sm-монослоеве води до агрегиране на домените, характерни за чистия липиден филм, а модифицирането на неврoпептида предизвиква в допълнение към агрегирането им и увеличаване на техния брой (Фиг. 53).



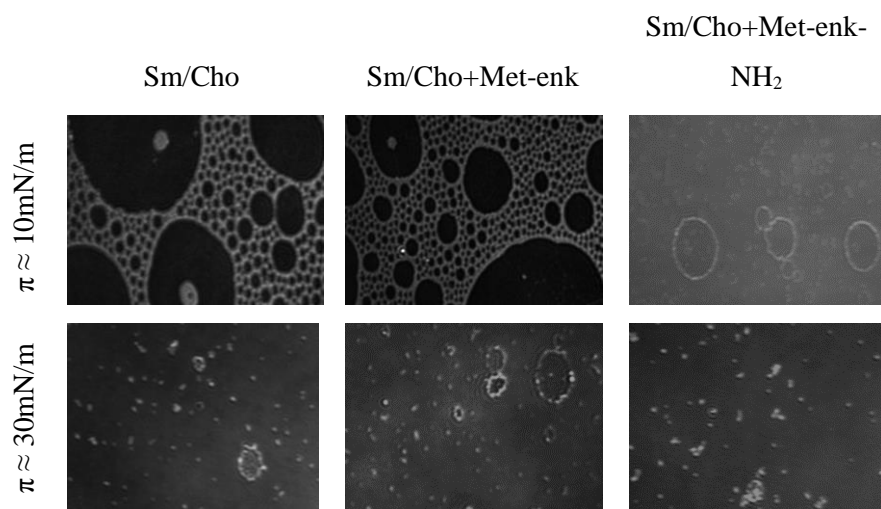
Фигура 53. БАМ-изображения на липидни монослоеве, съставени от POPC/Sm преди и след инжектиране на Met-enk и Met-enk-NH₂ в субфаза, съставена от 0,15 M NaCl, при стойности на повърхностното налягане на чистите липидни филми около 10 и 30 mN/m. Met-enk-метионин-енкефалин; POPC-палмитоолеоилфосфатидилхолин; Sm-сфингомиелин.

При фосфатидилхолин/холестеролния монослой, добавянето на метионин-енкефалина води до уплътняване на филма, което се вижда като по-хомогенна повърхност с много по-малко свободни от липидни молекули пространства под формата на черни празнини (Фиг. 54).

В случая на Sm/Cho ефектът е по-слабо изразен, но тенденцията за редуциране на свободната площ от немодифицирания енкефалин се запазва – мрежовидните домени на чистия липиден филм намаляват размера си при π около 10 mN/m (Фиг. 55).



Фигура 54. БАМ-изображения на липидни монослое, съставени от POPC/Cho преди и след инжектиране на Met-enk и Met-enk-NH₂ в субфаза, съставена от 0,15 M NaCl, при стойности на повърхностното налягане на чистите липидни филми около 10 и 30 mN/m. Met-enk-метионин-енкефалин; POPC-палмитоолеилфосфатидилхолин; Cho-холестерол.

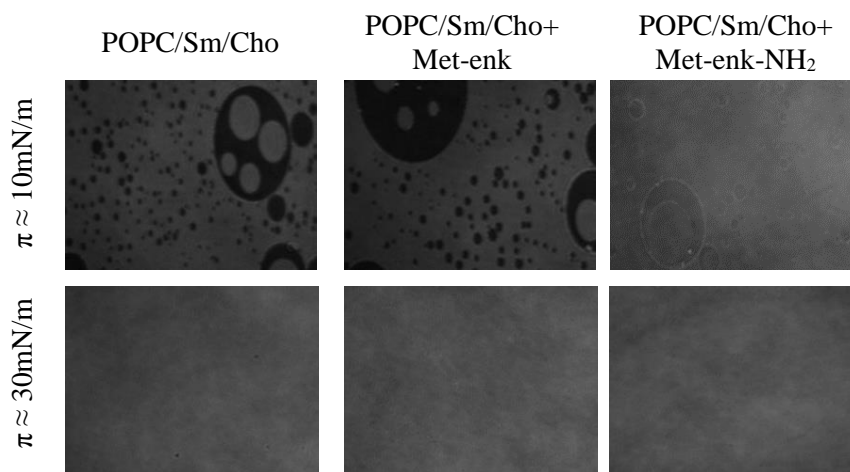


Фигура 55. БАМ-изображения на липидни монослое, съставени от Sm/Cho преди и след инжектиране на Met-enk и Met-enk-NH₂ в субфаза, съставена от 0,15 M NaCl, при стойности на повърхностното налягане на чистите липидни филми около 10 и 30 mN/m. Met-enk-метионин-енкефалин; Sm-сфингомиелин; Cho-холестерол.

Най-малка промяна в повърхностната морфология на монослоеве се установява при тройната рафтова смес след инжектиране на Met-enk в субфазата под формираните монослоеве, като тя се изразява в намаляване на броя дупчици във филма (Фиг. 56).

Добавянето на С-крайна аминок-група към изследвания неврпептид при всички холестерол-съдържащи липидни смеси води до значителни и

подобни ефекти – значително хомогенизиране на филмите, видимо като промяна в контраста на изображенията към сивата гама, както и намаляване на контраста на формираните домени (Фиг. 54-56).



Фигура 56. БАМ-изображения на липидни монослоеове, съставени от POPC/Sm/Cho преди и след инжектиране на Met-enk и Met-enk-NH₂ в субфаза, съставена от 0,15 M NaCl, при стойности на повърхностното налягане на чистите липидни филми около 10 и 30 mN/m. Met-enk-метионин-енкефалин; POPC-палмиоолеилфосфатисилхолин; Sm-сфингомиелин; Cho-холестерол.

При повърхностно налягане от около 30 mN/m, т.е. по-плътен монослой, не се забелязва видима промяна в повърхностната морфология, респ. в опаковката на молекулите преди и след добавянето и на двата изследвани пентапептида при всички анализирани изображения на липидните смесени филми. Въз основа на анализите на съответните изотерми и модулите на компресия обаче, е видно, че пептидите променят конформацията си при плътни монослоеове, което резултира в структурна реорганизация в липидните молекули на въздушно-водната фазова граница.

При ниски стойности на повърхностно налягане, формираните домени в смесените пептид/липидни филми потвърждават предположението, че пептидите навлизат в монослоеве. Освен това, разликите в изображенията на добавените към липидните монослоеове енкефалини, подкрепят изказаната вече хипотеза, че докато в случая на цвистерийонния Met-enk взаимодействието с липидите е основно в резултат на хидрофобни сили, при Met-enk-NH₂ положителният заряд на невропептида резултира в различно нагъване и следователно в различен тип на взаимодействие с липидните молекули. Тези резултати са в съответствие с описаните анализи за взаимодействието на изследваните пептиди с монослоеове, съставени от DMPC и DMPG, които показват, че повърхностното взаимодействие между

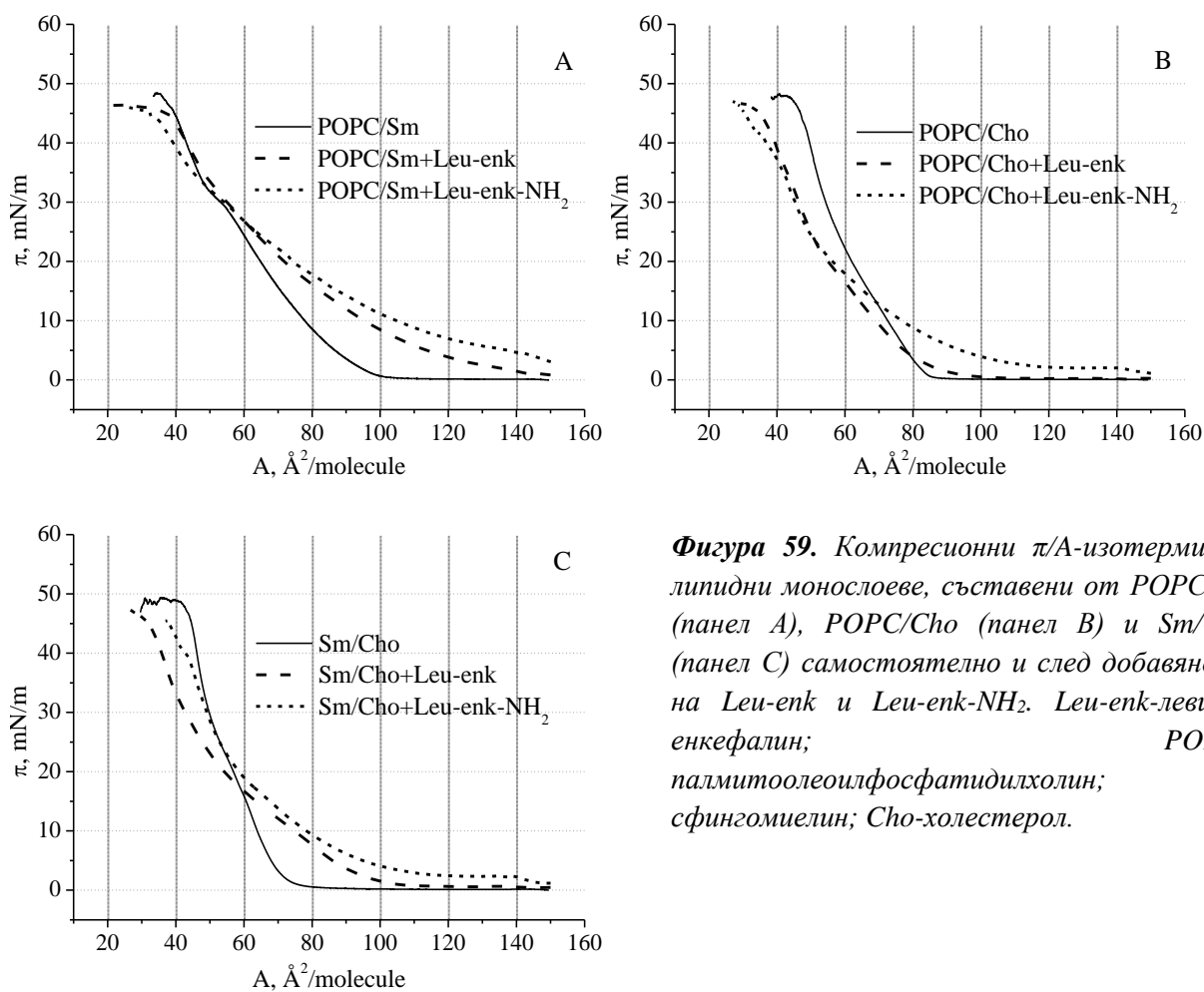
невропептидите и двата фосфолипида са резултат най-вече от хидрофобни взаимодействия. Електростатичните сили вероятно играят по-съществена роля само при компактните липидни монослоеове при блокирания с аминок-група карбоксилен край на Met-enk-NH₂. Освен това, амидирането на опиоидния пептид превръща цвистерйонния Met-enk в катион и следователно улеснява проникването му в мембранните липидни монослоеове. Met-enk обаче, вероятно предпочита ПОРС-съдържащата течно-неподредена част на монослоя, тъй като най-ясно изразената промяна в морфологията на филмите се установява при еквимоларната смес на фосфатидилхолина с холестерол (Фиг. 54).

4. Изследване на взаимодействието на синтетични левцин-енкефалини с моделни мембранни системи

4.1 Взаимодействие на синтетични левцин-енкефалини с липиди, съставлящи мембранните рафтове посредством монослойния модел на Лангмюир и метода на Вилхелми

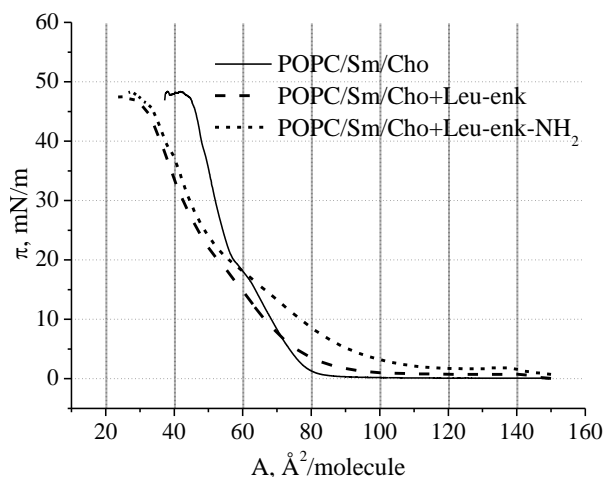
Изследването на взаимодействието на Leu-enk/Leu-enk-NH₂ с дву- и три-компонентните липидни смеси от ПОРС, Sm и Cho посредством компресионните π/A -изотерми, показва различия между несъдържащите холестерол (ПОРС/Sm) монослоеове и тези, при които той е съставен компонент (Фиг. 59 и 60). Вижда се, че при ПОРС/Sm се установява увеличаване на площта за молекула при дадено π с добавянето на двете форми на невропептида до високи стойности на повърхностно налягане (около 30-35 mN/m), след което промяната в подреждането на молекулите в липидно-пептидните монослоеове се променя и площта за липидна молекула намалява (Фиг. 59, панел А). Освен това, трябва да се отбележи, че С-крайното амидиране на Leu-enk води до по-силно изразени ефекти, както при по-ниски от 30 mN/m стойности на π (по-голяма площ/молекула), така и при по-високите (по-малка площ/молекула), в сравнение с немодифицирания невропептид. При всички останали смесени монослоеове посоченото преаранжиране на подредбата на липидните молекули, в следствие на енкефалиновите молекули, се осъществява при доста порехави монослоеове (по-ниско π), като отместването към по-ниски площи за молекула при уплътняване на опаковката на филмите е по-забележимо при смесите, в които участва ПОРС, вероятно заради наличието на ненаситен мастно-киселинен остатък (Фиг. 59, панел В и Фиг. 60). Т.е. може да се

предположи, че пептидите от една страна изместват Cho-молекули от повърхността, от друга – образуват структури, които благодарение на хидрофобни взаимодействия „изправят“ изкривяването в опашката на POPC, като в конкретните случаи добавената аминок-група не се отразява във висока степен на пептидната конформация при плътно-опаковани монослоеве.



Фигура 59. Компресионни π/A -изотерми на липидни монослоеве, съставени от POPC/Sm (панел A), POPC/Cho (панел B) и Sm/Cho (панел C) самостоятелно и след добавянето на Leu-enk и Leu-enk-NH₂. Leu-enk-левцин-енкефалин; POPC-палмитоолеоилфосфатидилхолин; Sm-сфингомиелин; Cho-холестерол.

В допълнение, от фигурите се вижда, че преходът от газово към течно-неподредено фазово състояние при смесените липид-пептидни филми при всички случаи е почти незабележим, което, както и при метионин-енкефалина, може да се обясни с проникване на невропептидите при рехавна опаковка на липидните молекули. Освен това, амидираният Leu-enk проявява по-силен ефект в началните фази на компресия, особено при POPC/Sm-смес, което отново би могло да се препише на наличието на положителен заряд, който да улесни първоначалното взаимодействие с липидните филми и по-точно с фосфолипидните им полярни глави.



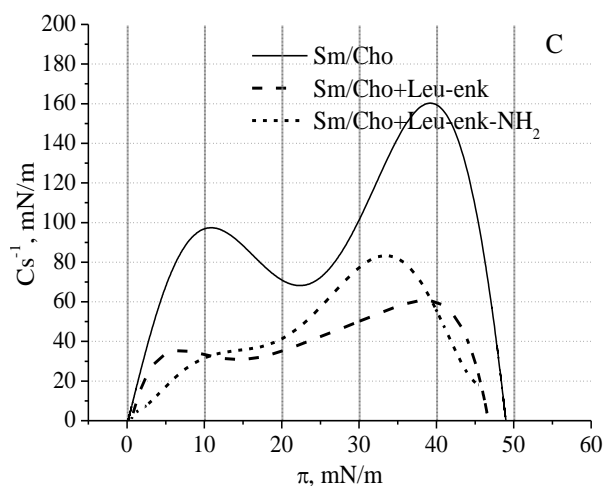
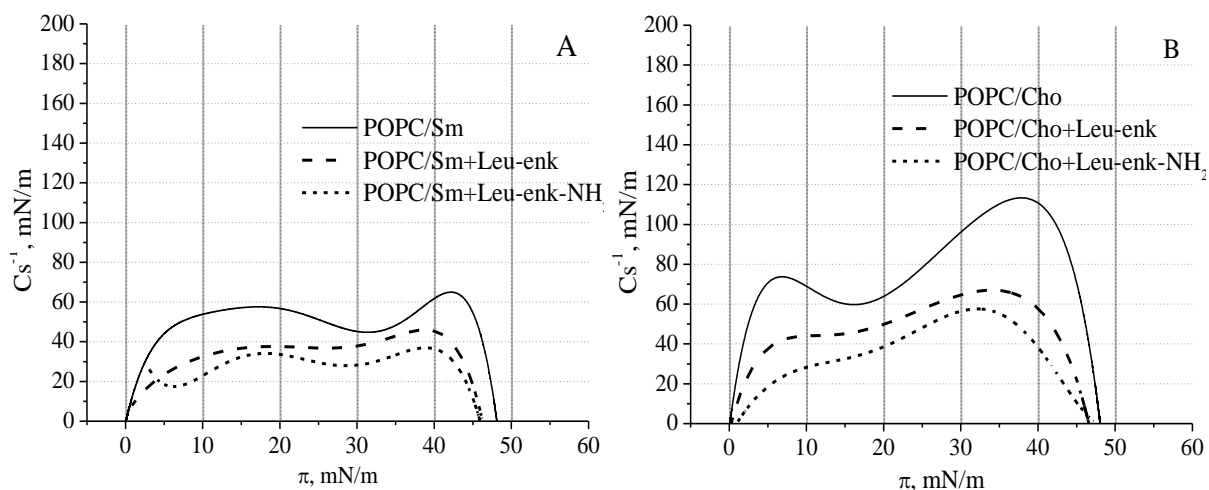
Фигура 60. Компресионна π/A -изотерма на липидни монослоеове, съставени от POPC/Sm/Cho самостоятелно и след добавянето на Leu-enk и Leu-enk-NH₂. Leu-enk-левцин-енкефалин; POPC-палмитоолеоилфосфатидилхолин; Sm-сфингомиелин; Cho-холестерол.

Наблюдаваните различни ефекти на Leu-енкефалините при различна опаковка на молекулите са в съответствие с откритията на Liu et al. (2006), според които преносът на енкефалини и енкефалинамиди през липидни бислойни мембрани се осъществява на три стъпки: адсорбция на пептидни молекули от външната страна на мембраните; преминаване на пептидите през хидрофобния участък на мембраните; и адсорбция на пептидните молекули от вътрешната повърхност на мембраните във вътрешната водна фаза на липозомите.

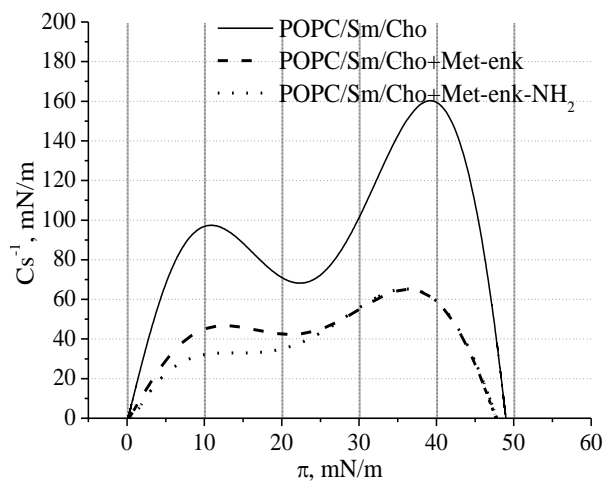
Анализите на изчислените Cs^{-1} , също потвърждават различните предпочитания на немодифицирания и на амидирания пентапептид към различните липидни смеси. Докато Leu-enk-NH₂ увеличава еластичността (по-ниски стойности на максималните Cs^{-1}) на POPC/Sm и POPC/Cho-смеси в по-голяма степен, в сравнение с Leu-enk (Фиг. 61, панели А и В), наличието на течно-подредени домени от Sm/Cho стопяват тази разлика при другите две липидни смеси, като най-големи промени в кривите Cs^{-1}/π се наблюдават именно при монослоеве, съставени само от Sm и Cho (Фиг. 61, панел С и Фиг. 62). Трябва все пак да се отбележи, че при всички анализирани случаи модулите на компресия на липид/енкефалиновите филми са по-ниски от тези на чистите липидни смеси, като тези ефекти са по-силно изразени при холестерол-съдържащите монослоеове.

По отношение на минимумите в анализирания показател също се установяват различия: при всички изследвани липидни смеси те са по-слабо изразени след добавянето и на двете форми Leu-enk (Фиг. 61 и 62); докато фазовият преход от течно-разтегнато към течно-кондензирано фазово състояние при POPC-съдържащите монослоеове обаче, се осъществява при сходни стойности на повърхностно налягане, при Sm/Cho-монослой се наблюдава отместване към по-ниско π (Фиг. 61, панел С). Това би могло да

се обясни с адсорбция на пептидите между Sm/Cho-домени, предизвиквайки тяхното приближаване, докато наличието на изкривяване в олеоиловата опашка в POPC вероятно компенсира този уплътняващ ефект, в резултат на поместването на пептидите именно в този участък.



Фигура 61. Модули на компресия (Cs^{-1} , mNm) в зависимост от π (mN/m) на липидни монослоеви, съставени от POPC/Sm (панел А), POPC/Cho (панел В) и Sm/Cho (панел С) самостоятелно и след добавянето на Leu-enk и Leu-enk-NH₂. Leu-enk-левцин-енкефалин; POPC-палмитоолеоилфосфатидилхолин; Sm-сфингомиелин; Cho-холестерол.

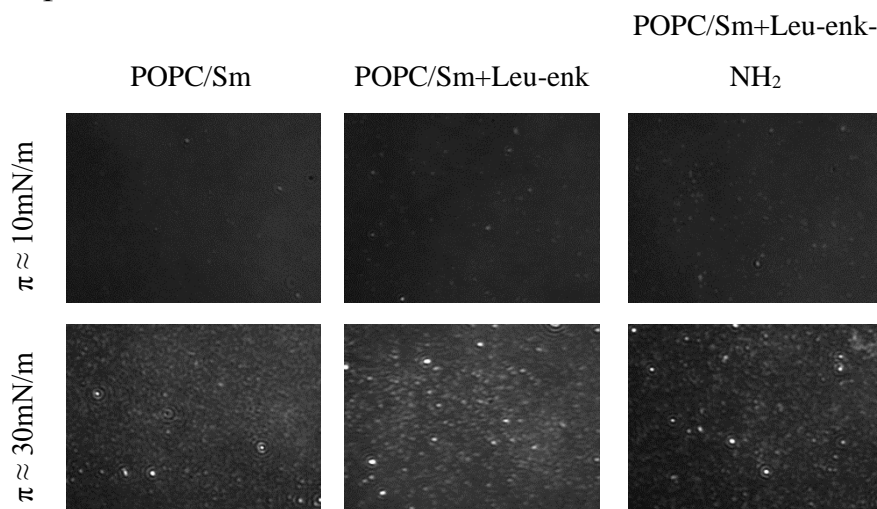


Фигура 62. Модули на компресия (Cs^{-1} , mNm) в зависимост от π (mN/m) на липидни монослоеви, съставени от POPC/Sm/Cho самостоятелно и след добавянето на Leu-enk и Leu-enk-NH₂. Leu-enk-левцин-енкефалин; POPC-палмитоолеоилфосфатидилхолин; Sm-сфингомиелин; Cho-холестерол.

4.2 Сравнителен анализ на взаимодействието на синтетичен левцин-енкефалин и негова амидирана форма с липиди, съставлящи мембранните рафтове посредством Брюстър-ъглова микроскопия

При дву- и три-компонентните липидни рафтови смеси, получените БАМ-изображения показват по-забележими различия в ефектите на Leu-enk и производното му, особено при холестерол-съдържащите монослоеве, но само при повърхностно налягане около 10 mN/m.

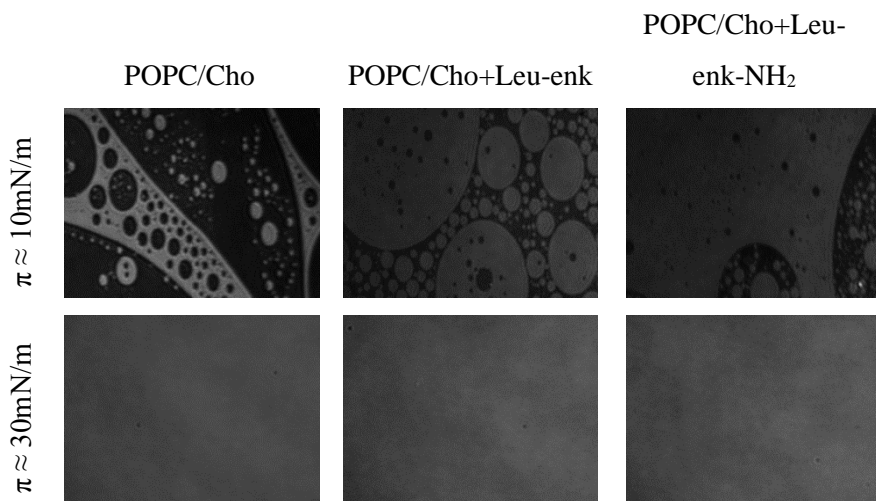
Липсата на холестерол при POPC/Sm-монослоеве логично се отразява в най-незабележимата промяна в морфологията на смесените липид/пептидни филми, тъй като е известно, че той има „втвърдяващ“ ефект върху мембраните (*Nelson and Cox 2008*), което води до по-ясни БАМ-изображения. Получените изображения показват, че добавянето на цвитерйонния пептид при изследваното рН води до формиране на малки агрегати на въздушно-водната фазова граница, чиято концентрация се увеличава с добавянето на NH₂-група към невропептида (Фиг. 66). Компресията на монослоеве до около 30 mN/m обаче, не се отразява в някаква характерна промяна в морфологията и при двата изследвани левцин-енкефалина.



Фигура 66. БАМ-изображения на липидни монослоеве, съставени от POPC/Sm преди и след инжектиране на Leu-enk и Leu-enk-NH₂ в субфаза, съставена от 0,15 M NaCl, при стойности на повърхностното налягане на чистите липидни филми около 10 и 30 mN/m. Leu-enk-левцин-енкефалин; POPC-палмитоолеилфосфатидилхолин; Sm-сфингомиелин.

При еквимоларната POPC/Cho-смес различията в изображенията на получените филми е по-очевидна: вижда се значително намаляване на свободните водни пространства след добавянето и на двата пептида, като

този ефект е чувствително по-силно наблюдаван при амидираното производно (Фиг. 67). При плътната опаковка на липидните молекули ($\pi \approx 30 \text{ mN/m}$) получените филми както при отсъствие, така и при наличие на енкефалини, изглеждат доста хомогенни, така че не може да се установи как влияе добавянето на невропептидите към липидните монослое.

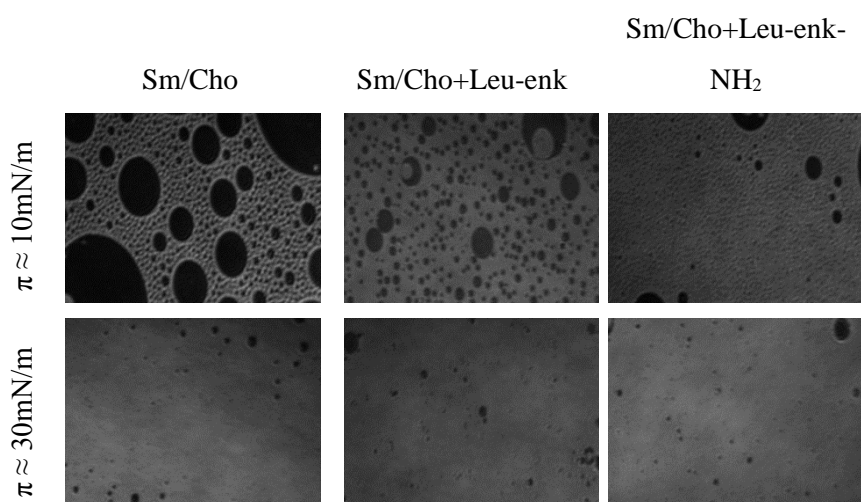


Фигура 67. БАМ-изображения на липидни монослое, съставени от POPC/Cho преди и след инжектиране на Leu-enk и Leu-enk-NH₂ в субфаза, съставена от 0,15 М NaCl, при стойности на повърхностното налягане на чистите липидни филми около 10 и 30 mN/m. Leu-enk-левциненкефалин; POPC-палмитоолеоилфосфатидилхолин; Cho-холестерол.

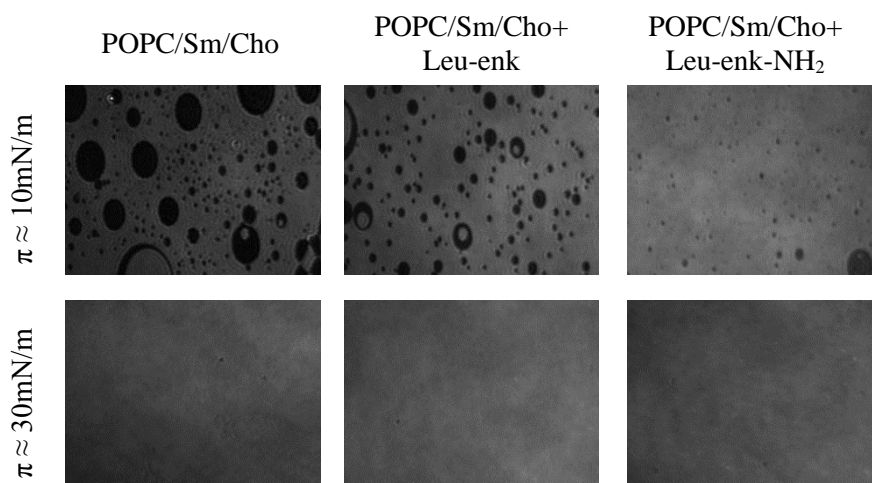
Подобна тенденция се установява при моделните мембрани, съставени от смес от сфингомиелин и холестерол – отново немодифицираният Leu-enk води до значително уплътняване на филма, отразяващо се в намаляване на размера на свободните от липиди кръгообразни пространства, а Leu-enk-NH₂ резултира в почти изцяло покриване на въздушно-водната повърхност (Фиг. 68). Напълно аналогично е положението и при тройната липидна смес след добавянето на съответните пептиди, което значително хомогенизира получените филм със значителен превес на амида (Фиг. 69).

Тъй като при Брюстър-ъгловата микроскопия получените изображения показват отражението на *p*-поляризираната светлина от повърхността, а при Лангмюировите монослое полярните части на липидните молекули контактуват с водната субфаза, докато във въздуха се разполагат хидрофобните опашки, е логично да се предположи, че при плътната опаковка на липидните молекули и формирането на хомогенни филми взаимодействието им с изследваните пептиди е в областта на главите и онези хидрофобни участъци, разположение в близост до полярната част.

Според *Babakhani et al. (2008)* пептидите не е необходимо да навлизат дълбоко в мембраните и да се стабилизират преди да се нагънат в структура от по-висок порядък – ако проникнат дълбоко, процесът на агрегация е неизгоден от термодинамична гледна точка. Това показва, че мембранното обкръжение играе директна и значителна роля в придобиването на правилна конформация на белтъците и пептидите, а не е просто пасивна среда.



Фигура 68. БАМ-изображения на липидни монослоеове, съставени от Sm/Cho преди и след инжектиране на Leu-enk и Leu-enk-NH₂ в субфаза, съставена от 0,15 M NaCl, при стойности на повърхностното налягане на чистите липидни филми около 10 и 30 mN/m. Leu-enk-левциненкефалин; Sm-сфингомиелин; Cho-холестерол.



Фигура 69. БАМ-изображения на липидни монослоеове, съставени от POPC/Sm/Cho преди и след инжектиране на Leu-enk и Leu-enk-NH₂ в субфаза, съставена от 0,15 M NaCl, при стойности на повърхностното налягане на чистите липидни филми около 10 и 30 mN/m. Leu-enk-левциненкефалин; POPC-палмиоолеоилфосфатисилхолин; Sm-сфингомиелин; Cho-холестерол.

ИЗВОДИ

1. Изследването на взаимодействието между метионин-енкефалин (Met-enk) и амидираната му форма (Met-enk-NH₂) към Лангмюирови монослоеове, съставени от различни по заряд фосфолипиди, показват, че проникването им в монослоеове от отрицателно заредения димиристоилфосфатидилглицерол (DMPG) е по-силно, спрямо това в монослоеове от цвитерйонния димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) и зависи от плътността (площта на молекула) на монослоя. Установено е, че площта за липидна молекула в монослоя, под която рязко се затруднява проникването на енкефалините, е по-голяма за монослоеове от DMPC (80 Å²/молекула), спрямо тази за монослоеове от DMPG (50 Å²/молекула).
2. Катионният Met-enk-NH₂ прониква към фосфолипидните монослоеове в значително по-висока степен, в сравнение с немодифицирания Met-enk, както при ниска, така и при висока плътност на липидните молекули в монослоя. Този ефект е по-силен към монослоеове от DMPG, което указва ролята на електростатичните взаимодействия между енкефалините и фосфолипидите. Определено е, че критичното повърхностно налягане на фосфолипидните монослоеове, над което енкефалините не могат да проникват в тях, е по-голямо за амидирания енкефалин, което за DMPG монослоеове нараства до 45 mN/m, спрямо това за немодифицирания енкефалин (28 mN/m).
3. Регистрирани са различия в повърхностната морфология на монослоеове от DMPC и от DMPG и в присъствие на немодифициран и амидиран метионин-енкефалин при различна плътност на липидните молекули в монослоя. Получените изображения от Брюстър-ъгловата микроскопия (БАМ) са в съответствие с резултатите от монослойните изследвания за по-силното проникване на Met-enk-NH₂, при който се наблюдава по-силна промяна в морфологията на изследваните монослоеове, спрямо немодифицирания енкефалин. Ефектите предизвикани от енкефалините са по-силно изразени при монослоеове от DMPG, спрямо тези при DMPC.
4. При изследване на влиянието на енкефалините върху стабилността и кинетиката на изтичане, и образуването на тънки течни филми (ТТФ), формиращи от DMPC и DMPG, е установено, че амидираният катионен енкефалин дестабилизира ТТФ от DMPC, за разлика от немодифицирания енкефалин. Показано е, че дебелината на смесените DMPC/Met-enk филми е по-голяма от тази на чистите DMPC филми.

Установени са значителни различия в кинетиката на изтичане на липидните ГТФ в присъствие и отсъствие на енкефалини. Регистрирано е, че немодифицираният енкефалин удължава времето за образуване на стабилни DMPC/Met-enk филми, спрямо това на DMPC филми, докато присъствието на амидирания енкефалин повишава скоростта на изтичане и води до скъсване на DMPC филмите, но не и на DMPG филмите.

5. Установена е различна степен на проникване на енкефалини към монослоевете от основни липидни компоненти на невроните. Показано е, че във всички случаи значително по-висока е степента на проникване на амидирания Met-enk-NH₂, спрямо Met-enk и, че разликите зависят от състава на монослоя. Определена е (чрез площ на молекула и повърхностно налягане) различна плътност на монослоя в зависимост от липидния му състав, над която двата енкефалина не могат да проникват в него. Установено е най-силно проникване на амидирания Met-enk-NH₂ към монослой от холестерол. Изказана е хипотеза за формиране на водородни връзки между NH₂-крайната група на амидирания енкефалин и ОН-групата на холестерола при взаимодействието им в монослоя.
6. Установена е различна степен на проникване на енкефалини към монослоевете от липиди, съставлящи мембранните рафтове (POPC, Sm и Cho, и техни двойни и тройни смеси). Показано е за всички индивидуални липиди и техните смеси, че двете форми на енкефалините проникват по-силно в монослоевете в течно-разтегнато състояние (LE) отколкото в течно-кондензирано състояние (LC), което и при двете състояния е по-силно при амидираната форма.
7. Установено е, че при компресия на монослоеве взаимодействията между рафтовите липиди и енкефалините водят до повърхностна реорганизация на молекулите и до промени в латералната еластичност на монослоеве. Най-значително увеличаване на латералната еластичност след добавка на енкефалини е наблюдавано за монослой от Cho, следван от Sm и POPC монослоеве, като е установено, че във всички случаи ефектите от амидирания енкефалин са по-силни от тези на немодифицирания енкефалин. Установено е, че енкефалините увеличават еластичността и на монослоеве от различните липидни смеси, като ефектите и на двата енкефалина са най-силно изразени при холестерол-съдържащите липидни смеси, където отново са по-изявени при Met-enk-NH₂.

8. Установено е, че в присъствие на енкефалини, характерът на π/A -изотермите и модулите на компресия (C_s^{-1}) на монослоевете от холестерол-съдържащи рафтови смеси и от несъдържащата холестерол смес (POPC/Sm) се различава значително и зависи от вида на енкефалина. На базата на получените резултати е предложена хипотеза за повишен афинитет на проникване на катионния Met-enk-NH₂ към течно-подредената фаза на Sm/Cho-домените в монослоя, а на цвистерйонния Met-enk – към течно-неподредената фаза на цвистерйонните POPC молекули в монослоя.
9. При изследване на взаимодействията на левцин-енкефалин (Leu-enk) и неговата амидирана форма с липиди, съставлящи мембранните рафтове са установени различията в ефектите на двете форми и е показано, че те са най-големи при монослоевете от Sm и Cho, следвани от POPC. Установено е, че двете форми на Leu-enk повишават латералната еластичност на липидните монослоевете, което е най-силно изразено при холестеролните моно-, ди- и три-компонентни монослоевете. В присъствието и на двете форми на Leu-enk е регистрирано изместване на точката на колапс в π/A -изотермите на монослоевете от чист POPC и от холестероловите смеси на POPC и Sm (вкл. и тройната смес) от площ при бл. 45 Å²/молекула до около 30 Å²/молекула, спрямо изотермите в отсъствие на левцин-енкефалините.
10. Изображенията на морфологията на монослоевите от POPC, Sm, Cho и техните смеси преди и след добавянето на двата природни енкефалина и техните амиди, показват значителни различия в ефектите на немодифицираните и амидираните пептиди, особено при рехавна опаковка на липидите. Демонстрирано е по-силното влияние на амидираната форма върху морфологията на монослоевите, което води до значително хомогенизиране на смесените монослоевете и намаляване на контраста на изображенията, изразено най-силно при монослойни смеси, съдържащи холестерол. При уплътнени монослоеве, влиянието на левцин-енкефалините върху повърхностната морфология е най-изразено при POPC, като отново по-силен е ефекта на амидираната форма.
11. Сравнителният анализ между двата аналога на природните енкефалини (Met-enk и Leu-enk) и техните амидирани форми по отношение на взаимодействията им с липиди в моделни монослоеве показва, че метионин-енкефалините променят в по-голяма степен изследваните равновесни и динамични характеристики на липидните монослоеве, в

сравнение с левцин-енкефалините, при които се наблюдават сходни в качествено отношение ефекти.

12. Нашите резултати демонстрират важноста от изследването на неuropeптиди и техни аналози в съответствие с хипотезата за мембранната катализа. В допълнение, получените данни показват, че моделът на Лангмюировите монослоеве, в комбинация с Брюстър-тъгловата микроскопия и модела на тънките течни филми могат успешно да се прилагат за предклинични изследвания на новосъздадени аналози на природните аналгетици на ниво биомембрани.

ПРИНОСИ

1. Показана е доминиращата роля на електростатичните взаимодействия между различно заредени форми на метионин-енкефалин и фосфолипиди с различен заряд в монослове и е установено количествено по-затруднено проникване на цвистерйонния Met-enk към монослове от цвистерйонния фосфатидилхолин (спрямо монослове от анионния фосфатидилглицерол), както и улеснено проникване на катионния Met-enk-NH₂ (спрямо това на Met-enk) към монослове от фосфатидилглицерол. Електростатичният характер на взаимодействията между метионин-енкефалини и фосфолипиди е потвърден и чрез модела на тънките течни филми в рамките на DLVO-теорията.
2. Установена е различна степен на проникване на енкефалини към монослове от основни липидни компоненти на невроните (холестерол, сфингомиелин и техни смеси) и е показано количествено по-силно проникване във всички случаи на катионния Met-enk-NH₂, спрямо това на Met-enk, ефект, който е най-силно изразен към монослове, формирани от холестерол. Определени са различни плътности на монослоя (чрез площ за молекула и повърхностно налягане), над които двата енкефалина не могат да проникват в него и е показана зависимостта им от липидния състав на монослоя и вида на енкефалина.
3. Установена е различна степен на проникване на енкефалини към монослове от липиди, съставлящи мембранните рафтове (POPC, Sm и Cho и техните смеси). При компресия на монослоеве в присъствие на енкефалини са установени ефекти на изместване на точката на колапс в π/A -изотермите към по-малки площи за молекула и на нарастване на латералната еластичност на монослоеве, които са най-силно изразени при монослове от Cho и холестерол-съдържащи смеси, и е показано, че във всички случаи ефектите от амидирания енкефалин Met-enk-NH₂ са по-силни от тези на Met-enk. Изказана е хипотеза за формиране на водородни връзки между NH₂-крайната група на амидирания енкефалин и OH-групата на холестерола при взаимодействието им в монослоя, водещо до повишен афинитет на проникване на амидирания енкефалин към течно-подредената фаза на Sm/Cho-домени в монослоя и такъв на Met-enk към течно-неподредената фаза на POPC (палмитоолеоилфосфатидилхолин) молекулите в монослоя.
4. Регистрирани са различия в повърхностната морфология на монослове от DMPC, DMPG, рафтови липиди и техни смеси в присъствие на

енкефалини (Met-enk и Leu-enk) при различна плътност на монослоя, които са в съответствие с резултатите, получени от монослойните изследвания. Показано е, че ефектите, предизвикани от Met-enk са по-силно изразени при монослоеве от DMPG (спрямо тези от DMPC) и промените във морфологията на филмите са най-очевидни при рехавна опаковка на липидните молекули и във всички случаи по-силно изразени при амидираните форми на енкефалините за различните по състав монослоеве, особено при холестерол-съдържащите смеси.

5. Сравнителният анализ между двата аналога на природните енкефалини (Met-enk и Leu-enk) и техните амидирани форми по отношение на взаимодействията им с липиди в моделни монослоеве показва, че при метионин-енкефалините се наблюдават по-силни ефекти върху изследваните равновестни и динамични характеристики на липидните монослоеве, в сравнение с левцин-енкефалините. При Leu-enk се наблюдават сходни на Met-enk в качествено отношение ефекти. Нашите резултати демонстрират важността от изследването на невропептиди и техни аналози в съответствие с хипотезата за мембранната катализа, както и че комбинирането на модела на Лангмюировите монослоеве с Брюстър-ъгловата микроскопия и с модела на тънките течни филми (използвано за първи път) може успешно да се прилага за предклинични изследвания на новосъздадени аналози на природните аналгетици на ниво биомембрани.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ

Статии в научни списания

1. **A. Tsanova**, R. Georgieva, A. Jordanova, T. Pajpanova, E. Golovinski, Z. Lalchev, Effects of Cholesterol and Sphingomyelin on penetration rate of neuropeptides to lipid monolayers. On-line version of the Journal Biotechnology and Biotechnological Equipment - special issue, vol. 23, pp. 469-472, 2009. **IF = 0,291**
2. **A. Tsanova**, A. Jordanova, G. As. Georgiev, T. Pajpanova, E. Golovinsky, Z. Lalchev, Comparative Study of the Interaction of Synthetic Methionine-enkephalin and its Amidated Derivate with Monolayers of Zwitterionic and Negatively Charged Phospholipids. Amino Acids, vol. 42(1), pp. 253-260, 2012. **IF=4,106**
3. **Asya Tsanova**, Albena Jordanova, Tamara Pajpanova, Evgeny Golovinsky, Zdravko Lalchev, Study of the interaction between synthetic enkephalins and films composed of raft lipids. Science & Technologies, vol. 3(1), Medicine, pp. 208-212, 2013
4. **A. Tsanova**, A. Jordanova, T. Dzimbova, T. Pajpanova, E. Golovinsky, Z. Lalchev, Interaction of methionine–enkephalins with raft-forming lipids: monolayers and BAM experiments. Amino Acids, vol. 46(5), pp. 1159-1168, 2014. **IF=3.914**

Участия в научни форуми, свързани с дисертацията

1. **A. Tsanova**, D. Dacheva, V. Penchev, G. Georgiev, T. Pajpanova, E. Golovinski, Z. Lalchev, Comparative study of the interaction between synthetic Methionine-enkephalin and monolayers of zwitterionic and negatively charged phospholipids, XI Anniversary Scientific Conference with International Attendance, Faculty of Biology, Sofia University “St. Kliment Ohridski”, p.119, May 27-29, 2009.
2. **A. Tsanova**, R. Georgieva, A. Jordanova, T. Pajpanova, E. Golovinski, Z. Lalchev, Effects of Cholesterol and Sphingomyelin on penetration rate of neuropeptides to lipid monolayers, XI Anniversary Scientific Conference with International Attendance, Faculty of Biology, Sofia University “St. Kliment Ohridski”, p.120, May 27-29, 2009.
3. **A. Tsanova**, D. Dacheva, V. Penchev, G. As. Georgiev, T. Pajpanova, E. Golovinski, Z. Lalchev, Comparative Study of the Interaction between Synthetic Methionine-enkephalin and its Aminated Derivate with Monolayers of Zwitterionic and Negatively Charged Phospholipids, 11th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins, Vienna, August 3-7, 2009, p. 764.

4. **А. Цанова**, В. Кръстева, С. Янева, А. Йорданова, Г. Ас. Георгиев, З. Лалчев. Сравнително изследване на проникващата способност на Метионин-енкефалин и неговата амидирана форма в монослое, съставени от сфингомиелин и холестерол, XX Юбилейна международна научна конференция, Стара Загора, 35 стр., 3-4 юни 2010.
5. **А. Tsanova**, S. Yaneva, V. Krasteva, A. Jordanova, Tensiometric studies of the interaction between enkephalins and lipid monolayers, Младежка научна конференция "Климентови дни", Биологически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“, стр. 37, 22-23 ноември 2010.
6. **А. Tsanova**, A. Jordanova, G. As. Georgiev, T. Pajpanova, E. Golovinsky, Z. Lalchev, Study of the interaction between synthetic Methionine-enkephalin and model lipid membranes, IVth International Congress of Molecular Medicine, Yeditepe University, Istanbul, Turkey, p. 107, 27-30.06.2011.
7. **Ася Цанова**, Албена Георгиева, Тамара Пайпанова, Евгени Головински, Здравко Лалчев, Изследване на взаимодействието между синтетични енкефалини и филми съставени от рафтови липиди, XXIII Международна научна конференция, Стара Загора, стр. 34, 6-7 юни 2013.
8. **Asya Tsanova**, Albena Jordanova, Tamara Pajpanova, Evgeny Golovinsky, Zdravko Lalchev. Interaction between leucine-enkephalins and model membranes composed of raft forming lipids, International conference "Bioscience-development and new opportunities" - KLIMENT`S DAYS, Sofia, Bulgaria, pp.67-68, 20-22 Nov 2013.

Забелязани цитирания на публикацията:

А. Tsanova, A. Jordanova, G. As. Georgiev, T. Pajpanova, E. Golovinsky, Z. Lalchev, Comparative Study of the Interaction of Synthetic Methionine-enkephalin and its Amidated Derivate with Monolayers of Zwitterionic and Negatively Charged Phospholipids, Amino Acids, vol. 42(1), pp. 253-260, 2012.

1. B. Gzyl-Malcher, J Handzlik, E Klekowska. Temperature dependence of the interaction of prazosin with lipid Langmuir monolayers, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, vol. 112, pp. 171–176, 2013.
2. Richard J. Bodnar, Endogenous opiates and behavior: 2012, Peptides, vol. 50, pp. 55-95, 2013.
3. Lhor M, Bernier SC, Horchani H, Bussi eres S, Cantin L, Desbat B, Salesse C. Comparison between the behavior of different hydrophobic peptides allowing membrane anchoring of proteins. Adv Colloid Interface Sci., vol. 27(1), pp. 233-239, 2014.