

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. КЛИМЕНТ

ОХРИДСКИ"

ХИМИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

Катедра Физикохимия



---

*Кристина Мирчева Мирчева*

## *Автореферат*

на дисертация за присъждане на образователната и научна  
степен "Доктор"

### **МЕХАНИЗМИ НА ДЕЙСТВИЕ НА ЛИПОЛИТИЧНИ И ПРОТЕОЛИТИЧНИ ЕНЗИМИ ВЪРХУ СУБСТРАТИ, ОРГАНИЗИРАНИ В МОДЕЛНИ НАНОРАЗМЕРНИ СТРУКТУРИ**

Научни ръководители:

доц. д-р Цветанка Иванова

проф. дхн Иван Панайотов

Рецензенти:

акад. дфн Александър Петров

доц. д-р Румен Тодоров

София, 2011г.

*Дисертационният труд съдържа 138 страници, 64 фигури и 5 таблици. Цитирани са 176 литературни източника. Номерата на фигурите, таблиците, уравненията и цитатите в автореферата съответстват на тези в дисертацията.*

*Дисертацията е обсъдена и насочена за защита от разширения катедрен съвет на катедра по физикохимия към Химически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“.*

*Защитата на дисертационния труд ще се състои на 18.07.2011г. от 16<sup>00</sup> часа в заседателната зала на Химически факултет, СУ „Св. Кл. Охридски“.*

*Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на Химически факултет, СУ „Св. Кл. Охридски“.*

## I. Увод

Характерно за живия свят е пространствено-структурната му микро- и наноразмерна организация. Разбирането, че високата специфичност на ензимно-каталитичните взаимодействия в живите системи се задава освен от механизмите на специфичните химични реакции и от физическата организация, в която тя се реализира, придобива все по-голяма тежест.

Настоящата дисертация си поставя за цел да изследва механизмите на действие на липолитични и протеолитични ензими върху субстрати, организирани в различни наноразмерни структури. В дисертацията механизмът на действие на ензимите се разглежда не в тесния смисъл на ориентация на каталитичния център на ензима към субстратните молекули при химичният акт на каталитично взаимодействие. Предложеният феноменологичен кинетичен подход не носи информация за този молекулен механизъм, а за механизма на организация на физикохимичните процеси (като проникване на ензима, масопренос на продуктите на реакцията и пр.) съпътстващи ензимното действие. Дисертацията представлява едно продължение на усилията, предприети в тази посока в лабораторията по биофизикохимия. В нея се изследват и анализират две важни обстоятелства, характерни за организацията в живите системи. От една страна, за тях е характерно едновременното действие на един или повече ензими върху смеси от различни субстрати, като от важно значение е дали и как се променя ензимната активност и ефикасността на ензимното действие. От друга страна, ензимната хидролиза е типичен пример за каталитична хетерогенна система, която е организирана и протича на биологичните гранични повърхности спрегнато с различни повърхностни процеси, като проникване и активация на ензима, реорганизация, адсорбция и десорбция на реакционните продукти, и др.

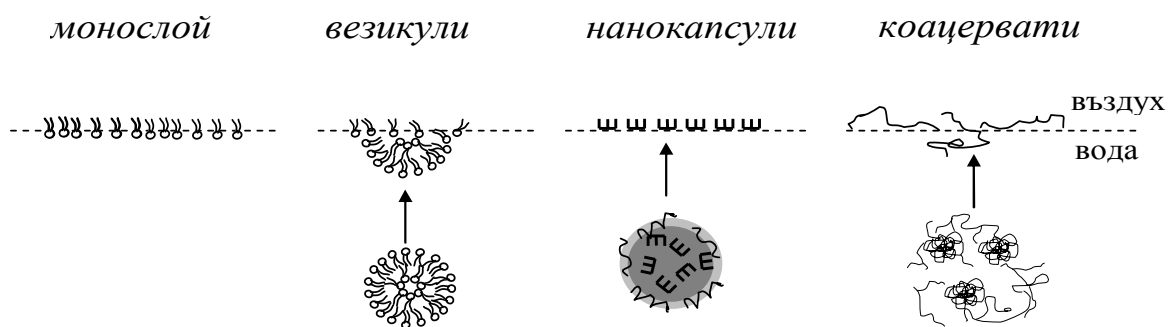
В дисертацията са изследвани механизмите на два типа ензимно-каталитични системи: действие на липази и фосфолипази върху триглицериди и фосфолипиди и действие на протеолитични ензими върху протеини от растителен произход.

Изборът на първата група моделни изследвания е свързан както с изключителното фундаментално значение на липолизата и фосфолиполизата за живите системи, така и с многобройните приложения в медицината, фармацията, хранителната, козметичната индустрии и др. Моделните изследвания на ефикасността на съвместното действие на избраните ензими върху смеси от субстрати с различна повърхностна структура ни

доближават до организацията, характерна за живите системи и са естествено продължение на провежданите в лабораторията по биофизикохимия изследвания на механизмите на липолиза и фосфолиполиза.

Изборът на втората група моделни изследвания е свързан както с фундаменталния интерес към протеолизата, така и с нарастващия интерес към използването на растителните протеини в разнообразни области.

Моделните наноразмерни структури, използвани в работата са монослое, бислойни везикули, наночастици и коацерватни комплекси, представени схематично на фигура 1:



**Фиг.1:** Схема на организация на моделни наноразмерни структури – монослой, бислойни везикули, наночастици и коацерватни на границна повърхност вода/въздух.

## II. Материали

**Трикаприлин (TC)** – Средното му молекулно тегло е 470.7 D. Представява триглицерид на каприловата киселина.

**Полиетиленгликол стеарат (PEG-St)** – Средното му молекулно тегло е 1784 D. Представява моноестер на стеаринова киселина и полиетиленгликол 1500.

**L- $\alpha$ -дилауроилфосфатидилхолин (DLPC)** – Средно молекулно тегло 621.8 D.

**L- $\alpha$ -диолеоилфосфатидилхолин (DOPC)** - Средно молекулно тегло 786.113 D.

**Labrafac<sup>®</sup>WL 1349** - Представява смес от триглицериди на каприновата и каприловата киселина със средно молекулно тегло 512 D.

**Solutol® HS15** - Представява смес от свободен полиетиленгликол 660 (~30%) и 12-хидроксистеарат на полиетиленгликол 660 (~70%) със средно молекулно тегло 911 D.

**Lipoid® S75-3** - Съдържа соев лецитин с 69% фосфатидилхолин. Средното му молекулно тегло е 800 D.

**α-Глиадин** – Мономерен пшеничен протеин със средно молекулно тегло 30 kDa, пречистен от общата глиадинова фракция чрез хроматография.

**Humicola lanuginosaa lipase (HLL)** – Ензим, хидролизиращ триглицериди. Средно молекулно тегло 32 000 D.

**Pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)** - Ензим, хидролизиращ фосфолипиди. Средно молекулно тегло 13 400 D.

**Savinase** – Ензим, хидролизиращ протеини. Средно молекулно тегло 26÷29 kD.

### III. Методи

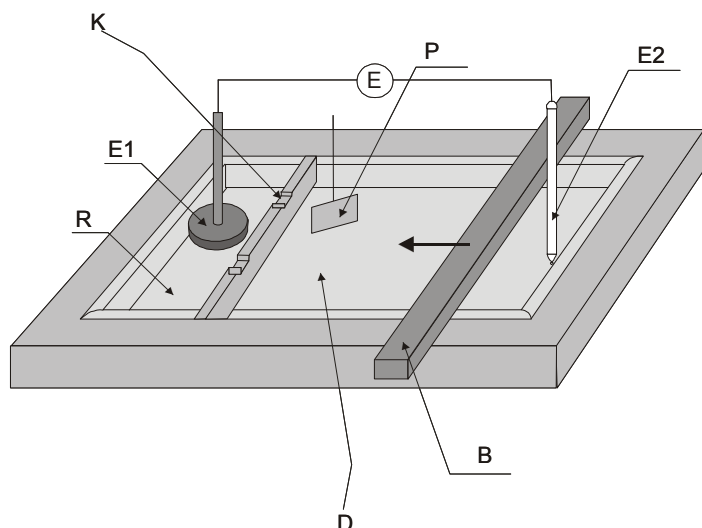
#### Експериментални техники

Експериментите на фазовата граница вода/въздух са проведени с помощта на електронна лангмюирова везна (KSV 2200, Финландия) с възможност да измерва едновременно повърхностно налягане ( $\pi$ ) и повърхностен потенциал ( $\Delta V$ ) на нанесените монослое.

Състоянието на изследваните монослое е проследено чрез измерване на изотермите повърхностно налягане ( $\pi$ ) – молекулна площ ( $a$ ) и повърхностен потенциал ( $\Delta V$ ) – молекулна площ ( $a$ ) в стандартна тefлонова вана с изходна площ 475.2 cm<sup>2</sup> и подложка двойно дестилирана вода. Образуваният слой се свива с постоянна скорост  $U_b = 50 \text{ cm}^2/\text{min}$ . По време на свиването намалява средната площ ( $a$ ) и повърхностното налягане ( $\pi$ ) нараства.

#### Ензимна хидролиза

Ензимната хидролиза на избраните ензими върху подходящи субстрати е проведена с помощта на баростатична везна (KSV, Финландия) и модифицирана лангмюирова вана, наречена още вана от „нулев порядък“ (“*zero order*”) [99], състояща се от две отделения с обща площ 310 cm<sup>2</sup> (фигура 24А).



**Фиг.24А:** Схема на експерименталната апаратура: R – реакционно отделение, D – резервоар, K – свързващи канали, B – бариер, E1 – йонизиращ електрод, E2 – каломелов електрод, E – електрометър, P – пластинка на Wilhelmy.

Лявото - реакционно отделение (R) ( $50 \text{ cm}^2$ ) съдържа алкален буфер ( $\text{pH} = 8$ ), а дясното – резервоарно отделение (D) ( $260 \text{ cm}^2$ ) съдържа двойно дестилирана вода. Повърхностните слоеве от двете отделения са свързани помежду си чрез два канала (K) ( $0.5 \text{ cm}^2$  всеки един). Повърхностните слоеве от изследваните субстрати са получени при равномерно нанасяне на малки капки от приготвените разтвори чрез спринцовка тип *Hamilton* по цялата повърхност на ваната и се свиват с помощта на бариер до желаната стойност на повърхностното налягане  $\pi$  с постоянна скорост  $U_b = 100 \text{ cm}^2/\text{min}$ . След спиране на бариера автоматично се включва баростатичното устройство и ензимът се инжектира в реакционното отделение (R), съдържащо подходящия буфер.

При хидролизния процес субстратните молекули от лявото реакционно отделение се превръщат в разтворими продукти и напускат повърхността, при което двумерното повърхностното налягане ( $\pi$ ) намалява. В резултат от десния резервоар (D) преминават субстратни молекули, а баростатичното устройство (B), премествайки бариера в означената посока (фигура 24А) на намаление на площта, поддържа постоянно налягане. По време на експерименталните измервания едновременно с намалението на площта (A) е проследено и изменението на  $\Delta V$ -потенциала с помощта на йонизиращ (E1) и сравнителен (E2) електрод и се регистрира от чувствителен електрометър (E). От намалението на площта (A) на повърхностния слой се определя директно появата на хидролизни продукти.

а) Хидролизата на чист монослой от трикаприлин (TC), чист монослой от полиетиленгликоол стеарат (PEG-St), както и на техни смеси под действие на ензима HLL е проследена по описания по-горе начин във ваната от „нулев порядък”,

съдържаща в реакционното отделение (R) буфер Tris- HCl (5 mM) с pH = 8 при  $\pi_{\text{const}} = 10 \text{ mN/m}$ .

б) Хидролизата на чисти монослоевете от дилауроилфосфатидилхолин (DLPC) и диолеоилфосфатидилхолин (DOPC) под действието на ензима PLA<sub>2</sub> е проследена по описания по-горе начин във ваната от „нулев порядък“ (фигура 24A), съдържаща в реакционното отделение (R) буфер 10 mM Tris – HCl, 21 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA и 100 mM NaCl с pH = 8. При ензимната хидролиза на монослоя от диолеоилфосфатидилхолин (DOPC) към буфера е добавен солубилизиращ агент бетациклодекстрин ( $\beta$ -CD) с различни концентрации  $C = 2.3 \text{ mg/cm}^3$  и  $C = 5 \text{ mg/cm}^3$ .

в) В случая на хидролиза на смесени TC/DLPC монослоевете под действие на двата ензима HLL+PLA<sub>2</sub> процедурата е същата, като двата ензима са инжектирани едновременно в реакционното отделение (R) на ваната.

г) В случая на хидролиза на смесени TC/DLPC монослоевете под действието само на един ензим HLL (или PLA<sub>2</sub>), връзката (K) между реакционното (R) и резервоарното (D) отделение е блокирана по време на нанасяне на смесения TC/DLPC монослой в реакционното отделение (R) и на чист TC (или DLPC) монослой в резервоарното отделение (D), (фигура 24A).

Концентрациите на ензимите HLL и PLA<sub>2</sub> в реакционното отделение са  $C_{E_0} = 0.5 \text{ nM}$ .

д) Хидролизата на многослой от чист  $\alpha$ -глиадин и слой, образуван от нанесени коацервати е проследена във ваната от „нулев порядък“, съдържаща буфер 10 mM Tris-HCl, pH = 8 при  $\pi_{\text{const}} = 5 \text{ mN/m}$  под действие на ензима *Savinase* с различни концентрации  $C_{E_0} = 1, 5, 10, 50$  и  $200 \text{ nM}$ .

С цел да се хомогенизира подложката, обемната фаза в реакционното отделение се разбърква непрекъснато чрез магнитна котва при  $250 \text{ min}^{-1}$ . Всички опити са проведени при стайна температура  $T = 20 \div 22^\circ\text{C}$ .

**Получаването на малки униламеларни везикули (SUV) от DOPC е извършено по класическия метод на *Bangham* [37]. Крайната фосфолипидна концентрация на получените SUV е  $10 \text{ mg/cm}^3$ , а средният им диаметър е около 50 nm.**

**Ензимната хидролиза на SUV дисперсия е проследена чрез измерване на изменението на повърхностното налягане ( $\pi$ ) с времето ( $t$ ) при постоянна повърхностна площ ( $A$ ) в правоъгълна тefлонова вана. На повърхността вода/въздух са нанесени**

обеми от 100  $\mu\text{l}$  от дисперсиите DOPC в отсъствие и присъствие на ензима PLA<sub>2</sub>. Ензимът е инкубиран предварително за 1 min в 100  $\mu\text{l}$  от липозомната дисперсия преди нанасянето на DOPC везикулите на повърхността. Използваната ензимна концентрация ( $C_E=1.04\times 10^{-4}$  g/cm<sup>3</sup>) съответства на съотношението ензим/везикули ( $C_E/C_V$ ) = 20:1.

**За получаването на липидни нанокapsули (LNC)** е използвана процедура, описана от *Heurtaut* и сътрудници [158]. Така получените LNC имат среден диаметър около 50 nm.

**Ензимна хидролиза на LNC.** Формирането на повърхностен филм от водна дисперсия на липидни нанокapsули (LNC) върху плоска повърхност е проследено с помощта на повърхностната везна (KSV 2200, Финландия).

Изследвани са две първоначални концентрации ( $C_{LNC I} + C_{LNC II}$ ) -  $8.54\times 10^{11}$  LNC cm<sup>-3</sup> и  $3.42\times 10^{11}$  LNC cm<sup>-3</sup>, в които нестабилната фракция LNC I е 70% от началната обемна концентрация, т.е.  $5.98\times 10^{11}$  LNC cm<sup>-3</sup> и  $C = 2.39\times 10^{11}$  LNC cm<sup>-3</sup>, съответно. Концентрацията на ензима 21.6 nM съответства на съотношението ензим/LNC ( $C_E/C_{LNC}$ ) = 20:1. Ензимът PLA<sub>2</sub> е инкубиран 2.5 min във водната дисперсия от LNC преди експерименталното изследване с цел да се осигури свързването му с LNC.

Всички експерименти са проведени при стайна температура ( $22 \pm 2$  °C).

#### **Получаване на коацерватни комплекси.**

Глиадинът (разтворен в 1% разтвор на оцетна киселина) е с концентрация 1 mg/ml. Арабската гума (AG) е разтворена в двойно дестилирана вода при температура 40°C и постоянно разбъркване. Полученият разтвор на арабска гума е с концентрация 1 mg/ml и е коригиран до желаното pH = 3.5 с 1% оцетна киселина.

Коацерватите са приготвени чрез прибавяне на разтвора на полизахарида (арабска гума) към протеиновия разтвор ( $\alpha$ -глиадин) при разбъркване, като количеството на глиадин и арабската гума е в тегловно съотношение 1:1 (w/w). Сместа се разбърква за около 1 min при загряване до 30°C, при което спонтанно се образуват коацерватни комплекси с размер 50  $\mu\text{m}$ .



## IV. Основни резултати

### A. Действие на липази и фосфолипази върху различно организирани субстрати от триглицериди и фосфолипиди.

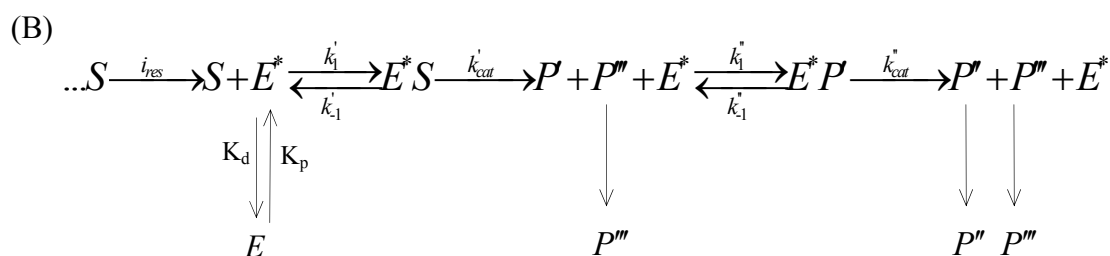
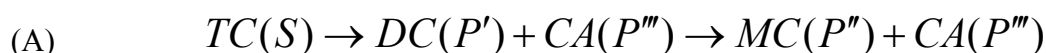
В една последователност от изследвания се изучават индивидуалните свойства на подбрани двойки: липаза - триглицерид и фосфолипаза - фосфолипид. Изборът на обектите и получените резултати позволяват разработения подход за определяне на ензимната активност да се приложи към по-сложни системи, в които повече ензими действат едновременно върху повече субстрати, организирани в различни моделни наноразмерни структури.

Предложеният феноменологичен подход е изложен сравнително подробно само за първата изследвана система, като при следващите само се представят специфичните им особености и получените резултати.

1. *Механизъм на действие на липазата HLL върху трикаприлин, организиран в моделен монослой.*

Ензимната хидролиза на късоверижния триглицерид трикаприлин (TC) протича на два етапа: неразтворимият трикаприлин (TC) хидролизира до неразтворим продукт дикаприлин (DC) и мигновено разтворимите продукти монокаприлин (MC) и каприлинова киселина (CA).

В адаптираната схема на *Michaelis – Menten* субстратът TC е означен с S, а продуктите DC, MC и CA съответно с P', P'' и P''' (фигура 28A):



**Фиг.28:** Кинетична схема на хидролиза на монослой от трикаприлин (TC): **Панел А:** Началният субстрат (S) - трикаприлин (TC), продуктите на хидролиза – неразтворимия дикаприлин P'(DC) и мигновено разтворимите продукти –

монокаприлин  $P''$  (MC) и каприлинова киселина  $P'''$  (CA); **Панел В:**  $i_{res}$  - поток на субстратни молекули ( $S$ ) от резервоара към реакционното отделение на ваната;  $k_p$  и  $k_d$  са скоростните константи на проникване и десорбция на ензима ( $E$ );  $k_1'$ ,  $k_{-1}'$ ,  $k_1''$ ,  $k_{-1}''$  са скоростните константи на образуване и дисоциация на ензим – субстратните комплекси ( $E^*S$ ) и ( $E^*P$ );  $k_{cat}'$  и  $k_{cat}''$  са каталитични скоростни константи на хидролиза на субстратите TC и DC в двата етапа на ензимната реакция;

Първата стъпка по схемата на *Michaelis – Menten* е обратим процес на проникване на водоразтворимия ензим  $E$  в липидния субстрат  $S$  на повърхността, където той се намира в по – изгодно енергетично състояние  $E^*$  и се свързва с една субстратна молекула  $S$  до получаване на ензим-субстратния комплекс  $E^*S$ , след което следва образуване и разпадане на междинните комплекси  $E^*S$  и  $E^*P'$  до получаване на хидролизните продукти.

В първия етап със скоростна константа  $k_{cat}'$  от една молекула трикаприлин (TC) се получава една молекула дикаприлин (DC) и една молекула каприлинова киселина (CA). Във втория етап със скоростна константа  $k_{cat}''$  от една молекула дикаприлин (DC) се получава една молекула монокаприлин (MC) и една молекула каприлинова киселина (CA). Реакционният продукт  $P'$  (DC) е неразтворим, докато продуктите  $P''$  (MC) и  $P'''$  (CA) са мигновено разтворими [142-144].

Тъй като ензимната хидролиза протича на граничната повърхност вода/въздух, концентрацията на адсорбирания на повърхността ензим  $E^*$ , субстрата  $S$ , междинните ензим-субстратни комплекси и хидролизните продукти са изразени като повърхностни концентрации:  $\Gamma_{E^*}$ ,  $\Gamma_S$ ,  $\Gamma_{E^*S}$ ,  $\Gamma_{E^*P'}$ ,  $\Gamma_{P'}$ ,  $\Gamma_{P''}$  и  $\Gamma_{P'''}$ , а концентрацията на ензима в обема - като обемна концентрация  $C_E$ .

Предложеният кинетичен модел на фигура 28, панел В се описва със следните кинетични уравнения [144]:

$$\frac{d\Gamma_{E^*S}}{dt} = k_1' \Gamma_S \Gamma_{E^*} - (k_{cat}' + k_{-1}') \Gamma_{E^*S} \quad (27)$$

$$\frac{d\Gamma_{E^*}}{dt} = k_p C_{E_0} + (k_{cat}' + k_{-1}') \Gamma_{E^*S} - (k_d + k_1' \Gamma_S) \Gamma_{E^*} + (k_{cat}'' + k_{-1}'') \Gamma_{E^*P'} - k_1'' \Gamma_{E^*} \Gamma_{P'} \quad (28)$$

$$\frac{d\Gamma_{P'}}{dt} = k'_{cat}\Gamma_{E^*S} - k''_1\Gamma_{E^*P'} + k''_{-1}\Gamma_{E^*P'} \quad (29)$$

$$\frac{d\Gamma_S}{dt} = -k'_1\Gamma_{E^*S} + k''_1\Gamma_{E^*S} + i_{res} \quad (30)$$

$$\frac{d\Gamma_{E^*P'}}{dt} = k'_1\Gamma_{E^*P'} - (k''_{cat} + k''_{-1})\Gamma_{E^*P'} \quad (31)$$

$$\frac{d\Gamma_{P'}}{dt} = k''_{cat}\Gamma_{E^*P'} \quad (32)$$

$$\frac{d\Gamma_{P''}}{dt} = k'_{cat}\Gamma_{E^*S} + k''_{cat}\Gamma_{E^*P'} \quad (33)$$

Потокът на субстрата ( $i_{res}$ ) държи сметка за преноса на субстратни молекули от резервоара към реакционното отделение на ваната и се определя експериментално по относителното намаление на площта на монослоя  $\frac{\Delta A}{A_r}$  с времето  $t$ :

$$i_{res} = \frac{d\Gamma_S}{dt} = \frac{1}{a_s A_r(t)} \frac{d\Delta A}{dt} \quad (34)$$

За да опростим решаването на системата от кинетични уравнения приемаме, че стационарното състояние на разпределение на ензима между обема и повърхността ( $E \rightleftharpoons E^*$ ) и двата последователни етапа от схемата на *Michaelis-Menten* се установяват относително бързо спрямо времето на провеждане на експеримента [134].

Чрез математически преобразувания и интегриране на уравненията при  $t = 0$  и при допускане, че след адсорбирането на ензима на повърхността неговата концентрация в обема остава практически непроменена ( $C_E \approx C_{E_0}$ ), получаваме израз за изменение на повърхностната концентрация на субстрата  $\Gamma_S$ :

$$\Gamma_S(t) = e^{-Q'_m C_{E_0} t} \left[ \Gamma_{S_0} + \int_0^t \frac{1}{a_s A_r} \frac{d\Delta A}{dt} e^{Q'_m C_{E_0} t} dt \right] \quad (40)$$

където:  $Q'_m = \frac{k'_{cat}}{\left(\frac{k_d}{k_p}\right)k'_m}$  е глобалната кинетична константа, наричана "качество на

повърхността", която отчита влиянието на физикохимичните процеси на повърхността (например проникване и десорбция на ензима) върху ензимната активност.

$k'_m = \frac{k'_{cat} + k'_{-1}}{k'_1}$  е повърхностната константа на *Michaelis-Menten*.

По подобен начин са получени изрази за :

- повърхностната концентрация на първия ензим-субстратен комплекс  $\Gamma_{E^*S}$  :

$$\Gamma_{E^*S} = \frac{k'_1}{\left(\frac{k'_d}{k'_p}\right)(k'_{cat} + k'_{-1})} C_{E_0} \Gamma_S(t) \quad (41)$$

- повърхностната концентрация на втория ензим-субстратен комплекс  $\Gamma_{E^*P}$  :

$$\Gamma_{E^*P} = \frac{k''_1}{\left(\frac{k''_d}{k''_p}\right)(k''_{cat} + k''_{-1})} C_{E_0} \Gamma_P(t) \quad (42)$$

- повърхностните концентрации на продуктите:

$$\Gamma_P(t) = e^{-Q_m C_{E_0} t} + \int_0^t Q_m C_{E_0} e^{Q_m C_{E_0} t} \Gamma_S(t) dt \quad (44)$$

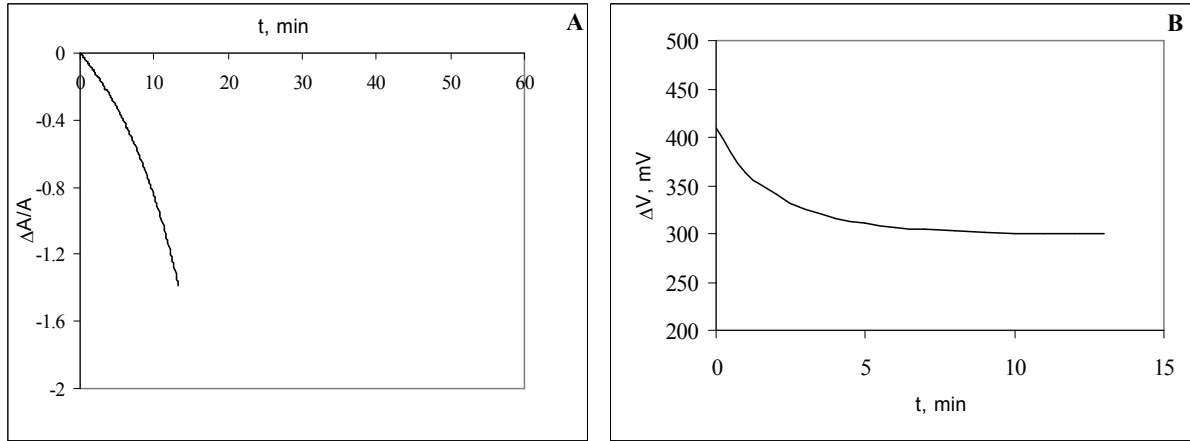
$$\text{където: } Q_m = \frac{k''_{cat}}{\left(\frac{k''_d}{k''_p}\right) k''_m} \text{ и } k''_m = \frac{k''_{cat} + k''_{-1}}{k''_1}$$

$$\Gamma_{P^-}(t) = Q_m C_{E_0} \int_0^t \Gamma_P(t) dt \quad (45)$$

$$\Gamma_{P^-}(t) = Q'_m C_{E_0} \int_0^t \Gamma_S(t) dt + Q_m C_{E_0} \int_0^t \Gamma_{P^-}(t) dt \quad (46)$$

Повърхностната хидролиза на чист монослой от ТС в присъствие на ензима HLL е изследвана чрез измерване на намалението на площта ( $\Delta A$ ) с времето ( $t$ ) и еволюцията на повърхностния потенциал ( $\Delta V$ ) с времето ( $t$ ) при постоянно повърхностно налягане  $\pi_{const} = 10 \text{ mN/m}$ .

След инжектирането на ензима започва хидролизния процес. Наблюдава се изменение на площта на монослоя  $\Delta A(t)$  и изменение на  $\Delta V(t)$ .  $t = 0$  съответства на инжектирането на ензима. Получените експериментални резултати са представени на фигура 30:



**Фиг.30:** Изменение на относителната площ  $\Delta A/A$  (**панел А**) и еволюция на повърхностния потенциал  $\Delta V$  (**панел В**) с времето ( $t$ ) при хидролиза на монослой от ТС под действие на HLL при постоянно повърхностно налягане ( $\pi = 10 \text{ mN/m}$ ).

Интерпретацията на опитните данни за  $\Delta A(t)$  се основава на разбирането, че в хода на хидролизния процес частта на намаление на единица площ от монослой  $\beta(t)$  в реакционното отделение е резултат на превръщането на неразтворимия субстрат ТС в неразтворимия продукт DC, заемащ по – малка площ и на мигновенното разтваряне на продуктите MC и CA:

$$\beta(t) = \frac{(a_s - a_p) \Gamma_p(t) + a_p' \Gamma_p''(t) + a_p'' \Gamma_p'''(t)}{a_s \Gamma_{S_0}} \quad (47)$$

където:  $a_s, a_p', a_p'', a_p'''$  са молекулните площи съответно на ТС, DC, MC и CA при съответното повърхностно налягане;  $\Gamma_p', \Gamma_p'', \Gamma_p'''$  са повърхностните концентрации съответно на DC, MC и CA;  $\Gamma_{S_0}$  - повърхностна концентрация на субстрата при  $t = 0$ .

В [140] е показано, че уравнение (47) е следствие от интегралната форма на уравнението за съхранение на веществото:

$$\Delta A(t) = A_r^0 \beta(t) + \sum \Delta A_i \beta(t - t_i) \quad (48)$$

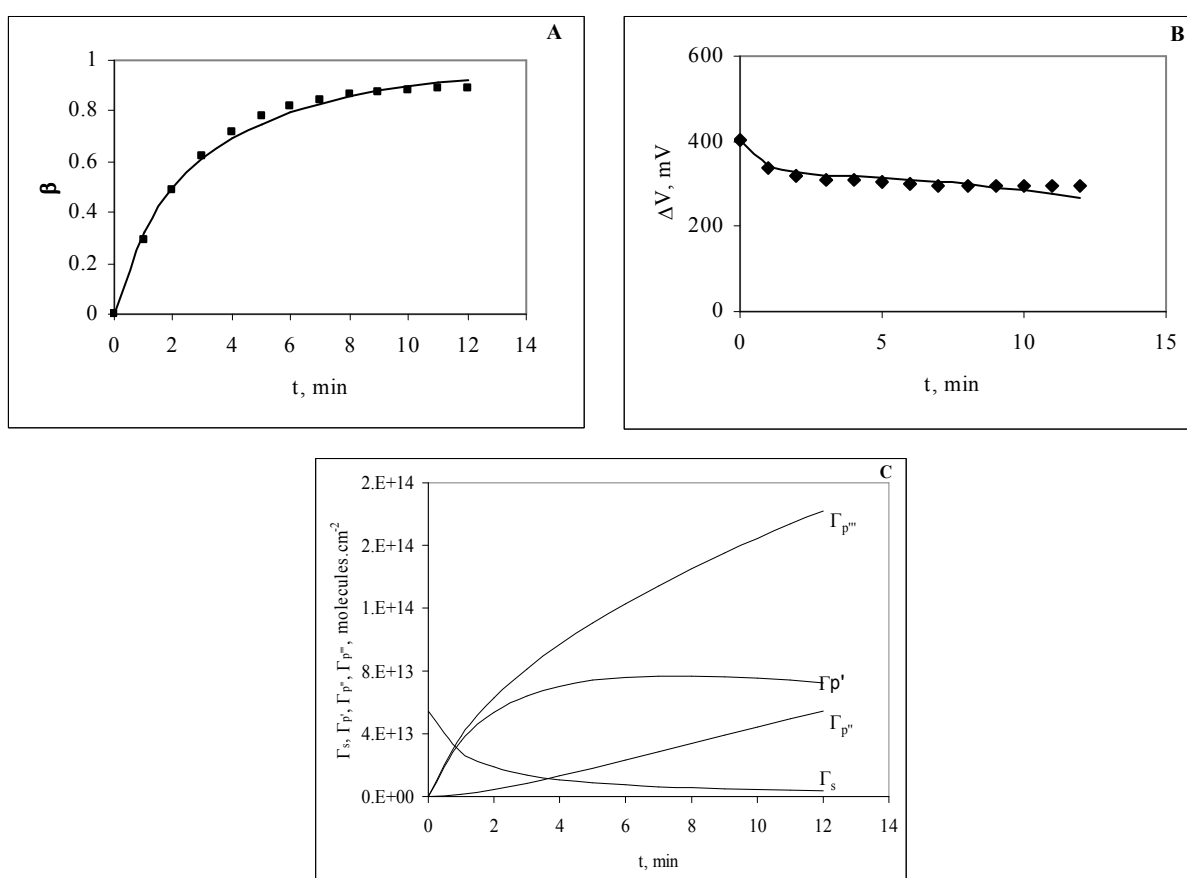
Интерпретацията на опитните данни за  $\Delta V(t)$  се основава на добре познатото уравнение на *Helmholtz* за повърхостния потенциал на незаредения монослой от неразтворимите ТС и DC:

$$\Delta V(t) = 4\pi\mu_{\perp}^s \Gamma_s(t) + \pi\mu_{\perp}^p \Gamma_p(t) \quad (49)$$

където:  $\mu_{\perp}^S = \frac{\mu_S}{\varepsilon}$  и  $\mu_{\perp}^{P'} = \frac{\mu_{P'}}{\varepsilon}$  са вертикалните компоненти на диполните моменти,

съответно на ТС и DC, а  $\varepsilon$  е диелектричната проницаемост на монослоя.

На следващата фигура 31А и В експерименталните данни за  $\beta(t)$ , получени от  $\Delta A(t)$  и уравнение (48) и за  $\Delta V(t)$ , означени с точки са съпоставени с теоретичното предсказание на уравнения (47) и (49) на развития по-горе кинетичен модел за хидролиза на чист ТС монослой.



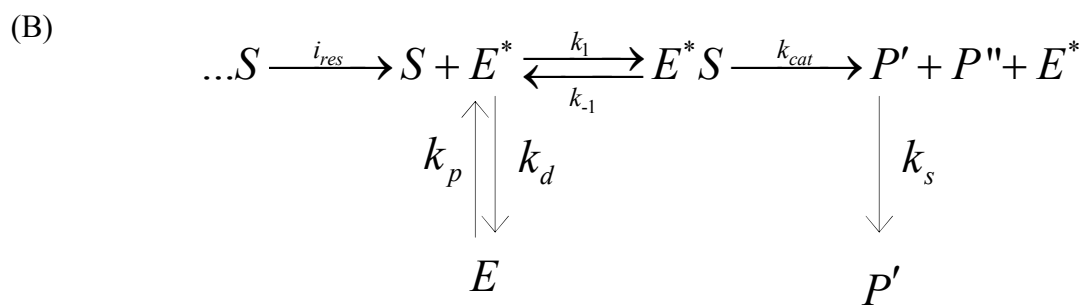
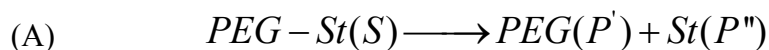
**Фиг. 31:** Хидролиза на чист ТС монослой с ензима HLL при постоянно повърхностно налягане  $\pi_{const} = 10 \text{ mN/m}$ : **Панел А** -  $\beta(t)$ : с точки са означени експерименталните данни; с плътна линия – теоретичното предсказание от уравнение (47); **Панел В** – Изменение на повърхностния потенциал  $\Delta V$  с времето  $t$ : с точки са означени експерименталните данни; с плътна линия – предсказанието от уравнение (49). **Панел С** – Повърхностни концентрации на субстрата и на хидролизните продукти  $\Gamma_s(t)$ ,  $\Gamma_{p'}(t)$ ,  $\Gamma_{p''}(t)$  и  $\Gamma_{p''}(t)$ , получени от уравнения (40,44-46).

Така определянето на два независими експериментални параметра – механичен (повърхностно налягане) и електричен (повърхностен потенциал) ни позволява да определим с подхода на фит процедура стойности на двете глобални кинетични константи  $Q_m'$  и  $Q_m''$  при хидролиза с HLL. На панел С, фигура 31 са представени измененията в хода на хидролизния процес на повърхностните концентрации на субстрата и продуктите на реакцията:  $\Gamma_S(t), \Gamma_{P'}(t), \Gamma_{P''}(t), \Gamma_{P'''}(t)$ .

От експерименталните данни с помощта на развития кинетичен модел за монослой от трикаприлин са получени стойности за глобалните кинетични константи  $Q_m' = 1.7 \cdot 10^{-12}$  (cm<sup>3</sup>/min.molecule) и  $Q_m'' = 1.8 \cdot 10^{-13}$  (cm<sup>3</sup>/min.molecule) при хидролиза с HLL, показващи че първият етап на хидролизата е с порядък по – бърз от втория.

## 2. Механизъм на действие на липазата HLL върху полиетиленгликол стеарат (PEG-St) и смесени монослоеове от TC и PEG-St.

Кинетичният модел на *Michaelis-Menten* бе адаптиран за описание на хидролизата на естерната група на полиетиленгликол-стеарат (PEG-St) в разтворимия с определена скорост продукт  $P'$  и неразтворимия продукт  $P''$  (фигура 32 А,В).



**Фиг.32:** Кинетична схема на хидролиза: **Панел А** – Началният субстрат (S) – полиетиленгликол стеарат (PEG-St), продуктите на хидролиза – разтворимия полиетиленгликол (PEG) –  $P'$  и неразтворимата стеаринова киселина (St) –  $P''$ ; **Панел В** –  $i_{res}$  - поток на субстратни молекули (S) от резервоара към реакционното отделение на ваната;  $k_p$  и  $k_d$  - скоростни константи на проникване и десорбция на ензима (E);  $k_1$  и  $k_{-1}$  - скоростни константи на обратимо формиране на ензим-

субстратен комплекс;  $k_{cat}$  - скоростна константа на каталитична хидролиза на ензимния субстрат (PEG-St),  $k_s$  - скоростна константа на разтваряне на продукта  $P'$ .

Ензимната хидролиза на полиетиленгликол стеарат протича в един етап със скоростна константа  $k_{cat}$ , в който от една молекула полиетиленгликол стеарат (PEG-St) се получават една молекула полиетиленгликол (PEG) и една молекула стеаринова киселина (St).

По подхода описан по-горе (за хидролиза на монослой от TC) е намерена стойност на глобалната кинетична константа  $Q_m = 7.10^{-13}$  (cm<sup>3</sup>/min.molecule) на превръщане на PEG-St в продуктите полиетиленгликол (PEG) и стеаринова киселина (St).

*Ензимна хидролиза с ензима HLL върху смесени монослое от TC и PEG-St.*

Получените теоретични изрази за чистите монослое от трикаприлин и полиетиленгликол стеарат могат да бъдат приложени за описание на действието на ензима HLL върху смесен монослой с молна част на TC:  $x_{TC} = \frac{\Gamma_{TC}}{\Gamma_{TC} + \Gamma_{PEG-St}}$ , ако допуснем: а) адитивност на площите в смесения монослой и б) независимост на действието на HLL върху всеки от двата субстрата от присъствието на другия субстрат. За целта, уравненията (40) и (58), описващи намалението на повърхностните концентрации на двата субстрата, съответно TC и PEG-St по време на хидролизата се изразяват чрез следните модифицирани форми:

$$\Gamma_s(t) = e^{-Q_m C_{E_0} t} \left[ x_{TC} \Gamma_{TC}^0 + k_{TC} \int_0^t \frac{\Gamma_{TC}^0}{A_r} \frac{d\Delta A}{dt} e^{Q_m C_{E_0} t} dt \right] \quad (63)$$

$$\Gamma_s(t) = e^{-Q_m C_{E_0} t} \left[ (1 - x_{TC}) \Gamma_{PEG-St}^0 + (1 - k_{TC}) \int_0^t \frac{\Gamma_{PEG-St}^0}{A_r} \frac{d\Delta A}{dt} e^{Q_m C_{E_0} t} dt \right] \quad (64)$$

където:  $x_{TC} = \frac{\Gamma_{TC}}{\Gamma_{TC} + \Gamma_{PEG-St}}$  е молната част на трикаприлин (TC) в смесения монослой.

$k_{TC} = \frac{\Gamma_{TC} a_{TC}}{\Gamma_{TC} a_{TC} + \Gamma_{PEG-St} a_{PEG-St}}$  е площната част на трикаприлин (TC) в смесения монослой.



Интерпретацията на  $\Delta A(t)$  и  $\Delta V(t)$  измерванията е подчинена на следните изрази:

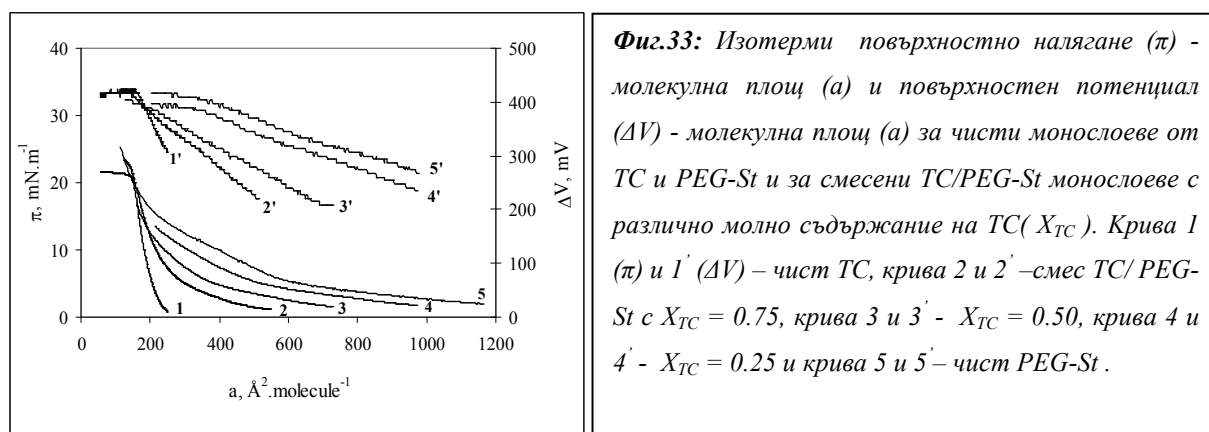
$$\beta(t) = \frac{(a_{TC} - a_{DC})\Gamma_{P'}(t) + a_{MC}\Gamma_{P''}(t) + a_{AC}\Gamma_{P'''}(t) + [(1-x) - (a_{PEG-St}\Gamma_S + a_{PEG}\Gamma_{P'} + a_{St}\Gamma_{P''})]}{x_{TC}a_{TC}\Gamma_{TC}^0 + (1-x_{TC})a_{PEG-St}\Gamma_{PEG-St}^0} \quad (66)$$

$$\Delta V(t) = 4\pi \left[ \begin{aligned} &\mu_{TC}(\Gamma_{TC}^0 - \Gamma_{P'} - \Gamma_{P''} - \Gamma_{P'''}) + \mu_{DC}\Gamma_{P'}(t) + \\ &+ (\mu_{PEG-St}(\Gamma_{PEG-St}^0 - \Gamma_{P''}) + \mu_{PEG}\Gamma_{P'}(t) + \mu_{St}\Gamma_{P''}(t) + \Psi_0) \end{aligned} \right] \quad (67)$$

където  $\Psi_0$  е отрицателния принос на двойния електричен слой, отчетен по класическата теория на *Gouy-Charman*.

Независимо измерване на равновесните изотерми  $\pi(a)$  и  $\Delta V(a)$  може да донесе информация за това дали е изпълнено първото условие, както и за стойностите за площите  $a$  и нормалните компоненти на диполните моменти  $\mu$ , необходими за използването на изразите (66) и (67).

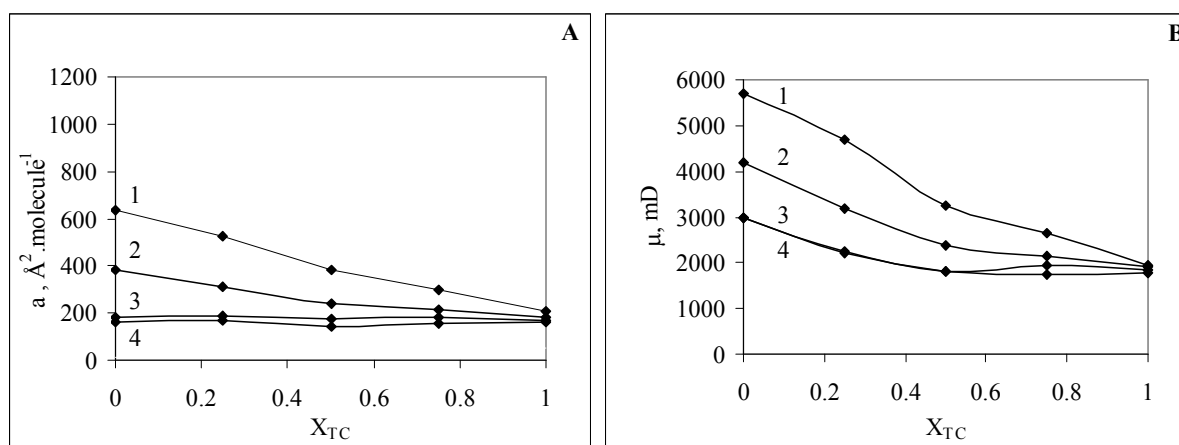
На фигура 33 са представени изотермите повърхностно налягане ( $\pi$ ) - молекулна площ ( $a$ ) и повърхностен потенциал ( $\Delta V$ ) - молекулна площ ( $a$ ) на монослоеове от чисти ТС и PEG-St и на техни смеси с различно молно съдържание на ТС.



Зависимостта  $\pi(a)$  за чист монослой от трикаприлин (криви 1 и 1') са типични изотерми на течноразтегнат монослой с колапс при  $\pi_c \approx 21-23$  mN/m, докато изотермите на полиетиленгликол стеарата (криви 5 и 5') са отместени към по-големи площи. Смесените ТС/PEG-St монослоеове с различна молна част на трикаприлин  $x_{TC} = 0.75, 0.50, 0.25$  (криви 4 и 4'; криви 3 и 3'; криви 2 и 2') заемат обяснимо място между чистите монослоеове от ТС и PEG-St. От  $\Delta V(a)$  експерименталните измервания и

уравнението на *Helmholtz* ( $\Delta V = 4\pi\mu_{\perp}\Gamma$ ) са изчислени перпендикулярните компоненти на диполните моменти  $\mu_{\perp}$  на молекула, където  $\Gamma$  е броя молекули на единица повърхност.

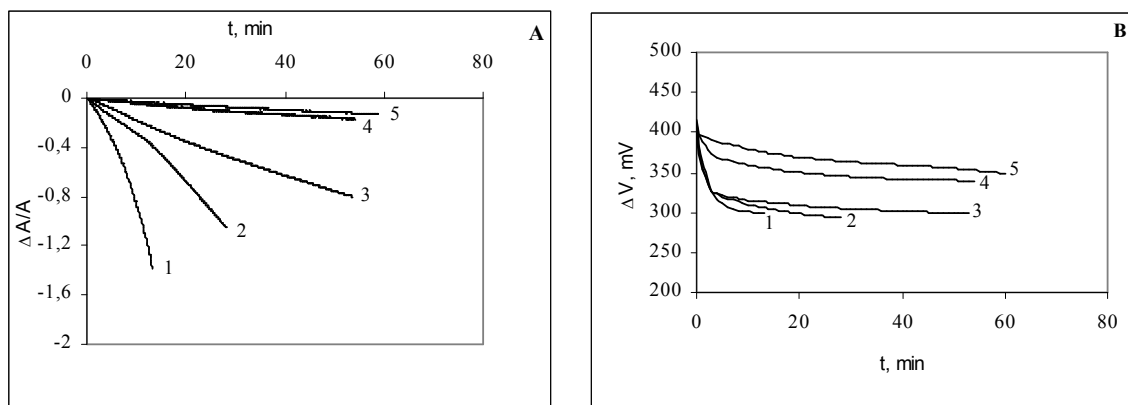
С цел да се провери идеалността на смесване на съответните компоненти на фигура 34, панели А,В е представена средната молекулна площ  $a$  и нормалните компоненти на диполните моменти  $\mu_{\perp}$ , падащи се на молекула в смесения слой от молния състав на ТС ( $X_{ТС}$ ).



**Фиг.34:** Средна молекулна площ  $a$  (панел А) и нормалния компонент на диполните моменти  $\mu_{\perp}$  (панел В) като функция от молната част на трикаприлин в смесените трикаприлин/полиетиленгликол стеарат слоеве при повърхностни налягания:  $\pi = 5$  mN/m (крива 1), 10 mN/m (крива 2), 15 mN/m (крива 3), 20 mN/m (крива 4).

Наблюдават се малки отрицателни отклонения от идеалността, които могат да бъдат отдадени на слабата разтворимост на PEG или на привличането между молекулите на ТС и PEG-St в монослоя. Интерпретацията на наблюдаваното отклонение в  $\mu_{\perp}$  от идеалността е по-трудна задача.

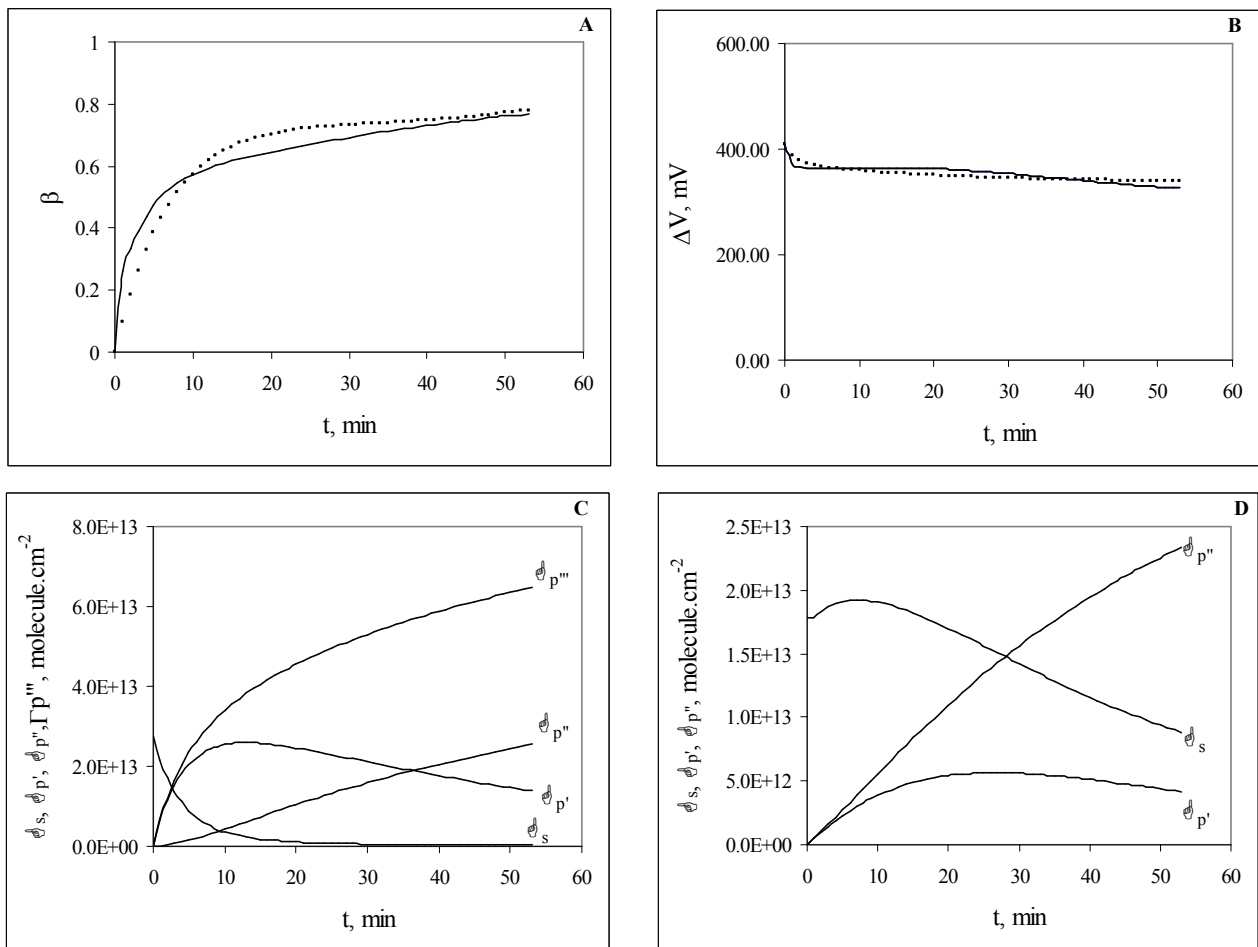
Фигура 35 илюстрира намалението на относителната площ ( $\Delta A / A$ ) (панел А) и изменението на повърхностния потенциал ( $\Delta V$ ) (панел В) като функция на времето ( $t$ ) при хидролиза на двата чисти компонента ТС и PEG-St и на техни смеси.  $t = 0$  съответства на инжектирането на ензима.



**Фиг.35:** Изменение на относителната площ  $\Delta A/A$  (панел А) и еволюция на повърхностния потенциал  $\Delta V$  (панел В) с времето ( $t$ ) при хидролиза на монослой от ТС, PEG-St и техни смеси под действие на HLL при постоянно повърхностно налягане ( $\pi = 10 \text{ mN/m}$ ). Крива 1 –  $X_{TC} = 1$ ; Крива 2 –  $X_{TC} = 0.75$ ; Крива 3 –  $X_{TC} = 0.50$ ; Крива 4 –  $X_{TC} = 0.25$ ; Крива 5 –  $X_{TC} = 0$ .

Хидролизата на трикаприлин води до трансформирането на неразтворимия ТС до водонеразтворимия продукт DC и мигновено разтворимите продукти MC и CA, докато хидролизата на полиетиленгликол стеарата (PEG-St) води до появата на разтворим PEG и неразтворима стеаринова киселина (-St) с определен повърхностен заряд. Наклонът на крива 5 за чист монослой от PEG-St е по-малък от този за чист ТС – крива 1. С кривите 2 ÷ 4 е представена хидролизната кинетика на смесени ТС/PEG-St монослоеове. С увеличаване съдържанието на ТС кривите се изместват към тази, получена за чист ТС. Вижда се, че ензимът HLL се характеризира с висока активност по отношение на ТС и има по-слаба активност спрямо субстрата PEG-St.

Експерименталните кинетични измервания за  $\Delta\beta(t)$  и  $\Delta V(t)$  са съпоставени с представените по - горе кинетични модели за хидролиза на чисти и смесени монослоеове, от които са получени стойности за измененията на  $\beta$ ,  $\Delta V$  и  $\Gamma$  с времето ( $t$ ) за смесени ТС/PEG-St монослоеове (Фигура 37, панели А,В,С,Д) при  $\pi_{\text{const}} = 10 \text{ mN/m}$ .



**Фиг.37:** Хидролиза на смесен трикаприлин/полиетиленгликол стеарат монослой с молно съдържание на трикаприлин  $X_{TC} = 0.5$  при постоянно повърхностно налягане  $\pi_{const} = 10$  mN/m; **Панел А** – Частта на редуция на единица площ от монослоя в реакционното отделение  $\beta(t)$ : с точки са означени експерименталните данни; с плътна линия – теоретичното напасване с уравнение (66); **Панел В** – Изменението на повърхостния потенциал  $\Delta V(t)$ : с точки са означени експерименталните данни; с плътна линия – теоретичното предсказание от уравнение (67); **Панел С** – Повърхостна концентрация на ензимния субстрат и хидролизните продукти за трикаприлин  $\Gamma_s(t)$ ,  $\Gamma_{p'}(t)$ ,  $\Gamma_{p''}(t)$  и  $\Gamma_{p'''}(t)$ , получени от уравнения (63,44-46); **Панел D** - Повърхостна концентрация на ензимния субстрат и хидролизните продукти за полиетиленгликол стеарат  $\Gamma_s(t)$ ,  $\Gamma_{p'}(t)$  и  $\Gamma_{p''}(t)$ , получени от уравнения (64,65,60);  $t = 0$  съответства на инжектирането на ензима.

Бяха проведени експерименти и направени изчисления за хидролизата с HLL на същите субстрати и при други  $\pi_{const}$ : 5, 15 и 20 mN/m.

Глобалните кинетични константи на ензимна хидрилоза на чисти ТС и PEG-St монослое, както и на техни смеси с различно молно съдържание на ТС са представени в таблица 2:

	$\pi$ (mN/m)	$Q_m'$ $10^{12}$ (cm <sup>3</sup> /min.molecule)	$Q_m''$ $10^{13}$ (cm <sup>3</sup> /min.molecule)	$Q_m$ $10^{13}$ (cm <sup>3</sup> /min.molecule)
ТС( $X_{ТС}=1$ )	5	1.7	1.8	
	10	1.7	1.8	
	15	1.9	2.3	
	20	1.5	2.2	
ТС/PEG-St ( $X_{ТС}=0.75$ )	5	1.0	1.0	7.0
	10	1.2	1.0	6.0
	15	1.3	1.5	6.0
	20	1.0	1.0	7.0
ТС/PEG-St ( $X_{ТС}=0.50$ )	5	1.0	1.0	7.0
	10	1.2	1.0	8.0
	15	1.0	1.0	6.0
	20	1.0	1.0	5.0
ТС/PEG-St ( $X_{ТС}=0.25$ )	5	1.5	1.0	6.0
	10	1.2	1.4	5.0
	15	1.2	1.0	8.0
	20	1.5	1.5	6.0
PEG-St ( $X_{ТС}=0$ )	5			7.0
	10			6.0
	15			6.0
	20			7.0

**Таблица 2:** Глобалните кинетични константи  $Q_m'$ ,  $Q_m''$ ,  $Q_m$ , получени по предложения кинетичен модел за чист ТС, чист PEG-St и смесени ТС/PEG-St монослое.

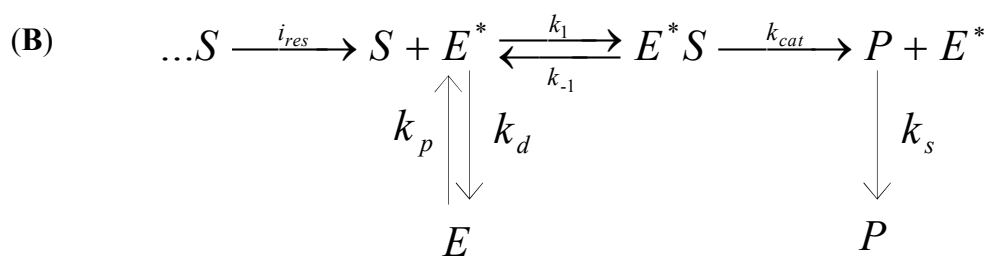
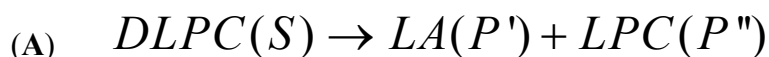
От таблицата се вижда, че глобалната кинетична константа на хидролиза на чист PEG-St при  $\pi_{const} = 10$  mN/m ( $Q_m = 6.10^{-13}$  cm<sup>3</sup>/min.molecule) е по-ниска от тази, получена за първия етап ( $Q_m' = 1,7.10^{-12}$  cm<sup>3</sup>/min.molecule) и по-висока от тези за втория етап ( $Q_m'' = 1,8.10^{-13}$  cm<sup>3</sup>/min.molecule) на хидролиза на ТС. Стойностите на  $Q_m$ ,  $Q_m'$ ,  $Q_m''$  практически не зависят от повърхностното налягане в изследвания интервал 5÷20 mN/m. Глобалните кинетични константи на каталитично действие на HLL върху двата субстрата в смесения монослой ТС/PEG-St са приблизително еднакви за различните състави  $X_{ТС}$  и практически съответстват на тези, получени при чисти монослое от ТС и PEG-St. Това сравнение показва, че повърхностната активност на ензима HLL в смесените монослое към всеки субстрат практически не се влияе от присъствието на другия субстрат и се наблюдава адитивност в ензимното действие.

3. Механизъм на действие на фосфолипазата  $PLA_2$  върху моделни монослоеве от средно- и дълговерижни фосфолипиди:

3.1. Ензимна хидролиза на монослой от дилауроилфосфатидилхолин (DLPC) под действие на  $PLA_2$ .

Подходящ пример на моделна система е монослоят от дилауроилфосфатидилхолин. Ензимната хидролиза на средноверижния фосфолипид DLPC протича в един етап със скоростна константа  $k_{cat}$ , при който от една молекула дилауроилфосфатидилхолин (DLPC) се получава една молекула лауринова киселина (LA) и една молекула лизофосфатидилхолин (LPC). Субстратът DLPC е означен с S, а продуктите LA и LPC съответно с  $P'$  и  $P''$ .

Кинетичният модел на *Michaelis-Menten* е адаптиран за описание на хидролизата на естерната група на DLPC в един разтворим продукт P ( $P = P' + P''$ ) (фигура 38 А, В).



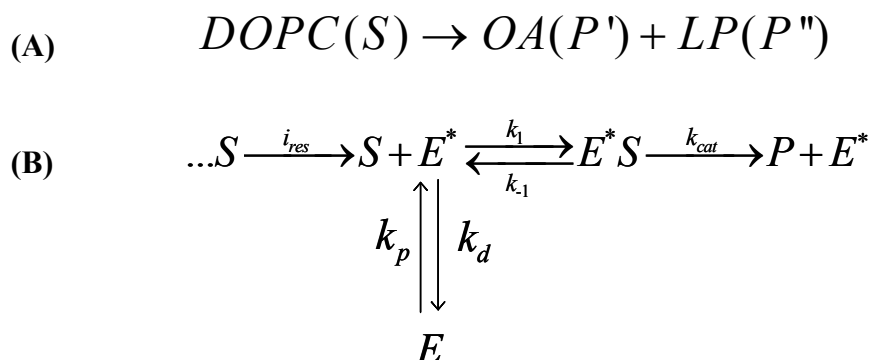
**Фиг.38:** Кинетична схема на хидролиза на DLPC: **Панел А** – Началният субстрат (S) – дилауроилфосфатидилхолин(DLPC), продуктите на хидролизата –лауринова киселина (LA)–  $P'$  и лизофосфатидилхолин (LPC)–  $P''$ ; **Панел В** –  $i_{res}$  - поток на субстратни молекули(S) от резервоара към реакционното отделение на ваната;  $k_p$  и  $k_d$  - скоростни константи на проникване и десорбция на ензима;  $k_1$  и  $k_{-1}$  - скоростни константи на обратимо формиране на ензим-субстратен комплекс;  $k_{cat}$  - скоростна константа на каталитична хидролиза на ензимния субстрат (DLPC);  $k_s$  – скоростна константа на разтваряне на P.

По описания вече по-горе начин от експерименталните данни и съответстващия кинетичен модел е определена стойност на глобалната кинетична константа  $Q_m = 0,5 \cdot 10^{-12}$  (cm<sup>3</sup>/min.molecule) на превръщане на DLPC в продукт.

### 3.2. Ензимна хидролиза на монослой от диолеоилфосфатидилхолин (DOPC) под действие на PLA<sub>2</sub>.

Природните субстрати за липолитични ензими са дълговерижни липиди, които при хидролиза пораждаат водонеразтворими липолитични продукти. Важен биологичен пример е ензимната хидролиза на диолеоилфосфатидилхолин (DOPC) под действие на фосфолипаза А<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), която води до получаване на водонеразтворимите продукти олеинова киселина (ОА) и лизофосфолипид (LP).

Кинетичният модел на *Michaelis-Menten*, адаптиран за описание на хидролизата на DOPC до неразтворим продукт P (ОА и LP) е представен на фигура 42, А и В. Субстратът DOPC е означен с S, а продуктите ОА и LP съответно с P' и P''.



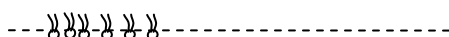
**Фиг.42:** Адаптирана схема на *Michaelis-Menten*, описваща хидролизата на DOPC: **Панел А** – Началният субстрат (S) – диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), продукта P на хидролизата от два молекулни вида P' и P'' – олеинова киселина (ОА) и лизофосфолипид (LP); **Панел В** –  $k_p$  и  $k_d$  - скоростни константи на проникване и десорбция на ензима;  $k_1$  и  $k_{-1}$  - скоростни константи на обратимо формиране на ензим-субстратен комплекс;  $k_{cat}$  - скоростна константа на каталитична хидролиза на ензимния субстрат (DOPC).

Водонеразтворимите продукти олеинова киселина (ОА) и лизофосфолипид (LP) остават на повърхността и натрупването им води до екраниране на взаимодействието ензим-субстрат и ензимната реакция се автоинхибира. Автоинхибирането прави

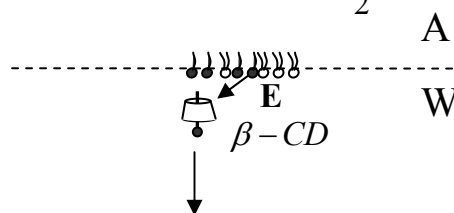
субстрата недостъпен за ензимна атака [148], докато реорганизацията и сегрегацията на продуктите видоизменя микрохетерогенността на монослоя и може да ускори ензимното свързване, дължащо се на автоактивация [148]. За да са разтворими водонеразтворимите липолитични продукти използвахме голям излишък от  $\beta$ -CD като солубилизиращ агент, с който неразтворимите продукти образуват разтворим комплекс и могат да бъдат отведени от повърхността (фигура 43), [149,150].

### Монослой

Без ензим

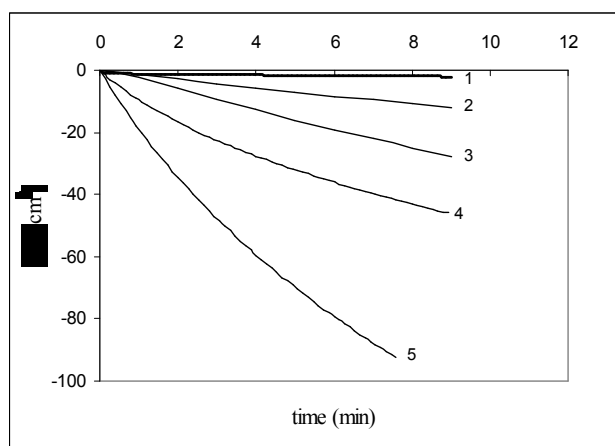


С ензим  $PLA_2$



**Фиг.43:** Повърхностна организация на DOPC монослой в отсъствие на ензим и след инжектиране на ензим в присъствие на  $\beta$ -CD.

На фигура 44 е показано изменението на  $\Delta A(t)$  по време на хидролиза на монослой от DOPC и по време на десорбция на монослой от OA в присъствие и отсъствие на  $\beta$ -CD с различни концентрации при  $\pi_{const} = 5 \text{ mN/m}$ .



**Фиг.44:** Изменение на  $\Delta A(t)$  по време на хидролиза на монослой от DOPC и по време на десорбция на монослой от OA в присъствие и отсъствие на  $\beta$ -CD при  $\pi_{const} = 5 \text{ mN/m}$ : крива 1 – DOPC монослой ( $C_{\beta-CD} = 0$ ); крива 2 – DOPC монослой ( $C_{\beta-CD} = 2.3 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ ); крива 3 – DOPC монослой ( $C_{\beta-CD} = 5 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ ); крива 4 – OA монослой ( $C_{\beta-CD} = 2.3 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ ); крива 5 – OA монослой ( $C_{\beta-CD} = 5 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ ).



От експерименталните данни и с помощта на развития кинетичен модел с отчитане на солубилизационния поток е намерена стойност на глобалната кинетична константа  $Q_m = 0.5 \cdot 10^{-12}$  (cm<sup>3</sup>/min.molecule) на хидролиза на DOPC под действие на фосфолипазата PLA<sub>2</sub> в присъствие на  $\beta$ -CD.

#### *4. Взаимодействие на липази и фосфолипази със смес от триглицериди и фосфолипиди в моделни монослоеове.*

За разбиране на съвместното действие на липази и фосфолипази върху смеси от триглицериди и фосфолипиди в настоящата дисертация е изследвана кинетиката на хидролиза на еднокомпонентни монослоеове от трикаприлин (TC) и дилауроилфосфатидилхолин (DLPC) и на смесени монослоеове от TC и DLPC в три различни молни съотношения. Проследява се каталитичното действие на липолитичния ензим (HLL) върху еднокомпонентни и смесени монослоеове от TC и DLPC, действието на (PLA<sub>2</sub>) върху монослой от DLPC и смесени монослоеове от TC и DLPC, както и едновременното действие на двата ензима върху слоевете от чистите компоненти и техните смеси. Ензимната хидролиза е изследвана по вече описания подход чрез измененията на площта на монослоя  $\Delta A(t)$  и на повърхностния потенциал  $\Delta V(t)$  във вана от “нулев порядък” (фигура 24А) при постоянна стойност на повърхностното налягане  $\pi = 15$  mN/m. Предложени са кинетични модели, описващи процеса на ензимна хидролиза на изследваните монослоеове.

##### *4.1 Кинетичен модел на ензимна хидролиза на смесени монослоеове от трикаприлин (TC)/ дилауроилфосфатидилхолин (DLPC) при едновременното действие на ензимите HLL и PLA<sub>2</sub>.*

Получените теоретични изрази за чистите монослоеове (от трикаприлин и дилауроилфосфатидилхолин) могат да бъдат приложени за смесен монослой с дадено молно съотношение, ако допуснем адитивност на площите в смесения монослой и независимост на действието на всеки ензим върху субстрата му. За целта уравненията (40 и 69), описващи намалението на повърхностните концентрации на двата субстрата, съответно TC и DLPC по време на хидролизата, се изразяват чрез следните модифицирани форми, които отчитат молната и съответно площната част на TC в смесения слой:

$$\Gamma_s(t) = e^{-Q_m C_{E_0} t} \left[ x_{TC} \Gamma_{TC}^0 + K_{TC} \int_0^t \frac{\Gamma_{TC}^0}{(A_r + \Delta A)} \frac{d\Delta A}{dt} e^{Q_m C_{E_0} t} dt \right] \quad (81)$$

$$\Gamma_s(t) = e^{-Q_m C_{E_0} t} \left[ X_{DLPC} \Gamma_{DLPC}^0 + K_{DLPC} \int_0^t \frac{\Gamma_{DLPC}^0}{(A_r + \Delta A)} \frac{d\Delta A}{dt} e^{Q_m C_{E_0} t} dt \right] \quad (82)$$

където:  $x_{TC} = \frac{\Gamma_{TC}}{\Gamma_{TC} + \Gamma_{DLPC}}$ , ( $X_{DLPC} = 1 - X_{TC}$ ) е молната част на ТС в смесения монослой, а  $k_{TC} = \frac{\Gamma_{TC} a_{TC}}{\Gamma_{TC} a_{TC} + \Gamma_{DLPC} a_{DLPC}}$ , ( $K_{DLPC} = 1 - K_{TC}$ ) е площната част на ТС в смесения монослой, който се доставя по време на хидролизата от резервоара (D) към реакционното отделение (R) (фигура 24А).

Интерпретацията на  $\Delta A(t)$  и  $\Delta V(t)$  измерванията се основава на следните изрази:

$$\beta(t) = \frac{(a_{TC} - a_{DC}) \Gamma_{P'}(t) + a_{MC} \Gamma_{P''}(t) + a_{AC} \Gamma_{P'''}(t) + [(1 - K_{TC}) - a_{DLPC} \Gamma_S(t) - a_P \Gamma_P(t)]}{k_{TC} a_{TC} \Gamma_{TC}^0 + (1 - k_{TC}) a_{DLPC} \Gamma_{DLPC}^0} \quad (83)$$

$$\Delta V(t) = 4\pi\mu_{\perp}^S \Gamma_S(t) + 4\pi\mu_{\perp}^{P'} \Gamma_{P'}(t) + 4\pi\mu_{\perp}^S \Gamma_S(t) + 4\pi\mu_{\perp}^P \Gamma_P(t) \quad (84)$$

4.2 Кинетичен модел на ензимна хидролиза на смесени монослоеве от трикаприлин (ТС) /дилауроилфосфатидилхолин (DLPC) под действието само на един ензим HLL (или PLA<sub>2</sub>).

Отчитайки независимото действие на ензима от присъствието на друг субстрат, уравненията, описващи хидролизата на чист монослой от ТС или DLPC (40 и 69) могат да бъдат използвани за смесен монослой, като се отчете молната част  $x_{TC} = \frac{\Gamma_{TC}}{\Gamma_{TC} + \Gamma_{DLPC}}$

за всеки един от субстратите в смесения монослой.

$$\Gamma_s(t) = e^{-Q_m C_{E_0} t} \left[ x_{TC} \Gamma_{TC}^0 + \int_0^t \frac{\Gamma_{TC}^0}{a_S A_r} \frac{d\Delta A}{dt} e^{Q_m C_{E_0} t} dt \right] \quad (85)$$

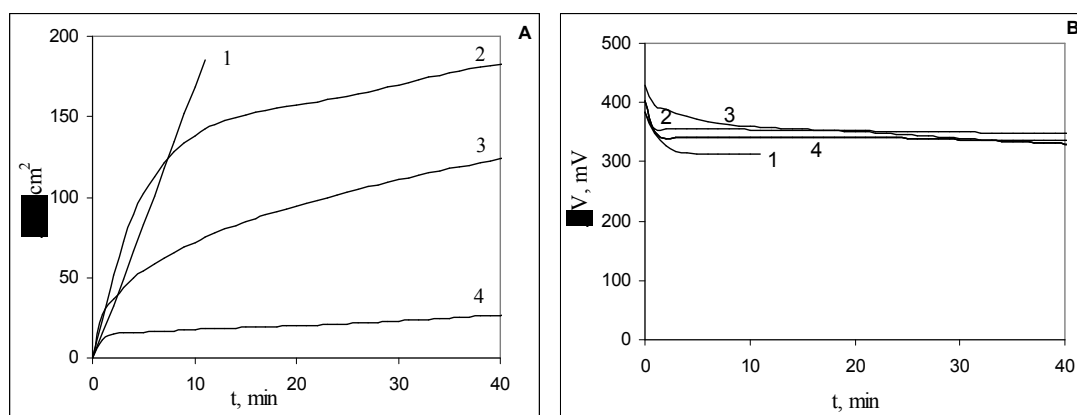
$$\Gamma_s(t) = e^{-Q_m C_{E_0} t} \left[ (1 - x_{TC}) \Gamma_{DLPC}^0 + \int_0^t \frac{\Gamma_{DLPC}^0}{a_S A_r} \frac{d\Delta A}{dt} e^{Q_m C_{E_0} t} dt \right] \quad (86)$$

Тези уравнения описват изменението на повърхностните концентрации на субстратите ТС и DLPC, респективно в смесения монослой. Те са граничен случай на уравнения (81 и 82), когато само един ензим (HLL или PLA<sub>2</sub>) действа върху смесените

ТС/DLPC монослоеве. Да отбележим важното обстоятелство, че в този случай потокът от резервоарното отделение е само подходящия за съответния ензим субстрат (ТС или DLPC) и в такъв случай площната част на чистия монослой, който постъпва от резервоара към реакционното отделение е  $K = 1$ .

Съответни уравнения за  $\beta(t)$  и  $\Delta V(t)$  могат да бъдат получени от (83) и (84) като се отчете приноса само на един от двата ензима.

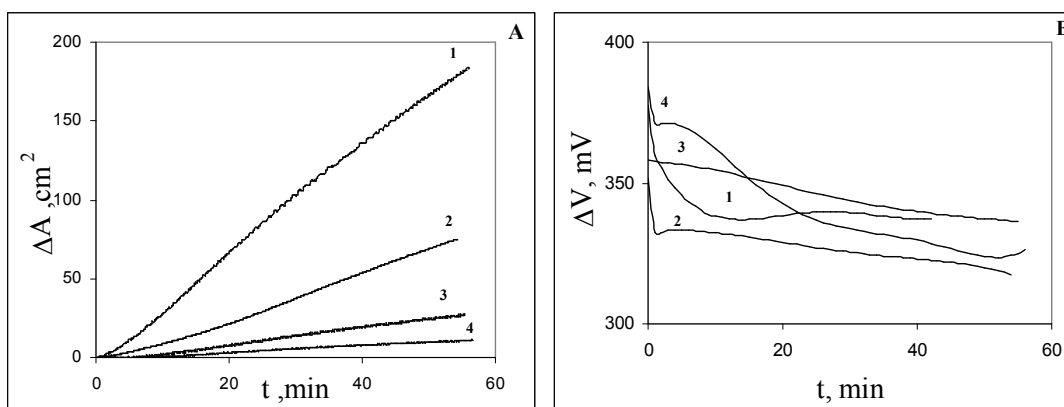
На фигура 48 е показано намалението на повърхностната площ ( $\Delta A$ ) (панел А) и еволюцията на повърхностния потенциал ( $\Delta V$ ) (панел В) с времето  $t$ , едновременно измерени по време на хидролиза на чист ТС и смесени ТС/DLPC мономолекулни слоеве с ензима HLL при постоянно повърхностно налягане  $\pi_{\text{const}} = 15 \text{ mN/m}$ .  $t = 0$  съответства на инжектирането на ензима.



**Фиг.48:** Панел А и В - Изменение на площта  $\Delta A(t)$  и повърхностния потенциал  $\Delta V(t)$  при постоянно повърхностно налягане ( $\pi_{\text{const}} = 15 \text{ mN/m}$ ) под действие на HLL върху монослой от чист ТС (криви 1) и смесен монослой от ТС и DLPC с различна молна част на ТС ( $X_{\text{TC}}$ ):  $X_{\text{TC}} = 0.75$  (криви 2),  $X_{\text{TC}} = 0.50$  (криви 3),  $X_{\text{TC}} = 0.25$  (криви 4).

Резултатите потвърждават, че ензима HLL е активен срещу субстрата ТС и не е активен срещу другия субстрат DLPC. Хидролизата на ТС води до трансформирането на неразтворимия ТС във водоразтворимия продукт DC и мигновено разтворимите продукти MC и CA. Криви 1 (панели А и В) съответстват на хидролизната кинетика на чист ТС монослой. Криви 2,3,4, на същата фигура представят кинетиката на хидролиза на смесени ТС/DLPC монослоеве. С увеличаване съдържанието на ТС в смесения слой кривите се отместват към тази, получена за чист ТС.

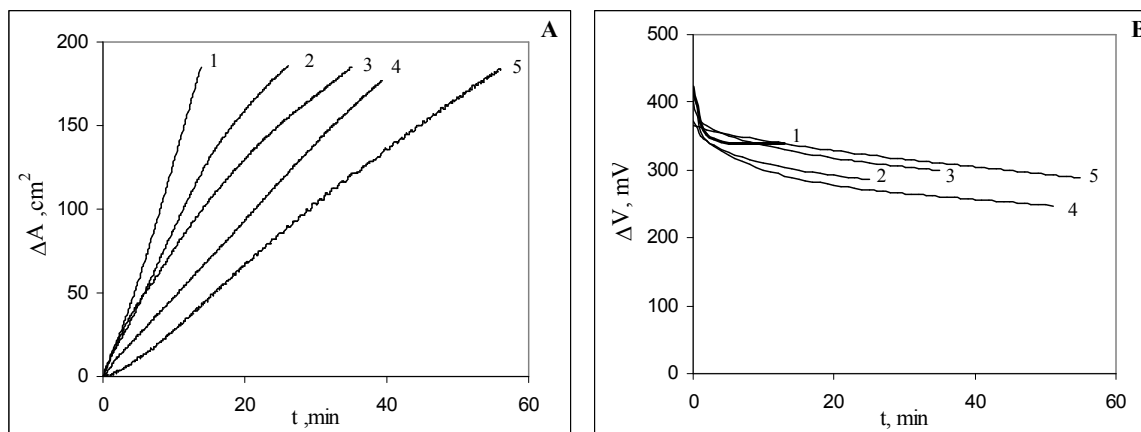
На фигура 49 е показано намалението на повърхностната площ ( $\Delta A$ ) (панел А) и еволюцията на повърхностния потенциал ( $\Delta V$ ) (панел В) с времето  $t$ , едновременно измерени по време на хидролиза на чист ТС и смесени ТС/DLPC мономолекулни слоеве с ензима  $PLA_2$  при постоянно повърхностно налягане  $\pi_{const} = 15 \text{ mN/m}$ .  $t = 0$  съответства на инжектирането на ензима.



**Фиг.49: Панел А и В -** Изменение на площта  $\Delta A(t)$  и повърхностния потенциал  $\Delta V(t)$  при постоянно повърхностно налягане ( $\pi_{const} = 15 \text{ mN/m}$ ) под действие на  $PLA_2$  върху чист монослой от DLPC (криви 1) и смесен монослой от ТС и DLPC с различна молна част на ТС ( $X_{TC}$ ):  $x_{TC} = 0.25$  (криви 2),  $X_{TC} = 0.50$  (криви 3),  $X_{TC} = 0.75$  (криви 4).

Резултатите потвърждават, че ензима  $PLA_2$  е активен срещу субстрата DLPC и не е активен срещу другия субстрат ТС. Хидролизата на DLPC води до появата на разтворими продукти (P) - лауринова киселина и лизофосфатидилхолин. Криви 1 (панели А и В) съответства на хидролизната кинетика на чист DLPC монослой, а криви 2,3,4, на същата фигура представят кинетиката на хидролиза на смесени ТС/DLPC монослоевете с различно молно съдържание на ТС.

Фигура 50 илюстрира намалението на повърхностната площ ( $\Delta A$ ) (панел А) и еволюцията на повърхностния потенциал ( $\Delta V$ ) (панел В) с времето  $t$ , едновременно измерени по време на хидролиза на смесени ТС/DLPC мономолекулни слоеве под едновременното действие на двата ензима HLL и  $PLA_2$  при постоянно повърхностно налягане  $\pi_{const} = 15 \text{ mN/m}$ .



**Фиг.50:** Панел *A* и *B* - Изменение на площта  $\Delta A(t)$  и повърхностния потенциал  $\Delta V(t)$  при постоянно повърхностно налягане ( $\pi_{const} = 15\text{mN/m}$ ) под едновременното действие на двата ензима HLL и  $\text{PLA}_2$  върху монослоеове от чист TC (криви 1), чист DLPC (криви 5) и техни смеси с различна молна част на TC ( $X_{TC}$ ):  $X_{TC} = 0.75$  (криви 2),  $X_{TC} = 0.50$  (криви 3),  $X_{TC} = 0.25$  (криви 4).

Ензимът HLL се характеризира с висока активност по отношение на триглицериди и няма активност спрямо субстрати като DLPC (фигура 48).

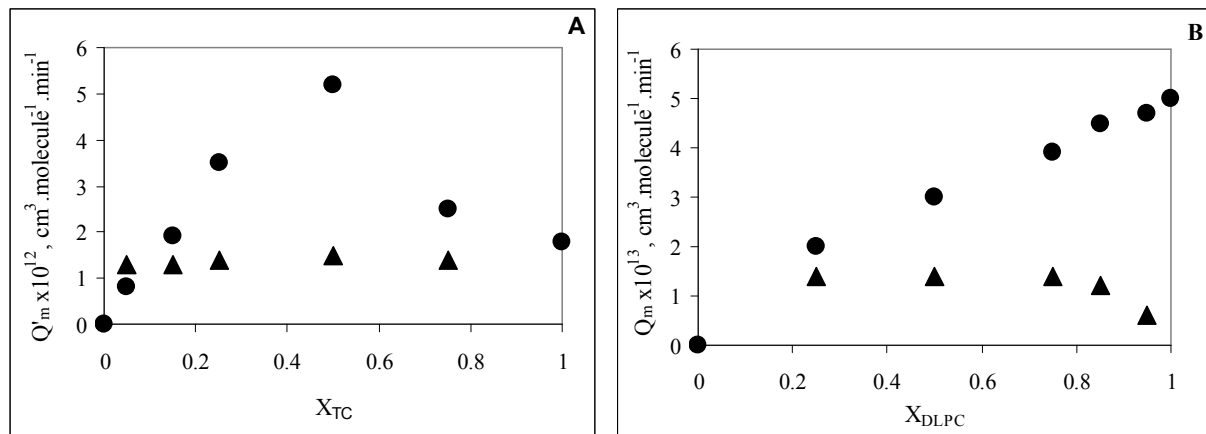
Ензимът  $\text{PLA}_2$  е активен спрямо субстрата DLPC и няма активност по отношение на триглицеридите (фигура 49).

При съвместното действие на двата ензима (HLL +  $\text{PLA}_2$ ) (фигура 50), наклонът на кривата  $\Delta A(t)$  за DLPC (крива 5) е много по-малък в сравнение с наклона на кривата  $\Delta A(t)$  за TC (крива 1) в съответствие с резултатите, показани на фигури 48 и 49. Кривите 2, 3, 4 на фигура 50 са резултат от хидролизата на смесените монослоеове TC/DLPC и са разположени между кривите за чистите монослоеове в съответствие с техния състав. С увеличаване съдържанието на TC, съответно на DLPC в смесените монослоеове, кривите се доближават до тези за чистия TC, съответно чистия DLPC.

Експерименталните кинетични данни за намалението на площта  $\Delta A(t)$  и изменението на повърхностния потенциал  $\Delta V(t)$ , получени чрез два независими метода и заедно с развитите кинетични модели ни позволяват да определим стойности за съответните глобални кинетични константи  $Q'_m$  и  $Q_m$  за TC и DLPC хидролиза, съответно.

Получените кинетични константи  $Q'_m$  и  $Q_m$  за чистите монослоеове от трикаприлин (TC) и дилауроилфосфатидилхолин (DLPC) под действието на ензима HLL и съответно

PLA<sub>2</sub> за смесени TC/DLPC монослоеве под действието на един ензим HLL (или PLA<sub>2</sub>), както и за смесени TC/DLPC монослоеве под едновременното действие на двойката ензимите (HLL + PLA<sub>2</sub>) са представени на фигура 54 панел А и В:



**Фиг.54:** Панел А - Глобални кинетични константи  $Q'_m$ , получени от кинетичните модели за чист TC и за смесен TC/DLPC монослой с различно молно съдържание под действие на ензима HLL (●) и при едновременното действие на двойката ензими (HLL+PLA<sub>2</sub>)(▲); Панел В - Глобални кинетични константи  $Q_m$ , получени от кинетичните модели за чист DLPC и за смесен TC/DLPC монослой с различно молно съдържание под действие на ензима PLA<sub>2</sub> (●) и при едновременното действие на двойката ензими (HLL+PLA<sub>2</sub>)(▲); Постоянно повърхностно налягане ( $\pi_{const} = 15$  mN/m).

Получените резултати на фигура 54 (панел А с точки), отнасящи се за хидролиза на смесен монослой TC/DLPC под действие на ензима HLL показват, че с намаление на молната част на TC ( $X_{TC}$ ) в смесения монослой, скоростта на хидролиза на TC нараства и максимална стойност на глобалната кинетична константа  $Q'_m$  се наблюдава около  $X_{TC} = 0.5$  в смесения филм. Тази промяна в активността на ензима в зависимост от молекулното обкръжение в смесения слой TC/DLPC може да се дължи на молекулни механизми, които не могат да се разграничат от използвания феноменологичен кинетичен подход, като:

1) Промяна в скоростта на проникване на ензима и по-добро свързване на субстрата с ензима на повърхността;

2) Структурни промени на повърхността, свързани със стеричното разположение на молекулите, наличие на дефекти при микрохетерогенността на слоя, които да са предпочитано място за липолитично действие или пък активният център на липазата е по-добре адаптиран за хидролиза в смесения слой.

Намерената феноменологична кинетична константа  $Q_m^i$  държи сметка и за двата фактора, тъй като ензимната хидролиза е свързана в крайна сметка и с проникването на ензима и с „качеството“ на повърхността.

В случая на хидролиза на смесен мономолекулен филм от TC/DLPC под действие на ензима PLA<sub>2</sub> получените резултати на фигура 54 (панел В с точки) показва линейно нарастване на скоростта на хидролиза на DLPC с увеличаване на съдържанието на DLPC в смесения филм. Този наблюдаван ефект показва, че повърхностната активност на PLA<sub>2</sub> не се влияе от промяната на молекулното обкръжение в смесения слой.

При едновременното действие на двойката ензими (HLL+PLA<sub>2</sub>) (фигура 54 панели А и В с триъгълници) каталитичната активност на всеки от ензимите намалява в присъствие на другия ензим. Този ефект на инхибиране може да се дължи на конкурентна адсорбция или структурни промени на повърхността.

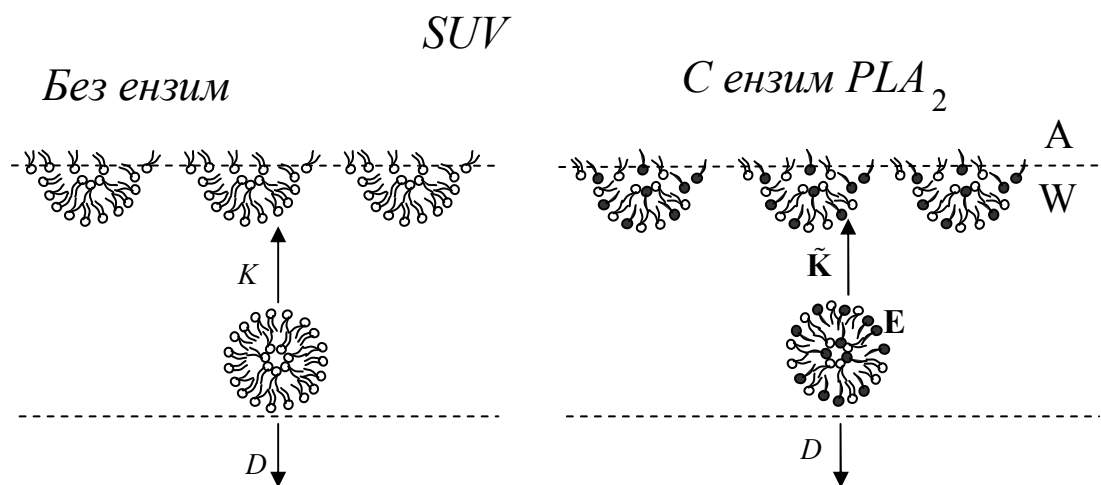
##### *5. Сравнително изследване на ефикасността на фосфолиполиза от PLA<sub>2</sub> върху DOPC субстрати, организирани като монослое, бислойни везикули и липидни нанокapsули.*

Ефикасността на фосфолиполиза зависи от начина, по който субстратите са организирани в микро- и наноразмерни структури. Каталитичното действие на фосфолипаза А<sub>2</sub> върху DOPC субстрати зависи от това дали те са организирани като монослое, бислойни везикули или липидни нанокapsули. Вече изследвахме и анализирахме кинетиката на хидролиза на монослой от DOPC, като подходяща моделна система чрез измерване на намалението на площта  $\Delta A(t)$  при постоянно повърхностно налягане в присъствието на  $\beta$ -CD.

В тази част от дисертацията се изследва ензимната липолиза върху DOPC субстрати, организирани като малки уиламеларни везикули (SUV) и липидни нанокapsули (LNC) под действието на ензима PLA<sub>2</sub>.

На фазовата граница вода/въздух сферичните бислойни везикули (SUV) се реорганизируют в повърхностни слоеве. В [48,50,155,156] са описани и развити

основните идеи, свързани с механизма и кинетиката на образуване на повърхностни слоеве при разграждането на бислойните везикули.

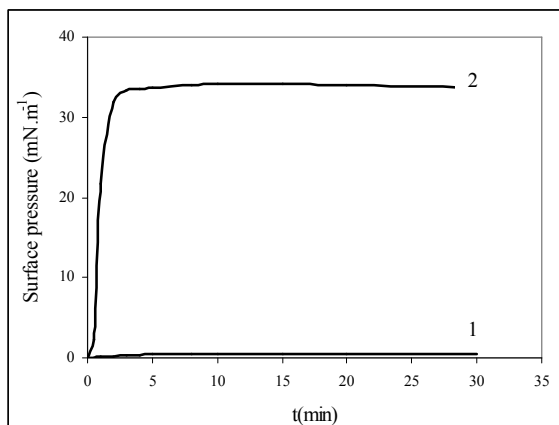


**Фиг.55:** Схематично представяне на дифузията и повърхностната дестабилизация на дисперсия от SUV без ензим и дисперсия от SUV, инкубирана в излишък на ензим и за достатъчно дълго време на инкубация;  $D$  – дифузионна константа,  $K$  и  $\tilde{K}$  – скоростни константи на необратимо трансформиране на везикулите на граничната повърхност вода ( $W$ )/въздух ( $A$ ) в отсъствие и в излишък на ензим.

Кинетиката на формиране на повърхностен филм след нанасяне на дисперсия от липозоми на повърхността в отсъствие и присъствие на ензим е описана в условията на два едновременно протичащи процеса: необратима дифузия на цели везикули към обемната течна фаза и необратимо преобразуване на затворени везикули на граничната повърхност в повърхностен филм от частично дезагрегирани структури. Процесът на дифузия може да бъде описан с дифузионното уравнение на *Fick*, а процесът на преобразуване на повърхността - с подходящо кинетично адсорбционно уравнение.

На фигура 57 е показано изменението на повърхностното налягане  $\pi$  с времето  $t$ , след нанасяне на 100  $\mu\text{l}$  дисперсия от SUV в отсъствие на ензим (крива 1) и в присъствие на ензим след инкубиране ( $T = 1\text{min}$ ) с ензим при съотношение ензим/SUV  $C_E/C_{\text{SUV}} = 20:1$  (крива 2).

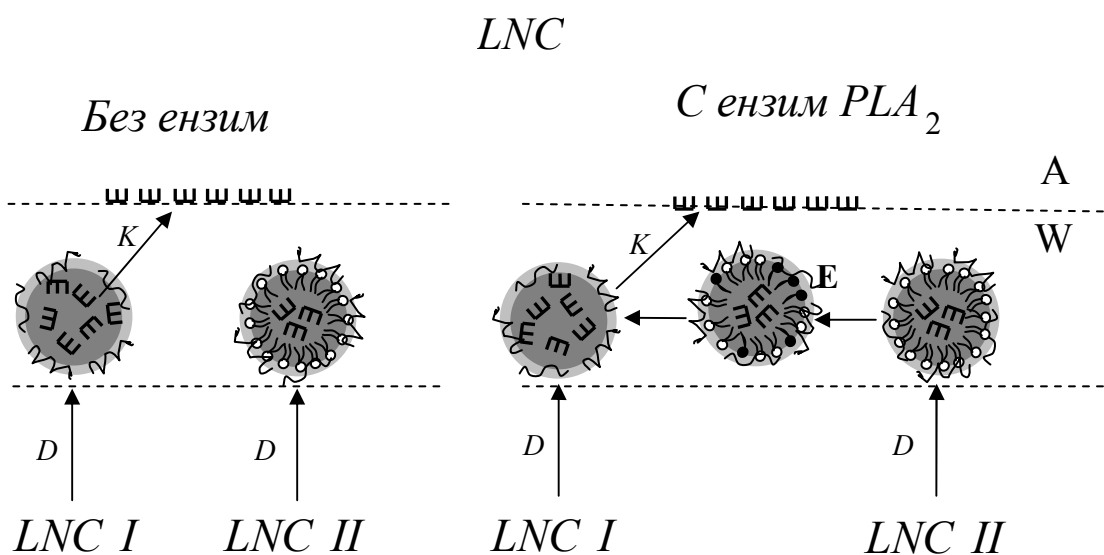




**Фиг. 57:** Зависимост на повърхностното налягане  $\pi$  от времето  $t$  след нанасяне на  $100 \mu\text{l}$  дисперсия от DOPC везикули: крива 1 – дисперсия от везикули без ензим; крива 2 - дисперсия от везикули, инкубирани за 1 min с ензим при постоянно съотношение  $C_E/C_{SUV} = 20:1$ .

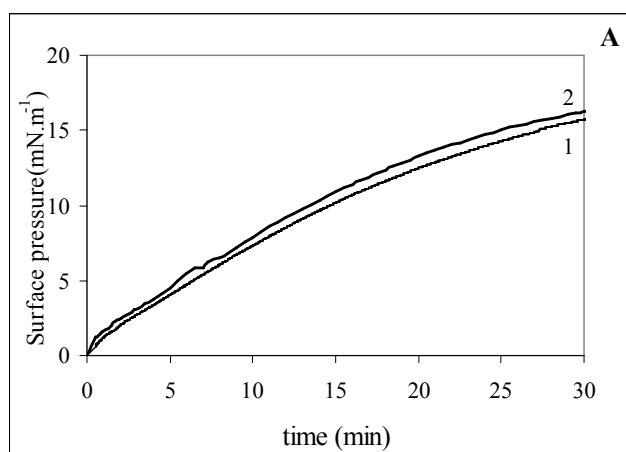
Под действието на фосфолипазата  $A_2$  се наблюдава значително ускоряване на процеса на разграждане на SUV, водещо до формиране на повърхностен слой и нарастване до по-висока стойност на повърхностното налягане.

Липидните нанокapsули (LNC), които намират приложение като преносители на лекарствени вещества [158-161] съдържат триглицеридно ядро - Labrafac®, покрито с фосфолипидни молекули от соев лецитин - Lipoid® и обвивка, формирана от полиетиленгликол стеарат (PEG-St) - Solutol®. Показано е, че в дисперсията съществуват две популации от LNC с фосфолипидни молекули (LNC I) и без фосфолипидни молекули (LNC II) (фигура 56). Двата вида популации са стабилни и остават интактни в обема от водна дисперсия, но капсулите без фосфолипидни молекули LNC I, локализирани в близост до повърхността губят своята механична стабилност и претърпяват повърхностна реорганизация, при което се формира повърхностен филм [160].



**Фиг.56:** Схематично представяне на дестабилизацията на липидни нанокapsули (LNC) без ензим и LNC, инкубирани с ензим;  $D$  – дифузионна константа,  $K$  – скоростна константа на необратимо трансформиране на LNC I частиците на граничната повърхност вода (W)/въздух (A) в отсъствие или наличие на ензим.

Експерименталните резултати  $\pi(t)$  за дисперсия от LNC с концентрация  $8.54 \times 10^{11}$  LNC  $\text{cm}^{-3}$  са представени на следващата фигура. Подобни резултати са получени и за LNC с концентрация  $3.42 \times 10^{11}$  LNC  $\text{cm}^{-3}$ .



**Фиг.58:** Еволюция на повърхностното налягане  $\pi$  с времето  $t$  по време на дезагрегация на LNC I и формиране на повърхностен филм: крива 1 – LNC дисперсия без ензим, крива 2 – LNC дисперсия, преинкубирана за 2.5 min с ензим при постоянно съотношение  $C_E/C_{LNC} = 20:1$ .

В контакт с повърхността LNC I популацията освобождава молекули от триглицеридите, съдържащи се в Labrafac, които се адсорбират на повърхността, увеличавайки повърхностното налягане  $\pi$  с времето  $t$ . Крива 1 на фигура 58 съответства на дисперсия без ензим, а крива 2 на същата фигура се отнася за същата дисперсия, но инкубирана с ензим за време  $T = 2.5$  min. Наблюдава се малко нарастване на кинетиката и увеличаване на крайното повърхностно налягане в резултат на действието на ензима PLA<sub>2</sub>.

*Интерпретация на експерименталните данни, получени при дисперсии от SUV или LNC.*

Когато липидния субстрат е организиран като дисперсия от бислоини везикули (SUV) или липидни нанокapsули (LNC), повърхностните концентрации на субстрата и продукта  $\Gamma_S$  съответно  $\Gamma_P$  от уравнения (75, 76) могат да бъдат изразени в бройки молекули за една частица  $N_S$  съответно  $N_P$  с помощта на очевидната връзка [136, 137]:

$$a\Gamma_p(t) = N_p(t) \quad (87)$$

$$a\Gamma_s(t) = N_s(t) = N_T - N_p(t) \quad (88)$$

където  $a$  е повърхностната площ на една частица,  $N_s(t)$  е броя на интактните фосфолипидни молекули в една ензим съдържаща частица,  $N_p(t)$  е броя на хидролизираните молекули след време  $(t)$ ,  $N_T$  е общия брой фосфолипидни молекули, изграждащи една частица.

С помощта на връзките (87 и 88) кинетичните уравнения (75 и 76) придобиват следната форма:

$$N_s(t) = N_T e^{-Q_d C_{Eo} t} \quad (89)$$

$$N_p(t) = N_T (1 - e^{-Q_d C_{Eo} t}) \quad (90)$$

*Няколко общи свойства за изследваните системи SUV и LNC дисперсии:*

Първо, експериментално е установено, че в дисперсната система с голямо съотношение площ/обем ( $A/V$ ), практически всички ензимни молекули са фиксирани на повърхността и тогава:

$$C_{Eo} = \frac{\Gamma_{E^*}}{\delta}, \frac{k_d}{k_p} = \frac{C_E}{\Gamma_{E^*}} = \frac{\Gamma_{E^*} / \delta}{\Gamma_{E^*}} = \frac{1}{\delta} \text{ и } Q_d = \frac{k_{cat}}{(1/\delta)K_M^*} \quad (91)$$

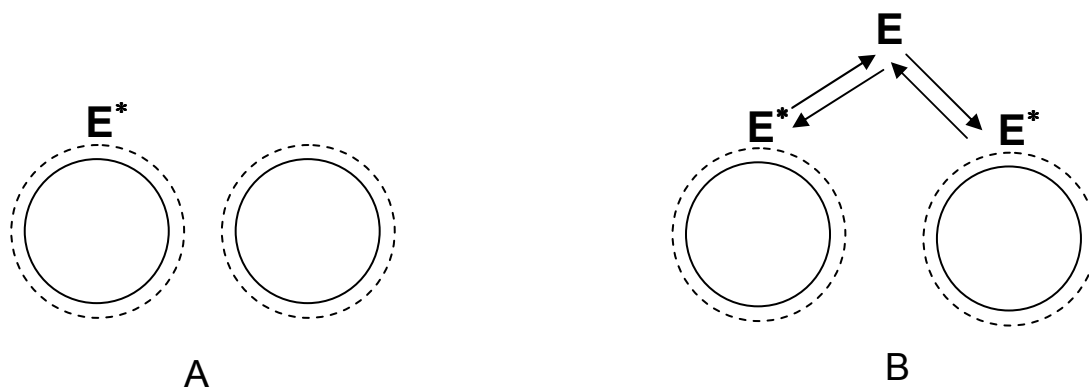
където  $\delta$  е линейния размер на частицата.

С (91) от (89, 90) се получава характеристичното време  $\tau$ , съответстващо на „e” пъти намалението на общия брой фосфолипидни молекули  $N_T$ , изграждащи една частица:

$$\tau = \frac{\delta}{\Gamma_{E^*} Q_d} \quad (92)$$

Това време  $\tau$  е свързано по някакъв механизъм с времето за дестабилизация на частицата.

Второ, ще разгледаме влиянието на процеса на обмен на ензимните молекули между частиците върху ефективността на каталитичната реакция. Базирайки се на модела на Jain [136,137] са възможни две крайни кинетични ситуации. В т.нар. “*scooting mode*”, ензимните молекули са необратимо свързани за една частица, докато в т.нар. “*hopping mode*” ензимите могат да се обменят между частиците при всеки каталитичен цикъл на превръщане на субстрата в продукт.



**Фиг.18:** Начини на вграждане на ензим в липозома: **Панел А:** “scooting mode”; **Панел В:** “hopping mode”.

В съответствие с поасоновото разпределение за всички ензимни молекули, вероятността за частици без свързан с тях ензим е  $P_{j=0} = e^{-C_E/C_P}$ . За големи съотношения ензим/частици ( $C_E/C_P$ ) е в сила  $C_E/C_P \gg 1$ , (практически няма частици без ензим)  $P_{j=0} = 0$  и тогава двете кинетични ситуации не могат да бъдат разграничени.

*Някои различия в свойствата на изследваните SUV и LNC дисперсии:*

Първо, в SUV дисперсията при големи съотношения  $C_E/C_{SUV}$  и след достатъчно дълго инкубационно време  $T$  с ензим, образуването на липолитични продукти води до структурна реорганизация и дестабилизация на всички налични везикули. Във водната дисперсия има само една популация от липозоми, в които сферичният ансамбъл е дестабилизиран и които се реорганизируют на повърхността с по-голяма скоростна константа  $\tilde{K}$  (фигура 55).

От друга страна, в LNC дисперсията има две популации (фигура 56): на нестабилни LNC I капсули без фосфолипидни молекули и стабилни LNC II с фосфолипидни молекули. Общото съотношение  $LNC\ I / (LNC\ I + LNC\ II)$  е предварително определено с независими методи [160]. Като резултат на липолитичното действие на  $PLA_2$ , част от стабилната фракция LNC II се дестабилизира и това може да бъде отчитано като превръщане на стабилната LNC II популация в нестабилна LNC I популация, променяйки съотношението  $LNC\ I / (LNC\ I + LNC\ II)$ , схематично показано на фигура 56.

Второ, бавната повърхностна реорганизация на SUV води до формиране на повърхностен филм от частично разрушените везикули (фигура 55), докато LNC

капсулите бързо освобождават от сърцевината си молекулите Labrafac на повърхността вода/въздух и формират мономолекулен слой от триглицерид (фигура 56).

*Интерпретация на експерименталните данни при дисперсия от SUV.*

В [138] е показано, че кинетиката на формиране на повърхностен филм от разрушени везикули след нанасяне на липозомната дисперсия на повърхността се описва със следното кинетично уравнение:

$$\ln\left(1 - \frac{n^*}{n_\infty^*}\right) = -K \frac{C_0 \delta}{n_\infty^*} \frac{2L}{\sqrt{D\pi}} \sqrt{t}, \quad (94)$$

където  $n^*$  е броят на разрушените везикули, адсорбирани на  $1\text{cm}^2$  площ при време  $t$ ;  $n_\infty^*$  е максималния брой от тези структури при плътна опаковка на слоя  $n_\infty^* = 5.1 \times 10^{10}$  разрушени везикули/ $\text{cm}^2$ ;  $\left(1 - \frac{n^*}{n_\infty^*}\right)$  е наличната повърхностна площ при време  $t$ ;  $K$  е скоростната константа на повърхностна реорганизация на везикулите;  $L$  е дебелината на слоя, формиран след нанасяне на дисперсията с концентрация  $C_0 = 2.45 \times 10^{14}$  SUV/ $\text{cm}^3$  ( $L = 5.4 \times 10^{-4}$  cm);  $D$  е дифузионния коефициент, изчислен по формулата на *Einstein* ( $D = 8.6 \times 10^{-8}$   $\text{cm}^2/\text{sec}$ ).

За големи отношения  $C_E/C_{\text{SUV}}$  след достатъчно дълго време на инкубация  $T = 1$  min. само една популация от дестабилизирани в резултат на хидролизата везикули се намира в обема на дисперсията (фигура 55) и уравнение (94) придобива вида:

$$\ln\left(1 - \frac{n^*}{n_\infty^*}\right) = -\tilde{K} \frac{C_0 \delta}{n_\infty^*} \frac{2L}{\sqrt{D\pi}} \sqrt{t} \quad (95)$$

където  $\tilde{K}$  е константата на дестабилизиране на SUV под действие на ензима.

От опитните данни  $\pi(t)$  от фигура 57 и уравнения (94 и 95) са определени стойностите на скоростните константи  $K = 1.6 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$  без ензим и  $\tilde{K} = 1.3 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$  с ензим. Вижда се, че скоростната константа  $\tilde{K}$  на повърхностна реорганизация на везикулите дестабилизирани в обема на дисперсията при действието на ензима е с два порядъка по-голяма от тази получена за везикулите без ензим  $K$ .

Експериментално беше установено, че при  $C_E/C_{\text{SUV}} = 20:1$  и инкубационно време  $T = 1$  min за дисперсия с ензим, се наблюдава максимална скорост на формиране на повърхностен филм. От това време, достатъчно за разрушаване на всички везикули може да се оцени и характерното време на хидролиза  $\tau = 1$  min. С помощта на ур. (92), с

$\Gamma_{E^*} = 2.6 \times 10^{11}$  molecule/cm<sup>2</sup> и  $\delta = 5 \times 10^{-6}$  cm е намерена стойност на глобалната кинетична константа  $Q_{SUV} = 1.9 \times 10^{-17}$  (cm<sup>3</sup>/min.molecule).

*Интерпретацията на експерименталните данни при дисперсия от LNC.*

Различаваме две последователни стъпки в кинетиката на формиране на повърхностен филм от Labrafac® от водни дисперсии на липидни наночапсули (LNC) (фигура 56). Първата стъпка е дифузия на LNC I от обема към подповърхностния слой на дисперсията с дебелина  $\delta$ , а втората е разрушаване на LNC I и нанасяне на освободените Labrafac молекули на повърхността вода/въздух, което води до нарастване на повърхностното налягане  $\pi$  с времето  $t$  (фигура 58). Чрез използване на изотермите  $\pi(\Gamma)$  за монослой от Labrafac, резултатите  $\pi(t)$  от фигура 58 могат да бъдат трансформирани в зависимостта  $\Gamma(t)$  и от нея може да се определят началните наклони  $(d\Gamma/dt)_{t \rightarrow 0}$  за плоска, изпъкнала и вдлъбната повърхност, показани с колона 1 на таблица 4.

Може да се покаже, че в граничния случай в началото на кинетиката ( $t \rightarrow 0$ ) и при достатъчно ниски концентрации на частиците, дифузията е по-бавния скоростно-определящ процес. В този граничен случай, кинетиката се описва с уравнението на *Fick* и дифузионния поток  $i_D = -D(\partial C/\partial x)_{x=0}$  на LNC I е равен на потока  $i_S = (d\Gamma/dt)_{t \rightarrow 0}(1/m)$  от разрушени и нанесени на повърхността LNC.

$$-D \left( \frac{\partial C}{\partial x} \right)_{x=0} = \left( \frac{d\Gamma}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} \frac{1}{m} \quad (97)$$

където  $C$  е концентрацията на LNC I,  $D$  е дифузионния коефициент за LNC I,  $m$  е броя на молекулите Labrafac, намиращи се в една LNC I,  $\Gamma$  е броя на адсорбираните молекули Labrafac за единица площ.

Дифузионният поток за плоската повърхност  $D(\partial C/\partial x)_{x=0}$  може да се получи от уравнението на *Fick* при подходящи гранични условия [164]:

$$D \left( \frac{\partial C}{\partial x} \right)_{x=0} = -C \sqrt{\frac{D}{\pi t}} \quad (98)$$

От уравнения (97 и 98) може да се получи следният теоретичен израз за началния наклон на  $\Gamma(t)$ :

$$\left( \frac{d\Gamma}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} = -Cm \sqrt{\frac{D}{\pi}} \frac{1}{\sqrt{t}} \quad (99)$$

От определените по независим начин експериментални стойности за  $D = 5.16 \times 10^{-6}$   $\text{cm}^2/\text{min}$  и  $m = 2.4 \times 10^4$   $\text{molecule/LNC}$  и уравнение (99) може да се изчисли теоретичната стойност за  $(d\Gamma/dt)_{t \rightarrow 0} = 1.5 \times 10^{13} \pm 0.5$   $\text{molecules/cm}^2 \cdot \text{min}$  за LNC дисперсия в отсъствие на ензим и да се сравни с началните наклони  $(d\Gamma/dt)_{t \rightarrow 0}$ , получени експериментално от зависимостта на  $\Gamma(t)$  за LNC дисперсия без ензим, представени в таблица 4 (колона 1) за плоска повърхност. Сравнението доказва, че в началото на кинетиката дифузията на LNC е скорост-определящ процес.

Експериментално получените начални наклони  $(d\Gamma/dt)_{t \rightarrow 0}$  за LNC дисперсия в присъствие на ензим са представени в същата таблица 4 (колона 2). Наблюдава се малкото нарастване на стойностите на  $(d\Gamma/dt)_{t \rightarrow 0}$  за LNC дисперсия с ензим. Подобни резултати са намерени и за всички изследвани повърхности (фигура 58).

Когато дисперсията е без ензим, концентрацията  $C$  съответства на началната концентрация на фракцията от LNC I, тъй като LNC II фракцията остава интактна и не участва във формирането на повърхностен филм. Въвеждането на ензима PLA<sub>2</sub> в дисперсията води до постепенно превръщане на стабилните капсули (LNC II) в нестабилни (LNC I) в съответствие с вероятностното уравнение  $P = 1 - e^{-T/\tau}$ , където  $T$  е времето за инкубиране, а  $\tau$  е характеристикното време на превръщане на LNC II в LNC I. Така, в присъствието на ензим концентрацията  $C$  на нестабилните капсули ще нараства с времето както следва:

$$C = C_{LNC I} + C_{LNC II} (1 - e^{-T/\tau}) \quad (100)$$

От експерименталните данни за  $(d\Gamma/dt)_{t \rightarrow 0}$  в отсъствие (колона 1 в таблица 4) и в присъствие на ензим (колона 2 в таблица 4), заедно с уравнения (99 и 100) са получени стойности за характеристикното време  $\tau$  на превръщане на LNC II в LNC I (колона 3 в таблица 4) и за процентното съдържание на нестабилната фракция LNC I (колона 6 в таблица 4).

Наблюдава се значително увеличение на нестабилната фракция LNC I от 70% на 89.5% (колона 5 и 6 в таблица 4). Въпреки това нестабилната фракция не достига 100% дори след по-дълго инкубационно време ( $T = 60$  min) на дисперсиите с PLA<sub>2</sub>. Експерименталните криви, получени за инкубационното време  $T = 60$  min (не са показани) са същите, както тези с време на инкубация 2.5 min. Приблизително 10% от стабилните капсули остават интактни. Това може да се дължи на факта, че някои субстратни фосфолипидни молекули остават недостъпни за ензима.

От уравнение (92) са определени стойности на глобалната кинетична константа  $Q_{LNC}$  (колона 7 в таблица 4) между  $3.4 \times 10^{-18}$  и  $4.1 \times 10^{-18}$  ( $\text{cm}^3/\text{molecule.min}$ ).

По подобен начин са получени стойности за характеристичното време на дестабилизация  $\tau$ , процентното съдържание на LNC I популацията и  $Q_{LNC}$  за изпъкнала (стоящо мехурче) и вдлъбната повърхност (капка). Получените данни са представени в таблица 4. Процесът на ензимно разрушаване в обема на LNC дисперсията става на повърхността на капсулата. Получени са стойности за  $\tau$  между 3 и 6 min (колона 3 в таблица 4) и за  $Q_{LNC}$  между  $3.4 \times 10^{-18}$  и  $5.6 \times 10^{-18}$  ( $\text{cm}^3/\text{molecule.min}$ ) за изследваните системи (плоска повърхност, стоящо мехурче, капка), които са почти еднакви, т.е. кривината на повърхността не влияе върху ензимната активност.

	1	2	3	4	5	6	7
	експерим. $\left(\frac{d\Gamma}{dt}\right)_{t \rightarrow 0}$ без ензим	експерим. $\left(\frac{d\Gamma}{dt}\right)_{t \rightarrow 0}$ с ензим	$\tau$	Начална обемна концентрация $C_{LNC I} + C_{LNC II}$	LNC I без ензим	LNC I с ензим	$Q_{LNC}$
	$\left[\frac{\text{molecules}}{\text{cm}^2 \cdot \text{min}}\right]$	$\left[\frac{\text{molecules}}{\text{cm}^2 \cdot \text{min}}\right]$	[min]	[LNC.cm <sup>-3</sup> ]	%	%	$\left[\frac{\text{cm}^3}{\text{molecules} \cdot \text{min}}\right]$
плоска повърхност	$1,8 \cdot 10^{13}$ $0,8 \cdot 10^{13}$	$2,5 \cdot 10^{13}$ $1,0 \cdot 10^{13}$	5,7 4,7	$8,54 \cdot 10^{11}$ $3,42 \cdot 10^{11}$	70	89,5 87,7	$3,4 \cdot 10^{-18}$ $4,1 \cdot 10^{-18}$
мехурче	$3,0 \cdot 10^{13}$ $1,4 \cdot 10^{13}$	$4,0 \cdot 10^{13}$ $2,0 \cdot 10^{13}$	3,7 3,4	$8,54 \cdot 10^{11}$ $3,42 \cdot 10^{11}$	70 70	85,2 83,5	$5,2 \cdot 10^{-18}$ $5,6 \cdot 10^{-18}$
капка	$3,9 \cdot 10^{13}$ $0,4 \cdot 10^{13}$	$3,9 \cdot 10^{13}$ $0,8 \cdot 10^{13}$	3,9 3,5	$8,54 \cdot 10^{11}$ $3,42 \cdot 10^{11}$	70 70	84,1 89,3	$4,9 \cdot 10^{-18}$ $5,5 \cdot 10^{-18}$

**Таблица 4:** Началните наклони  $(d\Gamma/dt)_{t \rightarrow 0}$  от  $\Gamma(t)$  за LNC без ензим и с ензим ( $C_E/C_{LNC} = 20:1$ ) и времето на инкубация  $T = 2.5$  min; характеристичното време  $\tau$  на превръщане на стабилната LNC II в нестабилна LNC I популация; процентно съдържание на нестабилна LNC I популация без ензим и с ензим, и глобалната кинетична константа  $Q_{LNC}$ , получена от кинетичния модел.



Получените стойности за характеристичното време  $\tau$  и за глобалната кинетична константа  $Q$  за трите изследвани системи – монослой (M), бислойни везикули (SUV) и липидни нанокапсули (LNC) са представени в таблица 5:

Изследвана система	$\tau$	$Q$
	min	$\text{cm}^3/\text{min.molecule}$
M	2	$1.6 \cdot 10^{-12}$
SUV	1	$1.9 \cdot 10^{-17}$
LNC	3÷6	$3.4 \div 4.1 \cdot 10^{-18}$

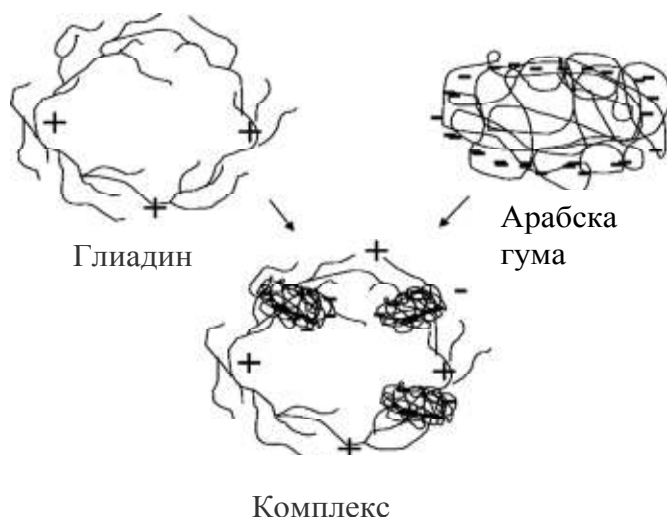
**Таблица 5:** Характеристичното време  $\tau$  и глобалната кинетична константа  $Q$  за изследваните системи (монослой, бислойни везикули и липидни нанокапсули), получени от кинетичния модел.

Сравнението на стойностите за глобалните кинетични константи  $Q$  за различните изследвани системи - за монослой  $Q = 1.6 \cdot 10^{-12}$  ( $\text{cm}^3/\text{min.molecule}$ ), за SUV  $Q = 1.9 \cdot 10^{-17}$  ( $\text{cm}^3/\text{min.molecule}$ ), за LNC  $Q = 3.4 \div 4.1 \cdot 10^{-18}$  ( $\text{cm}^3/\text{min.molecule}$ ) показва, че организацията на субстрата в бислойни сферични везикули и липидни нанокапсули е по-неблагоприятна за ензимната активност от монослойната. Стойността на  $Q_m$  за монослой е с пет порядъка по-голяма от тази, получена за SUV и с шест порядъка от тази за LNC. Този резултат е в съответствие с идеята, че монослоят е по-подходяща моделна система, което не е така в случая на слой, формиран от SUV или LNC частици. Тези разлики са свързани с различни повърхностни промени, които могат да се проявят при различно организирани ансамбли от фосфолипидни молекули. Например, ензимното проникване в различни повърхности зависи от тяхната структурна организация. Подвижността на фосфолипидните молекули и техните дифузионни коефициенти са много различни в различно организирани повърхности [165], което може да играе ключова роля в ензимната хидролиза.

**Б. Действие на протеолитичния ензим *Savinase* върху  $\alpha$ -Глиадин, организиран като моделен монослой и коацервати.**

Подходяща моделна система за изследване на механизма на протеолиза са протеиновите монослоеве.

Глиадинът е растителен протеин, изолиран от пшеница, който намира приложение в хранителната и фармацевтичната индустрия. Във фармацията глиадинът се използва за микрокапсулиране в коацерватни комплекси. На следващата фигура е представена една обща схема на спонтанно образуване на коацервати при смесването на два противоположно заредени електролита ( $\alpha$  – глиадин и арабска гума) при подходящи условия на средата. Получените коацерватни комплекси могат да се използват като системи за пренасяне и освобождаване на фармацевтично активни вещества.



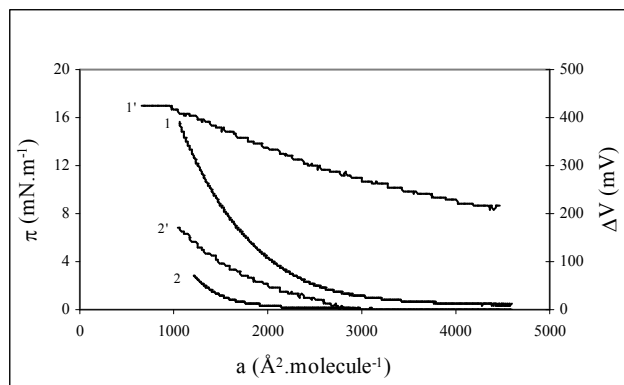
**Фиг.27:** Схематичен модел на организация на комплекс, образуван от два противоположно заредени полиелектролита ( $\alpha$  – глиадин и арабска гума).

В кисела среда глобуларните протеини претърпяват конформационни изменения, а при  $pH < 4$  протеиновата молекула е в разгъната форма [172] така, че след нанасяне на гранична повърхност вода/въздух пептидните групи идват в контакт с течната повърхност. Аналогични конформационни промени претърпява и глобулната молекула на  $\alpha$ - глиадин в кисела среда, далече от интервала на изоелектричната точка при  $pH = 6.5 \div 8$  [173].

В тази част на дисертацията е изследвано протеолитичното разграждане на растителния протеин  $\alpha$  – глиадин на граничната повърхност вода/въздух с помощта на адекватни експериментални и теоретични подходи. Изследвано е двумерното състояние на образуван повърхностен слой от  $\alpha$  – глиадин и на слой, образуван от нанесени коацервати, съдържащи  $\alpha$  – глиадин и кинетиката на ензимна протеолиза на  $\alpha$  –

глиадин и на коацервати от  $\alpha$  – глиадин чрез изменението на площта ( $\Delta A$ ) и изменението на повърхностния потенциал ( $\Delta V$ ) в баростатичен режим.

Изотермите повърхностно налягане ( $\pi$ ) – молекулна площ ( $a$ ) и повърхностен потенциал ( $\Delta V$ ) – площ за молекула ( $a$ ) на монослой от  $\alpha$ - глиадин, както и на монослой, образуван след нанасяне на коацервати, приготвени от  $\alpha$ -глиадин и арабска гума, са представени на фигура 62:



**Фиг.62:** Изотерми повърхностно налягане ( $\pi$ ) – молекулна площ ( $a$ ) и повърхностен потенциал ( $\Delta V$ ) – молекулна площ ( $a$ ) на монослой от  $\alpha$  – глиадин и на монослой от коацервати, получени при нанасянето им върху чиста вода от техни кисели разтвори ( смес от  $\alpha$  – глиадин и арабска гума в съотношение 1:1(w/w)); 1( $\pi(a)$ ) и 1' ( $\Delta V(a)$ ) –  $\alpha$  – глиадин с  $C = 1 \text{ mg/ml}$ ; 2( $\pi(a)$ ) и 2' ( $\Delta V(a)$ ) – коацервати с  $C = 1 \text{ mg/ml}$ .

Зависимостта  $\pi(a)$  и  $\Delta V(a)$  на монослой от глиадин представлява типична изотерма на протеинов монослой. От  $\pi(a)$  и насищането на  $\Delta V(a)$  изотермите за монослоя от  $\alpha$ -глиадин е определена площта ( $a$ ) около  $1000 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ , съответстваща на максимално плътна опаковка на слоя.

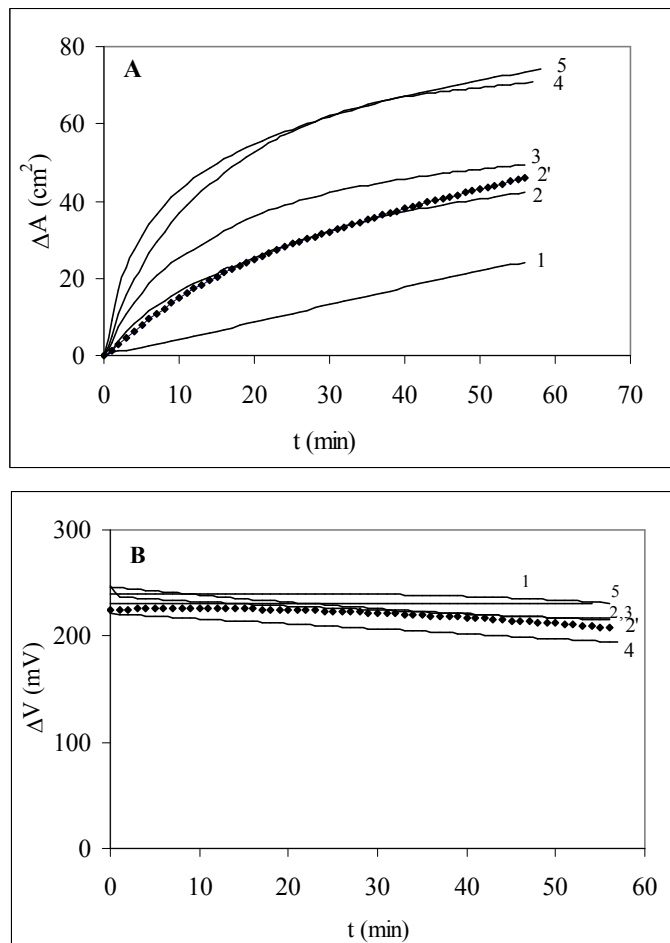
От данни на рентгеноструктурния анализ, площта на един полипептиден остатък с такова разположение е между  $15$  и  $20 \text{ \AA}^2$  [174]. От плътната опаковка на слоя при  $1000 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$  (фигура 62) може да бъде определен броя на аминокиселинните остатъци, намиращи се на повърхността, т.е. получаваме, че  $67$  аминокиселинни остатъци ( $\approx 27\%$  от общия брой  $250$  аминокиселинни остатъци) са достъпни за ензимна атака.

На фигура 62 монослоят от нанесени коацервати на повърхността (криви 2 и 2') съдържа същото количество  $\alpha$  – глиадин, както при чист монослой от  $\alpha$  – глиадин (криви 1 и 1'). Наблюдава се отместване на изотермите  $\pi(a)$  и  $\Delta V(a)$  на слоя, образуван след нанасянето на коацервати към по-малки площи спрямо тези, получени при монослоя от чист  $\alpha$  – глиадин. Полученият резултат може да се интерпретира, че част от глиадина е останал под формата на коацерватен комплекс и не се намира на повърхността.

Повърхностната хидролиза на чисти монослоеве от  $\alpha$ -глиадин и на монослой, образуван от коацервати под действие на ензима *Savinase* е изследвана чрез измерване на намалението на площта  $\Delta A$  с времето  $t$  и еволюцията на повърхностния потенциал  $\Delta V$  с времето  $t$  при постоянно повърхностно налягане. Намалението на повърхностната площ ( $\Delta A$ ) и изменението на повърхностния потенциал ( $\Delta V$ ) с времето  $t$  са измерени едновременно в процеса на хидролиза на монослой от чист  $\alpha$ -глиадин, както и на монослой от нанесени коацервати.

На фигура 63 са показани зависимостите на  $\Delta A(t)$  и  $\Delta V(t)$  на изследваните монослоеве, образувани от  $\alpha$ -глиадин и от нанесени коацервати, след инжектирането на ензима *Savinase* с пет различни концентрации.

Наблюдава се ясна зависимост от ензимната концентрация върху намалението на площта  $\Delta A(t)$ , докато ефекта върху  $\Delta V(t)$  е много по-малък. От опитните данни се вижда, че действието на ензима клони към насищане при  $\Delta A \sim 75 \text{ cm}^2$ , което съответства на  $\sim 27\%$  от цялата площ  $A = 280 \text{ cm}^2$  (при  $\pi_{\text{const}} = 5 \text{ mN/m}$ ). Този резултат е в известно съответствие с намереното по – горе, че само 27% от пептидните връзки са на повърхността и са достъпни за ензимна атака.



**Фиг. 63:** Изменение на площта  $\Delta A(t)$  (панел А) и повърхностния потенциал  $\Delta V(t)$  (панел В) при постоянно повърхностно налягане  $\pi_{\text{const}} = 5 \text{ mN/m}$  на монослой, образуван от  $\alpha$ -глиадин под действие на ензима *Savinase*: криви 1 ( $C_E = 1 \text{ nM}$ ); криви 2 ( $C_E = 5 \text{ nM}$ ); криви 3 ( $C_E = 10 \text{ nM}$ ); криви 4 ( $C_E = 50 \text{ nM}$ ) и криви 5 ( $C_E = 200 \text{ nM}$ ); криви 2' (означена с пунктир) съответства на монослой, образуван след нанасяне на коацервати под действие на ензима *Savinase* с  $C_E = 5 \text{ nM}$ .

Сравнението на получените криви за  $\Delta A(t)$  показва, че изменението на  $\Delta A(t)$  за монослой, образуван от нанесени коацервати е същото като изменението за монослой, образуван от чист  $\alpha$  – глиадин (фигура 63, крива 2'). Сходното изменение на  $\Delta A(t)$  вероятно се дължи на факта, че след нанасянето на коацервати, се хидролизират еднакъв брой глиадинови молекули, независимо от това дали те са включени или не в коацерватни комплекси на повърхността.

Интерпретацията на експерименталните данни за  $\Delta A(t)$  се основава на допускането, че намалението на площта на монослоя е резултат от прогресивната фрагментация по случаен механизъм на молекула  $\alpha$  – глиадин и мигновено разтваряне на получаващите се мономерни аминокиселинни остатъци в реакционното отделение, по време на повърхностната хидролиза под действие на ензима *Savinase*.

Уравнението за съхранение на веществото, записано за намалението на площта на монослоя  $\Delta A$  с времето ( $t$ ) държи сметка за прогресивното разкъсване на пептидните групи на молекулите, намиращи се първоначално в реакционното отделение ( $A_r^0$ ), както и за потока от  $i$ -порции ( $\Delta A_{t-t_i}$ ) субстратни молекули от резервоарното към реакционното отделение (фигура 24А) и мигновенното разтваряне на получаващите се аминокиселинните остатъци:

$$\Delta A(t) = A_r^0 \beta(t) + \sum_{i=0}^i \Delta A(t_i) \beta(t-t_i) \quad (101)$$

където  $A_r^0$  – началната площ на монослоя в реакционното отделение;  $\beta(t)$  - частта на намалението на единица площ на монослоя в резултат на появата на разтворими аминокиселинни остатъци, получена от експерименталните измервания за  $\Delta A(t)$ ;

Частта на разкъсани връзки  $\alpha$  (степен на напредване на протеолизата) се изразява чрез следната зависимост:

$$\alpha(t) = 1 - \frac{S(t)}{S_0} \quad (102)$$

където  $S(t)$  и  $S_0$  са броя на интактните пептидни връзки при време  $t$  и  $t = 0$ , съответно.

Броят на сегментите от само един аминокиселинен остатък ( $x = 1$ ), получени по случаен механизъм на фрагментация по време на протеолизата се дава със следния израз:

$$\omega_1(\alpha) = \alpha [2 + (S_0 - 1) \alpha] \quad (103 a)$$

Допускайки, че само един аминокиселинен остатък е разтворим ( $x = 1$ ), то частта на разтворимите аминокиселинни остатъци за единица площ се дава с:

$$\beta(\alpha) = \frac{\omega_1(\alpha)}{S_0 + 1} \quad (104)$$

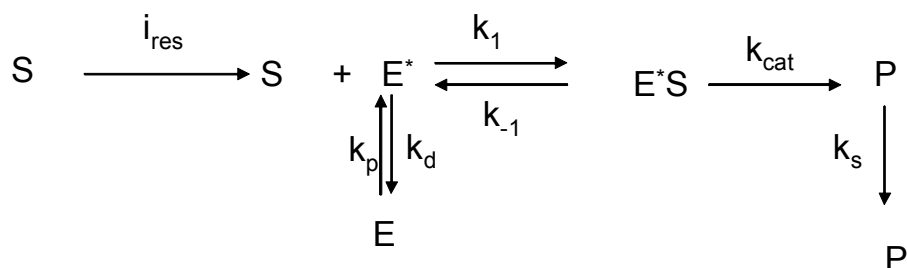
Интерпретацията на данните  $\Delta V(t)$  от измерването на повърхностния потенциал се основава на приноса на диполните моменти  $\mu_{\perp}^S$ ,  $\mu_{\perp}^P$ , на интактните S и на разкъсаните P пептидни групи. Съгласно познатото уравнение на *Helmholtz*,  $\Delta V(t)$  се изразява:

$$\Delta V(t) = 4\pi\mu_{\perp}^S\Gamma_S(t) + 4\pi\mu_{\perp}^P\Gamma_P(t) \quad (105)$$

където  $\mu_{\perp}^S = \frac{\mu_S}{\epsilon}$ ;  $\mu_{\perp}^P = \frac{\mu_P}{\epsilon}$  са вертикалните компоненти на диполните моменти на S и P;

$\epsilon$  е диелектрична проникваемост на монослоя;  $\Gamma_S$  и  $\Gamma_P$  са повърхностните концентрации на интактните S и разкъсаните пептидни групи P.

Описанието на получените експериментални данни може да се направи като се решат съвместно горните уравнения, описващи случайното фрагментиране на полипептидните молекули и разтварянето на получаващите се аминокиселинни остатъци с кинетични уравнения на протеолиза, съответстващи на адаптираната схема на *Michaelis - Menten* за реакция, локализирана на повърхността. Скоростта на реакцията се определя от кинетичната стъпка на *Michaelis - Menten* и от процесите на адсорбция и десорбция на субстрата, ензима и реакционния продукт. Кинетичната схема, описваща повърхностната ензимна хидролиза на пептидните групи в баростатични условия е представена на фигура 61:



**Фиг. 61:** Кинетична схема на хидролизния процес на  $\alpha$  – глиадин на повърхността вода/ въздух:  $i_{res}$ - поток на субстратни молекули S (пептидни връзки) от резервоара към реакционното отделение на ваната; E - ензим в обема;  $E^*$  - фиксиран на повърхността ензим; S - интактни пептидни групи (субстрат); P - разкъсани пептидни групи (продукт);  $k_1$  и  $k_{-1}$  - скоростни константи на образуване и дисоциация на ензим-субстратния комплекс ( $E^*S$ );  $k_{cat}$  - каталитична скоростна константа на хидролиза на

субстрата;  $k_p$  и  $k_d$  - скоростни константи на проникване и десорбция на ензима;  $k_S$  - скоростна константа на разтваряне на продукта.

Предложеният кинетичен модел се описва с подходящи кинетични уравнения, а чрез решаване на системата от тях в стационарно състояние и математически преобразувания, получаваме изрази за повърхностните концентрации  $\Gamma_S$  на субстрата и  $\Gamma_P$  на продукта:

$$\Gamma_S(t) = \frac{1}{e^{\int_0^t (Q_m C_E + \frac{d\beta}{dt}) dt}} \left( \Gamma_{S_0} + \int_0^t \frac{1}{a_S A_r^0} \frac{d\Delta A}{dt} e^{\int_0^t (Q_m C_E + \frac{d\beta}{dt}) dt} dt \right) \quad (109)$$

$$\Gamma_P(t) = \frac{1}{e^{\int_0^t \frac{d\beta}{dt} dt}} \int_0^t Q_m C_E \Gamma_S(t) e^{\int_0^t \frac{d\beta}{dt} dt} dt \quad (110)$$

където  $Q_m = \frac{k_{cat}}{\left(\frac{k_d}{k_p}\right) k_m}$  е глобалната кинетична константа.

От експерименталните измервания на  $\Delta A(t)$  и  $\Delta V(t)$  и с помощта на подходяща фит процедура е намерена стойност на глобалната кинетична константа  $Q_m = 1.10^{-14}$  ( $\text{cm}^3/\text{min.molecule}$ ) за чист монослой, образуван от  $\alpha$ -глиадин. В случая на монослой, формиран от нанесени коацервати експерименталните данни за  $\Delta A(t)$  и  $\Delta V(t)$  са сходни с тези за чист  $\alpha$  – глиадин. При нанасянето на коацервати на граничната повърхност се формира монослой от свободен глиадин и/или от глиадин, останал на повърхността при реорганизацията на коацерватите. С помощта на процедурата, използвана за определяне на глобалната кинетична константа  $Q_m$  за чист  $\alpha$  – глиадин е намерена стойност на  $Q_m = 1.10^{-14}$  ( $\text{cm}^3/\text{min.molecule}$ ) за слой, формиран от нанесени коацервати, съвпадаща с тази за  $\alpha$  – глиадин. Опитът показва, че глобалната кинетична константа  $Q_m$  не зависи от концентрацията на ензима при дадено повърхностно налягане.

## V. Изводи

1. Предложен е подход за изследване на кинетичните механизми на действието на липолитични ензими върху субстрати, организирани в монослой. Интерпретацията на измерваните в хода на хидролизата механична (повърхностно налягане  $\pi$ ) и електрична (повърхностен потенциал  $\Delta V$ ) величини с помощта на развитите кинетични модели позволява определянето на феноменологичната глобална константа  $Q_m$ , отчитаща влиянието върху ензимната активност на структурната организация на монослоя и физикохимичните процеси (проникване на ензима, десорбция на продуктите и др.), съпътстващи ензимокаталитичната реакция.

2. Определени са стойностите на  $Q_m$  за действието на липазата HLL върху ТС, PEG-St и смесени монослоевете ТС/PEG-St:

Глобалната кинетична константа на първия етап на превръщане на трикаприлина (ТС) в дикаприлин (ДС)  $Q_m' = 1,7 \cdot 10^{-12}$  ( $\text{cm}^3/\text{min} \cdot \text{molecule}$ ) е с порядък по-голяма от тази на втория етап на превръщане на дикаприлина (ДС) в монокаприлин (МС)  $Q_m'' = 1,8 \cdot 10^{-13}$  ( $\text{cm}^3/\text{min} \cdot \text{molecule}$ ).

Намерените стойности на глобалните кинетични константи на хидролиза на чист PEG-St ( $Q_m = 7 \cdot 10^{-13}$   $\text{cm}^3/\text{min} \cdot \text{molecule}$ ) са по-ниски от тези, получени за първия етап ( $Q_m'$ ) и по-високи от тези за втория етап ( $Q_m''$ ) на хидролиза на трикаприлин (ТС).

Глобалните кинетични константи на каталитично действие на ензима HLL върху ТС и PEG-St, получени за смесения монослой ТС/PEG-St са приблизително еднакви за различните състави  $X_{\text{ТС}}$  и съответстват на тези, получени при чистите монослоевете от ТС и PEG-St т.е. повърхностната активност на ензима HLL в смесените монослоевете практически не се влияе от промяната на молекулното обкръжение и се наблюдава адитивност в ензимното действие.

3. Ензимната хидролиза под действие на фосфолипаза  $\text{PLA}_2$  на средноверижния DLPC и дълговерижния DOPC фосфолипиди, организирани в монослоевете води до получаването на водоразтворими при DLPC, съответно неразтворими при DOPC липолитични продукти. Получени са стойности на  $Q_m$  и за двете изследвани системи.



4. За разбиране на съвместното действие на липази и фосфолипази върху смес от триглицериди и фосфолипида е изследвана кинетиката на хидролиза на смесени монослоеви от трикаприлин (TC) и дилауроилфосфатидилхолин (DLPC) с различни молни съдържания TC/ DLPC под действие на липолитичните ензими HLL и PLA<sub>2</sub>.

Получените резултати, отнасящи се за хидролиза за смесен монослой TC/DLPC под действие на ензима HLL показват, че с намаление на молната част на TC ( $X_{TC}$ ) в смесения слой, скоростта на хидролиза на TC нараства и максимална стойност на намерената глобална кинетична константа  $Q'_m \sim 5 \cdot 10^{-12}$  (cm<sup>3</sup>/min.molecule) на превръщане на TC в DC се наблюдава около  $X_{TC} = 0.5$  в смесения слой.

Тази промяна в активността на ензима HLL в зависимост от молекулното обкръжение в смесения TC/ DLPC слой може да се дължи на две причини, които не могат да се разграничат от използвания феноменологичен кинетичен подход: промяна в скоростта на проникване на ензима на повърхността и/или структурни промени на повърхността, свързани със стеричното разположение на молекулите, например наличие на дефекти при микрохетерогенността на слоя, които да са предпочитано място за липолитично действие. Феноменологичната кинетична константа  $Q'_m$  държи сметка и за двата възможни механизма.

В случая на хидролиза на смесен мономолекулен филм от TC/DLPC под действие на ензима PLA<sub>2</sub> получените резултати за  $Q_m$  показват линейно нарастване на скоростта на хидролиза на DLPC с увеличаване на съдържанието на DLPC в смесения филм, т.е. повърхностната активност на PLA<sub>2</sub> не се влияе от промяната на молекулното обкръжение в смесения слой.

При едновременното действие на двойката ензими (HLL+PLA<sub>2</sub>) каталитичната активност на всеки от ензимите намалява в присъствие на другия ензим. Този ефект на инхибиране може да се дължи на конкурентна адсорбция или структурни промени на повърхността.

5. Развит е подход за сравнително изследване на ефикасността на фосфолиполиза под действие на ензима PLA<sub>2</sub> върху DOPC субстрати, организирани като монослоеви, бислойни везикули и нанокапсули.

Сравнението на получените стойности за глобалните кинетични константи  $Q$  за различните изследвани системи (за монослой  $Q_m = 1.6 \cdot 10^{-12}$  (cm<sup>3</sup>/min.molecule), за SUV  $Q_{SUV} = 1.9 \cdot 10^{-17}$  (cm<sup>3</sup>/min.molecule), за LNC  $Q_{LNC} = 3.4 \div 4.1 \cdot 10^{-18}$  (cm<sup>3</sup>/min.molecule)

показва, че организацията на субстрата в бислойни сферични везикули и липидни нанокапсули е по-неблагоприятна за ензимната активност от монослойната. Стойността на  $Q_m$  за монослой е с пет порядъка по-голяма от тази, получена за SUV и с шест порядъка от тази за LNC.

Тези разлики са свързани с различни повърхностни промени, които могат да се проявят при различно организирани ансамбли от фосфолипидни молекули. Например, ензимното проникване, подвижността на фосфолипидните молекули и техните дифузионни коефициенти са много различни в различно организирани повърхности, и могат да играят ключова роля в ензимната хидролиза.

6. Протеолитичното разграждане на растителния протеин  $\alpha$ -глиадин на граничната повърхност вода/въздух под действието на ензима *Savinase* е описано като процес на случайно фрагментиране (“*random scission*”) и прогресивно разтваряне на получаващите се аминокиселинни остатъци.

От експерименталните данни и с помощта на развития кинетичен модел е определена стойност на глобалната кинетична константа  $Q_m = 1.10^{-14}$  ( $\text{cm}^3/\text{min.molecule}$ ).

При протеолитичното разграждане на коацерватни комплекси от  $\alpha$ -глиадин е намерена стойност за  $Q_m = 1.10^{-14}$  ( $\text{cm}^3/\text{min.molecule}$ ), съвпадаща с тази на  $\alpha$ -глиадин.

Сравнението с глобалните липолитични константи, плучени за монослоеве от късоверижни липиди показва, че те са с 2 – 3 порядъка по – високи от тези, получени за протеиновия слой.

## Списък на научните публикации по дисертацията

1. Tz. Ivanova, K. Mircheva, G. Dobрева, I. Panaiotov, J.E. Proust, R. Verger - “Action of *Humicola lanuginosa* lipase on mixed monomolecular films of tricaprylin and polyethylene glycol stearate”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 63 (2008) 91–100.
2. K. Mircheva, I. Minkov, Tz. Ivanova, I. Panaiotov, J.E. Proust, R. Verger - “Comparative study of lipolysis by PLA<sub>2</sub> of DOPC substrates organized as monolayers, bilayer vesicles and nanocapsules”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 67 (2008) 107–114.
3. K. Mircheva, Tz.Ivanova, I.Panaiotov, F. Boury - “Enzymatic hydrolysis by savinase of coacervates containing alpha-gliadin spread at the air-water interface”, *Nanoscience & Nanotechnology*, 9, eds. E.Balabanova, I.Dragieva, Sofia, 2009.
4. K. Mircheva, Tz. Ivanova, I. Panaiotov, V. Duceľ, F. Boury - “Enzymatic proteolysis of alpha gliadin monolayer spread at the air–water interface”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 347 (2010) 69–73.
5. K. Mircheva, Tz.Ivanova, I.Panaiotov, R.Verger - “Hydrolysis of mixed monomolecular films of Tricaprylin/Dilauroylphosphatidylcholine by lipase and phospholipase A<sub>2</sub>”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86 (2011) 71–80

## Забелязани цитати

1. Citing Paper: P.B. Ishai, D. Libster, A. Aserin, N. Garti, Y. Feldman. *Molecular Interactions in Lyotropic Reverse Hexagonal Liquid Crystals: A Dielectric Spectroscopy Study*. *J. Phys. Chem. B* 113, 12639-12647 (2009) References: 47.

Cited Authors: Ivanova, Mircheva, Dobрева, Panaiotov, Proust, Verger (*Colloids & Surfaces B*, 2008).

2. Citing Paper: A. Banc, P. Bauduin, B. Desbat, I. Ly, O. Deat. *Ion Extraction Mechanism Studies in a Lyotropic Lamellar Phase*. *J. Phys. Chem. B* 115, 1376-1384 (2011) References: 43.

Cited Authors: Mircheva, Minkov, Ivanova, Panaiotov, Proust, Verger (*Colloids & Surfaces B*, 2008);

3. Citing Paper: A. Wichkowska, E. Jablonowska, E. Rogalska, R. Bilewicz. Structuring of Supported Hybrid Phospholipide Bilayers on Electrodes with Phospholipase A2. *PhysChemChemPhys* **13**, 9716-9724 (2011)

Cited Authors: Mircheva, Minkov, Ivanova, Panaiotov, Proust, Verger (*Colloids & Surfaces B*, 2008);

**Материалите по дисертацията са представени на следните научни конференции:**

1. International workshop, Nanoscale Phenomena in Colloid and Interface Science, September 20-22 2007, Plovdiv, Bulgaria.
2. 10<sup>th</sup> Workshop “NANO 2008”, 27 - 28 November 2008, Sofia, Bulgaria.
3. 23<sup>rd</sup> Conference of the European Colloid and Interface Society (ECIS) 2009, 06-11 September, Antalia, Turkey.
4. 11<sup>th</sup> Workshop „NANOSCIENCE & NANOTECHNOLOGY 2009”, 01–03 October 2009, Varna, Bulgaria.
5. VI Национална конференция по химия за студенти и докторанти, 2007, 16 - 18 май, София.
6. VII Национална конференция по химия за студенти и докторанти, 2008, 20 – 22 май, София.

## Съдържание

I. Увод.....	1
II. Материали.....	2
III. Методи.....	3
IV. Основни резултати.....	7
A. Действие на липази и фосфолипази върху различно организирани субстрати от триглицериди и фосфолипиди.....	7
1. Механизъм на действие на липазата HLL върху трикаприлин, организиран в моделен монослой.....	7
2. Механизъм на действие на липазата HLL върху полиетиленгликоол стеарат (PEG-St) и смесени монослоеове от TC и PEG-St.....	13
3. Механизъм на действие на фосфолипазата PLA <sub>2</sub> върху моделни монослоеове от средно- и дълговерижни фосфолипиди.....	20
3.1. Ензимна хидролиза на монослой от дилауроилфосфатидилхолин (DLPC) под действие.....	20
3.2. Ензимна хидролиза на монослой от диолеоилфосфатидилхолин (DOPC) под действие на PLA <sub>2</sub> .....	21
4. Взаимодействие на липази и фосфолипази със смес от триглицериди и фосфолипиди в моделни монослоеове.....	23
4.1. Кинетичен модел на ензимна хидролиза на смесени монослоеове от трикаприлин (TC) / дилауроилфосфатидилхолин (DLPC) при едновременното действие на ензимите HLL и PLA <sub>2</sub> .....	23
4.2. Кинетичен модел на ензимна хидролиза на смесени монослоеове от трикаприлин (TC)/дилауроилфосфатидилхолин (DLPC) под действието само на един ензим HLL (или PLA <sub>2</sub> ).....	24
5. Сравнително изследване на ефикасността на фосфолиполиза от PLA <sub>2</sub> върху DOPC субстрати, организирани като монослоеове, бислойни везикули и липидни нанокapsули.....	29
B. Действие на протеолитичния ензим <i>Savinase</i> върху $\alpha$ -Глиадин, организиран като моделен монослой и коацервати.....	40
V. Изводи.....	46
Списък на научните публикации по дисертацията.....	49
Забелязани цитати.....	49
Материалите по дисертацията са представени на следните научни конференции.....	50