

Софийски университет “Св. Климент Охридски”  
Физически факултет



*Мая Валериева Тановска*

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

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертация за присъждане на образователна  
и научна степен „Доктор“**

**Професионално направление 4.1. Физически науки  
(Биофизика)**

**Научен ръководител :доц. д-р Борислав Павлов**

**Научен консултант: гл. ас. д-р Лилия Владимирова – Михалева**

**София**

**2019**

Дисертацията е обсъдена на заседание на катедрения съвет при катедра „Атомна физика“, ФзФ – СУ, проведено на 15.01.2019 год.

Авторът е бил редовен докторант в катедра „Атомна физика“ , при Физически факултет на СУ за периода: 15. 01. 2015 год. – 15. 01. 2019 год., където е извършена и основната част от експерименталната работа по дисертацията.

Дисертационният труд е изложен на 109 страници и включва 57 фигури и 3 таблици. Цитирани са 215 източника.

Материалите по защита са на разположение на интересувашите се в библиотеката и в катедра „Атомна физика“ на Физически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, бул. „Джеймс Баучер“ 5, 1164 ж.к. Лозенец, София.

Софийски университет “Св. Климент Охридски”

Физически факултет



*МАЯ ВАЛЕРИЕВА ТАНОВСКА*

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

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД  
ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН  
“ДОКТОР”

Професионално направление 4.1. Физически науки  
(Биофизика)

Научен ръководител: доц. д-р Борислав Павлов

Научен консултант: гл. ас. Лилия Владимирова - Михалева

София

2019

***Използвани съкращения:***

- AFM / ACM – atomic force microscopy / атомно силова микроскопия
- APCs – alkylphosphocholines / алкилфосфолини
- APLs – alkylphospholipids / алкилфосфолипиди
- БЛМ – бислойни липидни мембрани
- ДНК - дезоксирибонуклеиновата киселина
- EIS / ЕИС – electrochemical impedance spectroscopy / електрохимична импедансна спектроскопия
- ErPC - еруцилфосфохолин
- ErPC3 – erufosine / еруфозин
- in situ* - на място
- in vivo* - на живо
- n - показател на пречупване
- PCSA - нулев елипсометър, работещ по схема поляризатор – анализатор – компенсатор
- SFM – scanning force microscopy / сканираща силова микроскопия
- p* - паралелно поляризирана светлина
- R - съпротивление
- RA - конфигурация на елипсометър с въртящ се анализатор
- s* - перпендикулярно поляризирана светлина
- VASE - спектрална елипсометрия с променлив ъгъл
- Г - повърхностна концентрация
- PC - фосфатидилхолин
- PG – фосфатидилглицерол
- PS – фосфатидилсерин
- SLBs – Supported lipid bilayers / поддържащи липидни бислоеве
- SM – сфингомиелин

## Увод

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

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

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

страна, експериментите с реконструирани мембрани *in vitro* позволяват да се променя и дебелината на бислоя [1].

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

## **Цел и задачи на изследването**

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

За разкриването на целта се поставиха следните задачи:

1. Да се изследва зависимостта от температурата на липиден филм чрез импедансна спектроскопия.
2. Да се изследват поведението на липид/холестеролни филми при промяна съдържанието на холестерол чрез импедансна спектроскопия.
3. Елипсометрично изследване на взаимодействието на холестерол при изменение концентрацията на лецитин.
4. Да се изследва влиянието на антитуморния агент - еруфозин върху липидна моделна система (холестерол/сфингомиелин/фосфотидинхолин) чрез спектрална елипсометрия.

## **СТРУКТУРА НА ДИСЕРТАЦИЯТА**

Дисертационният труд се състои от две основни части – обща и специална.

Общата част (глава 1) има обзорен характер. Направен е преглед на изследванията върху взаимодействието на липидни моделни системи с биологично важните молекули – холестерол и еруфозин. Във втората част на тази глава са разгледани методиките за изследване на холестерол и еруфозин. И са представени известни досега изследвания.

Специалната част съдържа две глави. В глава “Материали и методи” са представените използваните методи – теоретичните и експериментални постановки на задачите и използваните материали. Разгледани са както електрохимичния метод – импедансна спектроскопия, а така също и елипсометричната - нулева и спектрална и атомно силова микроскопия.

Глава 3 представлява резултатите и обсъждането им. В раздел 3.1. са дадени експерименталните данни за импедансно изследване на филми от чист лецитин при различна температура, а в 3.2. импедансно изследване на лецитинови филми съдържащи холестерол, 3.3. елипсометрично изследване на взаимодействието на лецитин и холестерол, 3.4. елипсометрично изследване влиянието на антитуморния агент - еруфозин върху липидна моделна система.

## **II. СПЕЦИАЛНА ЧАСТ**

### **Глава 2 МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

#### **2.1. Материали.**

За получаване на образците са използвани следните химикали: холестерол (cholesterol, 5-cholesten-3 $\beta$ -ol, C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>OH, Sigma Chemical Co. USA); соев Лецитин (lecithin, Walmark, Чехия) без



допълнително пречистване. Фосфолипид, разтворен в n-хексан и стерол, разтворен в хлороформ / метанол (9/1, обем / обем) се смесват в подходящи количества да се приготвят изходни разтвори с желано съдържание.

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

Фосфатидилхолин (PC) от яйчен жълтък, Вид XVI – E,  $\geq 99$  % (TLC), лиофизиран праз закупен от Sigma Aldrich, Австралия и Сфингомиелин (SM), пилешки яйчен жълтък  $\geq 95$  %, Sigma Aldrich, Австралия се използват като липиден материал за приготвяне на филмите в това изследване. Холестерол (cholesterol, 5-cholesten-3 $\beta$ -ol, C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>OH, Sigma Chemical Co. USA) аналитичен клас също не се пречиства допълнително. Фосфолипидът, разтворен в n – хексан и стеролът, разтворен в хлороформ / метанол (9/1, об./об.) бяха смесени в подходящи количества за приготвяне на stock/сток разтвор с желаното съдържание. Експериментите бяха проведени при съотношенията на PC и SM, но с промяна на съответната процентна концентрация (10 %, 30 % и 60 %) на холестерола. 20  $\mu$ l липиден разтвор се инжектира на златната повърхност.

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

Еруфозинът - е синтезиран в института Max Plank Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany, и беше предоставен от проф. Мартин Бергер от "German Cancer Research Center, Heidelberg" ErPC3 се разтваря в PBS (phosphate buffered saline) – фосфатно буфериран разтвор, рН 7.4 и също се използва в различни концентрации.

### **2.1.1. Еруфозин**

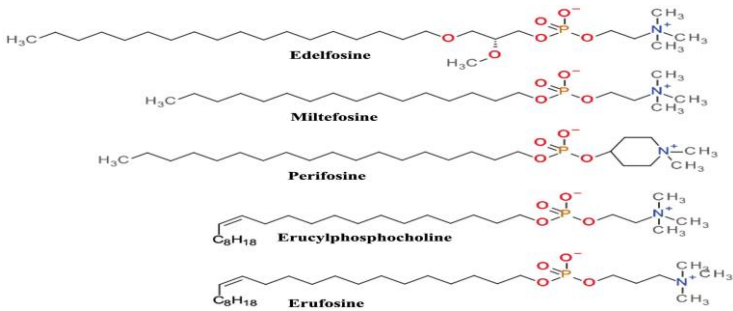
Алкилфосфохолините представляват нов клас цитостатични лекарства с нов начин на действие. Еруфозин (ErPC3), първото съединение от този клас, което може да се приложи интравенозно, наскоро се оказва, че е активно срещу човешки туморни и левкемични клетъчни линии.

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

интравенозно инжектираните алкилфосфохолини с конверсия към адхерентност, фибробласт-подобен клетъчен фенотип.

Еруфозинът има висока активност срещу левкемични клетки, без да засяга нормалната хематопоеза. Принадлежи към групата на алкилфосфохолините (АРС), които са инхибитори на протеин киназа С. Това е химиотерапевтично средство принадлежащо към група вещества наричани алкилфосфохолини (АРС). Тези синтетични съединения, получени от етер – липиди, показват силна проапоптична активност върху различни злокачествени клетъчни линии и първични туморни клетки. Трябва да се отбележи, че АРС не са миелотоксични (не увреждат костния мозък) и дори стимулират хематопоеза в костния мозък, за разлика от конвенционалните противоракови лекарства. Еруфозина е нов етер – липид алкифосфохолин, показващ висока ефективност върху туморни модели *in vivo* и *in vitro*. Доказано, е че индуцира апоптоза в много левкемични и глиомни клетъчни линии. Той не миелотоксичен, дори стимулира нормалната хематопоеза (процес на образуване на кръвни клетки). Тези функции се дължат на неговата химическа структура, която има дълъг алкил, верига от 22-въглеродни атома с една цис – двойна връзка. Това се базира на ниския еруфозинов хемолитичен потенциал (предизвикващ хемолиза, например : хемолитична анемия), което е предпоставка за системното му приложение и на свой ред позволява високи плазмени нива. Наблюдавано, е че еруфозина модулира различни пътища на сигнална трансдукция чрез взаимодействие с мембранни компоненти, обаче неговият точен механизъм на действие не е

разбран.



**Фиг. 1. Структура на еруфозина [201]**

### 2.1.2. Получаване на липиден филм върху твърда подложка

Най-елементарният начин за получаване на липидни филми върху твърда подложка е чисто емпиричен. Той се състои просто в нанасяне (с четка или пипета) на формиращия разтвор от липиди в хидрофобен разтворител върху субстрата, изчакване да се изпари разтворителя (в ексикатор под вакуум) и хидратация (най-често пряко потапяне във вода). Разчита се на липидната самоорганизация под действие на хидрофобния ефект, което в крайна сметка довежда до образуването на ориентиран бислои или мултислоеве. Разбира се, ако идеята е изграждане на двоен молекулен слой, повърхността на подложката трябва да бъде достатъчно хидрофилна за да може прилежащият липиден монослой да се ориентира с полярните глави към нея (Фиг. 2).

Такива филми са известни като “намазани” (англ. lipid painting, paint brush technique), или “излети” (англ. cast films). Като стъпка в подобрението на методиката бе предложено т.нар. ротационно покриване (англ. spin-coating, Фиг. 23), при което се извършва центробежно разстилане на липидния разтвор по

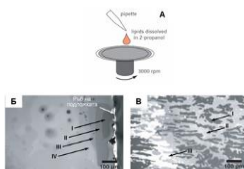
повърхността на субстрата (обикновено слюда, метал, стъкло, SiO<sub>2</sub>). В общи линии, техниката е разработена отдавна за най-различни полимерни покрития на повърхности. Макар в случая на липидите да е била предвидена за изследване на бислоини стекове с рентгенова дифракция, в последно време тя широко се практикува и за изучаване на ефектите на фазова сепарация. Това се дължи на благоприятното обстоятелство, че прилежащият към твърдотелния интерфейс бислои, който остава след отмиването на по-горните слоеве с буфер, е стабилен и хомогенен [202].



**Фиг.2. Приготвяне на “излети” липидни филми.**



**Фиг. 3. Получаване на сух липиден филм с помощта на ротационната техника „spin – coating”**

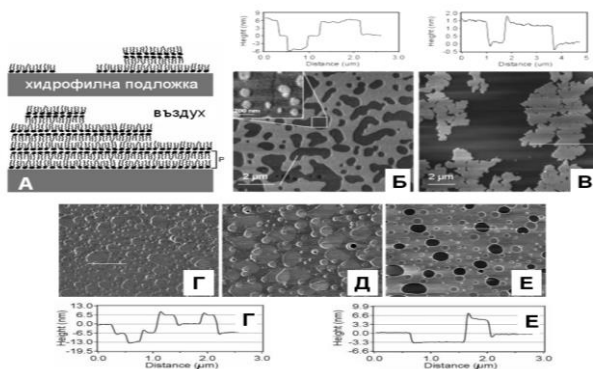


**Фиг 4. Ротационно покриване на твърдотелен субстрат с липиден филм. (А) Депозиране на липидния материал върху въртящата се подложка (в случая силицев окис, SiO<sub>x</sub>); (Б) Мултислоевете от 1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, SOPC (5 mg/mL) изложени на въздух. Отделните бимолекулни**

*слоеве са означени с римски цифри; (В) Промиването с воден разтвор последователно отстранява горните слоеве [203].*

Едно изследване с помощта на флуоресцентни микроскопски методи и AFM, проведено в групата от MEMPHYS (Дания), до голяма степен изясни структурата на липидните слоеве продуцирани с ротационната техника [204]. Очевидно, много важно условие за правилното отлагане на липидния филм е доброто омокряне на подложката от разтворителя. Ето защо той се подбира в зависимост от материала на субстрата. Степента на покриване обаче, зависи силно и от липидната концентрация (Фиг.5 А), като под някаква критична стойност (в случая 3mg/ml) започва да се забелязва характерна картина на нарушено омокряне (англ. dewetting) с открити области от субстрата (тъмните петна, Фиг.5). След хидратацията в буфер, по-горните слоеве от липида се “отмиват” и се получава равномерен хомогенен бислои, както за едно- (POPC) така и за двукомпонентни системи (POPC/DPPC, Фиг.5 Б,В). Авторите обръщат внимание, че методът коренно се различава от другите (сливане на липозоми и Лангмюир-Блоджет, LB) по това, че образуването на домени става след като бислоят вече е отложен върху субстрата, което е важно, тъй като “пренасянето” на бислои с формирани домени крие рискове от разрушаването им.

За част от липидните филми сме използвали техниката на „излети” филми, тъй-като ротационното отлагане е неудобно предвид на геометрията на работния електрод с поставката му (Фиг. 6). А за другата част от липидните филми сме използвали техниката на ротационното завъртане „spin – coating”.



**Фиг.5. Морфология на липидното покритие получено с ротационно отлагане. (А) Предполагаема ориентация на слоевете на въздух, след депозиране на разтвор с ниска (горе) и висока (долу) липидна концентрация. Прилежащият към субстрата стабилен бислой е отбелязан с Р; (Б) AFM изображение (долу) и профил (горе) на сух (на въздух) филм от смес POPC/PPC (1:1); (В) AFM изображение (долу) и профил (горе) на същия филм след хидратация [204].**

Липидният разтвор, приготвен предварително с желаната концентрация, се нанася с микропипета върху повърхността на субстрата за всеки опит в еднакви количества. След изпарение на разтворителя върху останалия сух филм се накапва електролит (0,1 М KCl) и се изчаква хидратирането на слоя. В така образуваната електролитна капка се потапя спомагателния „точков“ платинов електрод. Импедансът се измерва между този електрод и златното покритие с формирания липиден филм.

## 2.2. Методи на изследвания

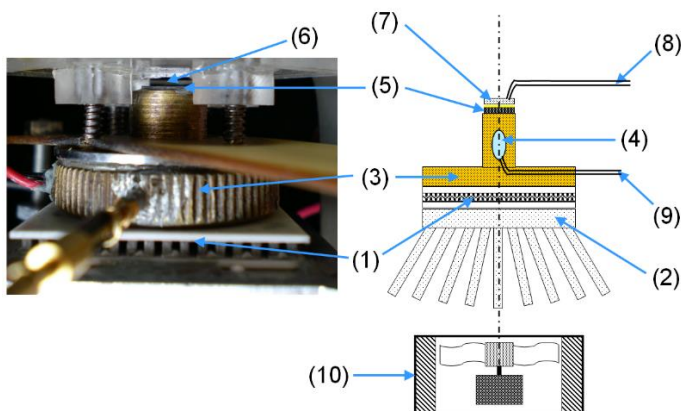
### 2.2.1. Електрохимична импедансна спектроскопия

Разнообразните техники на електроаналитичната химия вече са спечелили репутацията на надеждни инструменти за изследване на биомембранни и липидни моделни системи. Сред тях,

електрохимичната импедансна спектроскопия (EIS) изглежда е един от най-обещаващите по отношение на интерфейса изследвания.

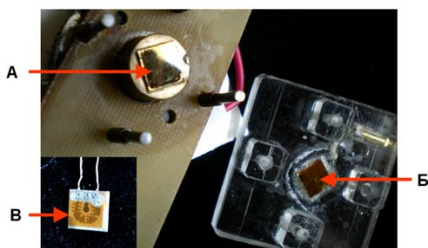
### 2.2.1.1.Измерване на температурата върху повърхността на субстрата. Калибриране на вградения температурен датчик.

Установката за измерване на импеданса на липидните филми (Фиг.6) се състои от два работни електрода – горен и долен (силициеви подложки с изпарено златно покритие, Фиг.6), топлопроводна месингова поставка с вграден терморезистор и Пелтие елемент с радиатор (обдухван от вентилатор). Поддържането на температурата в долния електрод става с промяна на тока през Пелтие елемента



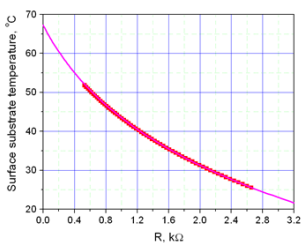
**Фиг.6.** Общ изглед и схема на установката за термостатиране и измерване на импеданса: (1) – Пелтие елемент с радиатор (2); (3) – топлопроводна месингова поставка с вграден терморезистор (4); (5) – долен работен електрод (силициева подложка с изпарено златно покритие); (6) – горен работен електрод;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





**Фиг.7. Снимка отблизо на работните електроди – долен (А) и горен (Б) и ситаловата подложка (В).**

Вграденият в месинговата поставка терморезистор очевидно не може да отчита истинската температура на депозираните върху долния златен електрод филми поради съществуването на температурен градиент между тях и Пелтие елемента. Ето защо бе направено калибриране, позволяващо измерването на температурата *in situ* върху златното покритие. Калибрирането бе проведено с помощта на ситалова подложка с фотолитографски нанесена платинова нишка, служеща за термосъпротивление. Подложката се поставя върху долния работен електрод като контакта се осъществява с вода (Фиг.7). Температурата се променя с помощта на Пелтие елемента. Получените данни са показани на Фиг.8.

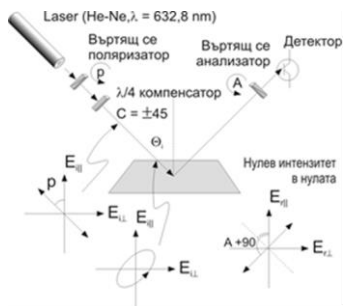


**Фиг.8. Крива на калибриране показваща температурата на повърхността на образеца в зависимост от съпротивлението на вградения терморезистор. Със символи са отбелязани експериментално измерените данни, а непрекъснатата линия е напасването им по метода на най-малките квадрати**

### 2.3. Елипсометрия – работна установка

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

Елипсометрията може да определи оптични константи, дебелини на слоя и много физически величини, които влияят на оптичните константи. Елипсометрията обикновено се използва за характеризиране както на тънки филми, така и на насипни материали. Най-честото приложение е измерване на дебелина на тънък слой и оптични константи. За много проби елипсометрията е чувствителна към дебелината на филма на подмонопластово ниво. Доказано е също, че това е основната техника за определяне на оптични константи в UV, видимата и инфрачервената област на дължината на вълната. Елипсометрията е много гъвкава и чувствителна към много микроструктурни свойства на материала.

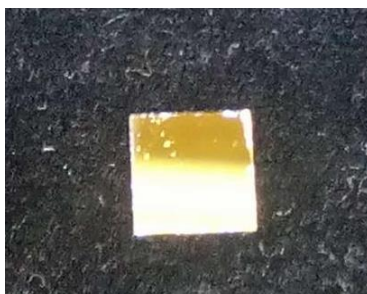


(a)



(b)

**Фиг. 9. (a) Схема на нулев елипсомер, работещ по схема поляризатор – анализатор – компенсатор (PACS); (b) The J. A. Woollam Co., Inc. M-2000<sup>□</sup> спектроскопичен елипсомер**



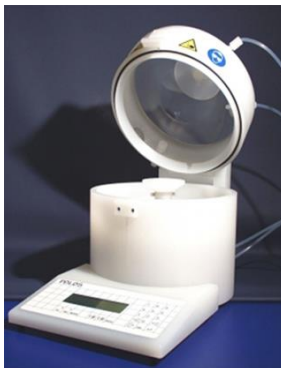
**Фиг. 10 Златна повърхност**

На фигура 10 сме показали подложката, която използваме за измерванията. Златна повърхност с дебелина на златното покритие на подложката е около  $d = 200 \text{ nm}$ .

#### **2.4. Метода spin - coating.**

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

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



***Фиг. 11. ANFF QLD имат APT-POLOS spin-coater, което заема различни геометрии от 2 инча, 8 инча или микроскопски слайдове. Системата разполага с автоматична система за подаване на разтворител и вакуум за по-безопасни операции и е изработена от PTFE части за по-голяма универсалност с различни системи разтворители.***

За нанасяне на липидните филми върху повърхността на субстрата се използва техниката spin - coating. Течен материал с различна концентрация на PC, холестерол и SM се изпуска директно върху повърхност (златна, мета – повърхност) [206-208].

Разтворът се разпределя по повърхността и веднага след като разтворът е омокрял подложката, пробата се ускорява с въртене. Обикновено въртенето се извършва на две стъпки. Докато първото по-бавно въртене позволява решението да покрива повърхността хомогенно, втората стъпка налага бързо изсъхване и

подхвърляне на резервния разтвор. За разтвори с хлороформ е доказано, че е полезно да прескочите първата стъпка и да започне въртенето с крайната честота от 3000 rpm веднага след като разтворът е пипетиран върху повърхността. След бързо изпаряване на разтворителя, добре дефиниран брой бислоеве се образуват на повърхността на субстрата.

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

След процедурата на spin – coating се измерват чрез елипсометрия от 45  $^{\circ}$  - 75  $^{\circ}$  през 2 $^{\circ}$ .

## **2.5. Атомно-силова микроскопия**

С атомно-силова микроскопия се изследваше взаимодействието на липидни моделни системи - разтвор на лецитин с холестерол. Максималната площ на сканиране е 30 x 30  $\mu$ m. Разделителната способност в този случай е 0,45 nm (“x” и “y” направление) и 0.078 nm (“z” направление)..

### III. Резултати и обсъждания

#### Глава 3 Резултати и обсъждане

При изследване на взаимодействието на липидни моделни системи с холестерол и еруфозин върху златна повърхност

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

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

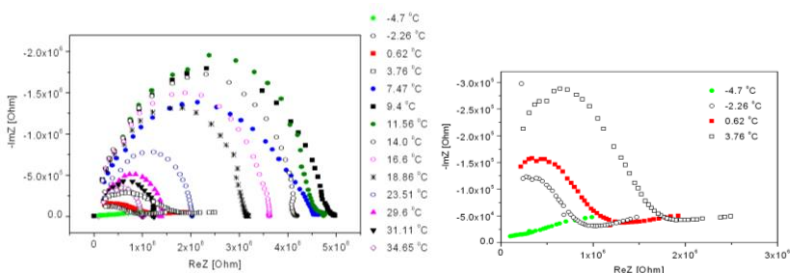
съществуват някои ограничения при използването на дадените методи, произтичащи от характера на процеса. Те трябва да не повлияват процеса на взаимодействие и едновременно с това да са достатъчно бързи. Като такива методи се използваха: елипсометрията, електрохимичните методи: импедансна спектроскопия и атомно силовата микроскопия.

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

Както казахме, една от целите на дисертационната работа е да се проследят измененията които настъпват в липидните филми, с промяна на температурата им. Това е постигнато с използването на лецитинови филми, разположени между двата еднакви работни електрода показани на Фиг.7. Разстоянието между електродите е постоянно, фиксирано с помощта на тefлонов спейсър с дебелина 30  $\mu\text{m}$ , в средата на, който има отворстие с диаметър 4 mm. Течният лецитин (без разтворител) се нанася в отворстието и електродите се притискат един към друг. В този параграф измерванията на

импеданса са проведени с автобалансиращия мост Wayne Kerr 6425 в спектрален диапазон 20Hz – 200kHz. Избран е формат на представяне на импеданса като успоредно свързани съпротивление  $R_p(f)$  и кондензатор  $C_p(f)$  зависещи от честотата. От получените данни за  $R_p(f)$  и  $C_p(f)$ , за всяка честота се пресмятат реалната  $ReZ$  и имагинерната  $ImZ$  част на импеданса по формулите:

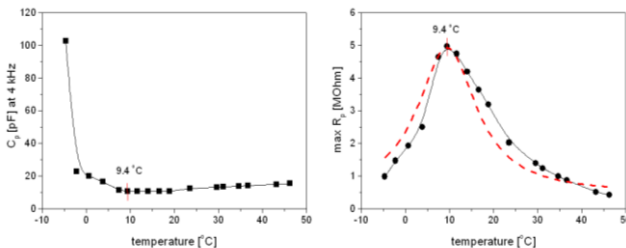
От представените на Фиг.12 резултати (във вид на Найкуист диаграми) се вижда, че импеданското поведение на филмите от чист лецитин с промяна на температурата е сложно. Докато за по-високите температури (приблизително от 7°C нагоре) то има характерния вид на част от полуокръжност (описваща се с ARC елемента), то за ниските температури Найкуист диаграмите (Фиг.45, вдясно) са доста по-различни. Тук няма да се впускаме в задълбочена дискусия относно вида на кривите, а само ще отбележим, че „изправената“ линия (в зелено), наблюдаваща се при най-ниските в нашия случай температури (-4.7°C), отговаря на подредено състояние на липидните молекули. Такова състояние е характерно за гел фазата. Този резултат, който интуитивно можеше да се очаква, се съгласува с по-рано получени данни за тънки (от порядъка на ангстръми, Å) течни филми върху подложка [209].



**Фиг.12. Найкуист диаграми за лецитинов слой при различни температури. Вижда се сложното поведение (вдясно) при**

**ниските температури (-4.7 ÷ 3.76 °C), което не може да бъде апроксимирано с еквивалентна схема само от един ARC елемент.**

Имайки предвид трудностите с напасването на данните и намирането на адекватен модел за описание на промените във филмите, в ще се използват на отделни съставки от импеданса. Така, за анализ на изменението на импеданса с температурата, се оказва удачно да се проследят поотделно промените в  $R_p(f)$  и  $C_p(f)$ . Наистина, беше намерено, че и двете величини се влияят от температурата, като съпротивлението в края на честотния диапазон  $\max R_p$  показва ясно изразен максимум при 9.4 °C (Фиг.13). Тъй като и  $C_p$  има макар и слабо изразен минимум за тази температура, логично е да предположим наличие на фазов преход от гел към течно-кристална фаза. В зависимост от дължината и наситеността на веригите си, фосфатидилхолините имат най-различни точки на топене, простиращи се от -20 до +50 °C (табл.1). Трябва да се каже, че поради големия разброс в състава на срещащите се лецитини, в литературата няма данни за твърдо установен интервал на техния фазов преход. Както споменахме по-горе, това зависи от източника и условията за извличането им. Ето защо, така получената стойност звучи напълно правдоподобно.



**Фиг.13. Зависимост на електричните параметри на лецитинов слой от температурата. Като индикаторни величини са избрани капацитета  $C_p$  при 4 kHz (■, ляво) и**



максималното съпротивление  $R_p$  (●, дясно). И на двете графики се забелязва екстремум при 9.4 °C. Непрекъснатите криви са бета-сплайн, прекаран за удобство, а пунктираната червена линия е апроксимация с логаритмична функция

#### Phase Transition Temperatures for Phospholipids in Water

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

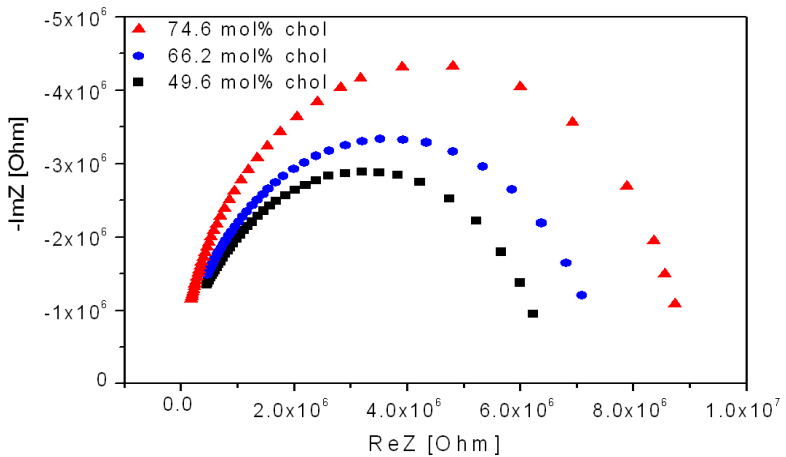
**Таблица 1. Температура на преход за някои от по-разпространените липиди [210].**

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

### 3.2. Импедансно изследване на лецитинови филми, съдържащи холестерол.

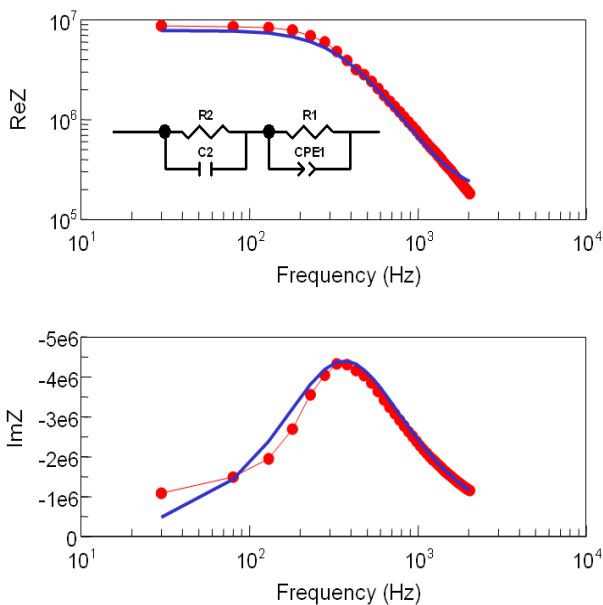
В съответствие със задачите на дисертацията, в настоящия параграф са разгледани резултатите от импедансното изследване на липидни филми съставени от лецитин и холестерол в различно тегловно (wt/wt) съотношение – 1/0.5, 1/1 и 1/1.5. Като се вземат предвид молекулните тегла на веществата, се получават съответните моларни съдържания на холестерол – 49.6, 66.2 и 74.6 mol%

респективно. Те са подбрани така, че първото от тях съответства на едно нормално (до високо) съдържание в плазмалемата, второто отговаря на границите за разтворимост на холестерола в мембранните фосфатидилхолини (PC), а третото е свръхвисоко, аномално.



**Фиг.14. Найкуист диаграми на липидни филми с различно съдържание на холестерол. Измерванията са направени с програмата PhysLab в диапазона 130 Hz – 2 kHz (честотата нараства от дясно наляво!).**

На Фиг.14 са показани данните получени за трите вида филми. В съзвучие с концепцията за уплътняващия ефект на холестерола (вж. по-горе *condensing effect*), максималният импеданс нараства съвсем отчетливо с увеличаване на концентрацията на холестерола в сместа. Еквивалентният електричен модел на импеданса се състои от ARC елемент и независещ от честотата R,C кръг.



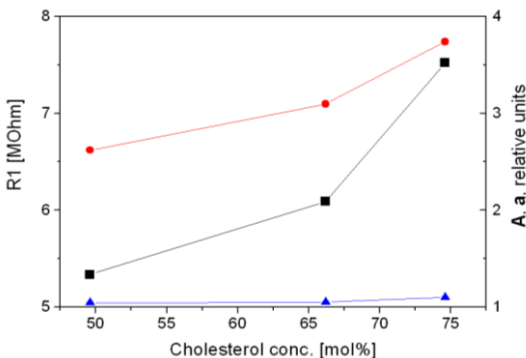
**Фиг. 15.** Диаграми на Бодe за липиден филм с 74.6 mol% съдържание на холестерол. Точките отговарят на експерименталните данни, а непрекъснатата синя линия на апроксимацията с посочения модел.

**Таблица 2**

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

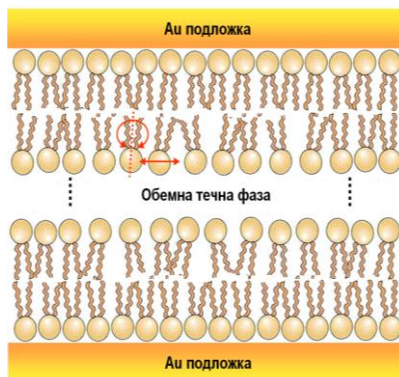
Резултатите от напасването с посочения на фигурата модел са дадени като диаграми на Фиг.15 и в цифров вид в Таблица 2. Видно е, че параметрите на кръга **R2** и **C2** не се менят силно (**C2** дори е фиксиран за удобство), докато параметрите на ARC елемента

**R1** и **A** съществено зависят от холестеролната концентрация (Фиг.16). Другият ARC параметър **a**, също не нараства много, а се колебае около единица което както знаем означава, че CPE клони към кондензатор.



**Фиг.16. Зависимост на параметрите на еквивалентния модел от съдържанието на холестерол.**

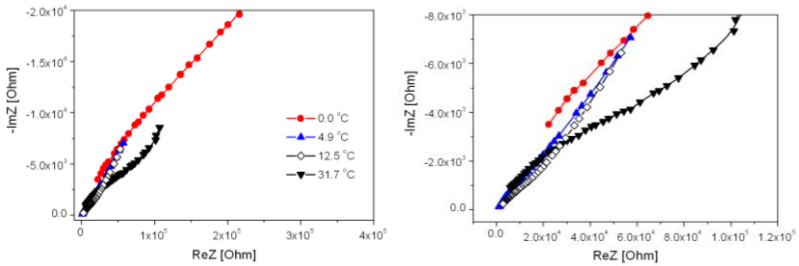
За съжаление обаче, не бихме могли да изберем по-простия модел, съставен от два обикновени R,C кръга защото в този случай процедурата на апроксимация силно се затруднява. Независимо от това е ясно, че изследваните филми са съставени от две подобласти, зависещи по различен начин от холестеролното съдържание. На базата на по-ранни изследвания, ние вече имаме изградени някакви представи за тях [211]. Едната област (или по-точно двете върху двата електрода) представлява първият мономолекулен слой адсорбиран към металната повърхност, плюс евентуално още няколко прилежащи слоя, ориентирани съобразно първия. Подредеността в тези слоеве силно намалява от плътно опаковани молекули в контакт с метала, до напълно хаотично разположени при прехода към обемната течна фаза, която всъщност може да се счита за втората характерна област на филма (Фиг.17).



**Фиг.17. Схематично представяне на подреждането на липидните молекули в близост до електродите.**

Очевидно, подвижността (ротационна и латерална дифузия) на молекулите в слоя прилепен до подложката е затруднена поради силните адхезионни взаимодействия с твърдата фаза. Характерно за тази зона с намалена мобилност е, че нейният импеданс в Найкуист формат представлява леко огъната линия, преминаваща в полуокръжност за обемната фаза [209,211]. Това поведение се потвърждава и от резултатите показани на Фиг.12 (вдясно), откъдето се вижда, че с нарастване на температурата (увеличаване на подвижността) видът на диаграмите се променя от права (зелената линия) към полуокръжност. Ефектът на повишаване на холестеролната концентрация е подобен, но за съжаление това не се забелязва на Фиг.47 поради не дотам ниските честоти (130 Hz), от които започват измерванията.

Като още едно доказателство за направените дотук разсъждения могат да служат данните за импеданса на холестерол съдържащите филми при различни температури (Фиг.18).



**Фиг.18. Найкуист диаграми за липиден филм с 66.2 mol% съдържание на холестерол, получени при различни температури. Вдясно е показано увеличение за високите честоти от което по-добре се вижда типичната форма на кривите, която е характерна за всички температури от 0 до 40°C.**

От представените на Фиг.18 резултати е явно, че в широк диапазон на температурата, поради уплътняващия ефект на холестерола, видът на Найкуист графиките е подобен на този за ниски температури на чисти лецитинови филми. Това показва, че при тези условия филмите се намират в твърда гел фаза. Температурата на преход към течно-кристално състояние е над 50 °C, тъй като холестеролът подрежда ацилните вериги в изпънато „транс“ положение и затруднява ротамеризацията и конформационното топене. Независимо от това се наблюдава, как с покачване на температурата кривите все по-отчетливо придобиват специфичната огъната форма, която е прекурсор на полуокръжност и права (Фиг.12, вдясно).

След направените дотук разглеждания, се надяваме, че получените резултати ще хвърлят допълнителна светлина върху изключително важния въпрос за стратификацията на дискутираните филми. Въпреки, че тяхната организация в субслоеве с характерна подредба на молекулите не буди съмнение и е потвърдена и с други методи [212], съвсем сигурно е, че са необходими допълнителни

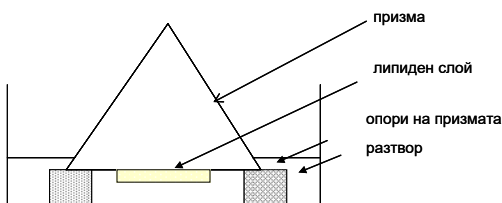
задълбочени изследвания за уточняване на финната структура на филмите и на механизмите които я пораждат.

### 3.3. Елипсометрично изследване на взаимодействието на лецитин и холестерол

Промените в поляризацията, измерени чрез елипсометрия, са изключително чувствителни към дебелината на филма (до нивото на монослоя), оптичните константи и микроструктурата на филма (като грапавост на повърхността, индексирание и смесване). Тази чувствителност на монослоя е полезна за изследване в реално време на слоево-слоино отлагане на филми, включително биологични монослоеве върху различни субстрати [15].

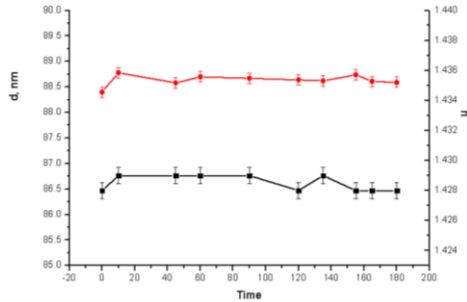
За изследване динамичните промени на липиден филм (лецитинов) чрез елипсометрия се използва 4 - слоен модел (Фиг. 19). Липидният слой адсорбира върху златната повърхност.

След измерване на дебелината и коефициента на пречупване на сухия липиден филм в клетката се вкарва 5 мл. (0.1 М) КСl (Фиг 19). Изследва се кинетиката на образуване на липидния слой. Получените резултати за  $n$  и  $d$  на липидния филм са



**Фиг. 19. Опитна постановка на елипсометричния експеримент**

представени на Фиг. 20. Вижда се, че след първоначалното „набъбване” филмът не се променя с времето. Пресметнато е средно квадратичното на отклонението на истинската стойност от измерената:  $\delta d = 0,011$ ,  $\delta n = 2 \cdot 10^{-3}$



**Фиг. 20** Получени резултати за кинетиката на образуване на липидния филм

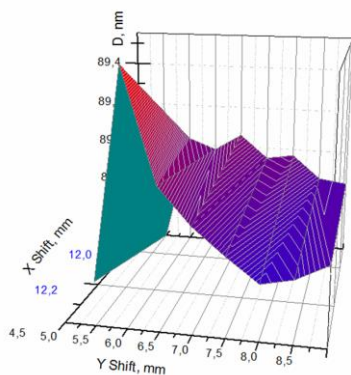
Извън съмнение е изключителното значение на биомембраните не само за клетъчната морфология, но и за множество важни, клетъчни процеси като сливане и делене, транспорт на вещества, участие в метаболизма, информационни процеси и т.н. Всички тези дейности се осъществяват благодарение на асоциираните с мембраната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

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



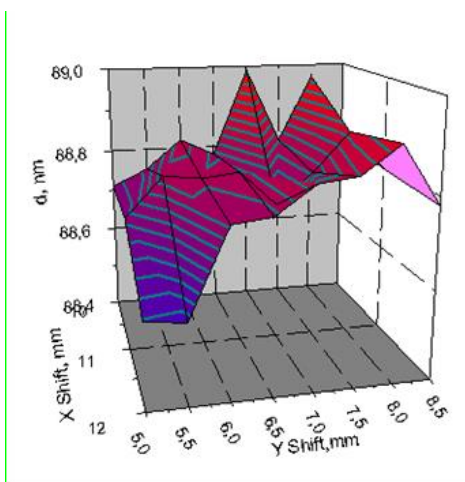
вграждане в мембраната, а следователно и за тяхното нормално функциониране.

Тънките течни филми представляват много полезен модел за изучаване на специфичните молекулни взаимодействия в непосредствена близост до междуфазовите повърхности [13]. Те обединяват положителните характеристики на BLM (Bilayer Lipid Membrane) и LB-филмите (Lengmuir - Bolget) и се явяват един добър компромис за изискванията при изграждането на биомембранните аналози – простота на получаването, стабилност и латерална подвижност на молекулите. Нехомогенността в профила на филма и развитието ѝ в процеса на изтъняване са изследвани елипсометрично [18] за случая на кварцова подложка. Представените експериментални резултати представляват зависимостите на показателя на пречупване и дебелината от разстоянието по дължината на диаметъра на филма. Те показват, че след приключил процес на изтъняване дебелината е почти еднаква навсякъде. В същото време, показателят на пречупване не се мени съществено, както по дължина на профила, така и с времето. Той е близък до 1.44, стойност получена и от други автори за липидни филми [13, 14]. Елипсометрията се явява сигурен и удобен метод за изучаване на повърхнинната динамика на биологични системи. Това е главното му преимущество, т.к. биологичните системи рядко са в покой – живата система по дефиниция е в движение и се основава на химични реакции, транспорт, синтез и деградация. Важно е също специфичността на взаимодействията между макромолекулите и техните функционални повърхнини. Следователно, ключов момент е контролът на отлагането и имобилизацията на биомолекулите.



**Фиг. 21** Взаимодействие на холестерол 20% с липид (лецитин – 80 мг/мл)

Тънкият филм получен от разтвор на 8 мг/мл лецитин и 20% холестерол се отлага по схемата на Фиг. 21.. Елипсомеричните измервания започват след изчакване на 2 два часа за „набъбването“ на слоя.

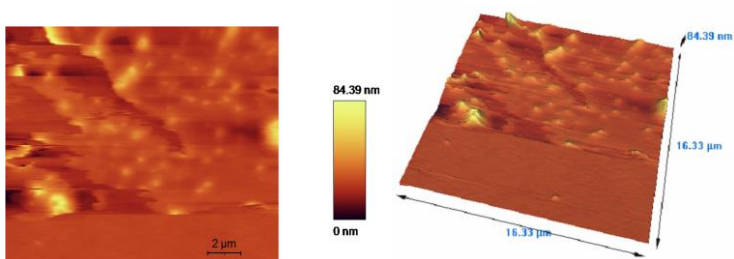


**Фиг. 22** Взаимодействие на холестерол 20% с липид (лецитин – 8 мг/мл)

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

Стойностите на елипсометричните ъгли  $\Psi$  и  $\Delta$  са получени чрез използване на специализираната програма ELLI3M. За графичното представяне е използван OriginPro8.

Получените резултати за две концентрации на липида са представени на Фиг. 21 и Фиг. 22. Резултатите показват топологията на моделния филм. Началната стойност на образувания филм (липид/холестерол) съвпада с получените резултати за образуването на липидния филм, т.е. дебелината на филма в началното е 88,4 nm. Ясно се очертават холестеролните молекули над липидния слой.



**Фиг. 23. AFM изследване на липиден филм (lecithin - 80 mg/ml) и 20% mol холестерол.**

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

Взаимодействието на холестерола с липидната мембрана е от голямо значение за разбиране на причините за обществено важните неврологични заболявания като Алцхаймер и Паркинсон. Поради

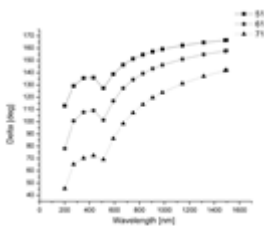
това работа разглежда адсорбционните свойства на моделните липидни мембрани с биологично важни молекули – холестерол.

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

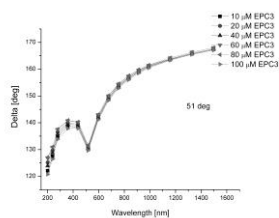
Топологията на адсорбционните повърхнини на холестерол и липид са получени чрез нулева елипсометрия. Ярко се очертават холестеролните образувания в липидния слой. Наблюдава се зависимост между концентрацията на липид и големината на нарастване на холестерол/липидния филм.

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

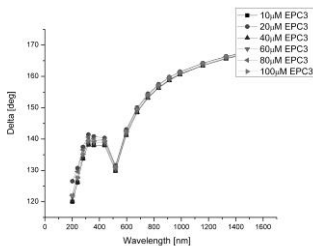
В тази работа фокусът е върху влиянието на антигуморен агент еруфозин и промени, които създава в липидните бислоеве. Получените резултати са представени в липиди - лецитин и свингомиелин и 60 %, 30 % и 10% съотношения на холестерола при различни концентрации на ЕгРС3 (10- 100 $\mu$ М) (Фиг. 24).



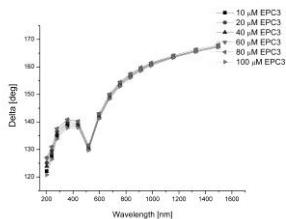
(a)



(b)



(c)



(d)

**Фиг. 24** *Спектрална характеристика на елипсометричните параметри за елипсометрични ъгли  $\Psi$  и  $\Delta$  и техните промени при различни условия: (a) показан е 60% холестерол + PC + SM в различни ъгли; (b) 10% холестерол + PC + SM + ErPC3 в различни концентрации само за един ъгъл  $51^\circ$ . (c) 30% холестерол + PC + SM + ErPC3 в различни концентрации само за един ъгъл  $51^\circ$ ; (d) 60% холестерол + PC + SM + ErPC3 в различни концентрации само за един ъгъл  $51^\circ$ .*

Експерименталните данни на спектралната елипсометрия показват реорганизация на липидния слой. Дебелината на слоя се увеличава с увеличаване процентното съдържание на холестерола. Добавянето на антитуморно средство в системата води до растеж на слоя до  $60 \mu\text{M}$  еруфозин.

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

Получените данни показват, че повишаване концентрация на еруфозин в системата, нараства и елипсометричният ъгъл  $\Delta$ , а следователно и дебелината на слоя.

<b><u>Златна подложка</u></b>	Експериментално определяне на дебелината на липидните слоеве без EUR (634 nm), nm	Експериментално определяне на дебелината на липидните слоеве с EUR (634 nm), nm
60% Chol + Lec +SM +10mM EUR	78,478 ±0,354	82,005 ±0,531
30% Chol + Lec +SM +10mM EUR	77,117 ±0, 248	79,267 ±0,781
10% Chol + Lec +SM +10mM EUR	76,220 ±0,173	78,496 ±0,722

***Таблица 3 : Образуваните липидни слоеве и влиянието на еруфозина***

Елипсометрията е удобен и бърз метод за изследване на свойствата и взаимодействията на биологичните моделни системи.

\* \* \*

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

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

#### IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

Импедансно изследване на лецитинови филми, съдържащи холестерол в съответните моларни съдържания на холестерол – 49.6, 66.2 и 74.6 mol% респективно потвърждава уплътняващата роля на холестерола. Максималният импеданс нараства съвсем отчетливо с увеличаване на концентрацията на холестерола в сместа.

Предложен е модел - подвижността (ротационна и латерална дифузия) на молекулите в слоя прилепен до подложката е затруднена поради силните адхезионни взаимодействия с твърдата фаза. Потвърждение на хипотезата са получените резултати за импеданса на холестерол-съдържащите филми при различни температури.

В дисертационната работа чрез елипсометрия се определя дебелината и коефициента на пречупване на сухия и омокрен липиден филм. Направена е топология на липид/холестеролни филми. Ясно се очертават холестеролните молекули над липидния слой. Резултати са в съответствие с получените от атомно-силова микроскопия.

Чрез спектрална елипсометрия е изяснено влиянието на антитуморния агент - еруфозин върху липидна моделна система. Дебелината на слоя се увеличава с процента на холестерола.

Добавянето на антитуморния агент в системата води до растеж на слоя до 60  $\mu$ М еруфозин.

## V. ИЗВОДИ

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

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

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

3. Изследванията от спектралната елипсометрия показват, че слоя - холестерол/сфингомиелин/фосфотидилхолин и еруфозин нараства с увеличаване концентрацията на холестерола.

4. Чрез импедансните изследвания е наблюдаван фазов преход от гел към течно-кристална фаза при 9,4 °С за лецитин.

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



6. Импедансните изследвания на холестерол - съдържащите филми при различни температури потвърждават предложената хипотеза. В широк диапазон на температурата, поради уплътняващия ефект на холестерола, видът на Найкуист графиките е подобен на този за ниски температури на чисти лецитинови филми.

## VI. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

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

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

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

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

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

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

## **VII. Списък на публикациите, включени в дисертацията:**

### **A) Статии в реферирани научни списания:**

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

### **B) Списък на забелязаните цитирания**

1. M. Tanovska, L. Vladimirova – Mihaleva, K. Bachev, V. Kochev “Electrochemical impedance investigation of cholesterol enriched supported films of lipids”, *Bulg. Chem. Commun.* 47(4) 2016, 30-33. (IF: 0,238)

- Khusnul Ain ; R. Arif Wibowo ; Soegianto Soelistono ; Lailatul Muniroh, “Measurement of Cholesterol Concentration Based on Bioimpedance with AD5933-EVAL”, (2017) “5th International Conference on Instrumentation, Communications, Information Technology, and Biomedical Engineering (ICICI-BME)”, Publisher: IEEE, INSPEC Accession Number: 18296864, DOI: 10.1109/ICICI-BME.2017.8537752;

### **B) Доклади на научни конференции:**

1. **10th International Symposium on Electrochemical Impedance Analysis (EIA)** (Borovetz, Bulgaria, 2014): “Electrochemical impedance investigation of cholesterol enriched supported films of lipids”, M. Tanovska, L. Vladimirova – Mihaleva, K. Bachev, V. Kochev

2. **19<sup>th</sup> International Scientific Conference of Young Scientists and Specialists of JINR AYSS-015 Dedicated to the 100<sup>th</sup> Anniversary of the birth of F.L.Shapiro** (Dubna, Russia, 2015): „Influence of gamma radiation on the homeostasis of iron", L. Vladimirova–Mihaleva, M. Tanovska, At. Papucharov.

3. **5<sup>th</sup> Regional Symposium on Electrochemistry – South East Europe (5<sup>th</sup>RSE- SEE)** (June 7-11, 2015, Pravets, Bulgaria): "An impedance study of the influence of anti-cancer agent Erufosine on breast cancer cells", L. Vladimirova- Mihaleva, M. V.Tanovska, P.Tsonev, S. Apostolova, V. Uzunova and R. Tzoneva.

4. **Photonica 2015** (August 2015, Belgrade, Serbia): "Ellipsometric and AFM Study of Adsorption Properties of Model Lipid Membranes with Biological Molecules", M. V. Tanovska, L.S.Vladimirova -Mihaleva, A. Andreeva, N, Zografov and M. Mihalev.

5. *Pavlin Tsonev, Maya Tanovska, Ulia Vinogradova, Lilia Vladimirova-Mihaleva, Evgenii Krasavin, Mihail Ostrovskii*, „**A Study of Functional Activity of the Retina after Irradiation with Visible Light and Ionizing Radiation from <sup>60</sup>Co**“, Научна сесия „Биомедицина и качество на живот – младите в науката“, България/София 2017

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

7. *Maya Tanovska, Marika Nihori, Mohsen Rahmani, Lilia Vladimirova - Mihaleva, Dragomir Neshev*, „**Ellipsometric Detection of Ferritin Adsorption on Gold after UV Irradiation**“, ВПУ10, България/София 2018

8. *Maya Tanovska, Mohsen Rahmani, Lilia Vladimirova - Mihaleva, Martin R Berger, Dragomir Neshev, Albena Momchilova, Rumiana Tzoneva.*, „**An Ellipsometric Study of Interaction of Anti-cancer Agent Erufosine on Lipid Model Systems**“, ВПУ10, България/София 2018

#### Г) Статии извън дисертацията:

1. Pavlin Tsonev, Maya Tanovska, Uliya Vinogradova, Lilia Vladimirova-Mihaleva, Evgenii Krasavin, Mihail Ostrovskii, **"A Study of Functional Activity of the Retina after Irradiation with Visible Light and Ionizing Radiation from  $^{60}\text{Co}$ "**, accepted.
2. Maya Tanovska, Marika Niihori, Mohsen Rahmani, Lilia Vladimirova - Mihaleva, Dragomir Neshev, **"Ellipsometric Detection of Ferritin Adsorption on Gold after UV Irradiation"**, accepted.
3. Asen Dimov, Ivan Tsanev, Maya Tanovska, Dimitar Penev, **"Assessment of radiation exposure to population of Bulgaria in 2016 due to diagnostic and interventional radiology and nuclear medicine"**, Radiation protection journal, June 2018/Issue 7.

#### Д) Участия в проекти :

1. Участие в проект от плана за сътрудничество на Р България с ОИЯИ, Дубна, Русия за 2016 год. на тема: „Влияние на радиационното въздействие върху мембранни белтъци“
2. Участие в проект NANOPHI : “Изследване на моделни мембранни системи”

## VIII БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам своите искрени благодарности на ръководителите ми от катедра „Атомна физика“ доц. д-р Борислав Павлов и гл. ас. д-р Лилия Владимирова – Михалева за доверието към мен, за помощта, за ценните съвети и подкрепата по време на моята творческа работа по дисертацията.

Благодаря за съдействието и помощта на гл. ас. д-р Андреана Андреева за изследванията проведени с AFM.

Благодаря на проф. Румяна Цонева от „Института по биофизика и биомедицинско инженерство – БАН“ и на проф. Мартин Бергер от “German Cancer Research Center, Heidelberg” за осигуряването на анти – туморния агент – еруфозин.

Трайни следи в моето съзнание е оставил човекът накарал ме да повярвам в себе си и да стигна до тук гл. ас. д-р Валери Кочев, който не е сред нас, но ще остане завинаги в сърцето ми.

И не на последно място искам да благодаря на семейството и приятели си, които и за миг не ми обърнаха гръб, а бяха с мен и до мен неотлъчно.