

РЕЗЮМЕТА НА РЕЦЕНЗИРАНИТЕ НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ на гл. ас. д-р Ася Свиленова Цанова

представени за участие в конкурс за заемане на академичната длъжност „доцент“ по професионално направление 4.3. Биологически науки (Биохимия), обявен в ДВ, бр. 63 от 30.07.2021 г. (корекция в ДВ бр. 65 от 06.08.2021 г.).

I. Публикации в реферирани списания извън дисертационен труд за придобиване на ОНС “доктор”

1. A. Jordanova, H. Petkova, V. Stoyanova, A. Tsanova, E. Stoimenova, R. Todorov, E. Hristova, Z. Lalchev. Adsorption mono- and bilayers from gastric aspirates of newborns. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, 73(9), pp. 1306-1313, 2020. DOI: 10.7546/CRABS.2020.09.16

Резюме

Неонаталният респираторен дистрес синдром (НРДС) засяга около 10% от новородените и е водеща причина за смъртността при преждевременно родени деца. НРДС се развива в резултат на първичен дефицит и/или вторично инактивиране на алвеоларния сърфактант (АС). АС е липопротеинова смес, която е от съществено значение за понижаване на повърхностното напрежение на алвеолите. По този начин недоносените деца, родени с незрели бели дробове и недостатъчен АС, развиват НРДС след раждането. Следователно ранната диагностика на белодробната зрялост е от решаващо значение за навременната клинична терапия.

Досега белодробната зрялост на новородените е определяна чрез биохимични и биофизични анализи на околоплодна течност от майките или на трахеални аспирати от новородените. Събирането на тези проби се извършва чрез инвазивни, травмиращи и болезнени процедури. Ранната диагностика на респираторна дисфункция при рискови новородени изисква създаването на нови високоспецифични, бързи и информативни методи.

Целта на настоящето изследване е да се оцени зрелостта на белодробния сърфактант при рисковите новородени чрез методите на тънките течни филми и Брюстър-ъгловата микроскопия (БАМ). За тази цел са изследвани гастрални аспирати (ГА) от: (1) преждевременно родени деца с първичен сърфактант дефицит в резултат на НРДС (на възраст 26-32 гестационна седмица); (2) контролна група от здрави доносени бебета; и (3) рискови новородени, родени след *in vitro* оплождане и кортикостероидна терапия (КСТ) на майките.

Нашите предварителни резултати показват, че вероятността за образуване на черен пенен филм от клинични проби, както и морфологията на монослоевите от ГА, наблюдавана чрез БАМ, се различават между преждевременно родени деца с НРДС, рискови новородени след КСТ и здрави доносени деца.

Abstract

Neonatal respiratory distress syndrome (NRDS) affects about 10% of newborn infants and is the leading cause of death in babies who were born prematurely. NRDS develops as a result of primary deficiency and/or secondary inactivation of alveolar surfactant (AS). AS is a lipoprotein mixture, which is essential in lowering the alveolar surface tension. Thus, preterm infants who were born with immature lungs and insufficient AS develop NRDS after delivery. Therefore, the early diagnostics of lung maturity is crucial for the prompt clinical therapy.

For the time being lung maturity of newborns is determined by biochemical and biophysical analyses of amniotic fluid from mothers or of tracheal aspirates from newborns. The collection of these samples is performed by invasive, traumatic, and painful procedures. However, early diagnosis of respiratory dysfunction in risk newborns requires the establishment of new highly specific, fast and informative methods.

The aim of this study was to assess lung surfactant maturity of risk newborns by methods of thin liquid films and Brewster angle microscopy (BAM). For this purpose gastric aspirates (GA) from: (1) prematurely born babies with primary surfactant deficiency as a result of NRDS (aged 26-32 weeks of gestation); (2) a control group of healthy full-term infants; and (3) risk infants born after *in vitro* fertilization and corticosteroid therapy (CST) of the mothers, were taken.

Our preliminary results showed that the probability of black foam film of clinical samples formation, as well as the BAM morphology of GA monolayers, differed between prematurely born children with NRDS, risk neonates after CST, and healthy full-term infants.

2. V. Stoyanova, A. Tsanova, A. Jordanova, N. Jekova, D. Stoichkova, K. Ivanova, E. Hristova, Detection of specific surfactant proteins in gastric aspirates from prematurely born children after corticosteroid therapy. *Journal of IMAB*, 26(4), pp. 3458-3462, 2020. DOI: [10.5272/jimab.2020264.3458](https://doi.org/10.5272/jimab.2020264.3458)

Резюме

Цел: Компонентите на алвеоларния сърфактант (АС), включително специфичните сърфактантни протеини (SPs) SP-A, SP-B, SP-C и SP-D, осигуряват стабилност по време на динамичния процес на вдишване/издишване. При недоносени деца могат да се наблюдават различни респираторни патологии поради недостиг на компоненти на сърфактанта, като Неонатален респираторен дистрес синдром. Прилагането на кортикостероиди при бременни жени с риск от преждевременно раждане е утвърдена интервенция в клиничната практика. В настоящето изследване са анализирани гастрални аспирати (ГА), като алтернативни проби на трахеалните аспирати и околоплодните течности за определяне на зрелостта на АС. Взети са проби от недоносени новородени след антенатална кортикостероидна терапия (КСТ) на бременни жени, които са анализирани за наличието на специфични сърфактантни протеини.

Материали и методи: Клиничните проби гастрални аспирати са събрани през първите минути след раждането с помощта на назогастрална сонда и са анализирани чрез полиакриламидна гелелектрофореза с натриев додецил сулфат (SDS-PAGE) и Western blot за детекция на SP-A, SP-B и SP-C.

Резултати: Получените резултати показват експресия на различни изоформи на отделните специфични сърфактантни протеини (SP) във всички проби ГА, в зависимост от етапа на узряване.

Заключения: Получените резултати показват, че КСТ играе роля в производството и узряването на компонентите на АС. Освен това ГА може да се счита за подходяща проба за оценка на зрелостта на сърфактанта при раждането.

Abstract

Purpose: Alveolar surfactant (AS) components, including the specific surfactant proteins (SPs) SP-A, SP-B, SP-C, and SP-D, provides stability during the dynamic process of inhalation/exhalation. In prematurely born children different respiratory pathologies due to surfactant components deficiency, like Neonatal Respiratory Distress Syndrome, can be observed. Administration of corticosteroids to

pregnant women at risk of preterm birth is an established intervention in clinical practice. In this study, we analyzed gastric aspirates (GAs), as alternative samples of tracheal aspirates and amniotic fluids for AS maturity determination. Samples were taken from prematurely born babies after antenatal corticosteroid therapy (CST) of pregnant women and were analyzed for the presence of specific surfactant proteins.

Materials and Methods: Clinical samples of gastric aspirates were collected in the first minutes after delivery by using of a nasogastric tube and were analyzed by Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot assays for detection of SPA, SP-B, and SP-C.

Results: Our results showed the expression of different isoforms of each specific surfactant protein (SP) in all GA samples, depending on the stage of maturation.

Conclusions: Our results showed that CST plays a role in AS components production and maturation. Moreover, GA can be considered as an adequate sample for assessment of surfactant maturity at birth.

3. **A. Tsanova**, V. Stoyanova, A. Jordanova, I. Grabchev. Study of the mechanism of the antimicrobial activity of novel water soluble ammonium quaternary benzanthrone on model membranes. *J Membrane Biol*, 253, pp. 247-256, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00232-020-00121-6>

Резюме

Нарастващата резистентност на много патогени към голяма част от обичайните антимикробни средства изисква разработването на нови вещества с по-ефективни антимикробни свойства. В настоящата работа е изследван механизмът на антимикробната активност на нов водоразтворим четвъртичен амониев бензантрон (Съединение В) върху моделни мембрани, състоящи се от дипалмитоилфосфатидилхолин, 1-палмитоил-2-олеоилфосфатидилхолин, дипалмитоилфосфатидилглицерол, 1-палмитоил-2-олеоилфосфатидилглицерол и дипалмитоилфосфатидилетаноламин (ДПФЕ). Липидите са избрани така, че да представляват модел на бактериална мембрана. Промените в повърхностното налягане на моделните мембрани, преди и след добавянето на Съединение В, са изследвани чрез монослойния метод на Лангмюр и са определени модулите на компресия за всеки монослой. В допълнение, чрез Брюстър-ъглова микроскопия е наблюдавана повърхностната морфология на липидните монослоеве преди и след инжектиране на Съединение В. Резултатите показват, че Съединение В прониква във всички изследвани монослоеве. Най-забележими ефекти са установени при отрицателно заредените фосфатидилглицероли и ДПФЕ, което води до заключението, че от голямо значение са електростатичните взаимодействия между съединението и липидните глави, и възможното образуване на водородни връзки между аминогрупата на етаноламина и кето-групите в структурата на Съединение В. В допълнение, проникващата способност на бензохинона във всички изследвани фосфолипиди е стабилна дори при по-високи стойности на повърхностното налягане, т.е. по-дебели монослоеве, поради хидрофобните взаимодействия, което също играе важна роля за антимикробната активност на Съединение В.

Abstract

The increasing resistance of many pathogens to most of the common antimicrobials requires the development of new substances with more effective antimicrobial properties. In the present work, we investigated the mechanism of the antimicrobial activity of novel water soluble ammonium quaternary benzanthrone (Compound B) on model membranes, composed of dipalmitoylphosphatidylcholine, 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylglycerol, 1-palmitoyl-2-

oleoylphosphatidylglycerol, and dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE). The lipids were chosen to represent a model of a bacterial membrane. The changes in surface pressure of the model membranes, before and after the addition of Compound B, were studied by the Langmuir's monolayer method, and the compressional modulus for each monolayer was determined. In addition, the surface morphology of the lipid monolayers before and after injection of Compound B was monitored by Brewster Angle Microscopy. The results showed that Compound B penetrated all the monolayers studied. The most noticeable effects were found with the negatively charged phosphatidylglycerols and with DPPE leading to the conclusion that the electrostatic interactions between the compound and the lipid head groups and the possible formation of hydrogen bonds between the amino group of the ethanolamine and the keto groups in the structure of Compound B are of great importance. In addition, the penetration ability of the benzoquinone with all phospholipids studied was stable even at higher values of the surface pressure, i.e. thicker monolayers, due to the hydrophobic interaction, which plays also an important role for the antimicrobial activity of Compound B.

4. **A. Tsanova**, A. Jordanova, V. Stoyanova, E. Tasheva-Terzieva, K. Ivanova, Z. Lalchev. Rapid biophysical analyses of gastric aspirates from risk newborns for lung maturity assessment after corticosteroid therapy. *Heliyon* 5(11), 2019. e03072. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03072>

Резюме

Въведение: Една от основните причини за по-високата смъртност сред рисковите новородени деца (включително недоносените деца) е неонаталния респираторен дистрес синдром (НРДС), който се развива в резултат на първичен дефицит или вторично инактивиране на алвеоларния сурфактант (АС). Следователно бързата и ранна диагностика на белодробна зрялост при рисковите новородени е от решаващо значение за тяхната навременна терапия.

Материали и методи: Гастралните аспирати (ГА) са събрани от 77 бебета, разделени в три групи: контрола от 38 здрави доносени деца; 16 недоносени новородени с НРДС и 23 преждевременно родени след *in vitro* оплождане и кортикостероидна терапия (КСТ). Повърхностни параметри: равновесно (γ_{eq}), максимално (γ_{max}) и минимално (γ_{min}) повърхностно напрежение, както и формата на хистерезисните криви на монослоевите от ГА са измерени чрез осевосиметричен анализ на формата на висяща капка (ADSA). В допълнение, морфологията на монослоевите от ГА е изследвана чрез Брюстър-ъглова микроскопия (БАМ).

Резултати: Получените резултати показват, че само стойностите на γ_{min} са надежден показател и са значително по-ниски при доносени бебета в сравнение с рисковите новородени. Получените резултати са потвърдени и от формата на хистерезисните криви на филмите от ГА. БАМ изображенията на монослоевите от ГА от НРДС-групата показват нарушена повърхностна морфология поради недостатъчност на сурфактант, в сравнение с контролната група. Кортикостероидната терапия подобрява както повърхностните характеристики на ГА, така и морфологията на монослоевите.

Заключения: Анализите на ГА чрез ADSA и БАМ са бързи и информативни подходи за оценка на белодробната зрялост. В допълнение, приложената кортикостероидна терапия подобрява всички повърхностни параметри на ГА поради съзряването на АС.

Abstract

Background: One of the main causes for the higher mortality among risk newborn children (including preterm infants) is neonatal respiratory distress syndrome (NRDS), which develops as a result of

primary deficiency or secondary inactivation of alveolar surfactant (AS). Therefore, fast and early diagnostics of risk newborns lung maturity is crucial for their prompt therapy.

Materials and methods: Gastric aspirates (GA) were collected from 77 infants divided into three groups: a control of 38 healthy full-term infants; 16 prematurely newborns with NRDS, and 23 prematurely born infants after *in vitro* fertilization and corticosteroid therapy (CST). Surface parameters: equilibrium (γ_{eq}), maximal (γ_{max}) and minimal (γ_{min}) surface tension, and the shape of hysteresis curves of GA monolayers were measured by axisymmetric drop shape analysis (ADSA) of a pending drop. In addition, the morphology of GA monolayers was studied by Brewster angle microscopy (BAM).

Results: Our results showed that only γ_{min} values were reliable and were significantly lower in full-term infants, as compared to the risk neonates. The results obtained were proved by the shape of hysteresis curves of GA surface active films. BAM images of GA monolayers from NRDS group showed impaired surface morphology due to the surfactant insufficiency, as compared to the control group. Corticosteroid therapy improved both GA surface characteristics and monolayer morphology.

Conclusions: GAs analyses by ADSA and BAM are fast and informative approaches for lung maturity assessment. In addition, the corticosteroid therapy applied improved all GAs surface parameters due to AS maturation.

5. M. Bangyozova, A. Jordanova, **A. Tsanova**, V. Stoyanova, E. Tasheva, K. Ivanova, R. Todorov, E. Hristova, Z. Lalchev. Application of Axisymmetric Drop Shape Analysis and Brewster Angle Microscopy for Assessment of Clinical Samples from Prematurely Born Infants with NRDS. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 519, pp. 187–191, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.05.062>

Резюме

Осевосиметричният анализ на формата на капка (ADSA) е мощна техника за измерване на повърхностното напрежение на висяща капка, изискваща само 50 микролитра от тестваната клинична проба. В допълнение, Брюстър-ъглова микроскопия (БАМ) е добре установен и полезен метод за визуализация на ултратънки повърхностни филми, като монослое на Лангмуир, на въздушно-водна фазова граница. В настоящото изследване са анализирани повърхностните свойства на гастрални аспирати (ГА) от преждевременно новородени с неонатален респираторен дистрес синдром (НРДС) и здрави доносени деца от гледна точка на намирането на достъпен метод за оценка на сърфактантната зрялост при раждането. Измерването на динамичните повърхностни характеристики на ГА чрез ADSA показва значително по-високи средни стойности на минималното повърхностно напрежение при недоносените деца в сравнение с доносените бебета. Този параметър се оказва най-надеждният за оценка на белодробната зрялост. В допълнение, хистерезисните криви на повърхностното напрежение спрямо повърхностната площ на капката показват по-стабилно повърхностно поведение на алвеоларния сърфактант при здрави деца, в сравнение с новородените с НРДС. Морфологията на монослоеве, съставени от ГА, също показва значителни разлики между пробите от двете изследвани групи. В заключение, методите ADSA и БАМ могат да бъдат използвани в клиничната практика за бърза и адекватна оценка на алвеоларния сърфактант при недоносени новородени по отношение на прилагането на екзогенен сърфактант.

Abstract

Axisymmetric drop shape analysis (ADSA) is a powerful technique for surface tension measurement of a pendant drop, requiring only 50 microliters of the tested clinical sample. In addition, Brewster angle microscopy (BAM) is a well-established and useful method for visualization of ultra-thin surface films, such as Langmuir monolayers, on air-water interface. In the present study we analysed the surface properties of gastric aspirates (GAs) from prematurely born infants with neonatal respiratory distress syndrome (NRDS) and healthy full term infants with regard to find an approachable method for assessment of surfactant maturity at birth. The measurement of dynamic surface characteristics of GA by ADSA showed significantly higher mean values of the minimal surface tension in the premature infants as compared to the full term babies. This parameter proves to be the most reliable parameter for lung maturity assessment. In addition, the hysteresis curves of the surface tension vs. drop surface area indicated more stable surface behavior of alveolar surfactant from healthy children, as compared to the NRDS infants. The morphology of the monolayers composed of GAs also showed considerable differences between the samples from both groups studied. In conclusion, ADSA and BAM methods could be used into the clinical practice for rapid and sensitive surfactant's assessment in premature infants with regard to administration of exogenous surfactant.

6. **A. Tsanova**, A. Jordanova, Z. Lalchev. Effects of Leucin-Enkephalins on Surface Characteristics and Morphology of Model Membranes Composed of Raft-Forming Lipids, *Journal of Membrane Biology*, 249 (3), pp. 229-238, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00232-015-9862-1>

Резюме

През последните десетилетия опиоидните пептиди като енкефалините (Тур-Gly-Gly-Phe-Met/Leu) са обект на обширни проучвания поради тяхното антиноцицептивно действие в организма. Според теорията за мембранната катализа, за да придобият подходяща конформация за свързване с техните рецептори, опиоидните пептиди взаимодействат с липидната фаза, заобикаляща мембранныя рецептор. В тази връзка, целта на настоящата работа е да се изследват ефектите на синтетичните левцин-енкефалин и левцин-енкефалинамид върху повърхностните характеристики и морфологията на липидните монослое, съставени от 1-палмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, сфингомиелин и холестерол самостоятелно, и с техните смеси. Липидите са избрани така, че да представляват модел на мембранен рафт, тъй като е известно, че рецепторите, свързани с G-протеин, включително опиоидните рецептори, са разположени предимно в мембранны рафтове. Посредством монослойния метод на Лангмюир, е изследвана промяната в повърхностното налягане на моделните мембрани преди и след добавянето на синтетичните енкефалини и са определени модулите на компресия на липидните и липидно-пептидните монослое. В допълнение, чрез Брюстър-ъглова микроскопия е наблюдавана повърхностната морфология само на липидните монослое и след инжектирането на двата енкефалина. Получените резултати показват, че и двата левцин-енкефалина влияят върху повърхностните характеристики на липидните монослое и водят до увеличаване на повърхностната плътност на смесените повърхностни липиди/енкефалинови филми при рехав опаковка на липидите. Този ефект е по-изразен при енкефалинамида, което предполага различен механизъм на взаимодействие на амидирания енкефалин с липидната фаза, в сравнение с левцин-енкефалина.

Abstract

During the last decades opioid peptides, like enkephalins (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met/Leu) are subject to extensive studies due to their antinociceptive action in organism. According to the membrane catalysis theory, in order to adopt a proper conformation for binding to their receptors, opioid peptides interact with the lipid phase of the membrane receptor surrounding. With this regard, the aim of the present work was to study the effects of synthetic leucine-enkephalin and leucine-enkephalinamide on surface characteristics and morphology of lipid monolayers, composed of 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, sphingomyelin, and cholesterol alone and with their mixtures. The lipids were chosen to represent a model of a membrane raft, since it is known that G-protein-coupled receptors, including opioid receptors, are located preferably in membrane rafts. By using Langmuir's monolayer method, the change in surface pressure of the model membranes before and after the addition of the synthetic enkephalins was studied, and the compressional moduli of the lipids and lipid-peptides monolayers were determined. In addition, by Brewster angle microscopy, the surface morphology of the lipid monolayers alone and after the injection of both enkephalins was monitored. Our results showed that both leucine-enkephalins affected the lipid monolayers surface characteristics, and led to an increase in surface density of the mixed surface lipids/enkephalins films at loose lipid packing. This effect was more pronounced for the enkephalinamide, suggesting a different mechanism of interaction for the amidated enkephalin with the lipid phase, as compared to leucine enkephalin.

7. Y. Yamakova, R. Petkov, **A. Tsanova**, M. Bangyozova, S. Ilcheva, V. Ilieva, A. Jordanova, Z. Lalchev. Perioperative changes in pulmonary surfactant in patients with lung carcinoma, *Anaesthesiology and Intensive Care*, 43 (4), pp. 22-25, 2014.

Резюме

Цел: Да установим настъпват ли промени в биохимичните и биофизичните свойства на белодробния сърфактант (БС) в невентилирания (оперирания) и вентилирания бял дроб при пациенти с недребноклетъчен карцином (NSCLC).

Материал и методи: В проучването включихме 36 пациента с NSCLC (проучвана група, ПГ) и контролна група (КГ) от 29 пациента без злокачествено заболяване. Оперативната интервенция бе извършена под обща анестезия с разделна интубация. При двете групи направихме бронхоалвеоларен лаваж (БАЛ) с 20 ml 0.9% NaCl: При ПГ – на оперирания (невентилирания) бял дроб след интубацията и преди реинтубацията, и на вентилирания бял дроб след интубацията и в края на анестезията. На КГ – на вентилирания бял дроб след интубацията. Биохимичният анализ включва: количество фосфолипиди и протеини. Биофизичен анализ: равновесно повърхностно напрежение (γ_{eq}) и динамични характеристики на монослоеве (минимално повърхностно напрежение γ_{min} , максимално повърхностно напрежение γ_{max}).

Резултати: При ПГ количеството на БС фосфолипиди беше по-високо от КГ (36.8 vs. 24 mg/ml). Отчетохме по-голямо количество БС протеини (mg/ml) във вторите проби и на двата бели дроба: вентилиран (0.47 vs. 0.34) и невентилиран (0.54 vs. 0.47). Отчетохме влошаване на γ_{eq} при карциномно болните в сравнение с КГ (45.27 vs. 24 mN/m). Не установихме статистически значими разлики в γ_{eq} , γ_{min} и γ_{max} преди и след анестезията, преди и след хипоксията.

Заключение: При пациентите с белодробен карцином настъпват промени в БС. Хипоксията и инхалационната анестезия променят биохимичните и биофизичните свойства на БС.

Abstract

Aim: To identify changes in the biochemical and biophysical behavior of lung surfactant (LS) in the ventilated and nonventilated lung during surgery in patients with nonsmall cells lung cancer (NSCLC).

Material and methods: In prospective study we included 36 patients (SG) with NSCLC and a control group (CG) of 29 patients without cancer. Surgery was performed under general anesthesia and a double lumen tube intubation. In both groups we performed bronchoalveolar lavage (BAL) with 20 ml 0.9% NaCl: SG – from the operated (nonventilated) lung after intubation and before reventilation and from ventilated lung after intubation and at the end of the anesthesia. CG – from ventilated lung after intubation. Biochemical analysis included: the amount of phospholipids and proteins. Biophysical analysis: the equilibrium surface tension (γ_{eq}) and dynamic characteristics of monolayers (minimum surface tension γ_{min} , maximum surface tension γ_{max}).

Results: In SG the amount of LS phospholipids was higher, as compared to the CG (36.8 vs. 24 mg/ml). In addition, we detected an increase in the amount of LS protein (mg/ml) in the second samples of both lungs: ventilated (0.47 vs. 0.34) and nonventilated (0.54 vs. 0.47). We noticed a deterioration of γ_{eq} in cancer patients as compared to the CG (45.27 vs. 24 mN/m). We didn't detect any changes in γ_{eq} , γ_{min} and γ_{max} before and after anesthesia and before and after hypoxia.

Conclusion: Lung cancer patients have changed behaviour of LS. Hypoxia and inhalation anesthesia affects the biochemical and biophysical properties of BS.

8. M. Bangyozova, E. Lontova, **A. Tsanova**, A. Jordanova, E. Stoimenova, Y. Yamakova, R. Petkov, Z. Lalchev. *In vitro* analysis of broncho-alveolar lavage from a patient with pulmonary alveolar proteinosis. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20 (Supplement 1), pp. 18-23, 2014. <https://www.agrojournal.org/20/01s-04.html>

Резюме

Белодробната алвеоларна протеиноза (БАП) е хетерогенно заболяване с генетична или придобита етиология, характеризиращо се с интраалвеоларно натрупване на липопротеинов материал. Клиничният ход на заболяването е променлив, вариращ от спонтанна ремисия до дихателна недостатъчност. Целта на настоящото изследване е да се сравнят биохимичните и биофизичните характеристики на бронхоалвеоларен лаваж (БАЛ) от пациент с БАП по време на цялостен белодробен лаваж (ЦБЛ), събиран след всеки етап от процедурата. За тази цел е проведен биохимичен и биофизичен анализ на клиничните проби. Измерени са концентрациите на фосфолипиди (ФЛ) и протеини в пробите. За определяне на съдържанието на протеини в пробите от бронхоалвеоларен лаваж е използван метода на Lowry (модификация на Peterson). Концентрацията на ФЛ е определена чрез екстракция по метода на Bligh и Dyer. Посредством тънкослойна хроматография е установен фосфолипидният профил на отделните фосфолипидни компоненти. В допълнение, с помощта на метода на осевосиметричния анализ на формата на капка, бяха определени повърхностните характеристики: равновесно, максимално и минимално повърхностно напрежение по време на 10 цикъла компресия-декомпресия в динамичните условия. Нашите резултати показват постепенно намаляване на съдържанието на протеини и фосфолипиди по време на процедурата. Логично, равновесното повърхностно напрежение се увеличава в резултат на намаленото съотношение фосфолипиди/протеини. След ЦБЛ физиологичното състояние на пациента се подобрява. Настоящото изследване би представлявало голям интерес за ефективното прилагане на процедурата за цялостно промиване на белия дроб в клиничната практика.

Abstract

Pulmonary alveolar proteinosis (PAP) is a heterogenous disorder of genetic or acquired etiologies characterized by intraalveolar accumulation of lipoproteinaceous material. The clinical course of the disease is variable, ranging from spontaneous remission to respiratory failure. The aim of the present study was to compare the biochemical and biophysical characteristics of broncho-alveolar lavage (BAL) from a patient with PAP, during the whole lung lavage (WLL) taken after each stage of the procedure. For this purpose biochemical and biophysical analysis of the clinical samples were made. The phospholipids (PLs) and the proteins concentrations of the samples were measured. For determination of protein content in broncho-alveolar lavage samples Lowry protein assay (Peterson's modification) was used. The PL's concentration was determined via extraction by the method of Blight and Dyer. Thin-layer chromatography was used for determining the phospholipid profile of the separate phospholipid components. In addition, by using the method of Axisymmetric Drop Shape Analysis, the surface characteristics: equilibrium, maximal and minimal surface tension during 10 cycles of compression-decompression in the dynamic conditions, were determined. Our results showed consecutive proteins and phospholipids content decrease during the procedure. Logically, the equilibrium surface tension was increased as a result of the decreased Phospholipids/Proteins ratio. After WLL the physiological condition of the patient was improved. The present study will be of great interest for effective implementation of the procedure of whole lung lavage in the clinical practice.

9. M. Bangyozova, A. Jordanova, A. Tsanova, N. Jekova, D. Chakarov, J. Doumanov, E. Christova, Z. Lachev. Biochemical and Biophysical Investigation of Surfactant in Neonatal Gastric Aspirate at Birth. *Acta Medica Portuguesa*, 26 (1), pp. 33-38, 2013.

Резюме

Въведение: Все още няма оптимален подход за установяване на сърфактант дефицит при недоносени новородени при раждането и решението за прилагане на екзогенен сърфактант се основава главно на изявата на клинични и радиологични признаци на неонатален респираторен дистрес синдром (НРДС).

Цели: Изследвани са биохимичните и биофизичните свойства на гастрални аспирати (ГА) от преждевременно родени с НРДС и здрави доносени деца с цел да се намери достъпен метод за оценка на сърфактантната зрялост.

Материали и методи: В проучването са включени 47 новородени, разделени в две групи. Първата група се състои от 34 здрави бебета, родени в термин (след 37 гестационна седмица). Втората група включва 13 недоносени новородени (на възраст от 26 до 32 гестационна седмица), развиващи клинични признаци на НРДС, за което са лекувани чрез асистирана вентилация и екзогенен сърфактант. Извършен е биохимичен анализ на съдържанието на протеини и липиди в ГА, събрани при раждането. Съставът на мастни киселини в пробите ГА е определен чрез анализ с газова хроматография с маселективен детектор (GS-MSD). Повърхностните характеристики (равновесни, максимални и минимални стойности на повърхностното напрежение) на пробите ГА са измерени чрез метода на висящата капка. Получените за изследваните групи данни са сравнени, като е използван t-теста на Student или анализа на Ман-Уитни. Стойностите се считат за статистически различни, ако стойността на p е $\leq 0,05$.

Резултати: Средната концентрация на фосфолипиди в ГА на недоносените новородени е пониска (295,7 $\mu\text{g/ml}$ срещу 374,5 $\mu\text{g/ml}$) отколкото при доносените деца, а средното съдържание на протеини е по-малко в ГА на недоносените бебета, отколкото при здравите новородени (574,5 $\mu\text{g/ml}$ срещу 641,5 $\mu\text{g/ml}$). Измерването на динамичните повърхностни характеристики на ГА

показва значително по-високи средни стойности на минималното повърхностно напрежение (γ_{\min}) при недоносените деца - 20,5 mN/m в сравнение с недоносените бебета - 12,3 mN/m ($p < 0,01$). Няма разлика между равновесните повърхостни напрежения (38 mN/m срещу 38 mN/m) на двете групи. Средните стойности на максималното повърхностно напрежение (γ_{\max}) в ГА не се различават значително между групите (50,1 mN/m срещу 48,5 mN/m).

Заклучение: Нашите резултати показват по-ниски концентрации на фосфолипиди и протеини в ГА от недоносени новородени в сравнение със здравите бебета при раждане. Динамичните повърхостни характеристики на ГА показват значителни разлики между двете групи, като минималното повърхностно напрежение се явява най-важният параметър за оценка на сурфактантната зрялост. Този параметър може да се използва в клиничната практика за бърза оценка на алвеоларния сурфактант при недоносени новородени по отношение на прилагането на екзогенен сурфактант.

Abstract

Background: The optimal approach to detection of surfactant deficiency in the prematurely born infants at birth remains unclear and the decision to apply exogenous surfactant is based mainly on the development of clinical and radiological signs of neonatal respiratory distress syndrome (NRDS).

Objectives: We studied the biochemical and biophysical properties of gastric aspirates (GA) from prematurely born infants with NRDS and healthy full term infants with an aim to find an approachable method for assessment of surfactant maturity at birth.

Material and Methods: Forty-seven newborn infants divided into two groups were enrolled in the study. The first group comprised 34 healthy infants born at term (after 37 weeks of gestation). The second group included 13 premature infants (aged from 26 to 32 weeks of gestation) developing clinical signs of NRDS for which they were treated by assisted ventilation and exogenous surfactant. A biochemical analysis of the protein and lipid content of GA collected at birth was performed. The fatty acid composition of the GA samples was determined by Gas Chromatography-Mass Selective Detector (GS-MSD) analysis. The surface characteristics (equilibrium, maximal and minimal surface tension values) of the GA samples were measured by using the pending drop method. Data were compared between the groups by using Student's t test or Mann-Whitney analysis. Values were considered significantly different if the p value was ≤ 0.05 .

Results: The mean phospholipids' concentration in GA of the premature infants was lower (295.7 $\mu\text{g} / \text{ml}$ vs. 374.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$) than in the term infants and the mean protein content was less in GA of the premature babies than the term newborns (574.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ vs. 641.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$). The measurement of dynamic surface characteristics of GA showed significantly higher mean values of the minimal surface tension (γ_{\min}) in the premature infants - 20.5 m / Nm compared to the term babies - 12.3 mN/m ($p < 0,01$). There was no difference between the equilibrium surface tensions (38 mN/m vs. 38 mN/m) of both groups; The mean values of maximal surface tension (γ_{\max}) in GA did not differ significantly between the groups (50.1 mN/m vs. 48.5 mN/m).

Conclusion: Our findings revealed lower phospholipids' and protein concentrations in the GA at birth from premature infants as compared to the healthy term infants. The dynamic surface characteristics of GA had significant differences between the two groups, the minimal surface tension being the most important parameter for evaluation of surfactant maturity. It could be used in the clinical practice for fast surfactant's assessment in the premature infants in regard to administration of exogenous surfactant.

10. G. As. Georgiev, C. Vassilieff, A. Jordanova, **A. Tsanova**, Z. Lalchev. Foam film study of albumin inhibited lung surfactant preparations: effect of added hydrophilic polymers. *Soft Matter*, 8 (48), pp. 12072-12079, 2012. DOI: [10.1039/C2SM25937K](https://doi.org/10.1039/C2SM25937K)

Резюме

При остър респираторен дистрес синдром (ARDS) концентрацията на албумин в алвеоларната течност достига 25–100 mg ml⁻¹. Поради високата си степен на адсорбция албуминът се адсорбира на въздушно-водната граница, което я прави недостъпна за белодробния сърфактант (БС). Инактивирането на БС може да бъде предотвратено чрез хидрофилни полимери поради изчерпване на привличащото осмотично налягане или друго специфично действие. В контролирани експерименти са изследвани два налични търговски белодробни сърфактантни препарата, БСП (Curosurf и Survanta) и четири хидрофилни полимера (PEG, декстран, PVP, хиалуронова киселина-НА) на една (монослойна) и две взаимодействащи си фазови граници въздух/разтвор (пенен филм) при условия, свободни от албумин и албумин инактивирани. Установената процедура за измерване на минималното повърхностно напрежение в последователни цикли на компресия-декомпресия на монослоеве разкрива, че минималното повърхностно напрежение $\leq 10 \text{ mN m}^{-1}$ за Survanta се постига с PEG, PVP и НА, докато за Curosurf с декстран, PVP и НА. Това корелира с наблюденията на Lu et al., 2005. Експериментите с пяна чрез микроинтерферометричния метод на Scheludko и Exerowa разкриват относителната способност на полимерите да намалят ефекта от инхибирането на албумина при възстановяване на образуването на стабилни и хомогенни черни филми (дебелина <17 nm). Стабилните черни филми се образуват от Survanta с PEG, PVP и НА, докато от Curosurf с декстран, PVP и НА. Кинетичните данни за изтъняване на пенен филм от Curosurf са интерпретирани, за да се получат стойностите на разклинящото налягане. Интересна промяна от отблъскване към привличане се наблюдава при дебелина от около 100 nm. Това може да се обясни с изчерпващото привличане, преодоляващо стеричното отблъскване. Беше установен магнитутът на изчерпващото привличане.

Abstract

In Adult and Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) the concentration of albumin in the alveolar fluid reaches 25–100 mg ml⁻¹. Due to its high adsorption rate albumin adsorbs at the air/water interface making it inaccessible for the lung surfactant (LS). LS inactivation can be prevented by hydrophilic polymers due to depletion attraction osmotic pressure or other specific action. Two commercially available lung surfactant preparations, LSP (Curosurf and Survanta), and four hydrophilic polymers (PEG, dextran, PVP, hyaluronic acid-NA) were investigated in control experiments at one (monolayer) and two interacting air/solution interfaces (foam film) under albumin free and albumin inactivated conditions. The established procedure to measure the minimal surface tension in successive compression–expansion cycles of monolayers revealed that minimal surface tension $\leq 10 \text{ mN m}^{-1}$ for Survanta is achieved with PEG, PVP, and NA, while for Curosurf with dextran, PVP, and NA. This correlates with the observations of Lu et al., 2005. Foam film experiments with the microinterferometric method of Scheludko and Exerowa revealed the relative ability of the polymers to decrease the effect of albumin inhibition in restoring the formation of stable and homogeneous black films (thickness < 17 nm). Stable black foam films are formed by Survanta with PEG, PVP, and NA, while by Curosurf with dextran, PVP, and NA. Kinetic data of Curosurf foam film thinning were interpreted to obtain values of the disjoining pressure. An interesting change from repulsion to attraction was observed at a thickness of appr. 100 nm. It may be explained by depletion attraction overcoming the steric repulsion. The magnitude of the depletion attraction was estimated.

11. M. Bangyozova, A. Jordanova, **A. Tsanova**, J. Doumanov, E. Christova, Z. Lalchev. Study of the lung surfactant maturity by biochemical and biophysical analyses of gasral aspirates from newborn infants, *Akusherstvo i ginekologii*, 51 (4), pp. 12-18, 2012.

Резюме

В настоящата работа са изследвани гастрални аспирати (ГА) от недоносени и доносени новородени деца, с цел установяване сърфактантна зрялост. Направен е биохимичен анализ на белтъчното и фосфолипидното съдържание на ГА в изследваните групи деца. Посредством тънкослойна хроматография са идентифицирани индивидуалните фосфолипидни компоненти. Повърхностното напрежение на ГА е изследвано чрез метода на висящата капка, като са определени повърхностните параметри на тестваните ГА в равновесни и динамични условия (равновесна, минимална и максимална стойност на повърхностното напрежение). Получените резултати показват, че се наблюдава повишение на белтъчната и фосфолипидната концентрация в ГА с напредване на бременността, както и значителни различия в индивидуалния фосфолипиден профил на аспиратите при недоносени и доносени деца. По отношение на повърхностните характеристики най-голяма разлика между изследваните групи се наблюдава при стойностите на минималното повърхностно напрежение (γ_{\min} , mN/m): докато при доносените деца се регистрира по-ниско повърхностно напрежение, то при недоносените се достигат значително по-високи стойности, което определя γ_{\min} като най-информативен от изследваните параметри. Получените резултати биха могли да намерят приложение в клиничната практика за бързо определяне на сърфактантна зрялост при недоносени деца, с оглед прилагане на животоспасяваща терапия с екзогенни сърфактанти.

Abstract

The aim of the present study was to estimate the lung surfactant maturity by analyses of gastral aspirates (GA) from prematurely born and full term infants. A biochemical analysis of the protein and lipid content in GA from the children groups tested was made. By thin-layer chromatography the individual phospholipid components in GA samples from prematurely born and full term children were detected. In addition, by using the pending drop method the surface characteristics (equilibrium, minimum and maximum surface tension values) were determined. Our results showed an increase in phospholipid and protein concentration in GA during pregnancy progress as well as significant differences in the individual phospholipid profile of the aspirates from prematurely born and full term children. In case of surface characteristics a highest difference was observed for the minimum surface tension values (γ_{\min} , mN/m); while in full term children a lower surface tension was determined, in the prematurely born children significantly higher values are reached, which defines γ_{\min} as the most informative of the parameters studied. Our results could find application into the clinical practice for fast surfactant maturity diagnostics in prematurely born children regarding lifesaving therapy with exogenous surfactants administration.

12. G. As. Georgiev, Sl. Ivanova, A. Jordanova, **A. Tsanova**, V. Getov, M. Dimitrov, Z. Lalchev. Interaction of monogalactosyldiacylglycerol with cytochrome b6f complex in surface films. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 419 (4), pp. 648-51, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.067>

Резюме

Взаимодействието на моногалактозилдиацилглицерол (МГДГ) с цитохром b6f комплекс (цит b6f), основен компонент на фотосинтетичния апарат, е изследвано в монослое на Лангмуир при цикли на компресия/декомпресия и при режим на постоянно повърхностно налягане. Изотермите на повърхностното налягане/площ на смесените филми са анализирани по отношение на повърхностния модул на компресия и двумерното вириално уравнение на състоянието. Морфологията и повърхностният потенциал на монослоеве са наблюдавани съответно чрез Брюстър-ъглова микроскопия и вибриращ електрод. Нашите резултати предполагат, че има специфично взаимодействие между МГДГ и цит b6f, което води до изчерпване на липидните молекули от повърхността. Настоящата работа хвърля светлина върху все още неясния въпрос как b6f комплексът влиза в контакт с основното съединение на тилакоидните мембрани, незареденият липиден МГДГ. Взаимодействието се осъществява дори при субнаномоларна концентрация на комплекса. Този ефект най-вероятно се дължи на водородни връзки между галактозната група на липида и протеиновата част на цит b6f.

Abstract

The interaction of monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) with cytochrome b6f complex (cyt b6f), a major component of the photosynthetic apparatus, was studied in Langmuir monolayers during compression/expansion cycling and at constant surface pressure mode. The surface pressure/area isotherms of the mixed films were analyzed in terms of surface compressional modulus and two-dimensional virial equation of state. The morphology and the surface potential of the monolayers were monitored by Brewster angle microscopy and vibrating plate sensor respectively. Our results suggested that there is a specific interaction between MGDG and cyt b6f which resulted in depletion of lipid molecules from the interface. The current work sheds light on the still unclear question how b6f complex gets in touch with the major compound of the thylakoid membranes, the non-charged lipid MGDG. The interaction occurred even at very low sub-nanomolar concentration of the complex. This effect most probably could be attributed to hydrogen bonding between the galactose headgroup of the lipid and the protein moiety of cyt b6f.

13. **A. Tsanova**, G. As. Georgiev, Z. Lalchev. *In vitro* application of Langmuir monolayer model to study *in vivo* biological systems, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 26 (1) (special issue, on-line), pp. 185-190, 2012. <https://doi.org/10.5504/50YRTIMB.2011.0034>

Резюме

Монослойният модел на Лангмуир се прилага за изследване на молекулните взаимодействия между фосфолипиди и повърхностно активни съединения и за определяне на латералната еластичност и свиваемостта на повърхностните филми на границата въздух-течност. Взаимодействието на синтетичния метионин-енкефалин (Met-enk) и неговото амидирано производно (Met-enk-NH₂) с монослое на цвитерйонния димирисоилфосфатидилхолин и отрицателно заредения димирисоилфосфатидилглицерол е изследвано чрез измерване на

зависимостта повърхностното напрежение (γ , mN/m)-време след инжектиране на енкефалини под Лангмуировия монослой. Намалването на γ -стойностите с времето показва, че има силен ефект на проникване на двата типа молекули Met-enk в монослоеве, като е той е по-значителен за амидираното производно Met-enk-NH₂.

Поведението на липидния слой на слъзен филм (ЛССФ) е изследвано в динамични условия чрез цикли на компресия/декомпресия на Лангмуирови филми. Това позволява да се определи реципрочната компресивност, C_s^{-1} и обратимостта, R_v , на слъзните филми на границата въздух-течност. Нашите резултати показват много висока латерална еластичност (т.е. ниска реципрочна компресивност) и висока структурна обратимост на мейбомиевите повърхностни филми, което е потвърдено и от изображенията от Брюстър-ъгловата микроскопия. Показано е, че дори при ниско повърхностно налягане (между 0,5 и 10 mN/m) човешкият мейбум образува неравни непрекъснати многослойни филми на границата въздух/вода, които стават по-равномерни при увеличаване на повърхностното налягане.

Нашите резултати демонстрират потенциала на липидните монослоеве, образувани във вана на Лангмуир, да бъдат успешно използвани като елегантен и прост модел за изследване на молекулните взаимодействия и свойствата на повърхностните филми на границата въздух/вода.

Abstract

Langmuir monolayer model is applied to study molecular interactions between phospholipids and surface active compounds and to determine the lateral elasticity and compressibility of the surface films at air-liquid interface. The interaction of the synthetic Methionine-enkephalin (Met-enk) and its amidated derivative (Met-enk-NH₂) with monolayers of the zwitterionic dimyristoylphosphatidylcholine and the negatively charged dimyristoylphosphatidylglycerol were evaluated by measurements of surface tension (γ , mN/m) - time dependencies after injection of enkephalins under the Langmuir monolayer. The decrease of γ values during time showed that there was a strong penetration effect of both types of Met-enk molecules into the monolayers, being significantly stronger for the amidated derivate, Met-enk-NH₂.

The behavior of tear film lipid layer (TFLL) is studied in dynamic conditions by compression/expansion cycling of Langmuir films. It allows determining reciprocal compressibility, C_s^{-1} , and reversibility, R_v , of the tear films at air-liquid interface. Our results showed very high lateral elasticity (i.e. low reciprocal compressibility) and high structural reversibility of the meibomian surface films which was confirmed by Brewster Angle Microscopy images. It is shown that even at low surface pressures (between 0.5 and 10 mN/m) human meibum forms rough continuous multilayer films at the air/water interface that get more uniform when surface pressure increases.

Our results demonstrate the potential of lipid monolayers formed in Langmuir's through to be successfully used as an elegant and simple model to study molecular interactions and properties of surface films at the air/water interface.

14. A. Jordanova, **A. Tsanova**, G. As. Georgiev, D. Chakarov. Interfacial tensiometry of tracheal aspirate from infants with neonatal respiratory distress syndrome. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 138, pp. 179-182, 2011. https://doi.org/10.1007/978-3-642-19038-4_32

Резюме

Изследвани са повърхностните свойства на трахеални аспирати от новородени с неонатален респираторен дистрес синдром (НРДС) и деца с НРДС след терапия с екзогенния сърфактант

Curosurf[®]. Повърхностните характеристики на аспиратите (равновесно повърхностно напрежение, максимално и минимално повърхностно напрежение по време на цикли на латерална компресия-декомпресия) са определени с метода на висящата капка. Нашите резултати показват, че трахеалните аспирати на новородени с нетретиран НРДС имат високи равновесни, максимални и минимални стойности на повърхностно напрежение. Обратно, пробите от бебета, третирани с *Curosurf*[®], показват по-ниски стойности на повърхностно напрежение, което предполага, че прилагането на *Curosurf*[®] подобрява състава и свойствата на белодробния сърфактант в белите дробове на новородени.

Abstract

The interfacial properties of tracheal aspirate from infants with untreated neonatal respiratory distress syndrome (NRDS), and NRDS infants after therapy with the exogenous surfactant *Curosurf*[®] were assessed. The interfacial characteristics of the aspirate (equilibrium surface tension, maximal and minimal surface tension during lateral compression-decompression cycles) were determined with the pendant drop method. Our results show that the tracheal aspirate of infants with untreated NRDS had high equilibrium, maximal and minimal surface tension values. In contrast, the samples from infants, treated with *Curosurf*[®], showed lower surface tension values, suggesting that the application of *Curosurf*[®] improves the composition and the properties of the pulmonary surfactant in the infant lung.

15. A. Jordanova, **A. Tsanova**, J. Doumanov, D. Chakarov, G. Georgiev, E. Christova, C. Vassilieff, Z. Lalchev. Effect of administration of surfactant therapy in newborns with neonatal respiratory distress syndrome. *Acta Medica Bulgarica*, 37 (2), pp. 32-39, 2010.

Резюме

Целта на настоящото изследване е да се сравнят физиологичното състояние и зрелостта на трахеални аспирати от новородени с нетретиран неонатален респираторен дистрес синдром (НРДС) и бебета с НРДС след терапия с екзогенния сърфактант *Curosurf*. Чистата дисперсия на *Curosurf* е тествана за контрола. За тази цел са проведени биохимични и биофизични анализи на клиничните проби (преди и след прилагане на *Curosurf*). Измерени са концентрациите на липиди и протеини в пробите. В допълнение, повърхностните характеристики: равновесни и максимални, и минимални стойности на повърхностното напрежение по време на 10 цикъла на компресия-декомпресия, както и формата на хистерезисната бримка в динамични условия са определени с помощта на метода на висящата капка. Нашите резултати показват, че децата с нетретиран НРДС имат ниско съдържание на фосфолипиди, високи равновесни, максимални и минимални γ -стойности. Обратно, клиничните проби от деца, лекувани с *Curosurf*, показват висока концентрация на фосфолипиди и ниски повърхностни характеристики, което предполага, че прилагането на екзогенния сърфактант подобрява състава и свойствата на белодробния сърфактант при новородени. Резултатите от нашата работа биха могли да бъдат полезни за клиничната практика в терапията на РДС при деца и възрастни.

Abstract

The aim of the present study was to compare the physiological condition and the maturity of tracheal aspirates from children with untreated neonatal respiratory distress syndrome (NRDS), and NRDS infants after therapy with the exogenous surfactant *Curosurf*. Pure *Curosurf* dispersion was tested for control. For this purpose biochemical and biophysical analyses of the clinical samples (before and after administration of *Curosurf*) were made. The lipids and proteins concentrations of the samples were

measured. In addition, the surface characteristics: equilibrium, and maximal and minimal surface tension values during 10 cycles of compression-decompression, as well as the shape of the hysteresis loop in the dynamic conditions were determined by using the pending drop method. Our results showed that the children with untreated NRDS had low phospholipid content, high equilibrium, maximal and minimal γ values. In contrast, the clinical samples from children, treated with Curosurf, showed high phospholipid concentration, and low surface characteristics, suggesting that the application of the exogenous surfactant improved the composition and the properties of the pulmonary surfactant in the infants. The results from our work could be useful for the clinical practice in the RDS therapy of children and adults.

16. A. Jordanova, V. Getov, **A. Tsanova**, G. As. Georgiev, S. Stoychev, N. Terezova, A. Shosheva, I. Zlatanov, M. Dimitrov, Z. Lachev. Effect of interaction of b6f subcomplex with neutral and charged Langmuir lipid monolayers. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, 62 (12), pp. 1539-1544, 2009.

Резюме

Цитохром b6f (цит b6f) комплекс е интегрален мембранен протеинов комплекс, който участва във фотосинтетичния електронен транспорт в хлоропластната тилакоидна мембрана на висшите растения и цианобактериите. Целта на настоящото изследване е да се изследва взаимодействието между субкомплекса цит b6f и различно заредените мембранни фосфолипиди на границата въздух/вода. Получените данни показват, че повърхностното липид-протеиново взаимодействие най-вероятно се дължи на комбинацията между електростатични и хидрофобни межумолекулни сили. Освен това, нашите резултати показват най-силен ефект при добавянето на отрицателно заредения субкомплекс цит b6f към монослоеве от положително заредения стеариламин, по-слаб ефект при цвистерийонния ДПФХ и не се установява ефект при отрицателно заредения ДМФГ.

Abstract

The cytochrome b6f (Cyt b6f) complex is an integral membrane protein complex that participates in the photosynthetic electron transport in the chloroplast thylakoid membrane of higher plants and cyanobacteria. The aim of the present study is to examine the interaction between Cyt b6f subcomplex and differently charged membrane phospholipids at air/water interface. The data obtained show that the surface lipid-protein interaction is most probably due to the combination between electrostatic and hydrophobic intermolecular forces. Moreover, our results show the strongest effect with the addition of the negatively charged Cyt b6f subcomplex to monolayers of the positively charged stearylamine, weaker effect of the zwitterionic DPPC and no effect of negatively charged DMPG.

17. G. As. Georgiev, E. Kutsarova, A. Jordanova, **A. Tsanova**, C.S. Vassilieff, Z. Lachev. Tuning of surface properties of thin lipid-protein films by hydrophilic non-surface active polymers. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23 (special issue, on-line), pp. 547-550, 2009. <https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10818483>

Резюме

Изследвана е способността на хидрофилните полимери (ХП) да обърнат инхибиторния ефект на албумина и да възстановят повърхностната активност на липид-протеиновите белодробни

сърфактантни препарати (ЛСП): Curosurf и Survanta. Приложените ХП са декстран и полиетилен гликол 10000 (ПЕГ10000). Повърхностната активност на ЛСП е оценена в тънки филми (монослой и пена) на границата въздух/вода. Албуминът измества ЛСП от фазовата граница и инхибира способността им да поддържат ниско повърхностно напрежение в монослоеве и да образуват стабилни тънки пенни филми (ПФ). Когато ХП се добавят към монослоеве, те възстановяват повърхностната активност на ЛСП и способността им да поддържат ниско динамично повърхностно напрежение. По същия начин включването на ХП в пенни филми води до неутрализиране на ефекта на албумина и образуване на стабилни тънки (с дебелина <17 nm) филми с хомогенни повърхности, както в случая с чистите ЛСП. Нашите открития позволяват да се търси отговорът на интригуващия проблем защо ПЕГ възстановява по-добре повърхностната активност на Survanta, докато декстранът - на Curosurf. Подобни резултати могат да бъдат от голямо значение за лечението на респираторен дистрес синдром при възрастни.

Abstract

We study the capability of hydrophilic polymers (HPs) to reverse the inhibitory effect of albumin and to restore the surface activity of lipid-protein lung surfactants preparations (LSPs): Curosurf and Survanta. HPs implied are dextran and Polyethylene glycol 10000 (PEG10000). LSPs surface activity is evaluated in Thin Films (monolayer and foam) at the air/water interface. Albumin displaces LSP from the interface and inhibits their ability to sustain low surface tension in monolayers and to form stable thin foam films (FFs). When HPs are added to monolayers they restore the surface activity of LSPs and recover their capability to maintain low dynamic surface tensions. Similarly the inclusion of HPs in foam films results in neutralization of the effect of albumin and in formation of stable, thin (with thickness <17 nm) films with homogeneous surfaces, as in the case of pure LSPs. Our findings permit to search for the answer of the intriguing problem why PEG recovers better the surface activity of Survanta, while Dextran - of Curosurf. Such results might be of major importance for the treatment of Adult Respiratory Distress Syndrome.

18. R. Gurov, G. As. Georgiev, A. Jordanova, **A. Tsanova**, C. Vassilieff, Z. Lalchev. Investigation of the interaction between three-block co-polymers with phospholipid monolayers and foam films. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23 (special issue, on-line), pp. 669-671, 2009. <https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10818513>

Резюме

Взаимодействието на триблокови кополимери (полоксамери) с димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ) и дипалмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) е изследвано на една (монослойна) и две взаимодействащи си въздушно-водни фазови граници (пенен филм). Избраните полоксамери са F-88 и F-98. И двата притежават два хидрофилни полиоксиетилена (ПОЕ) и една хидрофобна полиоксипропиленова част, но се различават по молекулно тегло. Тези вещества и тяхното междуфазово поведение са интересни за разработването на системи за таргетно доставяне на лекарства. Монослойната тензиометрия разкрива степента на проникване на полоксамер в монослоеве на ФХ и промените в поведението на монослоеве при компресия/декомпресия. Експериментите с пенните филми демонстрират ефекта от увеличаването на стеричното разклинящо налягане в присъствието на F-88 и F-98. Това води до промени в структурата на филма и съответстващата дебелина на водната подложка. Установено е, че взаимодействието между полоксамери и ФХ-молекули в монослоеве и пенните филми зависи както от размера на кополимера, така и от дължината на ацилната верига на фосфатидилхолините.

Abstract

The interaction of three-block copolymers (poloxamers) with dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC) and dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) is investigated experimentally at one (monolayer) and two interacting air/water interfaces (foam film). The poloxamers selected are F-88 and F-98. Both of them possess two hydrophilic polyoxyethylene (POE) and one hydrophobic polyoxypropylene moiety but differ in molecular weight. These substances and their interfacial behaviour are interesting for the development of targeted drug delivery systems. Monolayer tensiometry revealed the degree of poloxamer penetration in PC monolayers and the changes in monolayer compression/decompression behaviour. Foam film experiments showed the effect of steric disjoining pressure increase in presence of F-88 and F-98. It resulted in changes of film structure and equivalent water thickness. It was found that the interaction between poloxamers and PC molecules in monolayers and foam films depends both on copolymer size and on the acyl chain length of phosphatidylcholines.

19. **A. Tsanova**, D. Dacheva, V. Penchev, G. Georgiev, T. Pajpanova, E. Golovinski, Z. Lalchev. Comparative study of the interaction between synthetic Methionine-enkephalin and monolayers of zwitterionic and negatively charged phospholipids. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23 (special issue, on-line), pp. 463-466, 2009. <https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10818463>

Резюме

С помощта на монослойната техника на Лангмюир е изследвано повърхностното поведение и взаимодействието между синтетичен аналог на ендогенния невропептид метионин-енкефалин (Met-enk) и цвтерийонния димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ), и отрицателно заредения димиристоилфосфатидилглицерол (ДМФГ) на въздушно-водна фазова граница. Чрез метода на Вилхелми са детектирани промените в повърхностното напрежение (γ , mN/m) (след инжектиране на пептида в субфазата) на ДМФГ и ДМФХ монослое в зависимост от времето при определена площ на молекула. Намалването на γ -стойностите показва, че има силен ефект на проникване на молекулите Met-enk в монослоеве. Сравнението на взаимодействието между хидрофобния пентапептид и двата фосфолипидни монослоя показва, че енкефалинът взаимодейства по подобен начин с молекулите ДМФГ и ДМФХ, и че способността на Met-enk да прониква корелира с дадената повърхностна площ на липидна молекула. Въз основа на получените резултати предполагаме, че при монослоеве в течно-разтегнато фазово състояние електростатичното привличане улеснява взаимодействието между невропептида и отрицателно заредените фосфолипиди (ДМФГ), докато при по-компактно подреждане на липидните молекули проникването на енкефалина се дължи предимно на хидрофобни взаимодействия.

Abstract

Using Langmuir's monolayer technique, surface behaviour and the interaction between a synthetic analogue of endogenous neuropeptide Methionine-enkephalin (Met-enk) and zwitterionic dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), and the negatively charged dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) at air/water interface are studied. By using the Wilhelmy method, surface tension (γ , mN/m) changes (after injection of the peptide under the interface) of DMPG and DMPC monolayers as a function of time at given molecular area are detected. The decrease in γ values shows that there is a strong penetration effect of Met-enk molecules into the monolayers. The comparison of the interaction between the hydrophobic pentapeptide and both phospholipid monolayers shows that the enkephalin

interacts similarly with DMPG and DMPC molecules, and that the ability of Met-enk to penetrate correlates with the given surface area per lipid molecule. Based on the results obtained we suggest that in case of liquid-expanded monolayers the electrostatic attraction facilitates the interaction between the neuropeptide and the negatively charged phospholipids (DMPG), while at more compact ordering of lipid molecules the penetration of the enkephalin is preliminary due to hydrophobic interactions.

20. **A. Tzanova**, A. Uzunova. Interaction between Cadmium and Paraquat Stress on *Pisum sativum* L. Photosynthetic Response of Pea Plants Induced by Cd^{2+} and Paraquat. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences*, 59(6), pp. 651-656, 2006.

Резюме

Третирането с кадмий и/или паракват самостоятелно и в комбинация предизвика множество физиологични промени в граховите растения. Приложен самостоятелно CdCl_2 (50 и 100 μM), понижава параметрите на растеж, нивата на фиксация на $^{14}\text{CO}_2$ и съдържанието на пластидните пигменти. Паракватната обработка (100 μM) на граховите листа намалява съдържанието на хлорофил и каротеноиди, докато другите измерени параметри не се променят значително. При комбинирано приложение (Cd_2^+ и Pq) е установено повишаване на токсичността на кадмий по отношение на растежа, натрупването на биомаса, фотосинтезата и съдържанието на пластидни пигменти. Токсичният ефект на CdCl_2 се дължи на относително лесното му поемане и натрупване от грахови растения. В допълнение, пръскането на листата с хербицида паракват повишава пропускливостта на плазмалемата за Cd_2^+ , което води до увеличаване на отрицателния ефект на кадмия при комбинираното третиране.

Abstract

Cadmium and/or paraquat treatment alone and in combination induced numerous physiological alterations in pea plants. Applied alone CdCl_2 (50 and 100 μM), decreased growth parameters, $^{14}\text{CO}_2$ -fixation levels and plastid pigments content. Paraquat treatment (100 μM) of pea leaves reduced chlorophyll and carotenoid contents, whereas the other parameters measured did not change significantly. In combined application (Cd_2^+ and Pq) increasing of cadmium toxicity in respect of growth, biomass accumulation, photosynthesis and plastid pigments content was found. CdCl_2 toxic effect was due to its relatively easy taking up and accumulation by pea plants. In addition, spraying the leaves with the herbicide paraquat enhanced plasmalemma permeability for Cd_2^+ which led to increasing cadmium negative effect during combined treatment.

21. G. Chaneva, **A. Tzanova**, A. Uzunova. Interaction between cadmium and paraquat stress on *Pisum sativum* L. Oxidative stress in pea plants induced by Cd^{2+} and paraquat. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences*, 59(6), pp.657-662, 2006.

Резюме

Приложени са две различни концентрации на кадмий (50 и 100 μM Cd_2^+) самостоятелно и в комбинация със 100 μM PQ, хербицид, който засилва производството на супероксидни радикали. Съдържанието на H_2O_2 и малонов диалдехид (MDA) в граховите листа нараства с времето на експозиция и съответно е с 61% и 43% по-високо от контролата при 100 μM Cd на 10-ия ден от третирането. Съдържанието на пролин почти не се променя на 3-ия ден от експозицията и се увеличи с около 70% на 7-ия и 10-ия ден при 100 μM Cd. Изтичането на йони се увеличава до същата степен след третиране с Cd. Едновременно приложеният 100 μM PQ причинява по-

изразено увеличение на съдържанието на пролин и изтичане на йони от граховите листа. Нивата на H_2O_2 и MDA се повишават в по-малка степен след третиране с хербицида, отколкото след прилагане на Cd. PQ не влияе значително на съдържанието на H_2O_2 и MDA, което е около това на контролата и дори по-малко. Третирането с PQ повишава съдържанието на пролин и изтичането на йони на 7-ия и 10-ия ден от експозицията.

Abstract

Two different cadmium concentrations (50 and 100 μM Cd_2^+) were applied individually and simultaneously with 100 μM PQ, a herbicide exacerbating superoxide radical production. H_2O_2 and malone dialdehyde (MDA) content in pea leaves increased along with the time of exposure and it was respectively 61% and 43% higher than the control at 100 μM Cd on the 10th day of treatment. Proline content was almost unaffected on the 3rd day of exposure and increased by about 70% on the 7th and 10th day at 100 μM Cd. Ion leakage increased to the same degree after Cd treatment. Simultaneously applied 100 μM PQ caused more pronounced increase in proline content and ion leakage from pea leaves. H_2O_2 and MDA levels were increased to a less extent after herbicide treatment than after Cd application. PQ did not affect significantly H_2O_2 and MDA content which was about the control and even less. PQ treatment increased proline content and ion leakage on the 7th and 10th day of exposure.

(публикации във връзка с дисертационен труд за придобиване на ОНС “доктор”)

22. **A. Tsanova**, A. Jordanova, T. Dzimbova, T. Pajpanova, E. Golovinsky, Z. Lalchev. Interaction of methionine-enkephalins with raft-forming lipids: monolayers and BAM experiments. *Amino Acids*, 46 (5), pp. 1159-1168, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1647-1>

Резюме

Енкефалините (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met/Leu) са опиоидни пептиди с доказано антиноцицептивно действие в организма. Те взаимодействат с опиоидни рецептори, принадлежащи към суперсемейството G-протеин свързани рецептори. Известно е, че тези рецептори са разположени предимно в мембранни рафтове, съставени главно от сфингомиелин (См), холестерол (Хол) и фосфатидилхолин. В настоящата работа, посредством монослойната техника на Лангмюир в комбинация с метода на Вилхелми за измерване на повърхностно налягане, е изследвано взаимодействието на синтетичен метионин-енкефалин и неговото амидирано производно с 1-палмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ПОФХ), См и Хол, както и с техните двойни и тройни смеси. От измерените изотерми налягане/площ са определени модулите на компресия на липидите и липидно-пептидните монослоеви. Нашите резултати показват, че добавянето на синтетични енкефалини към изследваните монослоеви води до промяна в характеристиките на липидните монослоеви, което е по-ясно изразено при енкефалинамида. В допълнение, с помощта на Брюстър-ъгловата микроскопия (БАМ) е определена повърхностната морфология на липидните монослоеви преди и след инжектирането на двата енкефалина. БАМ-изображенията показват увеличаване на повърхностната плътност на смесените повърхностни липид/енкефалинови филми, особено при дву- и трикомпонентни липидни смеси. Този ефект е по-силно изразен за енкефалинамида. Тези наблюдения показват наличие на взаимодействие между пептидите и липидите, образувачи мембранни рафтове, което е по-силно изявено при амидирания пептид, което предполага разлика в нагъването на двата енкефалина. Нашето изследване демонстрира потенциала на липидните монослоеви за приложение като елегантни и

прости мембранни модели за изследване на липид-пептидни взаимодействия в равнината на биомембраните.

Abstract

Enkephalins (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met/Leu) are opioid peptides with proven antinociceptive action in organism. They interact with opioid receptors belonging to G-protein coupled receptor superfamily. It is known that these receptors are located preferably in membrane rafts composed mainly of sphingomyelin (Sm), cholesterol (Cho), and phosphatidylcholine. In the present work, using Langmuir's monolayer technique in combination with Wilhelmy's method for measuring the surface pressure, the interaction of synthetic methionine-enkephalin and its amidated derivative with 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), Sm, and Cho, as well as with their double and triple mixtures, was studied. From the pressure/area isotherms measured, the compressional moduli of the lipids and lipid-peptide monolayers were determined. Our results showed that the addition of the synthetic enkephalins to the monolayers studied led to change in the lipid monolayers characteristics, which was more evident in enkephalinamide case. In addition, using Brewster angle microscopy (BAM), the surface morphology of the lipid monolayers, before and after the injection of both enkephalins, was determined. The BAM images showed an increase in surface density of the mixed surface lipids/enkephalins films, especially with double and triple component lipid mixtures. This effect was more pronounced for the enkephalinamide as well. These observations showed that there was an interaction between the peptides and the raft-forming lipids, which was stronger for the amidated peptide, suggesting a difference in folding of both enkephalins. Our research demonstrates the potential of lipid monolayers for elegant and simple membrane models to study lipid-peptide interactions at the plane of biomembranes.

23. **A. Tsanova**, A. Jordanova, G. As. Georgiev, T. Pajpanova, E. Golovinsky, Z. Lalchev. Comparative Study of the Interaction of Synthetic Methionine-enkephalin and its Amidated Derivate with Monolayers of Zwitterionic and Negatively Charged Phospholipids. *Amino Acids*, 42 (1), pp. 253-260, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0803-0>

Резюме

Посредством монослойната техника на Лангмюир е изследвано повърхностното поведение и взаимодействието на синтетичния невропептид метионин-енкефалин (Met-enk) и неговото амидирано производно (Met-enk-NH₂) с монослоеве от цвтерийонния димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ) и отрицателно заредения димирistolфосфатидилглицерол (ДМФГ). Измерено е повърхностното напрежение (γ , mN/m) на монослоеве от ДМФГ и ДМФХ в зависимост от времето (след инжектиране на пептида в субфазата). Намаляването на стойностите на γ показва, че има силен проникващ ефект на двата типа молекули Met-enk в монослоеве, като той е значително по-силен за амидираното производно Met-enk-NH₂. Предполагаме, че взаимодействието между невропептидите и ДМФХ се определя предимно от амфифилоността на пептидите, докато електростатичните сили играят значителна роля за вмъкването на катионния Met-enk-NH₂ в ДМФГ-монослоеве, особено при висока плътност на опаковката. Нашите резултати демонстрират потенциала на липидните монослоеве, образувани във вана на Лангмюир, да бъдат успешно използвани като елегантни и прости мембранни модели за изследване на липид-пептидни взаимодействия на въздушно-водна фазова граница.

Abstract

Using Langmuir's monolayer technique, the surface behavior and the interaction of the synthetic neuropeptide methionine-enkephalin (Met-enk) and its amidated derivate (Met-enk-NH₂) with monolayers of the zwitterionic dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and the negatively charged dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) were studied. The surface tension (γ , mN/m) of DMPG and DMPC monolayers as a function of time (after injection of the peptide under the interface) was detected. The decrease in γ values showed that there was a strong penetration effect of both types of Met-enk molecules into the monolayers, being significantly stronger for the amidated derivate, Met-enk-NH₂. We suggest that the interaction between the neuropeptides and DMPC was predominantly determined by peptides amphiphilicity, while the electrostatic forces play significant role for the insertion of the cationic Met-enk-NH₂ in DMPG monolayers, especially at high packing densities. Our results demonstrate the potential of lipid monolayers formed in Langmuir's trough to be successfully used as an elegant and simple membrane models to study lipid-peptide interactions at the air/water interface.

24. **A. Tsanova**, A. Jordanova, T. Pajpanova, E. Golovinski, Z. Lalchev. Effects of Cholesterol-Sphingomyelin Interactions on penetration of neuropeptides to their monolayers. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23 (special issue, on-line), pp. 469-472, 2009. <https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10818465>

Резюме

В настоящата работа са изследвани повърхностното поведение и взаимодействията между синтетичния аналог на ендогенния неuropeпид метионин-енкефалин (Met-enk) и монослоеве, съставени от холестерол (Хол), сфингомиелин (См) и техните смеси. Измерванията са осъществени с помощта на монослойната техника на Лангмуир в комбинация с метода на Вилхелми за определяне на монослойно (върху субфаза от 0,14 М NaCl) повърхностно напрежение като функция от времето и площта за липидна молекула. След инжектирането на Met-enk в субфазата, във всички експерименти се установява намаляване на повърхностното напрежение. Получените данни показват, че пептидът прониква в монослоеве от двата типа липиди, както и в техните смеси. Доказано е, че по отношение на проникването на Met-enk има синергичен ефект в смесените монослоеве на Хол и См. Най-вероятно това се дължи на способността на холестерола да регулира флуидитета на липидните монослоеве. По този начин ние предполагаме, че Хол улеснява проникването на неuropeптида в См-монослойни филми.

Abstract

In the present study, the surface behavior and interactions between the synthetic analogue of the endogenous neuropeptide Methionine-enkephalin (Met-enk) and monolayers composed of cholesterol (Chol), sphingomyelin (SM) and their mixtures are studied. The measurements are made by using Langmuir's monolayer technique simultaneously with Wilhelmy method for determination of monolayer (on subphase of 0.14 M NaCl) surface tension as a function of time and lipid molecular area. After the injection of the Met-enk into the subphase, a decrease in surface tension is detected in all experiments. The data obtained show that the peptide penetrates the monolayers of both lipid types as well as of their mixtures. It is proved that, regarding the Met-enk penetration, there is a synergetic effect in the mixed monolayers of Chol and SM. Most probably, this is due to the ability of cholesterol to regulate the fluidity of lipid monolayers. Thus, we suggest that Chol facilitates the penetration of the neuropeptide in SM monolayer films.