

Светлана Христова Христова

**Електрически свойства и антираково действие
на цитохром *c*, адсорбиран върху колоидни
частици от монтморилонит**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на
образователната и научна степен

“ДОКТОР”

Област 4. Природни науки, математика и информатика
Направление 4.2. Химически науки
Докторска програма. Физикохимия

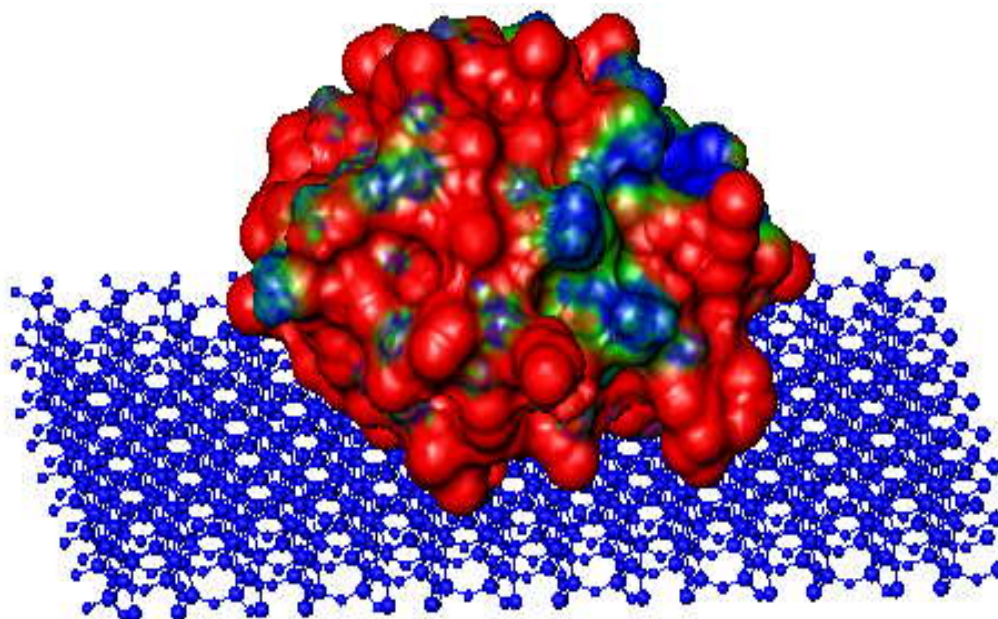
Научен ръководител: доц. д-р Александър М. Живков

София, 2019 г.

Изследванията са проведени в секция „Повърхности и колоиди“ на Института по физикохимия „Акад. Ростислав Каишев“ – БАН, и в Националната специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания, София.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Колоквиум „Алексей Шелудко“ към ИФХ–БАН на заседание с разширен състав на 15 февруари 2019 г. Защита ще се състои на 20 юни 2019 г. от 16 ч. в ИФХ, бл. 11, 4-ти километър, София

Научно жури: (1) Проф. дхн Елена Милева (Председател, ИФХ);
(2) Акад. дбн Борис Тенчов (МУ, Катедра медицинска физика и биофизика, външен рецензент); (3) Проф. дхн Христо Нанев (външен рецензент); (4) Доц. д-р Стоян Каракашев (СУ „Кл. Охридски“, Факултет по химия и фармация, Катедра физикохимия, външен член);
(5) Доц. д-р Александър Живков (ИФХ, вътрешен член)



СЪДЪРЖАНИЕ

<i>глава 1. Въведение, цел и задачи</i>	5
<i>глава 2. Материали и методи</i>	8
2.1. Материали	8
2.2. Белтъчна електростатика	8
2.3. Микроелектрофореза	8
2.4. Светоразсейване в електрично поле	9
<i>глава 3. Адсорбция на цитохром с върху частици от монтморилонит</i>	10
3.1. Електрофоретична подвижност	10
3.2. Електрическа поляризуемост	11
3.3. Коагулационна стабилност	12
<i>глава 4. Изоелектрична точка на свободен и адсорбиран цитохром с</i>	14
4.1. Белтъчна електростатика	14
4.2. Изоелектрично фокусиране	15
4.3. Микроелектрофореза	16
4.4. Светоразсейване в електрично поле	17
<i>глава 5. Антираково действие на комплекса цитохром-монтморилонит</i> ...	19
5.1. Заряд, електростатичен и електрокинетичен потенциал	19
5.2. Цитотоксичен ефект	21
Изводи	23
Заклучение	24
Приноси	25
Конференции	26

Символи и съкращения

- $A(KL)$ – оптична функция за несферични частици с дълъг размер L
 c – тегловна концентрация на частиците от монтморилонит [mg/L, мг/л]
 $C_{\text{цит}}$ – тегловна концентрация на цитохром С [mg/L, мг/л]
 D_r – ротационен дифузионен коефициент на частиците в суспензията
 E – напрегнатост (интензитет, сила) на електричното поле [V/m, В/м]
 H – оптична константа на суспензията при дължина на вълната λ_0
 I_0, I_E – интензитет на светоразсейване без и при включено електрично поле
 $\Delta I/I_0 = (I_E - I_0)/I_0$ – относителен електрооптичен ефект (ЕОЕ), %
 ΔI_t – ЕОЕ в момент t след изключване на електричното поле
 ΔI_s – ЕОЕ в стационарно състояние
 K – модул на вълновия вектор, $K = (2\pi/\lambda) \sin(\theta/2)$
 k – константа на Болцман, $k = 1,38 \cdot 10^{-23}$ [J/K, Дж/К]
 n_1, n_0 – коефициенти на пречупване на частицата и средата, съответно
 M – маса на една частица в суспензията [kg, кг]
 $P(\theta)$ – фактор на вътрешна интерференция, $P(0^\circ) \equiv 1$, $0 < P(\theta) \leq 1$
 t – време [ms, мс] след включване или изключване на електричното поле
 $\Phi(\gamma, p, E, T, t)$ – ориентационна функция на електрооптичния ефект
 α – степен на дисоциация на карбоксилните групи или аминогрупите на белтъка: $\alpha = [\text{COO}^-]/[\text{COOH}]$ или $\alpha = [\text{NH}_3^+]/[\text{NH}_2]$
 γ – електрична поляризуемост [C·m/V, Кл·м/В]
 ϵ_0 – електрична константа в СИ, $\epsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{12}$ Ф/м
 ϵ – относителна диелектрична проницаемост на средата
 η_0 – вискозитет на средата в суспензията [Pa·s, Па·с]
 λ_0 – дължина на вълната във вакуум [nm, нм]
 $\lambda = \lambda_0/n_0$ дължина на вълната [нм] в среда с коефициент на пречупване n_0
 ν – честота на синусоидално електричното поле [Hz, Хц] с период $1/\nu$ [s, с]
 $\nu_{1/2}$ – релаксационна честота на електрооптичен ефект [Hz, Хц] при $\Delta I_s/2$
 θ – ъгъл на разсейване (ъгълът между преминаващия лъч и разсеяния)
 τ – релаксационно време [ms, мс], $\tau = t$ при $\Delta I_s/e$, ($e = 2,72$)
 μ – електрофоретична подвижност на частиците [$\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, $\text{m}^2/\text{В}\cdot\text{с}$]
 ζ – електрокинетичен потенциал [mV, мВ]
ЕОЕ – (относителен) електрооптичен ефект ($\Delta I/I_0$)
ДЕС – двоен електричен слой
ИЕТ, ТНЗ – изоелектрична точка и точка на нулев заряд

ВЪВЕДЕНИЕ, ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цитохром *c* (cytC) е малък водоразтворим глобуларен хемопроteid, чиято полипептидната верига от 104 аминокиселинни остатъка е навита около хем (плосък желязо-съдържащ порфиринов цикъл). CytC присъства във всички живи организми – от бактериите до човека – и при еукариотите е разположен в пространството между вътрешната и външната мембрана на митохондриите, където изпълнява роля на преносител на електрони между мембранно-свързаните белтъци на дихателната верига, която осигурява биологичната клетка с химична енергия чрез ензимно окисление на глюкозата. Освен тази основна роля, cytC– има важна роля при елиминацията на функционално-неактивните или повредени клетки, като излиза в цитоплазмата и запуска сложна верига от биохимични реакции, наречена апоптоза (програмирана клетъчна смърт), която води до гибел на клетката. При раковите клетки този механизъм не работи, тъй като те получават енергия чрез гликолиза (безкислородно разграждане на глюкозата), но ако в клетката се вкара екзогенен cytC, то апоптозата се задейства и раковата клетка загива. В дисертацията това е направено чрез фагоцитоза на колоидни частици с адсорбиран върху тях cytC, това е възможно благодарение на способността на раковите клетки да поглъщат такива частици (ендоцитоза). Този подход е перспективен за лечение на някои видове рак с открита повърхност, като рак на органите на храносмилателната система или кожата.

Като всеки белтък, cytC е амфотерен поради на йонизацията на аминокиселинните остатъци, съдържащи карбоксилни или аминогрупи, като степента на дисоциация $\alpha = [\text{COO}^-]/[\text{COOH}]$ или $\alpha = [\text{NH}_3^+]/[\text{NH}_2]$ се определя от рН на средата. Това дава възможност да се подбере подходящо рН, при което белтъкът е противоположно зареден на колоидните частици и се адсорбира върху тях под действие на електростатичното привличане. За cytC удобен е воден разтвор с рН 6, където той е положително зареден.

ЦЕЛ: Да се изследва адсорбцията на цитохром *C* върху колоидни частици, електричните свойства на комплекса и антираковото му действие.

Така формулираната цел означава да се изследва рН-зависимостта на електричния заряд на белтъка, да се подберат подходящи колоидни частици и условия за адсорбцията му, и да се изследват електричните и геометричните свойства на частиците с адсорбиран върху тях сytC като функция на рН на средата и концентрацията на белтъка. Както електричните, така и геометричните свойства са важни, тъй като способността за фагоцитоза зависи от заряда и размера на частиците: вероятността за поглъщане на колоидна частица се определя от модула на еластичност при огъване и отрицателния заряд на цитоплазматичната мембрана на раковите клетки. В литературата е показано, че най-ефективно се поглъщат положително заредени частици с плоска форма и размер около 0,5 мкм. За адсорбция на положително заредения (при рН 6) сytC е необходимо колоидните частици да са изначално отрицателно заредени, а сумарният заряд на комплекса да е положителен, последното може да се осъществи чрез презареждане при свръхеквивалентна адсорбция на сytC. Желателно е адсорбцията да е наситена, защото това осигурява внасяне на максимален брой сytC глобули при фагоцитоза на една колоидна частица. При това повърхностният заряд на частиците трябва да е оптимален: достатъчно висок за осигури адсорбцията на голям брой глобули, но не твърде висок, за може адсорбираният сytC да презареди повърхността. Изхождайки от тези съображения, ние избрахме колоидни частици от глинестия минерал монтморилонит (ММ), който има рН-независим отрицателен заряд, дължащ се на изоморфни замествания с Fe^{2+} и Mg^{2+} йони в кристалната решетка, съставена от централен слой алуминиев оксид и два външни слоя силициев оксид. Тази структура определя плоската форма с дебелина 1 нм и големия размер (около 1 мкм) на колоидните частици. Трите порядъка разлика в размерите водят до големи стойности на съотношението площ/маса и на адсорбционната способност на ММ частици. Три пъти по-малката дебелина на ММ пластинка в сравнение с големите 3 нм белтъчни глобули позволява да се следи степента на адсорбция чрез масата на сytC-ММ частиците, която нараства с броя адсорбирани сytC глобули. Втора възможност предлага сумарният заряд на сytC-ММ комплекса поради противоположния заряд на ММ и сytC.

За достигане на целите на изследването са формулирани следните експериментални задачи:

1. Изследване на рН-зависимостта на сумарния електричен заряд на свободен цитохром С чрез методите на белтъчната електростатика и изоелектрично фокусиране.

2. Изследване концентрационната зависимост на адсорбция на cytC върху ММ пластинки чрез на масата, електрофоретичната подвижност и електрическата поляризуемост на cytC-ММ частиците.

3. Изследване на коагулационната стабилност на cytC-ММ суспензия.

4. Изследване на рН-зависимия заряд на cytC-ММ частиците.

5. Изследване на антираковото действие на cytC-ММ комплекса върху култура от метастазирани клетки от рак на дебело черво на човек.

За целта са използвани следните групи методи:

(1) Физикохимични методи: Електрическо светоразсейване, микроелектрофореза и изоелектрично фокусиране. Електрооптичният метод е основан на изменение на светоразсейването при ориентация на несферични частици в електрично поле и дава информация за електрическата поляризуемост, размера на частиците и коагулационната стабилност на суспензията. Електрофоретичната подвижност в постоянно поле дава най-пряка връзка с повърхностния заряд, а с това и със степента на адсорбция. Електрофоретичното фокусиране е стандартен метод за определяне на изоелектричната точка на белтъци в нативна конформация, основан на подвижността им в рН-градиент.

(2) Компютърни методи: белтъчна електростатика и моделиране.

Електростатиката на белтъци е основана на изчисляване на локалния електричен потенциал, създаван от зарядите на макромолекулата в нативната ѝ 3D-конформация, който потенциал определя реалната дисоционна константа K_a на всяка от йонируемите групи, а с това и рН-зависимостта на сумарния заряд.

(3) Биологични методи: цитотоксичност на ракова клетъчна култура.

При тази техника се оценява виталността чрез броене на живите и мъртви клетки след въздействие с cytC разтвор, ММ суспензия и cytC-ММ комплекс.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

2.1. Материали

Киселинно-модифициран монтморилонит (ММ) К10 с площ 220-270 м²/г (Sigma-Aldrich) е суспендиран и след озвучаване е изолирана фракция с размер 0,5 мкм чрез четирикратно диференциално центрофугиране. Използван е цитохром С (cytC) (Calbiochem) от сърце на кон. Суспензиите са с крайни концентрации 3 мг/л ММ и 0–10 мг/л cytC, рН 6–11 (КОН) и йонна сила 0–0,15 М КСl в тройно-дестилирана вода. За изоелектрично фокусиране са използвани IPG плаки с фиксирани амфолити и системата Ettan IPGphor 3. Фирмената клетъчна култура (ATCC® CCL-227) е чиста линия от метастазирани ракови клетки, изолирани от лимфен възел на човек с аденокарцином на дебелото черво.

2.2. Белтъчна електростатика

За пресмятане на сумарния заряд на свободен cytC са използвани програмите Probska (САЩ) и Blues (Италия), изчисляващи индивидуалните рK_a стойности и 16 „калкулатора” за изоелектричната точка с усреднени рK_a.

2.3. Микроелектрофореза

Електрофоретичната подвижност μ (скорост на миграция в постоянно електрично поле с сила E) според теорията на Смолуховски-Хюкел-Хенри е пропорционална на електрокинетичния потенциал ζ на колоидните частици. Коефициентът на пропорционалност зависи от относителната диелектрична проницаемост ϵ и вискозитета η на средата, и в известни граници е функцията на отношението на радиуса на частицата a към дебелината на двойния електричен слой δ (за сферична частица $f(a/\delta) = 2/3 - 1$):

$$\mu = (\epsilon_0 \epsilon / \eta) f(a/\delta) \zeta . \quad (1)$$

За измерване на μ е използван прибор за микроелектрофореза Mark II (Rank Brothers, UK) в който се измерва времето t , за което избрана частица изминава разстояние $l_{el} = 34,2$ мкм в плоска кварцова клетка с вътрешна дебелина 715 мкм и междуелектродно разстояние $d = 6,2$ см, на която се подава постоянно напрежение до $U = 100$ В с напрегнатост (сила) $E = U/d$ [В/см] при обръщане посоката на полето за всяка частица. Подвижността $\mu = l_{el} / \langle t \rangle E$ [м²В⁻¹с⁻¹] се изчислява от средното време $\langle t \rangle$ [с] за 20 + 20 единични частици (измерено в двете стационарни плоскости, в които електроосмотичният поток е нулев), като частиците се гледат под оптичен микроскоп в тъмно поле (ултрамикроскоп).

2.4. Светоразсейване в електрично поле

Съгласно теорията на Релей-Дебай-Ганс (РДГ), интензитетът I_0 на разсеяната под ъгъл θ светлина при преминаване през суспензия с тегловна концентрация c на диспергираното вещество, е пропорционален на масата M на колоидните частици и на коефициента на вътрешна интерференция $P(\theta)$:

$$I_0 = k_a c H M P(\theta) , \quad (2)$$

където: k_a е апаратурна константа, определена от разсейващия обем и телесния ъгъл на фотоприемника; H – оптичната константа на суспензията, определена от коефициента на пречупване на частиците n_1 и на средата n_0 и от дължината на вълната λ_0 във вакуум. Функцията $P(\theta)$ се определя от формата и относителния размер B/λ на частиците при дължина на вълната в средата $\lambda = \lambda_0/n_0$.

При прилагане на синусоидално електрично поле със сила E и честота ν , частиците с несферична форма се ориентират до степен $\Phi(\gamma, E, T, t)$ – функция на E , времето t след включване или изключване на полето, електрическата им поляризуемост γ и температурата T . В резултат на ориентацията се променя $P(\theta)$ и това води до промяна на интензитета на светоразсейване $\Delta I = I_E - I_0$ (със и без приложено поле). При ниски енергии на ориентация $\gamma E^2 \ll kT$, определени от термичната енергията kT и индуцирания диполен момент γE , стационарната стойност $\Delta I_s/I_0$ на електрооптичния ефект (ЕОЕ) е пропорционална на квадрата E^2 на полето, което позволява да се определи поляризуемостта γ на частиците от полевата зависимост $\Delta I_s/I_0 = f(E^2)$:

$$\Delta I_s/I_0 = [A(KB) / P(\theta)] \times \Phi(\gamma, E, T) = [A(KB) / P(\theta)] \times (\gamma E^2 / 15kT) , \quad (3)$$

където $KB = 2\pi (B/\lambda) \sin(\theta/2)$ за плоски частици (пластинки) с диаметър B .

След изключване на полето частиците се дезориентират с времето t със скорост, определена от размера B и формата им, както и от вискозитета η на средата при температура T , които определят коефициента на ротационна дифузия $D_r \sim kT/\eta B^3$ и релаксационното време $\tau = 1/6D_r$, за което $\Delta I_s/I_0$ спада e пъти (при 20°C : τ [мс] = $59B^3$ за плоски частици с диаметър B [мкм]):

$$\Delta I_t/I_0 = [A(KB) / P(\theta)] \times \Phi(\gamma, E, T, t) = (\Delta I_s/I_0) \exp(-t/\tau) , \quad (4)$$

Използвана е електрооптичната апаратура в ИФХ, която работи при фиксиран ъгъл $\theta = 90^\circ$ и клетка с платинови електроди с разстояние $d = 2,6$ см, към която от функционален генератор Wavetek-185 и усилвател Krohn-Hite-7500 се подава синусоидално напрежение до $U = 140$ В с честота $\nu = 10$ Хц – 1 МХц.

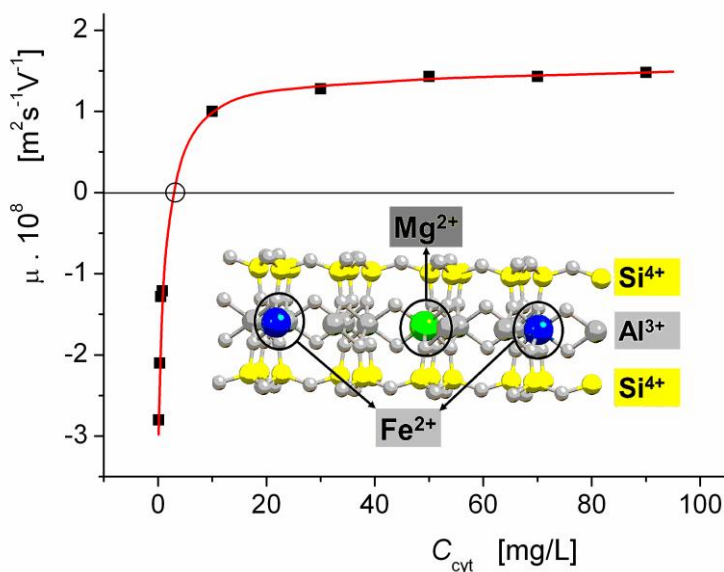
РЕЗУЛТАТИ

глава 3. Адсорбция на цитохром С върху частици от монтморилонит

В тази глава са изложени резултатите за адсорбцията на cytC върху ММ нанопластинки, изследвана чрез микроелектрофореза и електрическо светоразсейване при рН 6,5, където нетният заряд на белтъчните глобули е положителен. Коагулационната стабилност на суспензиите също е изследвана и са намерени условия за избягване на агрегация на cytC-ММ частиците.

3.1. Електрофоретична подвижност

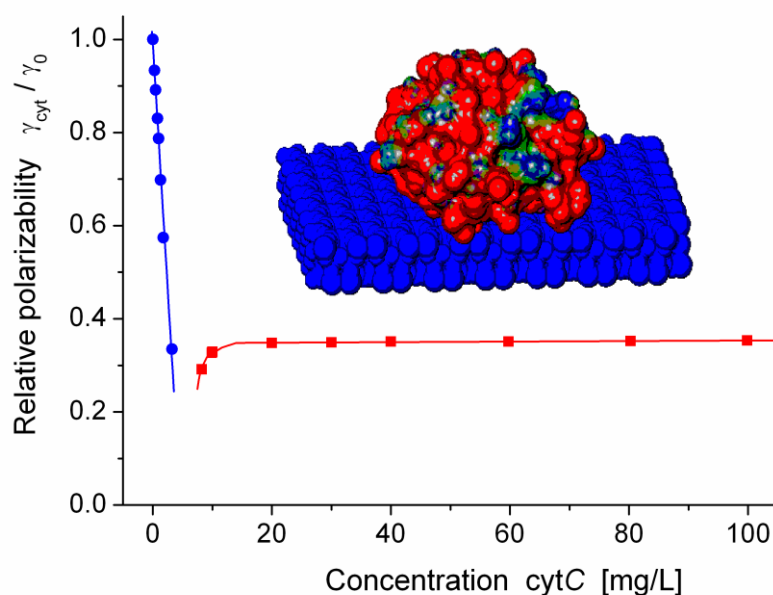
Електрофоретичната подвижност μ е пропорционална на повърхностния заряд и това дава възможност да се изследва адсорбцията на положително заредения cytC върху отрицателните ММ частици чрез зависимостта $\mu(C_{\text{cyt}})$ от концентрацията на белтъка C_{cyt} в суспензията, като степента на адсорбция отразява сумарния заряд на cytC-ММ частиците. Фиг. 1 показва две области: при ниски C_{cyt} отрицателният заряд намалява по абсолютна стойност, а след достигане на изоелектричната точка (ИЕТ, $\mu = 0$) cytC-ММ частиците се презареждат поради свръхеквивалентна адсорбция и зарядът нараства, но вече с положителен знак.



Фиг. 1. Кристална решетка на ММ ламела и електрофоретична подвижност μ в 3 мг/л ММ суспензия при концентрация C_{cyt} на cytC. ИЕТ е при $C_{\text{cyt}} \approx 3$ мг/л.

3.2. Електрическа поляризуемост

Електрическата поляризуемост γ отразява електрокинетичния заряд, определящ електроосмотичния поток, който ориентира частиците до степен $\Phi(\gamma, E)$ в електрично поле със сила E . Стойността на γ е пропорционална на сумарния заряд и показва степента на адсорбция на положително заредените cytC глобули върху отрицателно заредените ММ пластинки. Стойностите на γ са определени от наклона на полевата зависимост $\Delta I_s/I_0 \sim \gamma E^2$ (уравн. 3) в линейната ѝ част, където енергията на ориентация е ниска ($\gamma E^2 \ll kT$). Стационарният ЕОЕ ΔI_s е измерван при честота $\nu = 5$ кХц от платото на дисперсионната зависимост $\Delta I_s(\nu)$, където поляризацията успява да достигне равновесие за един полупериод на приложеното синусоидално електрично поле. Фиг. 2 показва фрагмент от cytC-ММ при рН 6 и намаляване на поляризуемостта с концентрацията C_{cyt} на белтъка до минимум, който съвпада с ИЕТ на електрофоретична подвижност μ (фиг. 1), това показва, че ориентацията на cytC-ММ частици се дължи на поляризация на противойоните в дифузната част на двойния електричен слой (ДЕС).

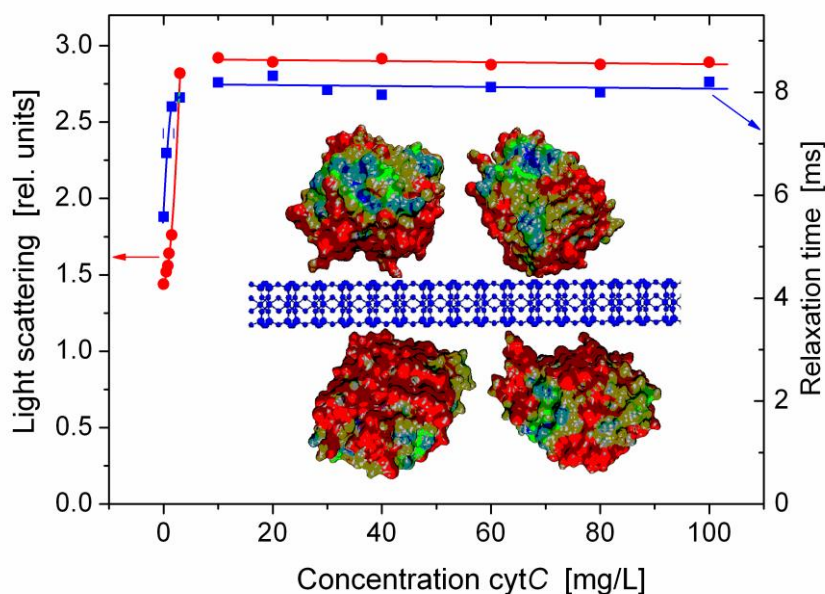


Фиг. 2. Зависимост на електрическата поляризуемост γ на cytC-ММ частици от концентрацията на cytC в суспензията, нормирана към γ_0 на голи ММ частици.

Платото при високите C_{cyt} на двете концентрационни зависимости $\mu(C_{\text{cyt}})$ и $\gamma(C_{\text{cyt}})$, (фиг. 1, 2) показва, че адсорбцията е наситена, монослойна, и има 8–9 глобули на 100 nm^2 , които окупират около $2/3$ от повърхността. В литературата такава плътност е постигана само при адсорбция в точката на нулев заряд (pI) и висока йонна сила, когато се образуват многослойни покрития от белтъци.

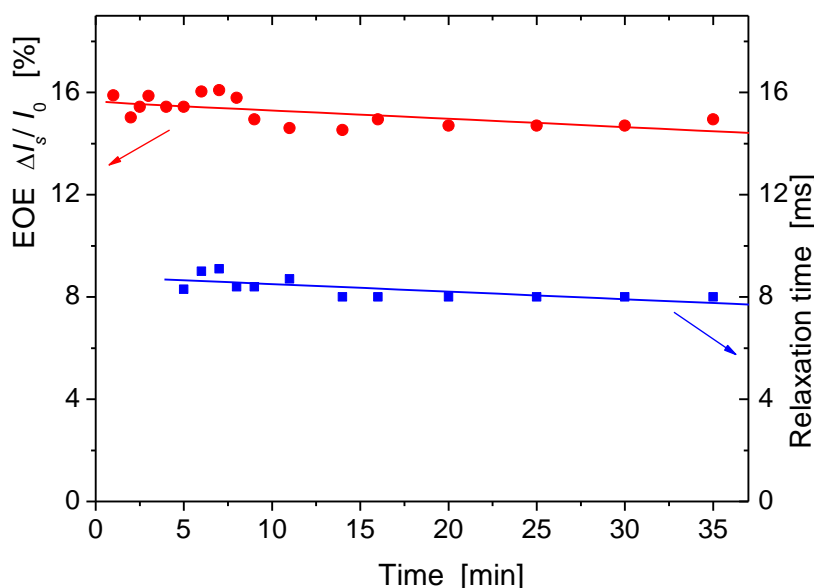
3.3. Коагулационна стабилност

Електрическата поляризуемост γ се определя както от повърхностната плътност на заряда, така и от формата и размера на частиците, и поради това за коректно измерване на γ е необходимо да се избегне агрегацията им. Коагулационната стабилност на cytC-ММ суспензия е изследвана чрез: масата, хидродинамичните (дифузионният коефициент) и електрическите (поляризуемостта) свойства на частиците. Първият способ е основан на зависимостта $I_0 \sim M$ на интензитета на разсеяната светлина I_0 от масата M на частиците (урав. 1), а вторият – тази на коефициента на ротационна дифузия $D_r \sim 1/B^3$ от големия размер B на частиците, измерен чрез релаксационното време $\tau = 1/(6D_r)$ (урав. 4). Третият използван способ се основава на силната зависимост $\gamma \sim B^{2-3}$ на поляризуемостта от дългия размер B и от формата на частиците, която определя надлъжната γ^{\parallel} и напречната γ^{\perp} й компоненти: $\gamma = \gamma^{\parallel} - \gamma^{\perp}$. При агрегация от типа лице-лице γ и B нарастват поради частичното застъпване на пластинките в агрегата, като с това нараства и степента на ориентация $\Phi(\gamma, E)$, което води до съответно нарастване на стационарния ЕОЕ в областта на ниските енергии на ориентация ($\gamma E^2 \ll kT$). Четвъртият способ е комбиниран: зависимостта $\tau(E^2)$ на релаксационното време τ от силата E на електричното поле, основана на различната степен на ориентация на малките (единични cytC-ММ частици) и агрегатите от тях.



Фиг. 3. Концентрационна зависимост на интензитета на светоразсейване I_0 при хаотична ориентация (лявата скала) и на релаксационното време τ в 3 мг/л ММ суспензия при концентрация C_{cyt} на cytC, и фрагмент от cytC-ММ частица.

Фиг. 3 показва нарастване на M и τ при ниски концентрации C_{cut} и плато при високи C_{cut} , което може да се дължи както на частична агрегация, така и на приноса на адсорбираните белтъчни глобули. В случай на агрегация процесът трябва да продължи с времето t , като и двата параметъра γ и τ трябва да нарастват при агрегация на ММ пластинките тип лице-лице. Но фиг. 4 показва отсъствие на времева зависимост, въпреки че всяка cutC-ММ частица преминава през точката на нулев сумарен заряд, където електростатичното отблъскване между частиците липсва. Отсъствието на агрегация ние обясняваме с бърза адсорбция на малките (3 нм) cutC глобули и два порядъка по-големите (0,5 μm) ММ пластинки, които не успяват да се доближат за времето, докато сумарният им заряд е близо до нула, т.е. с голямата разлика в коефициентите на транслационна дифузия. Полевата зависимост $\tau(E^2)$ на релаксационното време показва, че полидисперсността остава непроменена, а при агрегация би трябвало да нараства.



Фиг. 4. Зависимост на стационарния ЕОЕ I_s/I_0 и релаксационното време от τ от времето t след смесване на суспензия 3 мг/л ММ и разтвор 10 мг/л cutC.

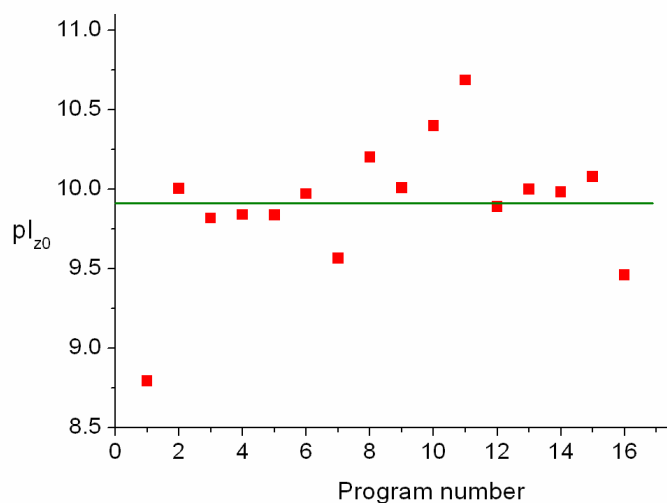
Отсъствието на времева и концентрационна зависимост на M , τ и $\gamma \sim \Delta I/I_0$ (с изключение на 1:1 cutC:ММ концентрации, където в ИЕТ възниква бърза коагулация) позволява нарастването на I_0 (фиг. 3) се отнесе към приноса ΔM на адсорбираните белтъчни глобули, регистрацията на което е възможна благодарение на съотношението 1:3 на дебелината на ММ пластинка към cutC диаметъра.

глава 4. Изоелектрична точка на свободен и адсорбиран цитохром с

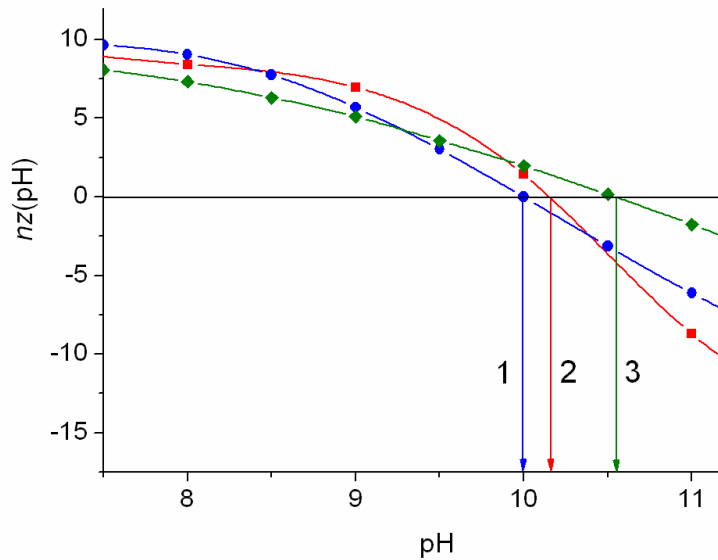
Адсорбцията на глобуларни белтъци върху заредена повърхност може да отмести дисоционните константи pK_a на йонизируемите групи, което води до изменение на нетния заряд и разпределението на електростатичното поле около белтъчната глобула. Изоелектричната точка pI се определя като pH при което има равенството на заредените положително NH_3^+ и отрицателно COO^- групи и е характерна за всеки белтък със специфичен набор на йонизируемите аминокиселинни остатъци. В тази глава са изложени резултатите за pH -зависимостта на нетния заряд на *cytC* (свободен в разтвор и адсорбиран върху ММ нанопластинки), изследван чрез четири различни метода. В литература pI на *cytC*, определен с различни експериментални методи, варира в широк диапазон: pH 9.0–10.65.

4.1. Белтъчна електростатика

Употребявани най-често, pI -калкулаторите дават твърде различни стойности (фиг. 5), тъй като използват pK_a константи, усреднени за много белтъци. За разлика от тях програмите за белтъчна електростатика отчитат всички електростатични взаимодействия и дават индивидуална pK_a стойност за всяка йонизируема група, повлияна от всички заряди в белтъчната глобула. При този компютърен метод се изчисляват електростатичните параметри, изхождайки от кристалографската структура, но не се отчита адсорбцията на малки йони като Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ и Cl^- , твърде важни във физиологично отношение. Използваните три програми дават pI -стойности, отличаващи се с 1,5 pH единици (фиг. 6).

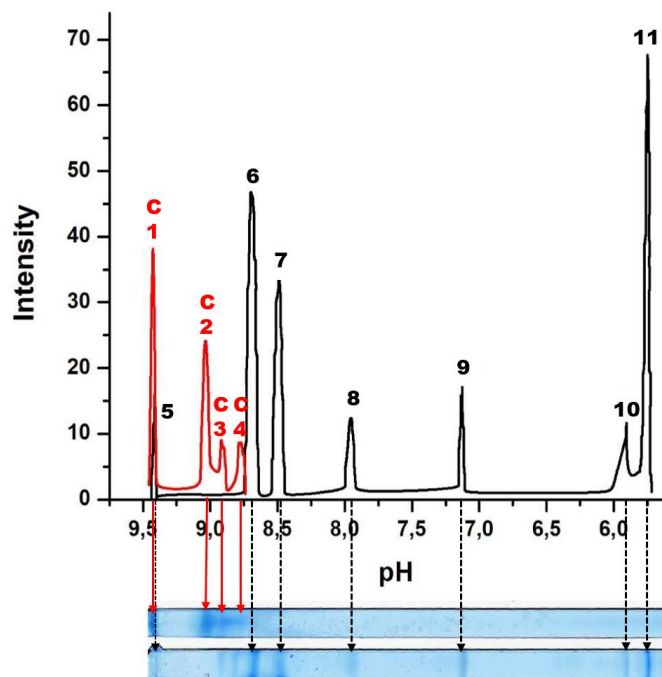


Фиг. 5. Точка на нулев заряд на *cytC*, изчислена с 16 pI -калкулатора с фиксирани pK_a константи. Средната стойност е pI 9,91 (хоризонталната линия).



Фиг. 6. pH-зависимост на нетния заряд n_z на нативна cytC глобула, изчислен с програмите RHEMTO (крива 1, pI_{nz} 9.99), Propka (крива 2, pI_{nz} 10.16), и Blueses (крива 3, pI_{nz} 10.55) за 1hrs кристалографска структура на cytC от сърце на кон.

4.2. Изоелектрично фокусиране

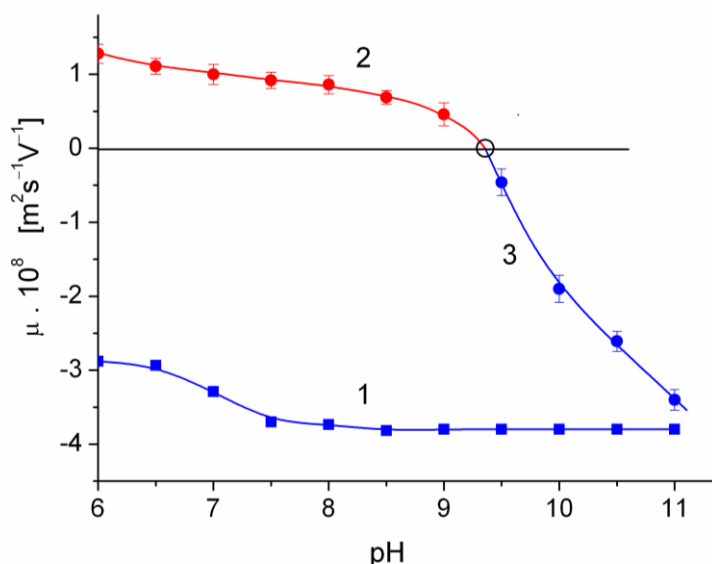


Фиг. 7. Изоелектрично фокусиране в гел с ковалентно свързани амфолити. Двете пътечки са с cytC (горната) и набор от стандартни белтъци (долната). Отгоре е разпределението на оптичката плътност за съответните ивици протеини.

Методът на изоелектрично фокусиране е основан на неподвижността на белтъчните глобули при електрофореза в гел с рН-градиент, в позиция, където ИЕТ на нативна белтъчна глобула съвпада с локалното рН, създавано от амфолити (заредени полимери). Въпреки, че е общоприет и е използваната съвременната техника с ковалентно свързани амфолити (избягват се неточностите при разпределението им в електрично поле в лабораторни условия), този метод не дава точни резултати за абсолютната стойност на рI. При това освен основната форма (С1, рI 9.44) се появяват и три допълнителни ивици (С2, С3, С4) (фиг. 7).

4.3. Микроелектрофореза

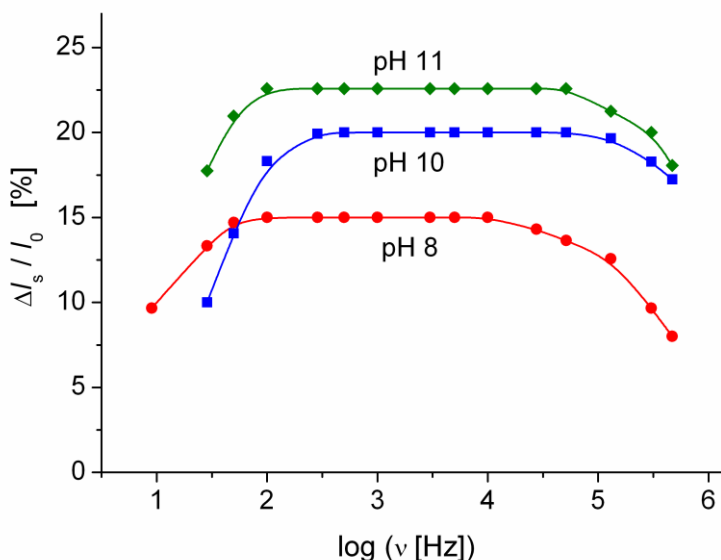
Изоелектричната точка (ИЕТ) на свободен сytС не може да се определи с съвременната техника за динамично светоразсейване поради малкия размер на глобулите, затова ние ги адсорбираме върху ММ пластинки и измерваме електрофоретичната подвижност на сytС-ММ частици с метода на електрофореза под микроскоп в тъмно поле. При рН 6 отрицателно заредените ММ нанопластинки придобиват положителен заряд, който става отрицателен при алкални рН, като ИЕТ е при рН 9,35. Тази стойност се отличава от рI 9.44 на свободен сytС само с 0,1 рН-единица, което показва, че електрокинетичният заряд се дължи почти изцяло на адсорбирания белтък. Това ние обясняваме с хидродинамично екраниране на гладката ММ повърхност от адсорбираните 3 нм-рови сytС глобули.



Фиг. 8. рН-зависимост на електрофоретичната подвижност μ на колоидни частици: ММ (крива 1) и сytС-ММ положително (крива 2) и отрицателно (крива 3) заредени. ИЕТ е при рН 9,35 (интерполирана към $\mu = 0$ стойност).

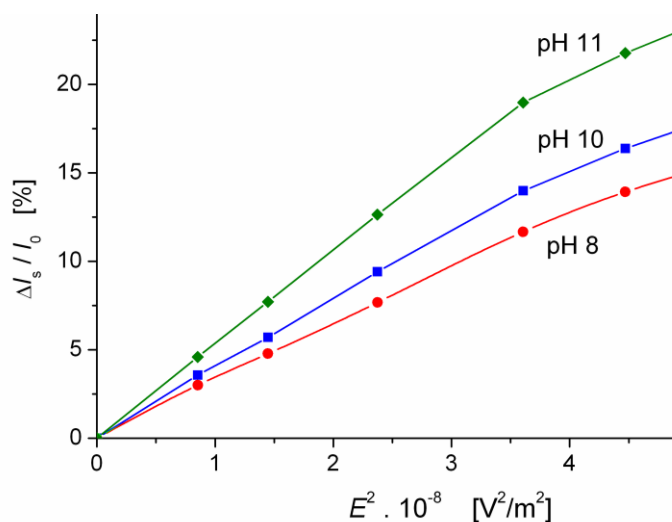
4.4. Светоразсейване в електрично поле

Електрическата поляризуемост γ при колоидни частици се дължи почти изцяло на поляризация на подвижните противойони в дифузната част на ДЕС, и това позволява електрооптичният метод да се използва за определяне на ИЕТ на адсорбиран белтък, която възможност досега не е използвана, въпреки че този метод дава богата информация, в това число за агрегацията на частиците. Предлаганата от нас процедура включва пет стъпки: (1) избор на честота на прилаганото електрично поле; (2) избор на подходяща сила на полето; (3) измерване на стационарния ЕОЕ в суспензии с различни рН; (4) определяне на електрическата поляризуемост; и (5) определяне на ИЕТ на адсорбирания белтък по минимума на рН-зависимостта на поляризуемостта.

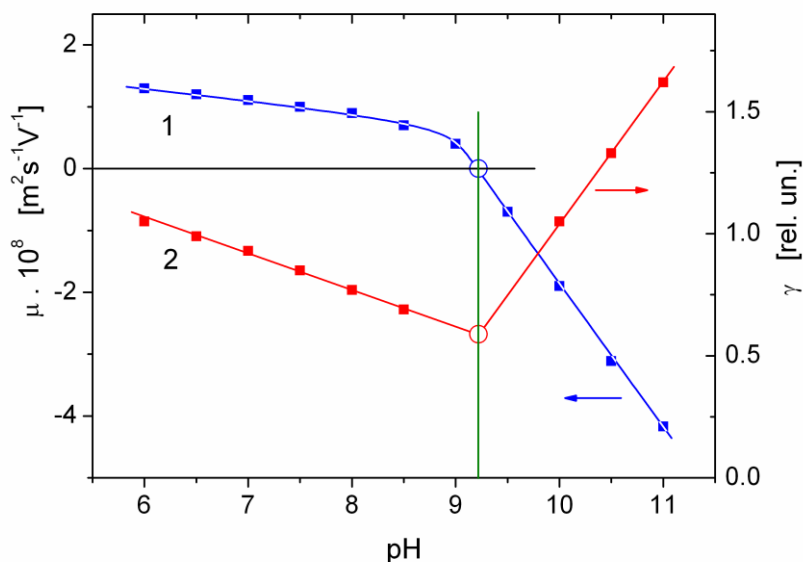


Фиг. 9. Зависимост на стационарния ЕОЕ ($\Delta I_s / I_0$) от честотата ν на приложеното синусоидално електрично поле при суспензии с рН под и над ИЕТ при рН 9,3.

Дисперсионната зависимост (фиг. 9) показва плато, където поляризацията на противойоните е равновесна, затова е избрана честотата $\nu = 5$ кХц, при която са провеждани измерванията на стационарния ЕОЕ ΔI_s . Полевата зависимост $\Delta I_s(E^2)$ показва линейност при напрегнатост до $E = 190$ В/см, в тази област енергията на ориентация γE^2 е малка спрямо термичната kT и това позволява поляризуемостта да се определи от наклона на правите $(\Delta I_s / \Delta I_0) = f(E^2)$ (фиг. 10). Тъй като количеството на противойоните е равно на повърхностния заряд, то стойността на γ е пропорционална на сумарния заряд на сytС-ММ частиците, т.е. на ММ нанопластинките с адсорбираните двустранно сytС глобули.



Фиг. 10. Зависимост на стационарния ЕОЕ ($\Delta I_s/I_0$) от квадрата E^2 на силата на приложеното електрично поле при суспензии с рН под и над ИЕТ при рН 9,3.



Фиг. 11. рН-зависимост на електрофоретичната подвижност μ и на електрическата поляризуемост γ на суспензии от cytC-ММ частици. С празни кръгчета са дадени стойностите, интерполирани към $\mu = 0$ и минимална стойност на γ .

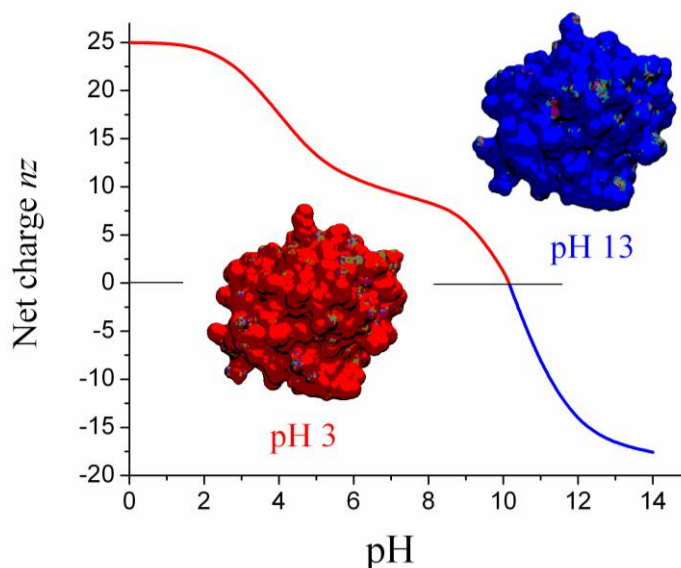
Двете рН-зависимости (фиг. 11) показват, че минимумът на електрическата поляризуемост $\gamma(\text{pH})$ съвпада с ИЕТ на $\mu(\text{pH})$ (нулева електрофоретична подвижност). Този факт доказва, че експериментално измеримата електрическа поляризуемост има електрокинетична природа и се дължи изцяло на противоионите към белтъчните глобули, въпреки, че те покриват само 2/3 от повърхността на ММ пластинка. Съвпадението на $\mu = 0$ и $\gamma = \min$ (рН 9.3) с рI 9.4 на cytC (фиг. 7) показва, че отрицателната повърхност на ММ пластинка (фиг. 8) е екранирана хидродинамично от адсорбираните cytC глобули, а не електростатично.

глава 5. Антираково действие на комплекса цитохром-монтморилонит

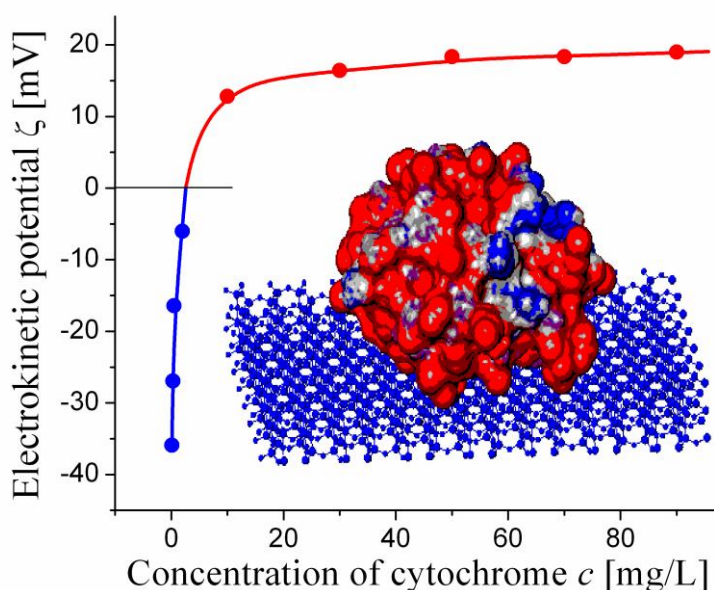
В тази глава са изложени резултатите за антираковото действие на *cytC*, адсорбиран върху ММ нанопластинки. Този ефект се определя от генетично детерминираната способност на *cytC* да запуска процеса на апоптоза (клетъчно самоубийство), когато попадне от митохондриите в цитоплазмата. Екзогенното му внасяне чрез микроинжекция има същия ефект, но *cytC* глобули не могат да проникнат в клетката, преодолявайки липидната мембрана, тъй като са водоразтворими. Затова използваме способността на раковите клетки да фагоцитират колоидни частици, като ги обгръщат с външната си мембрана. Ефективността на това действие се определя от размера и заряда на частиците, затова те трябва да са с подходяща геометрия (форма и размери) и положително заредени, за да се адсорбират върху отрицателно заредената клетъчна мембрана преди да бъдат погълнати от клетката. Но колоидната частица трябва изначално да е отрицателно заредена, за да адсорбира положително заредените *cytC* глобули. За да удовлетворим тези условия, сме избрали ММ нанопластинки с размер 0,5 мкм, като адсорбцията трябва да презареди частиците ММ, и да е при ниска йонна сила, за да се избегне агрегацията и с това размерът на частиците да стане твърде голям. За оптимален размер, суспензията е фракционирана чрез центрофугиране и адсорбцията е провеждана при неутрално рН, подходящо съотношение белтък /частици и концентрация на ММ суспензия, като адсорбцията е наситена, *cytC*-ММ комплексът придобива положителен заряд и се избягва агрегацията. За избора на подходящи условия са използвани резултатите, описани в глава 3.

5.1. Заряд, електростатичен и електрокинетичен потенциал

Зависимостта електростатичния заряд на *cytC* глобула на свободен белтък във воден разтвор (фиг. 12) показва две стъпала, които се дължат на дисоциация на карбоксилните ($\text{COOH} \leftrightarrow \text{COO}^- + \text{H}^+$) и аминокиселинни остатъци, достъпни за хидроксониевите йони (H_3O^+). Малкият наклон на $nz(\text{pH})$ -зависимостта между двете стъпала показва, че този рН-диапазон е най-подходящ за провеждане на адсорбцията, тъй като *cytC* глобулите са положително заредени и не е необходимо добавянето на киселина, което би увеличило йонната сила и с това вероятността от агрегация на частиците.



Фиг. 12. pH-зависимост на нетния заряд nz и молекулен модел с разпределение на потенциала (положителен при pH 3 и отрицателен при pH 13) по повърхността на белтъчната глобула, изчислени с програмата ProBka за 1hrs кристалографска структура на макромолекула cytC, изолиран от сърце на кон.



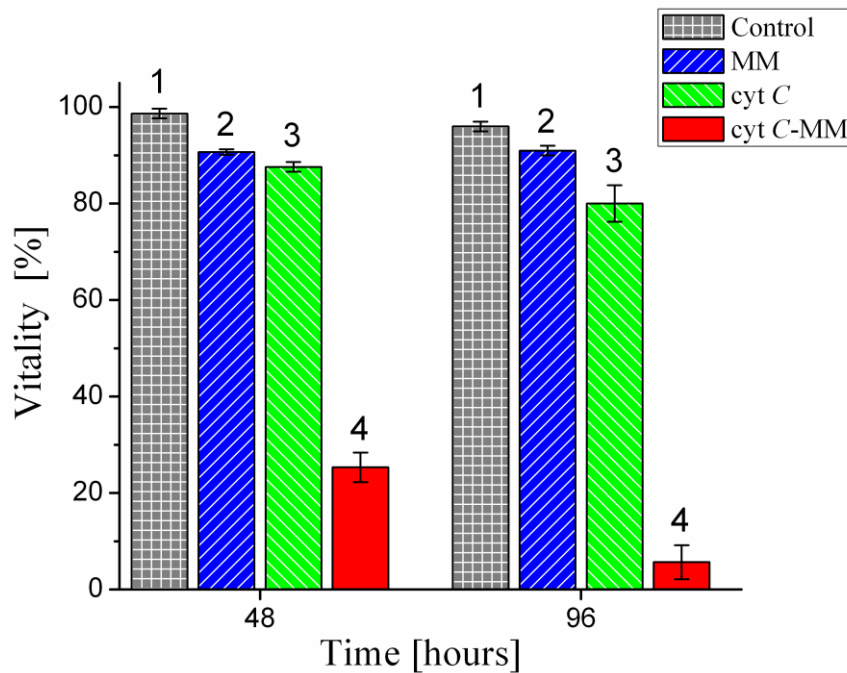
Фиг. 13. Зависимост на електрокинетичния потенциал (изчислен по урав. (1) от измерената електрофоретична подвижност μ) на cytC-ММ частици от концентрацията на cytC в суспензията. *Вставка:* Молекулен модел на cytC глобула, адсорбирана върху ММ квази-двумерен кристал и разпределение на потенциала по повърхността на белтъчната глобула: положителен (червен цвят), отрицателен (син) и неутрален (бял), изчислени за нативен cytC при pH 6.

За избор на подходящо съотношение белтък/частици е изследвана степента на адсорбция на cytC върху ММ нанопластинки чрез концентрационната зависимост $\mu(C_{\text{cyt}})$ на електрофоретичната подвижност μ от концентрацията C_{cyt} в суспензията, като е изчислен електрокинетичният потенциал на cytC-ММ нанопластинки (фиг. 13). Резултатът показва, че адсорбцията е близо да насищане при 10 мг/л cytC в 3 мг/л ММ суспензия. Това съотношение е изгодно с това, че в суспензията не остава съществено количество свободен белтък, и затова то е избрано за изследване на антираковото действие на cytC-ММ частици.

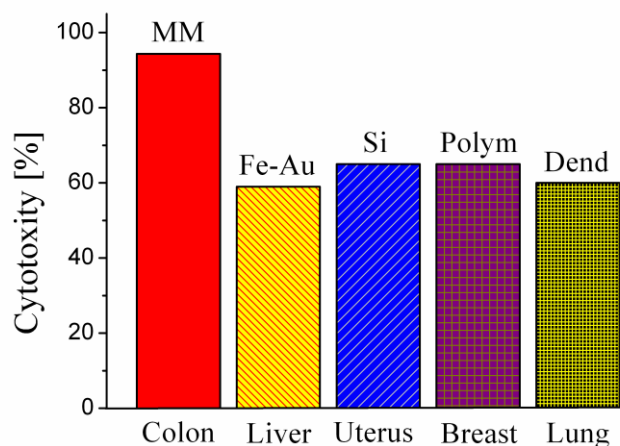
5.2. Цитотоксичен ефект

Ефективността на антираково действие на cytC, адсорбиран върху ММ нанопластинки е изследвана чрез цитотоксичния ефект върху клетъчна култура от рак на дебелото черво (клетките са изолирани от лимфен възел на болния, т.е. те са метастазиращи). За целта културата е оцветявана с трипан-синьо, като мъртвите клетки се оцветяват поради проникване на багрилото в тях, а живите (след отмиване) остават неочветени. За контрола са използвани култури с добавяне на изотоничен cytC разтвор или ММ суспензия в 0,15 М NaCl. Изброявани са живите клетки (1280 в пробата, 220 в контролите) 48 и 96 часа след третиране със съответния разтвор/суспензия. Експериментът е повторен трикратно. Резултатът показва, че разтворът на cytC и суспензията на ММ частици, сравнени с контрола с добавен само физиологичен разтвор, нямат значимо цитотоксично действие. Но суспензията от cytC-ММ частици показва силно изразен цитотоксичен ефект, който нараства с времето, достигайки 94% на 96-я час (фиг. 14).

Сравняването с литературни данни показва, че действието на cytC, адсорбиран върху ММ нанопластинки, е значително по-силно от постигнатото с други колоидни частици-носители при въздействие върху туморни клетки от други органи. Този резултат е постигнат благодарение на избора на колоидни частици с подходящи: форма (плоска), размер (0,5 мкм), заряд (отрицателен) и условия за адсорбция (наситена, рН 6, без добавен електролит), при което cytC образува плътен монослой от cytC-глобули, ММ пластинките придобиват положителен сумарен заряд, адсорбират се електростатично върху отрицателно заредената цитоплазматична мембрана на туморните клетки и ефективно се фагоцитират.



Фиг. 14. Виталност на клетъчна култура (процент живи клетки от контролния им брой в началото на експеримента). Делът на живите клетки в културата с cytC-MM частици (изброените на микроскопски снимки клетки са 3840 от три проби) е 25% и 6%, съответно 48 и 96 часа след добавянето на суспензията.



Фиг. 15. Цитотоксичен ефект на cytC имобилизиран върху различни колоидни частици: (MM) 60 мг/л MM, метастазирал рак на дебело черво (настоящото изследване); (Fe-Au) 25 мг/л хибридни наночастици (желязна сърцевина и златна черупка), рак на черен дроб; (Si) 37 мг/л мезопорести силициеви наночастици, рак на маточната шийка; (Polym) 3,2 мг/л полимерни наночастици; рак на гърдата; (Dend) 0,12 мг/л дендритни наночастици, рак на бял дроб.

ИЗВОДИ

1. Изчисляването на нетния заряд на глобуларния белтък сytC с методите на белтъчна електростатика показва плато в диапазона рН 6–8, където той е положително зареден и може електростатично да се адсорбира върху отрицателно заредена повърхност. Изчислената точка на нулев заряд е при рН 10.

2. Зависимостта на електрофоретичната подвижност $\mu(C_{\text{cvt}})$ и на електрическата поляризуемост $\gamma(C_{\text{cvt}})$ от концентрацията C_{cvt} на сytC показват, че при рН 6 положително заредените белтъчни глобули се адсорбират върху отрицателните ММ пластинки, като сумарният заряд става положителен. Точката на презареждане е при съотношение 1:1 на тегловите концентрации, а наситена адсорбция се наблюдава над 10:3 сytC:ММ в суспензията.

3. Наличието на плато на концентрационните зависимости $\mu(C_{\text{cvt}})$ и $\gamma(C_{\text{cvt}})$ в широк интервал от концентрации C_{cvt} на белтъка показва че, адсорбцията на сytC върху ММ пластинки е наситена и монослойна, като е избегната повърхностната агрегация на белтъчните глобули благодарение на заряда на сytC и много ниската йонна сила в отсъствието на буфери и индиферентни електролити.

4. Суспензията от сytC-ММ частици е стабилна, агрегация се появява само в точката на презареждане, както показват концентрационните зависимости на интензитета на светоразсейване $I_0(C_{\text{cvt}})$ при хаотична ориентация, релаксационното време $\tau(C_{\text{cvt}})$ и на негова зависимост $\tau(E^2)$ от квадрата на електричното поле, както и времевите зависимости на $\tau(t)$ и на стационарния ЕОЕ $(\Delta I_s/I_0)(t)$.

5. Интензитетът на статично светоразсейване при наситена адсорбция на сytC показва, че масата на ММ пластинки нараства с около 50 %, това означава, че тактоидите на използвания ММ във водна среда се разпадат до моноламели и че на 100 nm^2 се падат 8–9 сytC глобули, заемащи 2/3 от повърхността.

6. рН-зависимите минимална електрическа поляризуемост и нулева електрофоретична подвижност на сytC-ММ съвпадат с ИЕТ точка на свободен сytC, следователно белтъчните глобули са неориентирани върху ММ повърхност.

7. Експериментите с клетъчна култура от метастазирал рак на човешко дебело черво показват, че сytC-ММ частиците имат силен цитотоксичен ефект, достигащ 94 % след 96 часа, който е с 1/3 по-висок от описания в литературата с други колоидни частици-носители на сytC и с по-малко опасни видове рак.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Единството на природата изисква даден обект или явление да се изследва всестранно, но след епохата на енциклопедистите това не става поради силната диференциация в науката, използването на специфични методи и ограничения интелект на обикновения изследовател. Тази дисертация се получи интердисциплинарна благодарение на обстоятелствата: докторантура в секцията по колоидна химия на ИФХ, щатна работа в лаборатория за стволови клетки в болницата по хематологични болести, и биофизичното образование на автора, получено в СУ „Кл. Охридски“. Темата на докторантурата, изначално формулирана като „Изследване на електричните свойства на глобуларни белтъци, адсорбирани върху колоидни частици“ (съвместно ръководство на доц. А. Живков и проф. Б. Атанасов от ИОХ-БАН), означаваше центърът да падне върху предполагаемите промени на белтъчната глобула при адсорбцията ѝ върху твърда повърхност. Но моделирането с методите на белтъчната електростатика показва, че зарядът на повърхността не оказва значимо влияние върху дисоционните константи и цялото електростатично поле на белтъчната глобула. Компютърното изследване трябваше да бъде съчетано с физикохимичен експеримент, като критерий беше избрана ИЕТ на белтъка, отразяваща баланса положителните и отрицателните заряди. С използваните методи на електрофореза и електрооптика на колоидни частици се определя електрокинетичния заряд, това означава, че ИЕТ на адсорбиран белтък трябва да е различна в зависимост от ориентацията на глобулите. За сравнение беше използвана съвременна техника за изоелектрично фокусиране. Но експериментите показаха, че ИЕТ е същата за свободен и адсорбиран cytC , следователно в условията на нашия експеримент белтъчните глобули са адсорбирани без строга ориентация. Този резултат дава възможност да се прилагат колоид-химичните методи да определяне на ИЕТ на белтъци чрез рН-зависимостта на заряда на колоидни частици при наситена адсорбция. Знанието за ключовата роля на cytC в процеса на апоптоза (блокирана при раковите клетки) и биофизичните механизми на фагоцитоза бяха използвани за внасяне на екстрацелуларен cytC в ракови клетки (не проникващ в свободно състояние), бидейки адсорбиран върху ММ нанопластинки. Експериментите с ракова клетъчна култура от метастазирал рак на дебело черво показа 96 % смъртност при достигнати от други автори 60–65 % с други колоидни частици. Този резултат е постигнат благодарение на избора на колоидни частици и оптимална адсорбция на cytC върху ММ, изследвана методите на колоидната химия.

ПРИНОСИ

1. Изчислена е рН-зависимостта на нетния заряд на глобуларния белтък цитохром *c* (cytC), която показва точка на нулев заряд (ТНЗ) рI 10и плато в диапазона рН 6–8, подходящо за електростатична адсорбция върху отрицателно заредената повърхност на глинестия минерал монтморилонит (ММ).

2. Установено е, че при наситена белтъчна адсорбция пластинките ММ се презареждат положително, придобивайки заряда на cytC глобули при рН 6.

3. Чрез статично светоразсейване на комплекса cytC-ММ е установено, че използваният ММ се състои от моноламели, а не от тактоиди с няколко ламели.

4. При неутрално рН и отсъствие на електролити плътността на положително заредените глобули cytC върху ММ повърхност е близка до теоретичната за монослой. С това е опровергано общоприетото мнение, че за да се достигне наситена адсорбция, трябва да се работи в ИЕТ на белтъка и при висока йонна сила, за да се екранира електростатичното отблъскване между глобулите.

5. Установено е, че определените с микроелектрофореза и електрическо светоразсейване ИЕТ на cytC-ММ колоидни частици при наситена адсорбция почти съвпадат с ИЕТ на свободен нативен cytC, определена с изоелектрично фокусиране. Това означава, че белтъчните глобули са неориентирани върху повърхността и че тези колоидни методи могат да се използват за определяне на ИЕТ и на други белтъци, при това без използване на буфери и индиферентни електролити, отместващи истинската ИЕТ поради адсорбция на йоните им.

6. Установено е, че минимумът на електрическата поляризуемост съвпада с нулевата електрофоретична подвижност. Това доказва електрокинетичната природа на електроориентационния ефект и в случая на адсорбирани глобули.

7. При наситена адсорбция заредената повърхност на колоидната частица се екранира хидродинамично от адсорбираните белтъчни глобули, което следва от съпадението на рН-стойностите на нулева електрофоретична подвижност на комплекса cytC-ММ и неутрално-заредените в ИЕТ макромолекули на cytC.

8. Установено е, че cytC, адсорбиран върху ММ колоидни частици, води до почти пълна гибел на клетъчна култура от метастазирал рак на дебело черво, като цитотоксичният ефект е с 1/3 по-висок от описания в литературата с други колоидни частици-преносители на cytC и с по-малко опасни видове рак.

КОНФЕРЕНЦИИ

Резултатите, включени в дисертацията, са докладвани лично от автора на 28 семинари, колоквиуми, национални и международни конференции:

- Осем Колоквиума на секция „Повърхности и колоиди“ ИФХ: два през 2013 г, три през 2014 г., един през 2015 г. и два през 2019 г.;
- Четири семинара за млади учени в ИФХ – 2012, 2013, 2014, 2015 г.
- Три национални конференции по химия за студенти и докторанти – Факултет по химия и фармация „СУ Св. Климент Охридски“ – 2009, 2012, 2015 г.
- Една заключителна конференция по проект № BG051PO001-3.3.06-0038
- Два национални конгреса: по хематология – 2015 г. и на физиците в България – 2016 г.
- Три национални конференции с международно участие – Варна (2008 и 2009 г.) и Плевен (2014 г.)
- Две юбилейни конференции с международно участие – Биологически факултет „СУ Св. Климент Охридски“ 2009, Институт по молекулярна биология „акад. Р. Цанев“ – БАН -2015 г.

- Пет международни конференции:

1. Sixth International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries – Chemistry and 21st century challenges – “Science and Innovation”, 10-14.09.2008, Sofia, Bulgaria, постер.

2. International Conference „Biomolecules and nanostructures - 4”, 15-19.05.2013, Pultusk, Poland, постер.

3. International Conference „ELKIN 2014”- Gent, Belgium, 20-23.05.2014, два постера.

4. IV International Colloids Conference: Surface Design and Engineering, Madrid, Spain, 15-18.06.2014, постер.

5. 10th Balkan day of hematology 23.10.2015, постер.

ПУБЛИКАЦИИ

1. S.H. Hristova, A.M. Zhivkov, Adsorption of cytochrome *c* on montmorillonite nanoplates: protein concentration dependence, *J. Colloid Interface Sci.* 446 (2015) 252-262, [Q1](#), [IF 5.09](#), студия, 8 цитата от чужди автори.
2. S.H. Hristova, A.M. Zhivkov, Isoelectric point of free and adsorbed cytochrome *c* determined by various methods, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 174 (2019) 87-94, [Q1](#), [IF 4.27](#), студия.
3. S.H. Hristova, A.M. Zhivkov, Electrooptical determination of the isoelectric point of globular proteins: cytochrome *c* adsorbed on montmorillonite nanoplates, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 176 (2019) 480-387, [Q1](#), [IF 4.27](#), студия.
4. S.H. Hristova, A.M. Zhivkov, Cytotoxic effect of exogenous cytochrome *c* adsorbed on montmorillonite colloid particles on colon cancer cell culture, *Compt. rend. Acad. bulg. Sci.* (2019) N2, 198-203, [Q2](#), [IF 0.27](#), статия.

