

Софийски Университет „Св. Климент Охридски“

Физически Факултет



ДИПЛОМНА РАБОТА

*ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНО - КВАЛИФИКАЦИОННА СТЕПЕН „БАКАЛАВЪР“*

на Джулия Погосян

Специалност: Медицинска Физика

Фак. № 7PH8000011

**Тема: „Приложение на образната елипсометрия за
изследване взаимодействието на милтефозин с
липидни моделни системи“**

Научен ръководител:

гл. ас. д-р Лилия Владимирова- Михалева


Lilia Strahilova
Vladimirova-
Mihaleva
2026.09.10
18:54:39 +03'00'

Съдържание

Увод	3
Цели и задачи	4
Основни съкращения	5
1. Обзорна част	6
1.1. Основни понятия и методи в елипсометрията	6
1.1.1. Основни понятия на елипсометрията	6
1.1.2. Източници, използвани в елипсометрите	9
1.1.3. Основни видове елипсометрия	9
1.2. Липидни моделни системи	11
1.3. Анализ на взаимодействието на алкилфосфохолини с клетъчни култури и мембранни аналози.....	15
2. Специална част	20
2.1. Материали	20
2.2. Методи.....	21
3. Резултати и дискусия	23
4. Заключение	31
5. Приноси на дипломната работа	32
6. Литература	33

Увод

Съвременните биофизични изследвания все по-често използват моделни системи, чрез които сложната организация на клетъчните мембрани може да бъде изучавана при контролирани експериментални условия. Такива системи позволяват да се проследи влиянието на отделни липидни компоненти върху структурата, хомогенността и стабилността на мембранноподобни слоеве.

Особен интерес представляват взаимодействията между мембранно активни лекарствени молекули и липидни структури. Милтефозинът е алкилфосфолипид с изразена способност да взаимодейства с клетъчни мембрани и липидни домени, поради което неговото поведение в моделни системи е важно за разбирането на възможните механизми на действие.

Образната елипсометрия е подходящ метод за такъв тип изследвания, тъй като съчетава количествено определяне на оптичната дебелина с пространствено картографиране на повърхността. Методът е безконтактен, не изисква флуоресцентно маркиране и позволява да се сравняват измененията в един и същ тип липиден филм преди и след третиране.

Настоящата дипломна работа е насочена към оценка на приложимостта на образната елипсометрия за изследване на взаимодействието на милтефозин с липидни моделни системи на основата на лецитин, холестерол и сфингомиелин. Основният акцент е поставен върху промените в дебелината, морфологията и пространствената хомогенност на липидните филми след експозиция на милтефозин.

Цели и задачи

Целта на настоящата дипломна работа е да се изследва приложимостта на образната елипсометрия като безконтактен оптичен метод за проследяване на взаимодействието на милтефозин с липидни моделни системи с различен състав. Чрез анализ на промените в дебелината, морфологията и пространствената хомогенност на липидните филми се цели да се оцени влиянието на милтефозин върху мембранноподобни структури и потенциалът на метода за изследване на лекарствено-мембранни взаимодействия.

За постигането на тази цел са поставени следните задачи:

1. Да се направи литературен преглед на физичните основи, възможностите и ограниченията на образната елипсометрия при изследване на тънки слоеве и биомембранни моделни системи.
2. Да се анализират литературни данни за взаимодействието на милтефозин и други алкилфосфолипиди с клетъчни мембрани, липидни моделни системи и мембранни аналози.
3. Да се подберат подходящи липидни състави и концентрации на милтефозин за експериментално изследване, съобразени с данни от предходни биофизични и клетъчни изследвания.
4. Да се подготвят липидни моделни системи върху твърди подложки и да се проведат елипсометрични измервания преди и след третиране с милтефозин.
5. Да се обработят получените елипсометрични данни и да се анализират измененията в дебелината, морфологията и хомогенността на липидните филми.
6. Да се оцени доколко образната елипсометрия е подходящ метод за изследване на взаимодействието между милтефозин и липидни моделни системи.

Основни съкращения

APL – алкилфосфолипиди

DMSO – Dimethyl sulfoxide

ErPC3 – еруфозин

ЕЦМ – екстрацелуларен матрикс (извънклетъчна среда)

HePC – милтефозин

PBS – фосфатен буфер (Phosphate-buffered saline)

1. Обзорна част

В обзорната част са разгледани теоретичните и експерименталните основания на настоящото изследване. Първо са представени основните принципи на елипсометрията и особеностите на образната елипсометрия като метод за анализ на тънки слоеве. След това са обобщени структурните характеристики на липидните моделни системи, които ги правят подходящи за имитиране на биологични мембрани. В последната част е разгледана литературата за алкилфосфолипидите и по-специално за милтефозина като мембранно-активно съединение.

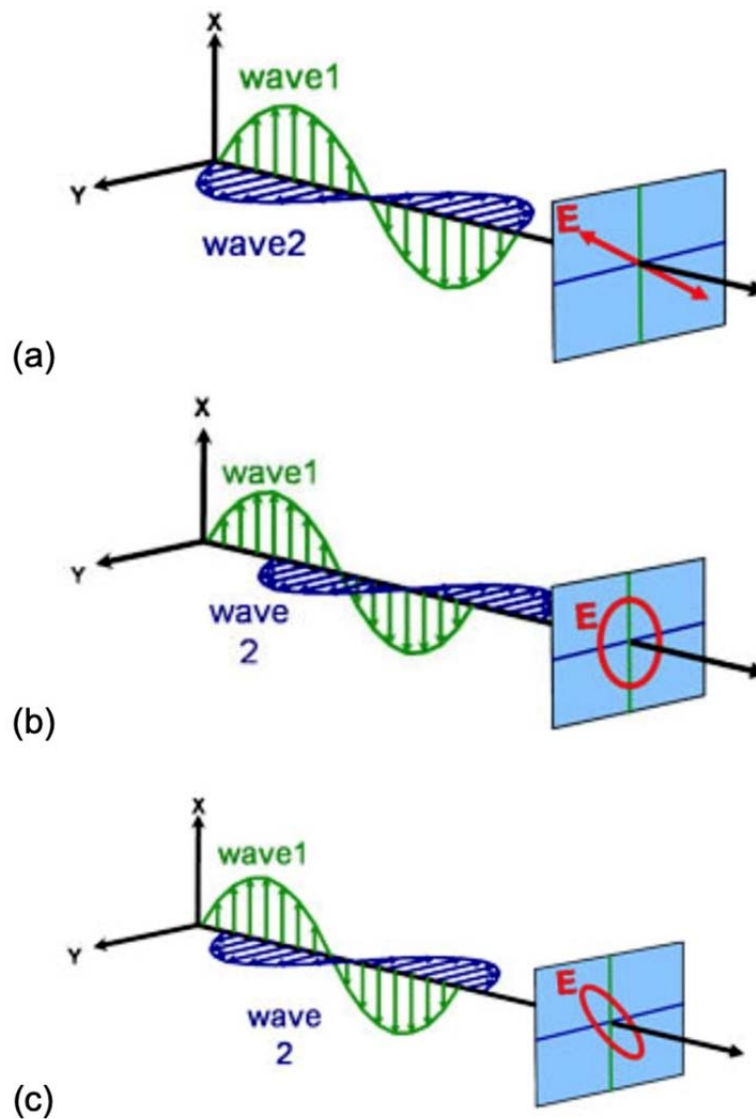
1.1. Основни понятия и методи в елипсометрията

1.1.1. Основни понятия на елипсометрията

Елипсометрията е оптичен метод, при който информация за изследваната повърхност се получава чрез анализ на промяната в поляризационното състояние на светлината след отражение или преминаване през пробата. Наименованието произлиза от елиптичната поляризация, а исторически развитието на метода се свързва с работите на Paul Drude от края на XIX век. Терминът „елипсометрия“ започва да се използва през XX век и днес обозначава група високочувствителни методи за характеризиране на тънки слоеве, повърхности и многослойни структури [1]

В промишлеността елипсометрията намира широко приложение при контрол на полупроводникови структури, оптични покрития, плоскопанелни дисплеи, устройства за съхранение на данни и биосензори. Предимството на метода е, че позволява определяне на дебелина и оптични константи без механично увреждане на пробата, което е особено важно при изследване на тънки и чувствителни слоеве.

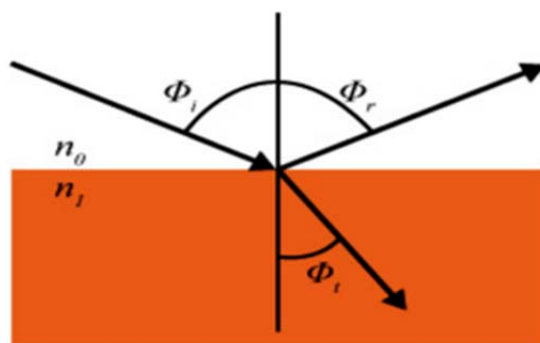
Поляризацията описва ориентацията и фазовата връзка между електричните компоненти на светлинната вълна. Когато две взаимно перпендикулярни компоненти са в една и съща фаза, светлината е линейно поляризирана. При фазова разлика 90 градуса и еднакви амплитуди се получава кръгова поляризация. В най-общия случай амплитудите и фазовата разлика са произволни и резултатът е елиптична поляризация, която е в основата на елипсометричния анализ.



Фигура 1. Комбиниране на две взаимно перпендикулярни светлинни вълни, илюстриращо линейна, кръгова и елиптична поляризация.

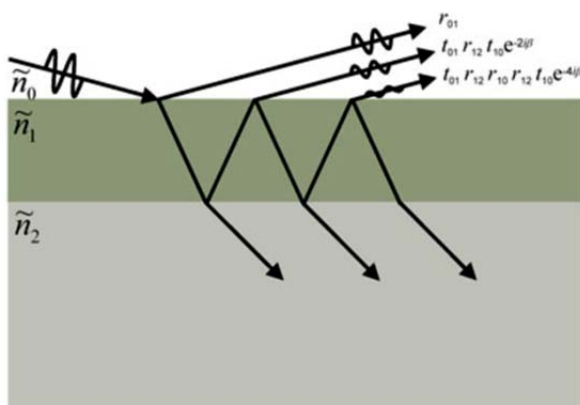
Елипсометричните измервания обикновено се извършват в режим на отражение. При падане на светлина върху граница между две среди част от лъча се отразява, а друга част се пречупва. Ъглите на падане, отражение и пречупване се определят от закона на Снелиус, а промяната в амплитудата и фазата на s- и p-поляризираните компоненти се описва чрез уравненията на Френел [2].

$$n_0 \sin(\Phi_i) = n_1 \sin(\Phi_t) \quad (1)$$



Фигура 2. Отражение и пречупване на светлината при границата между две среди съгласно закона на Снелиус [2].

При тънки слоеве отражението се формира не само от горната повърхност, но и от всяка следваща граница между материалите. Получените отразени и пречупени лъчи интерферират, като резултатният сигнал зависи от дебелината на слоя, комплексния показател на пречупване и оптичния модел на системата. Затова елипсометрията е особено чувствителна към малки промени в дебелината и оптичните свойства на филма.



Фигура 3. Отражение и пречупване на светлината в тънък филм. Интерференцията между отделните лъчи се определя от фазата и амплитудата на електричните полета, а приносът им се описва чрез коефициентите на Френел [2].

В елипсометрията основно значение имат двете поляризационни компоненти спрямо равнината на падане. s-поляризираната светлина има електричен вектор, перпендикулярен на равнината на падане, докато p-поляризираната светлина има електричен вектор, разположен в тази равнина. Съотношението между комплексните коефициенти на отражение за двете компоненти се изразява чрез елипсометричните параметри Ψ и Δ . Те не дават директно дебелината на слоя, а се интерпретират чрез

оптичен модел, в който се задават структурата на слоевете и техните оптични характеристики.

1.1.2. Източници, използвани в елипсометрите

Изборът на светлинен източник определя чувствителността, пространствената разделителна способност и спектралния обхват на елипсометричното измерване. Лазерите осигуряват висока интензивност и добре колимиран лъч, което ги прави подходящи при измервания в малки области или при условия, близки до ъгъла на Брюстер. Недостатъкът им е, че работят при една или няколко фиксирани дължини на вълната.

При спектралната елипсометрия се използват широколентови източници, най-често дъгови лампи, които покриват голям интервал от дължини на вълните. Това позволява едновременно извличане на информация за дебелината и дисперсията на оптичните константи. Тези източници обаче имат по-ниска насоченост и по-трудно се фокусират в малка област. На практика изборът между лазерен и широколентов източник зависи от задачата: пространствена локализация, спектрална информация или комбинация от двете.

1.1.3. Основни видове елипсометрия

Елипсометричните методи могат да се разграничат по няколко признака. Според използвания спектрален обхват се различават едновълнова и спектроскопска елипсометрия. Едновълновата елипсометрия използва монохроматичен източник, например He-Ne лазер с дължина на вълната 632,8 nm, и е подходяща за бързи измервания върху сравнително добре дефинирани системи. Спектроскопската елипсометрия работи в широк спектрален диапазон и позволява по-надеждно определяне на параметрите на оптичния модел, тъй като регресионният анализ използва информация от целия измерен спектър [3]

Според оптичните свойства на пробата се различават стандартна и генерализирана елипсометрия. Стандартната елипсометрия е приложима при изотропни или достатъчно прости системи, при които няма преобразуване между s- и p-поляризацията. Генерализираната елипсометрия се използва при анизотропни, грапави или оптически по-сложни образци, където е необходимо пълно описание на поляризационната трансформация.

От математична гледна точка взаимодействието на светлината с пробата може да се описва чрез формализма на Джоунс или чрез формализма на Мюлер. Формализмът на Джоунс е достатъчен за недеполяризиращи системи, докато матрицата на Мюлер позволява описание и количествена оценка на деполяризацията. Това е важно при нееднородни слоеве, прозрачни субстрати или системи, при които отраженията и пространствените вариации влияят върху измерения сигнал [3].

1.1.3.1. Образна елипсометрия (Imaging ellipsometry)

Образната елипсометрия (Imaging Ellipsometry, IE) съчетава принципите на класическата елипсометрия с регистриране на пространствено разрешено изображение чрез CCD камера. Вместо да се измерва само средна стойност от една точка върху пробата, методът позволява получаване на карта на оптичната дебелина и пространствената хомогенност на слоя. Това е особено ценно при системи, в които повърхността не е напълно еднородна [4].

Съвременните образни елипсометри често работят на принципа на нулевата елипсометрия. При подходяща настройка на поляризатора, компенсатора и анализатора отражението от субстрата се потиска, а малки изменения в слоя върху него водят до измерим контраст в изображението. Типична конфигурация е LPCSA: лазер, поляризатор, компенсатор, проба и анализатор. Като източник често се използва монохроматичен лазер, например с дължина на вълната 532 nm, а камерата регистрира двумерно разпределение на интензитета.

Предимството на образната елипсометрия е, че съчетава количествен оптичен анализ с директно визуализиране на повърхностни нееднородности. Методът е безконтактен, не изисква флуоресцентно маркиране и може да се използва за проследяване на промени в тънки филми, включително липидни слоеве и мембранни модели.

В [4] е показано, че образната елипсометрия е високочувствителен метод за количествено изследване на поддържани фосфолипидни мембрани. Авторите демонстрират възможност за определяне на дебелина, оптични свойства и пространствено разпределение на мембранни структури при условия, близки до физиологичните.

Особено важно за биофизични приложения е, че измерванията могат да се извършват *in situ* в течна среда. Това отличава образната елипсометрия от методи, които изискват вакуум, изсушаване или контакт със сонда. В литературата е посочено, че методът

може да регистрира изменения в дебелината на липидни слоеве от порядъка на десети от нанометъра, което го прави подходящ за проследяване на структурни преходи, хидратация, набъбване и взаимодействия с биомолекули [4].

Допълнителни изследвания показват приложимостта на образната елипсометрия за откриване на локални дефекти, нееднородности и вариации в дебелината на прозрачни тънки слоеве върху силициеви подложки [5].

Методът е използван и за характеризиране на лазерно записани структури в халкогенидни тънки слоеве, където профилът на показателя на пречупване зависи от дозата на лазерното облъчване [6]. Това показва, че образната елипсометрия е приложима не само за биологични системи, но и за широк клас тънкослойни материали.

В [7] образната елипсометрия е комбинирана с ATR-FTIR спектроскопия за изследване на структурата и термотропното фазово поведение на поддържани флуорирани фосфолипидни двуслойни мембрани. Резултатите показват, че флуорирането променя дебелината, наклона на липидните вериги и температурната стабилност на мембраната. Тези данни подчертават значението на образната елипсометрия при анализ на фини структурни промени в липидни системи.

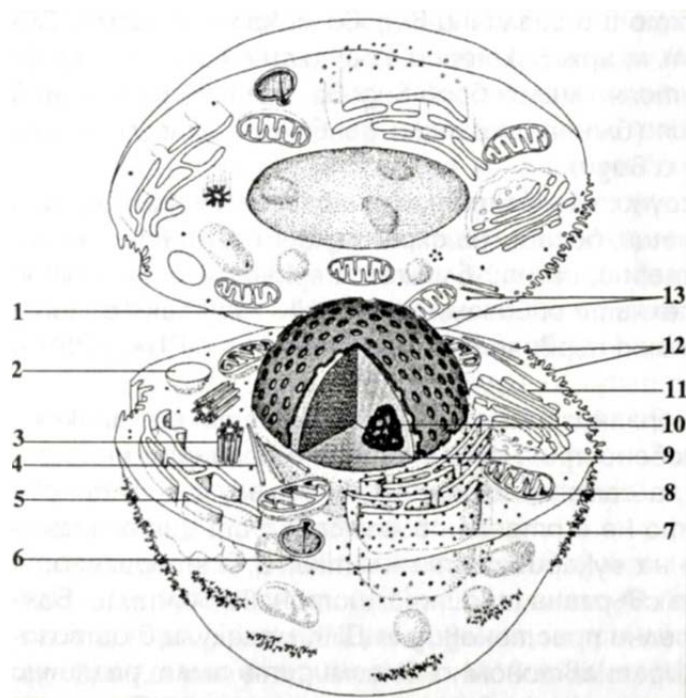
Така литературните данни очертават образната елипсометрия като подходящ метод за настоящата дипломна работа: тя позволява едновременно измерване на дебелина, оценка на пространствената хомогенност и наблюдение на ефекта от взаимодействието между мембранноподобни липидни слоеве и мембранно-активни молекули.

1.2. Липидни моделни системи

Клетъчната мембрана е сложна, динамична и химически хетерогенна структура. За да се изследват отделни нейни свойства при контролирани условия, често се използват липидни моделни системи. Те не възпроизвеждат напълно биологичната мембрана, но позволяват да се проследи влиянието на конкретни компоненти, като фосфолипиди, холестерол и сфингомиелин, върху организацията, дебелината, флуидността и стабилността на мембранноподобния слой.

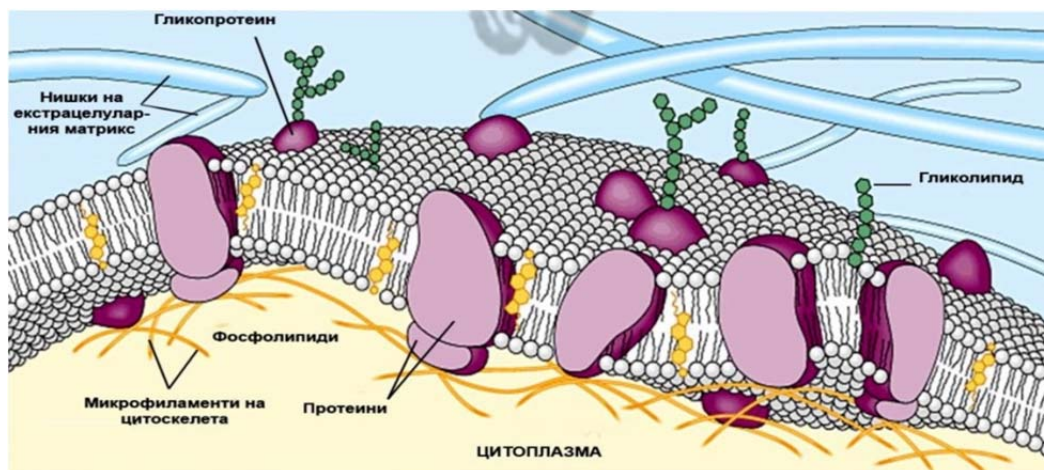
Еукариотните клетки се отличават със сложна вътрешна организация и наличие на множество мембранно ограничени органели. Плазмената мембрана отделя клетката от

околната среда и участва в транспорта на вещества, клетъчната сигнализация, механичната стабилност и взаимодействието с извънклетъчната среда [8]



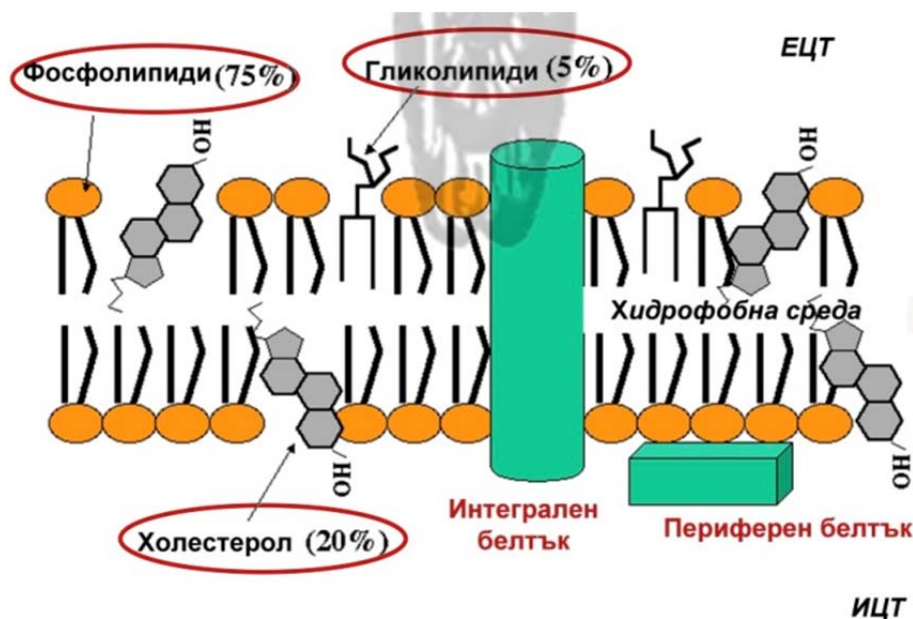
Фигура 4. Еукариотна животинска клетка - обобщена схема: 1. ядрена пора; 2. лизозома; 3. центриола; 4. микротубули; 5. гладък ендоплазмен ретикулум; 6. плазмена мембрана; 7. гранулиран ендоплазмен ретикулум и свързани с него рибозоми; 8. митохондрии; 9. ядро; 10. ядръце; 11. апарат на Голджи; 12. микровили; 13. рибозоми [8].

Според точно-мозаечния модел на Singer и Nicolson структурната основа на биомембраните е течен липиден бислой, в който са вградени белтъчни молекули. Липидите и белтъците не са неподвижни, а могат да се преместват странично в равнината на мембраната, което определя нейната динамична организация [8].



Фигура 5. Структура на биомембрана [8].

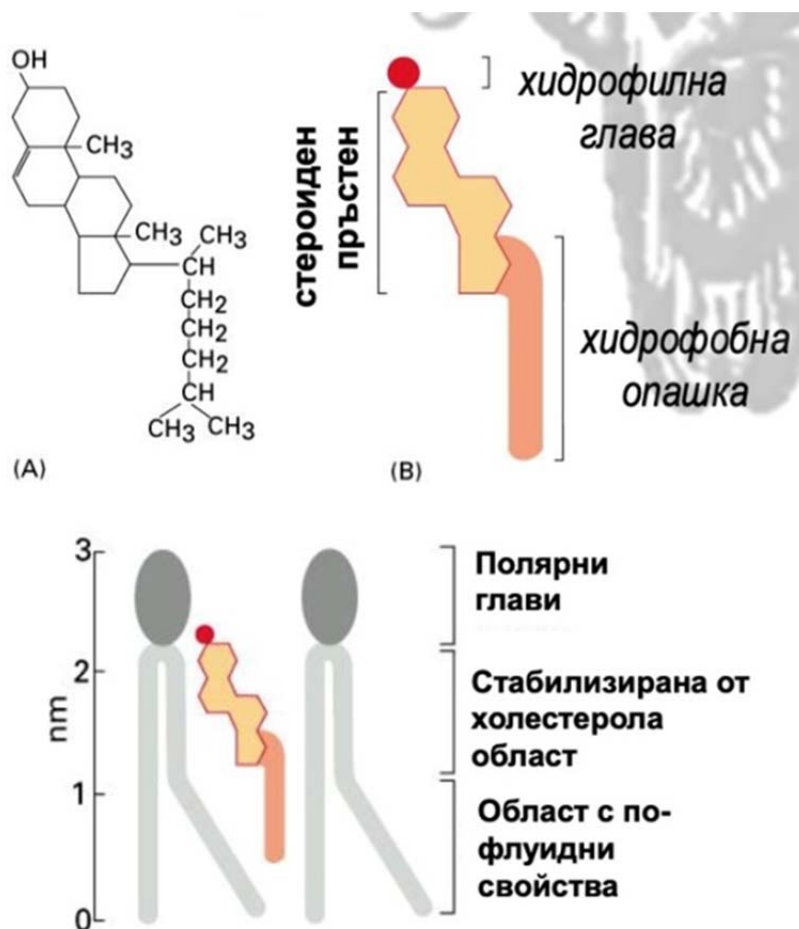
Фосфолипидите са основният структурен компонент на клетъчната мембрана. Всяка фосфолипидна молекула има хидрофилна полярна глава и две хидрофобни въглеродородни вериги. Поради тази амфипатична структура във водна среда фосфолипидите се самоорганизират в бислой, при който полярните глави са ориентирани към водната среда, а хидрофобните вериги са насочени навътре.



Фигура 6. Мембранни липиди [8].

Физичните свойства на липидния бислой зависят от дължината и степента на насищане на мастнокиселинните вериги. Ненаситените вериги създават огъване в молекулата и затрудняват плътното подреждане, което повишава флуидността. Наситените вериги улесняват по-плътната организация и намаляват подвижността. Така съставът на мембраната определя нейната еластичност, флуидност, стабилност и пропускливост.

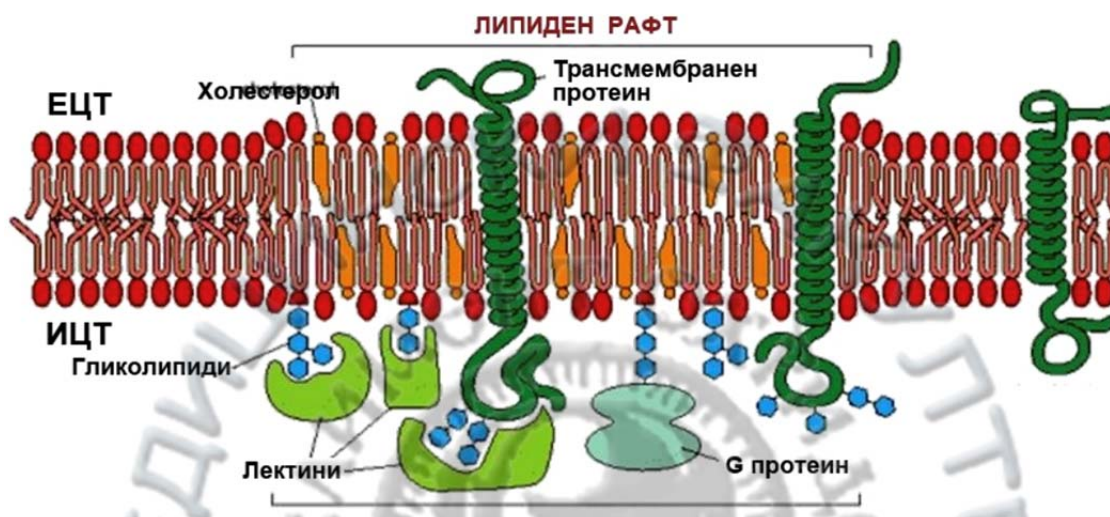
Холестеролът е друг ключов компонент на плазмената мембрана. Той се разполага между фосфолипидните молекули и регулира флуидността и механичната устойчивост на бислоя. При физиологични температури холестеролът ограничава прекомерното движение на фосфолипидите и стабилизира мембраната, а при температурни промени намалява резките преходи между по-подредено и по-течно състояние.



Фигура 7. Структура на холестерол [8].

Освен фосфолипиди и холестерол мембраната съдържа гликолипиди и сфинголипиди, които участват в клетъчното разпознаване, междуклетъчната комуникация и взаимодействието с извънклетъчната среда. Важна особеност на плазмената мембрана е липидната асиметрия: външният и вътрешният слой на бислоя имат различен състав и изпълняват различни биологични функции.

В мембраната се формират и специализирани микродомейни, известни като липидни рафтове. Те са обогатени с холестерол, сфинголипиди и определени мембранны белтъци, поради което се отличават с по-висока подреденост и по-ниска флуидност от околната мембрана. Липидните рафтове участват в клетъчната сигнализация, мембранный транспорт, ендоцитозата и взаимодействието с различни биологично активни молекули.



Фигура 8. Липиден рафт [9].

Мембранните белтъци допълват функционалната организация на плазмената мембрана. Те регулират транспорта на вещества, приемането и предаването на сигнали, ензимната активност, механичната стабилност и клетъчното разпознаване [9].

За целите на настоящата работа особено значение имат моделните системи, съдържащи лецитин, холестерол и сфингомиелин. Чрез промяна в съотношението между тези компоненти може да се получат слоеве с различна степен на подреденост и различна мембранноподобна организация. Това позволява да се оцени как липидният състав влияе върху взаимодействието с милтефозин.

Образната елипсометрия е подходяща за такъв тип моделни системи, защото дава информация не само за средната дебелина на слоя, но и за пространственото разпределение на дебелината върху повърхността. По този начин могат да се проследят промени в хомогенността и морфологията на липидния филм преди и след третиране с лекарствено вещество.

1.3. Анализ на взаимодействието на алкилфосфохолини с клетъчни култури и мембранни аналози

Алкилфосфолипидните аналози (alkylphospholipid analogues, APLs) са синтетични мембранно-активни съединения с противотуморна активност. За разлика от класическите цитостатици, които често действат чрез директно увреждане на ДНК или инхибиране на клетъчното делене, алкилфосфолипидите взаимодействат предимно с плазмената мембрана, липидния метаболизъм и мембранно-свързаните сигнални

пътища. Това ги прави особено интересни за биофизични изследвания с липидни моделни системи.

Edelfosine (Еделфозин, ET-18-ОСН3) е първият подробно изследван представител на тази група. Той съдържа глицеролов скелет, етерно свързана C18-алкилова верига и фосфохолинова глава. Предклиничните проучвания показват антинеопластична активност, свързана с инхибиране на синтеза на фосфатидилхолин, промени в липидните рафтове и потискане на PI3K/Akt- и MAPK-зависими сигнални пътища. В резултат се активират каспазозависими механизми на апоптоза [10]

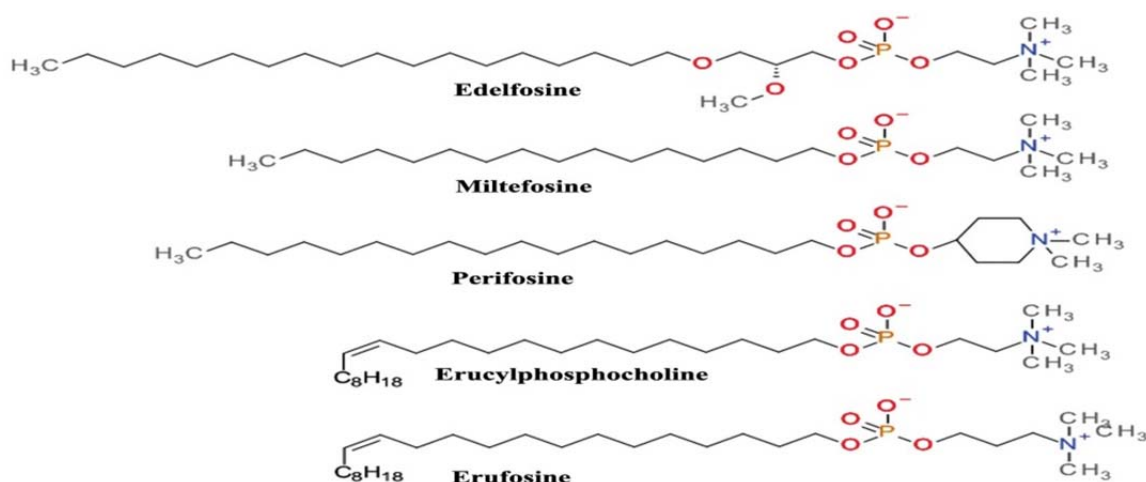
Въпреки обещаващите предклинични резултати, клиничната ефективност на edelfosine като системен антитуморен агент остава ограничена[11]. По-успешно приложение е описано при екзовиво пречистване на костен мозък преди автоложна трансплантация при остра левкемия, където се използва селективната токсичност към левкемичните клетки.

Ilmofosine (Илмофозин, BM 41.440) е тιοестерен аналог на edelfosine, при който кислородният атом в етерната връзка е заместен със сяра. Тази модификация цели подобряване на фармакокинетичните характеристики и метаболитната стабилност, без съществена промяна в принципния механизъм на действие [11]. Въпреки широкия спектър на цитотоксична активност в предклинични модели, клиничните изпитвания не потвърждават очакваната ефективност и развитието му като противотуморно средство е ограничено.

Perifosine (Перифозин) е синтетичен аналог от второ поколение, при който холиновата глава на miltefosine е заменена с цикличен пиперидинов остатък. Основна негова мишена е серин/треонин киназата Akt (PKB), като потискането на PI3K/Akt сигналния път води до намалена клетъчна пролиферация и повишена чувствителност към апоптоза. Макар ефективността му като монотерапия да е ограничена, комбинирането с лъчетерапия показва обещаващи резултати в предклинични модели.

Erucylphosphocholine (Еруцилфосфохолин, ErPC) се различава от miltefosine с по-дълга въглеводородна верига (C22) и наличие на *cis*-двойна връзка. Тези структурни особености повишават липофилността и благоприятстват формирането на ламеларни мембранни структури, което намалява хемолитичната токсичност, характерна за част от останалите представители на класа [9]. Способността на ErPC да прониква през

кръвно-мозъчната бариера го прави перспективен кандидат за изследвания при мозъчни тумори.



Фигура 9. Структура на алкилфосфолипидните аналози [12]

Miltefosine (Милтефозин, hexadecylphosphocholine) е първият представител на второто поколение алкилфосфохолини, достигнал до клинична употреба. За разлика от първото поколение съединения той не съдържа глицеролов скелет, а има по-опростена структура, съставена от алкилова верига и фосфохолинова глава. Тази структура определя способността му да се вгражда в липидни мембрани и да влияе върху тяхната организация.

Милтефозин индуцира клетъчна смърт чрез промяна на мембрания фосфолипиден метаболизъм, нарушаване на липидната сигнализация и потискане на PI3K/Akt и MAPK сигналните каскади. Освен това влияе върху активността на фосфолипаза С и протеин киназа С, което допълнително нарушава клетъчната хомеостаза и стимулира апоптотични процеси.

Системното приложение на miltefosine е ограничено от хемолитична активност при интравенозно приложение и гастроинтестинална токсичност при перорално лечение. Въпреки това локалното приложение при кожни метастази от карцином на млечната жлеза и кожни лимфоми показва положителни резултати, а извън онкологията miltefosine е утвърден като първото ефективно перорално средство за лечение на висцерална лайшманиоза [10].

Мембраният механизъм на действие е особено важен за настоящата работа. В [13] е изследвано взаимодействието между miltefosine и моделни липозомни мембрани, при което се проследява действието на сфингомиелиназа и фосфолипаза С. Показано е, че

miltefosine потиска мембранното ремоделиране, намалява агрегацията и сливането на липозомите и ограничава образуването на високоизвити мембранни домени.

Този ефект се обяснява с амфифилната структура на miltefosine. Молекулата може да се вгражда между мембранните фосфолипиди и да променя физичните свойства на липидния бислой, без директно да инхибира ензимната активност на фосфолипазите. Следователно мембраната сама по себе си се разглежда като важна терапевтична мишена на miltefosine [13]

В [14] е показано, че милтефозинът влияе върху физикохимичните свойства на междуклетъчните мембрани на stratum corneum, като увеличава тяхната течливост. Чрез електронен парамагнитен резонанс е установено, че при определени концентрации лекарството намалява подредеността на липидните молекули. Авторите предполагат, че милтефозинът действа като „разделител“ на въглеродородните вериги и така повишава мембранната флуидност [14]

Резултатите на Н. Саранги и сътрудници [15] показват, че взаимодействието на милтефозин с липидни мембрани зависи силно от техния състав. Най-силен ефект е наблюдаван при мембрани, изградени само от DOPC, където се отчита намаляване на мембранното съпротивление, повишаване на капацитета и признаци за изтъняване на бислоя. При мембрани, съдържащи сфингомиелин и холестерол, както и при модел, имитиращ плазмената мембрана на бозайници, проникването на miltefosine е по-ограничено, което се свързва с по-плътната организация на липидните домени.

Тези данни подкрепят схващането, че ефектът на милтефозина се определя не само от химичната структура на лекарството, но и от липидния състав, организацията и физикохимичните свойства на мембраната [15]

В работата на Guo Yu и сътрудници [16] се разглежда приложение на липидни наноструктурирани носители, натоварени с miltefosine, при експериментални модели на рак на гърдата. Изследвани са клетъчни линии и животински модели със свободен и капсулиран miltefosine, като са използвани методи за физикохимично характеризиране, фармакокинетичен анализ и оценка на антитуморния ефект. Тъй като статията е ретрахирана през 2023 г., тя следва да се използва само като пример за възможен формулационен подход, а не като самостоятелно доказателство за ефективност или безопасност [16]

Обобщено, литературният обзор показва, че милтефозинът е мембранно-активно съединение, чието действие зависи от организацията и състава на липидната среда. Това обосновава използването на липидни моделни системи с различно съдържание на холестерол и сфингомиелин, както и прилагането на образна елипсометрия за проследяване на промените в дебелината, морфологията и хомогенността на филмите.

Специална част

2.1. Материали

2.1.1. Използвани материали

В настоящото изследване за приготвяне на липидните филми беше използван соев лецитин (Walmark, Чехия) без допълнително пречистване. Холестерол (5-холестен-3 β -ол, C₂₇H₄₅OH, Sigma Chemical Co., USA) с аналитична чистота също беше използван без допълнително пречистване. Основните разтвори бяха приготвени чрез разтваряне на фосфолипида в n-хексан и на стерола в смес хлороформ/метанол (9:1, об./об.), след което компонентите бяха смесени в необходимите съотношения.

Лецитинът (2,5 mM) и холестеролът бяха смесени при фиксирано общо количество липиди от 150 μ mol на проба, с молни фракции на холестерола 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 и 0,6. Сфингомиелинът (Sphingomyelin, chicken egg yolk, $\geq$ 95%, Sigma-Aldrich, Australia) беше разтворен в същата смес от разтворители и добавен към избрани състави. Miltefosine ($\geq$ 98%, perchloric acid titration, Sigma-Aldrich, USA) беше използван за приготвяне на работни разтвори в 1 $\times$ фосфатно буфериран физиологичен разтвор (PBS; pH = 7,4; Sigma-Aldrich, Australia).

Като твърди носители бяха използвани покрити със злато кварцови подложки (0,5 $\times$ 0,5 cm) с непрозрачен Au слой. Преди отлагането на липидните разтвори подложките бяха почистени чрез изплакване с етанол и изсушаване с въздушна струя при стайна температура.

2.1.2. Приготвяне на липидни слоеве

Лецитиново-холестеролните разтвори бяха приготвени в смес хлороформ/метанол (3:2, v/v) чрез смесване на лецитин и холестерол при зададените молни фракции. За всеки състав аликвота от 5 μ L беше нанесена върху почистен, покрит със злато кварцов субстрат и незабавно центрофугирана при 2000 rpm за 60 s. След центрофугиране пробите бяха оставени при околни лабораторни условия, за да се осигури изпаряване на разтворителя. Полученият липиден филм върху подложката е означен по-долу като лецитинова основа.

При експериментите със сфингомиелин лецитиновата основа първо беше приготвена по описания по-горе начин. След изсушаване върху предварително образуваната лецитинова основа беше нанесен 1 μ L разтвор на сфингомиелин (2,5 mM, в същата смес хлороформ/метанол) и пробата беше оставена да изсъхне. Тази втора стъпка на

отлагане беше извършена при молни фракции на холестерол 0,1, 0,3 и 0,6, за да се проследи как съдържанието на холестерол влияе върху включването на сфингомиелин и върху свойствата на получения филм.

За приготвяне на изходен разтвор 4 mg miltefosine бяха разтворени в 1 mL DMSO, което съответства приблизително на 10 mM разтвор. Работните концентрации 100, 150 и 190 μ M бяха избрани въз основа на данни за IC₅₀/IC₇₅ при A549 и HUVEC клетъчни модели, използвани в предходни изследвания [17, 18].

След приготвяне липидно покритите субстрати (със и без сфингомиелин) бяха изложени на miltefosine в PBS за 60 s при стайна температура. Контролните проби бяха третирани само с PBS при идентични условия, за да се отделят ефектите, свързани с буфера, от ефекта на лекарствената молекула. След третирането пробите бяха изсушени и измерени чрез образна елипсометрия, като целта беше количествено да се проследят дебелината на филма и пространствената му хомогенност преди и след експозиция на PBS или miltefosine.

2.2. Методи

2.2.1. Образна елипсометрия (Imaging Ellipsometry)

Елипсометричните измервания бяха извършени с образен спектроскопски елипсометър Accurion EP4 (Park Systems) при ъгъл на падане 60° и при околни лабораторни условия. Спектроскопската нулева елипсометрия беше използвана в диапазона 360-1000 nm за определяне на условията на измерване и за валидиране на оптичния модел. Пространствено разрешените карти на дебелината бяха получени в режим на образна елипсометрия с ротационно компенсирана елипсометрия (RCE), като за всяко изображение бяха използвани автоматизирани настройки за фокус и експозиция [16] Park Systems, Accurion EP4 Imaging Spectroscopic Ellipsometer, product documentation.

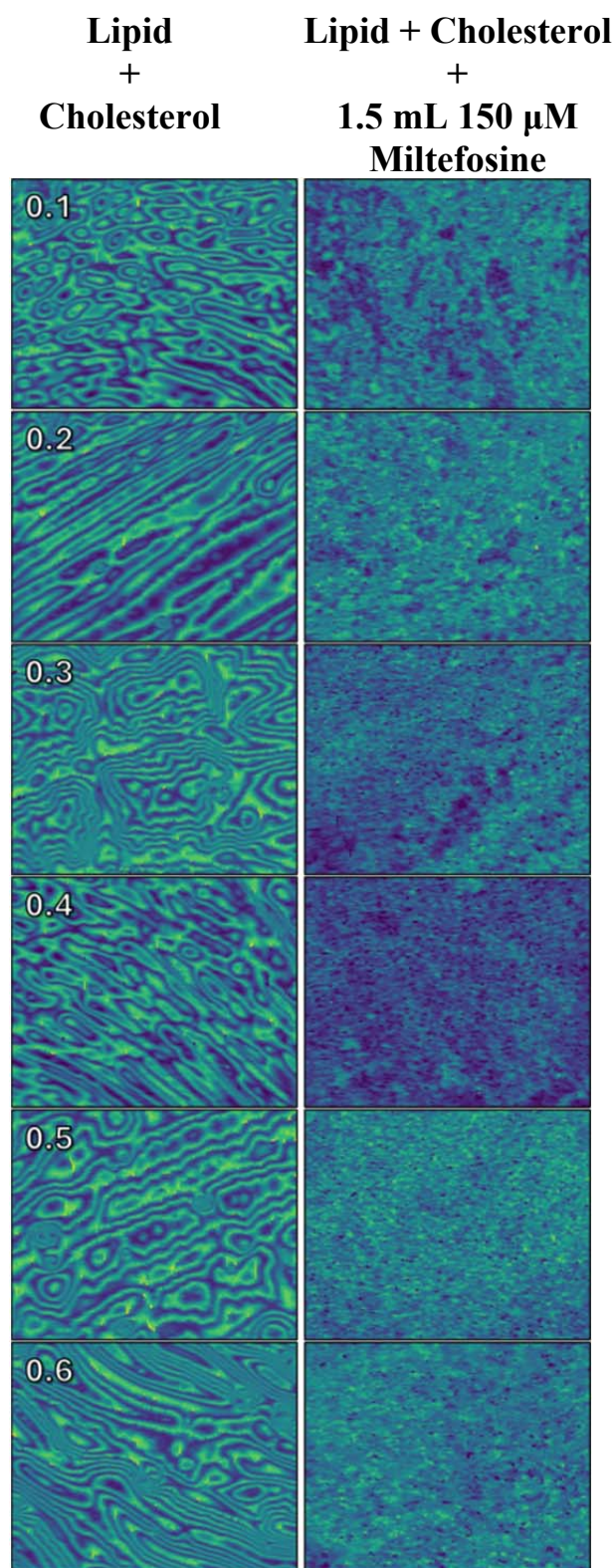
Данните бяха анализирани чрез многослоен оптичен модел, включващ кварцов субстрат, златен слой и поддържан липиден филм. Комплексният показател на пречупване на златото беше взет от Johnson и Christy [17]. Дебелините на слоевете на субстрата и ефективната грапавост бяха поддържани постоянни при последващите нападения. Липидният покривен слой беше моделиран като прозрачен филм на Коши ($k = 0$) с фиксиран показател на пречупване $n = 1.45$ при референтната дължина на вълната, а дебелината на филма беше използвана като основен параметър за нападение.

Картите на дебелината бяха генерирани чрез прилагане на същия оптичен модел към RCE изображенията, което даде пространствени разпределения на еквивалентната оптична дебелина преди и след третиране с PBS или miltefosine. Всички напасвания и карти бяха изготвени със софтуера за анализ EP4 [19].

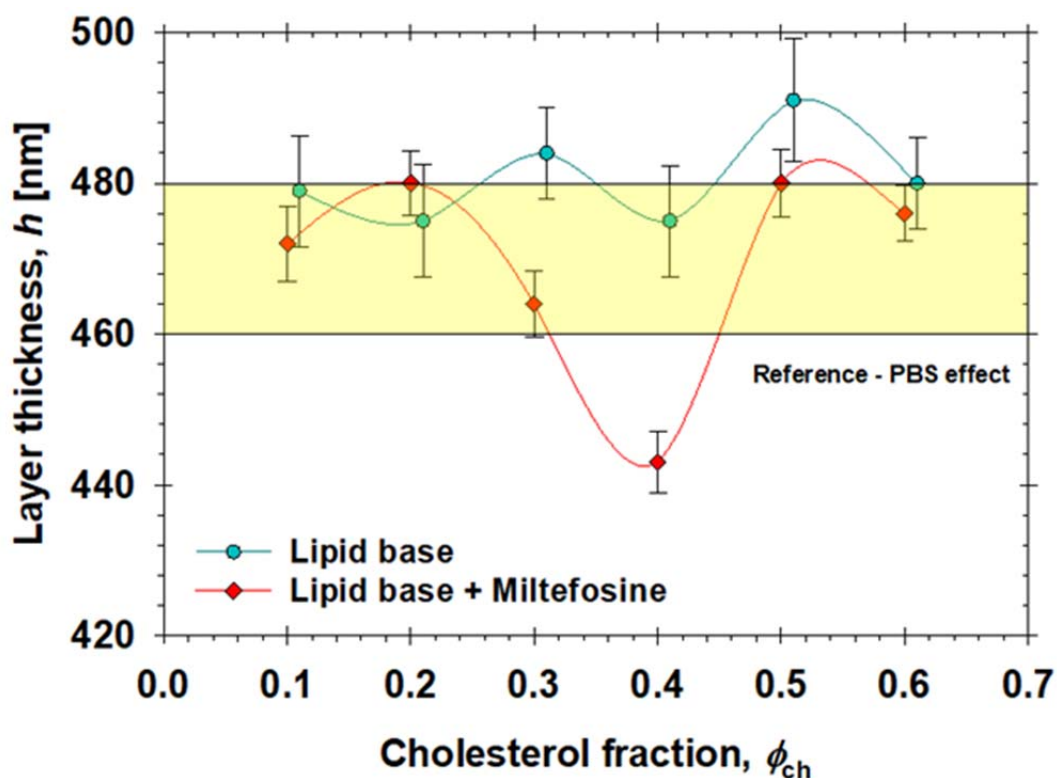
2. Резултати и дискусия

За проследяване на взаимодействието на милтефозин с липидни моделни системи първо бяха изследвани лецитин-холестеролни филми (L+Chol). Тези проби служат като базов мембранен модел, при който може да се оцени как съдържанието на холестерол влияе върху морфологията, дебелината и хомогенността на слоя преди и след експозиция на милтефозин. Измерванията бяха проведени при молни фракции на холестерола 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 и 0,6 (Фиг. 10).

Картите на дебелината показват пространствено нееднородно разпределение на липидния материал, което се проявява като области с различна еквивалентна оптична дебелина. Разликите между сините и жълтите зони отразяват вариации в локалната дебелина и плътност на слоя. Зависимостта на средната дебелина от холестеролната фракция е представена на Фиг. 11. За изследваните L+Chol филми средната дебелина на липидната база е приблизително 480 ± 20 nm.



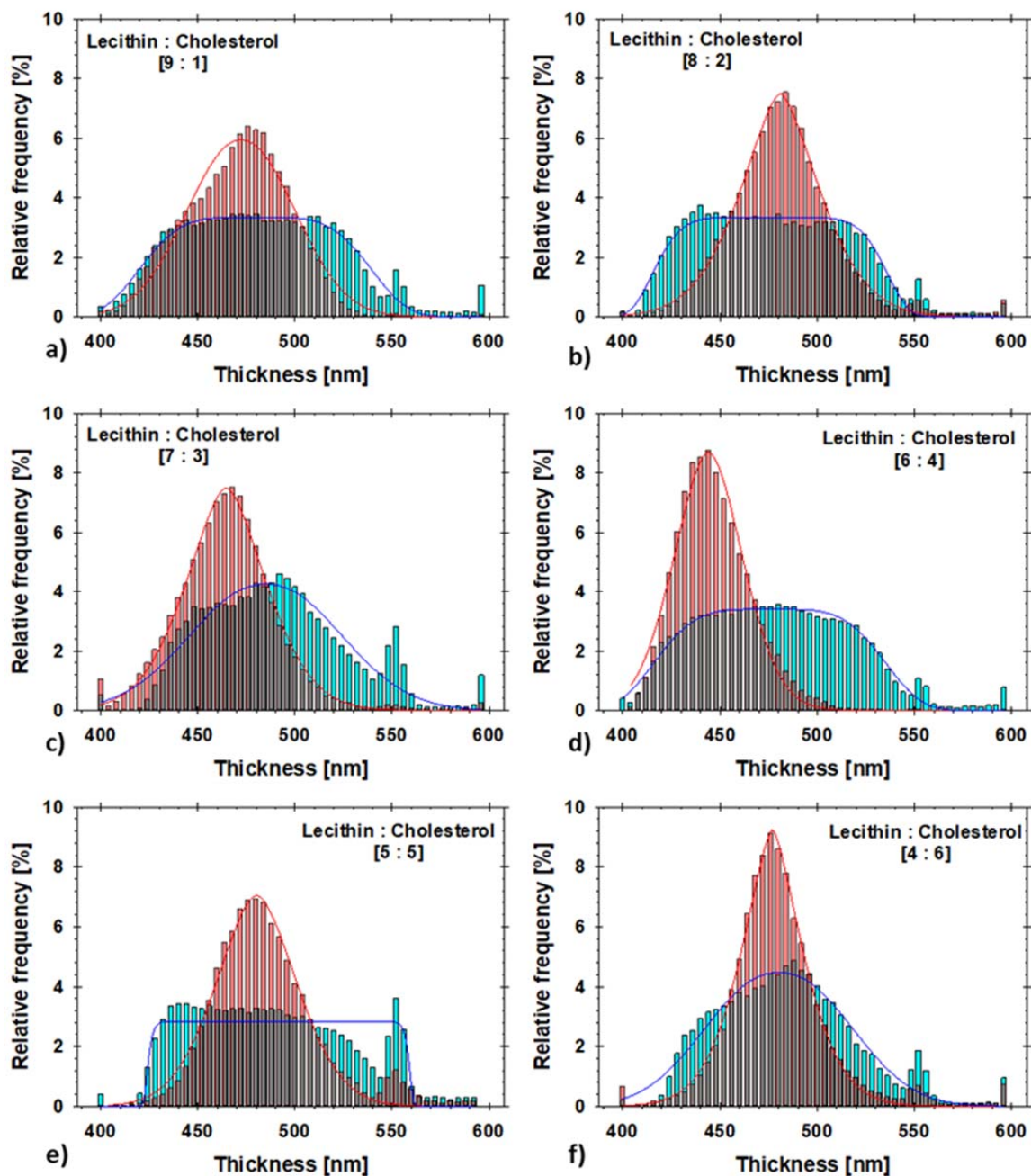
Фигура 10. Морфология на нанесени лецитин-холестеролни филми (L+Chol) преди и след обработка с милтефозин. Представени са елипсометрични карти на еквивалентната оптична дебелина за молни фракции на холестерола $x_{chol} = 0,1-0,6$. Лявата колона показва филмите след изпаряване на разтворителя при околни лабораторни условия, а дясната колона - съответните филми след експозиция на милтефозин в PBS за 60 s и последващо изсушаване.



Фигура 11. Зависимост на средната дебелина на липидния слой от моларната фракция на холестерола в L+Chol филмите.

За по-точна оценка на хомогенността на липидната база беше анализирано относителното разпределение на дебелините, извлечени от елипсометричните карти. Хистограмите на Фиг. 12 показват не само средната стойност на дебелината, но и ширината на разпределението, т.е. доколко отделните области от филма се различават една от друга.

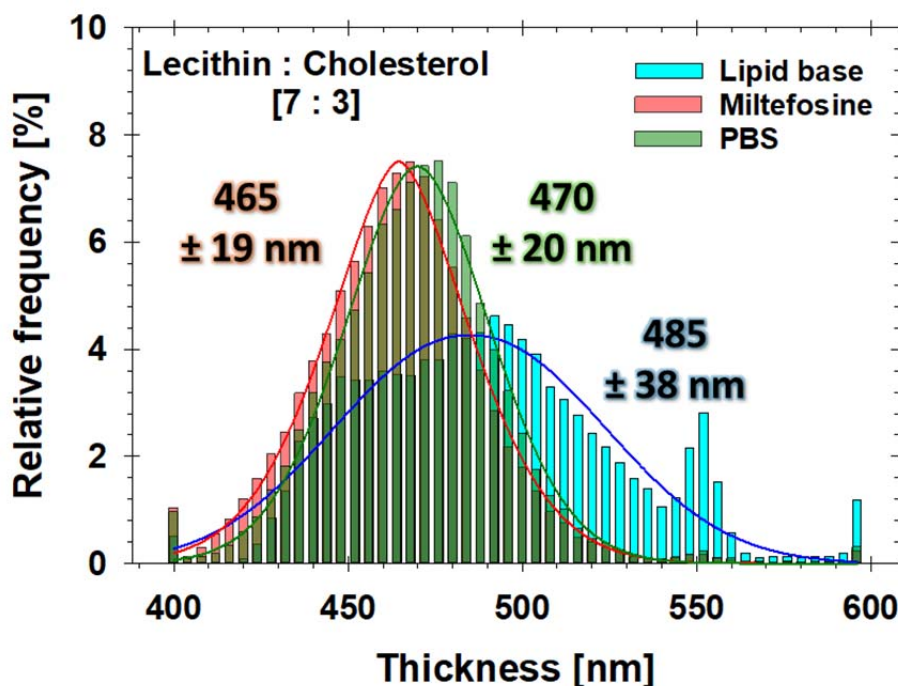
Върху лецитин-холестеролните филми беше приложен 150 μM разтвор на милтефозин. Тази концентрация е избрана като междинна работна стойност, съобразена с използваните в предходни клетъчни изследвания IC50/IC75 диапазони за A549 и HUVEC модели [17, 18].



Фигура 12. Разпределения на дебелината на нанесени лецитин-холестеролни филми, получени чрез образна елипсометрия. Хистограмите показват относителната честота на стойностите на дебелината за моларни съотношения лецитин:холестерол (a) 9:1, (b) 8:2, (c) 7:3, (d) 6:4, (e) 5:5 и (f) 4:6. Червените колони съответстват на изходните филми, а циановите - на същите филми след експозиция на милтефозин в PBS за 60 s. Плътните криви са Гаусови апроксимации, използвани за оценка на средната дебелина и ширината на разпределението.

След експозиция на милтефозин се наблюдава намаляване на дебелината на слоя и стесняване на разпределението на дебелините. При част от съставите стойностите се концентрират основно в диапазона 400-500 nm, което показва по-равномерно

разпределение на липидния материал върху повърхността. Този резултат може да се интерпретира като структурна реорганизация на слоя, предизвикана от взаимодействието на амфифилната молекула милтефозин с липидната матрица. Тъй като милтефозинът е приложен в PBS, влиянието на буфера беше отчетено чрез отделен контролен експеримент.

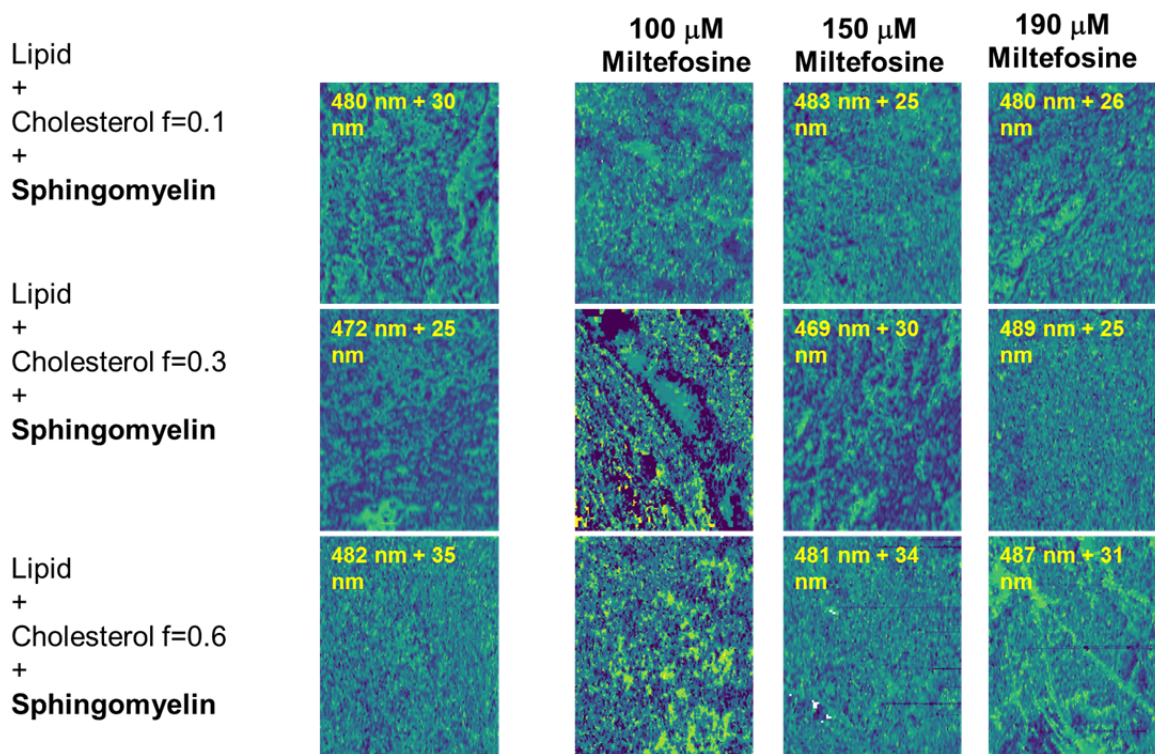


Фигура 13. Разпределения на дебелината на лецитин-холестеролни филми със съотношение 7:3, получени чрез образна елипсометрия, с включен контрол за влиянието на PBS.

На Фиг. 13 е представено разпределението на дебелината за L+Chol филми със съотношение 7:3 след контролно третиране с PBS. Сравнението показва, че буферът може да предизвика известни промени в повърхностното разпределение, но наблюдаваното пренареждане след добавяне на милтефозин е по-изразено. Това позволява ефектът на лекарствената молекула да се разглежда като специфичен принос към промяната в липидния филм, а не само като резултат от контакт с водна среда.

Втората група експерименти беше проведена с липидна моделна система L+Chol+Sph, получена чрез добавяне на сфингомиелин към лецитин-холестеролната база. Тази система е по-близка до мембранни области, богати на сфинголипиди и холестерол, които са свързани с по-плътна липидна организация. Изследвани бяха проби с молни фракции на холестерола 0,1, 0,3 и 0,6, като към предварително формирания L+Chol

слой беше добавен разтвор на сфингомиелин (1 μL , 2,5 mM). Добавянето на сфингомиелин води до изглаждане на слоя, без да променя съществено средната му дебелина.

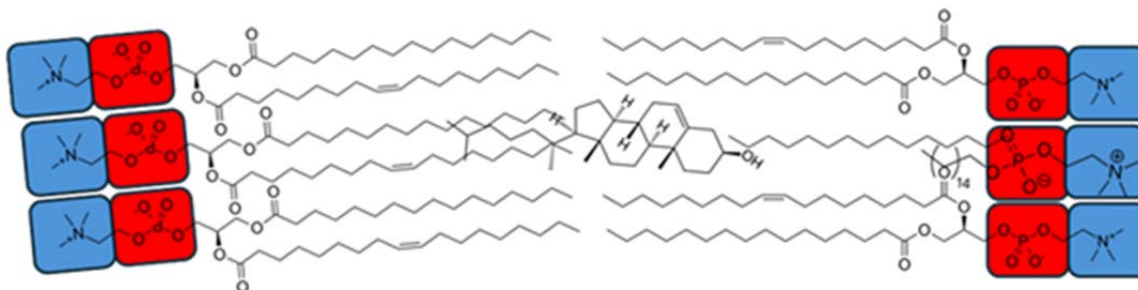


Фигура 14. Морфология на нанесени лецитинови филми (L+Chol+Sph) преди и след обработка с милтефозин. Показани са представителни елипсометрични карти на еквивалентната оптична дебелина за молни фракции на холестерола $x_{\text{chol}} = 0,1, 0,3$ и $0,6$. Лявата колона показва изходните филми, а следващите колони - съответните филми след експозиция на милтефозин при 100, 150 и 190 μM . Всички карти са обработени чрез многослойния оптичен модел, описан в раздел „Методи“, и са представени при еднаква цветова скала.

След добавяне на милтефозин към L+Chol+Sph филмите не се наблюдава съществено увеличаване на дебелината на слоя. Вместо натрупване на материал върху повърхността се отчита изглаждане и по-хомогенно разпределение на дебелината. Това поведение подкрепя предположението, че милтефозинът не остава само като отделен повърхностен слой, а се вгражда или преразпределя в липидната матрица. Подобна интерпретация е в съответствие с данни, че алкилфосфолипидите взаимодействат с мембраните чрез включване в липидния бислой и промяна на неговите физикохимични свойства [15, 16,].

За онагледяване на тази интерпретация е представена схема на възможното вграждане на милтефозин в L+Chol+Sph моделната система (Фиг. 15). Схемата обобщава

наблюдаваната тенденция: вместо образуване на отделен дебел повърхностен слой, взаимодействието вероятно води до преорганизация на липидната матрица и до по-равномерно разпределение на материала.



Фигура 15. Схема на предполагаемо вграждане на милтефозин в липидната моделна система L+Chol+Sph.

Обобщено, резултатите показват, че образната елипсометрия е подходящ метод за проследяване на промени в морфологията и еквивалентната оптична дебелина на липидни моделни системи след третиране с милтефозин. Използваните концентрации 100, 150 и 190 μM са съобразени с предходни изследвания върху A549 и HUVEC клетъчни модели [14, 15], което позволява получените данни да бъдат интерпретирани в контекста на биологично релевантни концентрационни диапазони.

Най-изразено намаляване на дебелината при L+Chol филмите се наблюдава за състава с лецитин:холестерол 6:4. Това подсказва, че ефектът на милтефозина зависи от холестеролното съдържание и от началната организация на липидния слой. Такъв извод е съгласуван с литературни данни, според които мембранныят състав, съдържанието на холестерол и наличието на сфинголипиди могат да определят степента на проникване и начина на действие на алкилфосфолипидите [15, 16, 20, 21, 22].

От гледна точка на механизма, получените данни подкрепят схващането, че милтефозинът действа не само като молекула, която се адсорбира върху повърхността, а като мембранно активен алкилфосфолипид. Вграждането му в липидната фаза може да промени локалната подреденост, дебелината и хомогенността на слоя. Това е особено важно при системи, съдържащи сфингомиелин и холестерол, тъй като тези липиди участват във формирането на по-подредени мембранны домени.

Следователно резултатите от настоящата работа свързват елипсометрично измеримите промени в дебелината и морфологията с известните мембранни механизми на действие на милтефозина. Наблюдаваното изглаждане и намаляване на дебелината след третиране показват, че образната елипсометрия може да се използва като чувствителен, безмаркерен подход за оценка на взаимодействието между лекарствени молекули и липидни моделни системи.

3. Заключение

В настоящата дипломна работа беше изследвано взаимодействието на милтефозин с липидни моделни системи чрез образна елипсометрия. Подходът позволява безмаркерно проследяване на морфологията, хомогенността и еквивалентната оптична дебелина на тънки липидни филми преди и след третиране с лекарствена молекула.

Получените резултати показват, че милтефозинът променя структурата на лецитин-холестеролните филми, като води до намаляване на дебелината и до по-равномерно разпределение на липидния материал върху повърхността. Най-изразен ефект е отчетен при състава лецитин:холестерол 6:4, което показва, че взаимодействието зависи от холестеролното съдържание и началната организация на слоя.

При системите, съдържащи сфингомиелин, добавянето на милтефозин не води до съществено увеличаване на дебелината, а по-скоро до изглаждане и хомогенизиране на филма. Този резултат подкрепя предположението, че милтефозинът не се натрупва само като отделен повърхностен слой, а се вгражда или преразпределя в липидната матрица. Така образната елипсометрия се потвърждава като чувствителен метод за изследване на лекарство-мембранни взаимодействия в моделни системи.

Работата показва и перспективата за последващи изследвания с по-близки до клетъчната мембрана модели, включително монослоеве, по-сложни липидни състави и други мембранно активни лекарствени молекули. Такива експерименти биха позволили по-пълно свързване на елипсометричните данни с биофизичните механизми на действие на изследваните препарати.

4. Приноси на дипломната работа

В рамките на дипломната работа са постигнати следните основни приноси:

1. Извършен е литературен обзор върху приложението на образната елипсометрия за характеризирание на тънки слоеве, поддържани липидни мембрани и лекарство-мембранни взаимодействия.
2. Обобщени са данни за структурата и мембранните механизми на действие на алкилфосфолипидите, с акцент върху милтефозина и неговото взаимодействие с липидни моделни системи.
3. Подбрани и приложени са липидни моделни системи на основата на лецитин, холестерол и сфингомиелин, чрез които е проследено влиянието на мембранныя състав върху взаимодействието с милтефозин.
4. Проведени са експерименти с образна елипсометрия за количествено определяне на морфологията, хомогенността и еквивалентната оптична дебелина на липидните филми преди и след третиране с PBS и милтефозин.
5. Направен е анализ на получените елипсометрични данни, който показва, че методът е приложим за безмаркерно изследване на взаимодействието на милтефозин с липидни моделни системи и може да се използва като основа за бъдещи предклинични биофизични изследвания.

5. Литература

1. J.A. Woollam Co., Ellipsometry Tutorial and Ellipsometry FAQ, 2025.
2. Jordan Kuhn, Introduction to Ellipsometry Techniques, 2017.
3. H. Fujiwara, Spectroscopic Ellipsometry: Principles and Applications, John Wiley & Sons, 2007, DOI: 10.1002/9780470060193.
4. Michel C. Howland, Alan W. Szmodis, Babak Sanii, Atul N. Parikh, Characterization of Physical Properties of Supported Phospholipid Membranes Using Imaging Ellipsometry at Optical Wavelengths, *Bioph. J.*, 92: 1306–1311, 2007.
5. Gang Jin, Roger Jansson, Hans Arwin, Imaging Ellipsometry revisited: Developments for visualization of thin transparent layers on silicon substrates, *Rev. Sci. Instrum.* 67, 2930–2936, 1996.
6. C.Röling, P.Thiesen, A. Meshalkin, E.Achimova, V. Abashkin, A. Prisacar, G. Triduh, Imaging ellipsometry mapping of photo-induced refractive index in As₂S₃ films, 2013.
7. Steffan Schuy, Simon Faiss, Nicholas C.Yoder, Venkateshwarlu Kalsani, Krishna Kumar, Andreas Janshoff, Reiner Vogel, Structure and Thermotropic Phase Behavior of Fluorinated Phospholipid Bilayers: A Combined Attenuated Total Reflection FTIR Spectroscopy and Imaging Ellipsometry Study, *J. Phys. Chem. B*, 112 (28): 8250–8256, 2008.
8. Илия Ватев, Василий Ишев, Димитър Ковачев, Цветанка Маринова, Георги Николов, Спаска Станилова, Биология, Учебник за медицинските университети, 02013.
9. проф. Елена Джамбазова, Физиология на човека, УИ „Св. Климент Охридски“, 2025.
10. Stefan R. Vink, Wim J. van Blitterswijk, Jan H. M. Schellens, Marcel Verheij Rationale and Clinical application of alkylphospholipid analogues in combination with radiotherapy, *Cancer Treat Rev*, 33:191-22, 2007.
11. Berdel WE, Fink U, Rastetter J. Clinical phase I pilot study of the alkyl lysophospholipid derivative ET-18-OCH₃
12. Dr. Boris Gaillard, Cendrine Seguin, Dr. Jean-Serge Remy, Prof. Dr. Françoise Pons, Dr. Luc Lebeau, Erufosine (ErPC3) Cationic Prodrugs as Dual Gene Delivery Reagents for Combined Antitumor Therapy, *Chemistry*, 25(68):15662-15679, 2019.
13. Yenisleidy de las Mercedes Zulueta Diaz, Ernesti Esteban, Ambroggio, Maria Laura Fanani. Miltefosine inhibits the membrane remodeling caused by phospholipase action

- by changing physical properties, *Bioch. Biophys. Acta (BBA) – Biomembranes*, 1862(10), 2020.
14. Lais Alonso, Sebastiao Antonio Mendanha, Cassia Alessandra Marquezin, Marina Berardi, Amando Siuiti Ito, A. Ulises Acuna, Antonio Alonso, Interaction of miltefosine with intercellular membranes of stratum corneum and biometric lipid vesicles, *Int J Pharm.*, 434(1-2):391-8, 2012.
 15. Nirod Sarangi, Amrutha Prabhakaran, Tia Keyes, Interaction of Miltefosine with Microcavity Supported Lipid Membrane: Biophysical insights from electrochemical impedance spectroscopy, 32:12, p.2936-2945, Special Issue:65th Birthday of Prof Emmanuel Iwuoha: Electrochemistry in Africa, Electroanalysis, 2020.
 16. G. Yu, Z. Ali, A. S. Khan, K. Ullah, H. Jamshaid, A. Zeb, M. Imran, S. Sarwar, H.-G. Choi, F. ud Din, Preparation, Pharmacokinetics, and Antitumor Potential of Miltefosine-Loaded Nanostructured Lipid Carriers, *Intern. J. of Nanomed.* 16 3255-3273, 2021.
 17. Д. Попстоянова, Дипломна работа: Електрохимични методи за изследване на влиянието на милтефозин върху клетъчни линии от рак на белия дроб и ендотелни клетки от пъпна връв, Физически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“, специалност Медицинска физика, 2022.
 18. V. Uzunova, R. Tzoneva, T. Stoyanova, R. Pankov, R. Skrobanska, G. Georgiev, L. Maslenkova, Z. Tsonchev, A. Momchilova, Dimethylsphingosine and miltefosine induce apoptosis in lung adenocarcinoma A549 cells in a synergistic manner, *Chemico-Biological Interactions* 310 (2019) 108731, DOI: 10.1016/j.cbi.2019.108731.
 19. P. B. Johnson, R. W. Christy, Optical Constants of the Noble Metals, *Physical Review B* 6 (1972) 4370-4379, DOI: 10.1103/PhysRevB.6.4370.
 20. A. Kostadinova, T. Topouzova-Hristova, A. Momchilova, R. Tzoneva, M. R. Berger, Antitumor Lipids - Structure, Functions, and Medical Applications, *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 101, 27-66, 2015.
 21. N. Apostolova, R. A. Toshkova, A. B. Momchilova, R. D. Tzoneva, Statins and Alkylphospholipids as New Anticancer Agents Targeting Lipid Metabolism, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 16(12), 1512-1522, 2016.
 22. P. Ríos-Marco, C. Marco, X. Gálvez, J. M. Jiménez-López, M. P. Carrasco, Alkylphospholipids: An update on molecular mechanisms and clinical relevance, *Biochem. et Biophys. Acta - Biomembranes* 1859, 1657-1667, 2017..