

Резюмета на научните публикации на доц. д-р Виктория Виткова на български език и английски език за участие в конкурс за академичната длъжност „професор”, обявен в Държавен вестник, брой 61 от 02.08.2019 г.

1. C. Minetti, **V. Vitkova**, F. Dubois, I. Bivas, Digital holographic microscopy as a tool to study the thermal shape fluctuations of lipid vesicles, *Optics Letters* **41**(8): 1833- 1836 (2016) DOI: 10.1364/OL.41.001833; IF: 3.416 (2016 Impact Factor) **Q1**

1.1. Abstract: The bending elasticity modulus of lipid membranes is obtained by applying for the first time, to the best of our knowledge, a novel experimental technique based on digital holographic microscopy. The fluctuations of the radius with time were extracted by tracking and measuring the optical thickness at the vesicle poles. The temporal autocorrelation function of the vesicle diameter computed for each of the studied vesicles was then fitted with the theoretical expression to deduce the membrane's tension and bending constant. For the bending elasticity modulus of SOPC bilayers, the value of $(0.93 \pm 0.03) \times 10^{-12}$ erg was obtained. This result is in accordance with values previously obtained by means of other conventional methods for the same type of lipid membrane in the presence of sugar molecules in aqueous medium. The obtained results encourage the future development of the digital holographic microscopy as a technique suitable for the measurement of the bending elasticity of lipid membranes.

1.2. Резюме: За първи път модулет на еластичност на огъване на моделни липидни мембрани е получен чрез прилагането на нов експериментален подход, основан на цифрова холографска микроскопия. Флукуациите на радиуса като функция на времето са получени от записа на оптичната дебелина на везикулата при нулев полярен ъгъл. Времевата автокорелационна функция на диаметъра на везикулата, изчислена за всяка от изследваните везикули, е описана чрез съществуващата в литературата теория за зависимостта ѝ от модула на еластичност на огъване на мембраната и нейното механично напрежение. Изчислена е стойността на модула на еластичност на огъване на стеарил-олеил фосфатидилхолинова мембрана, $(0.93 \pm 0.03) \times 10^{-12}$ erg в съгласие с данните, получени чрез конвенционалните методи за измерване на мембранната еластичност на огъване за същия тип мембрана в захарни разтвори. Нашият резултат е добра основа за развитието на цифровата холографска микроскопия като подходящ метод за изследване на механичните свойства на липидни мембрани.

2. K. Antonova, **V. Vitkova**, C. Meyer, Membrane tubulation from giant lipid vesicles in alternating electric fields, *Physical Review E* **93**, 012413 (2016); IF 2.252 **Q1**

2.1. Abstract: We report on the formation of tubular membrane protrusions from giant unilamellar vesicles in alternating electric fields. The construction of the experimental chamber permitted the application of external AC fields with strength of dozens of V/mm and kHz frequency during relatively long time periods (several minutes). Besides the vesicle electrodeformation from quasispherical to prolate ellipsoidal shape, the formation of long tubular membrane protrusions with length of up to several vesicle diameters, arising from the vesicular surface in the field direction, was registered and analyzed. The threshold

electric field at which the electro-induced protrusions appeared was lower than the field strengths inducing membrane electroporation.

- 2.2. **Резюме:** В настоящата статия се съобщава и анализира формирането на цилиндрични мембранни структури, изтеглени от мембраните на гигантски, еднослойни, почти сферични липидни везикули при въздействие на променливо електрично поле върху тях. Конструкцията на експерименталната клетка позволява прилагането на променливи електрични полета с интензитет от порядъка на десетки В/мм в килохерцовия честотен обхват в продължение на сравнително дълги интервали от време (няколко минути). Заедно с промяната на формат на везикулата от квазисферична във форма на удължен по посоката на електричното поле елипсоид, се наблюдава изтеглянето от мембраната на везикулата по посоката на полето на цилиндрични мембранни нишки с дължина, достигаща няколко пъти диаметъра на везикулата. Интензитетът на електричното поле, при което е наблюдавана морфологичната трансформация на везикулата е под граничните стойности на полето, при които се индуцира мембранна електропорация.
3. **V. Vitkova, D. Mitkova, K. Antonova, G. Popkirov, R. Dimova, Sucrose alter the electric capacitance and dielectric permittivity of lipid bilayers, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 557, p. 51-57 (2018) Available online 5 May 2018; <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.05.011>; IF: 2.714 Q2**
 - 3.1. **Abstract:** Understanding sugar-membrane interactions is of fundamental and technological relevance considering the role of sugars in drought-protection mechanisms of plants as well as the cryo- and bio-preserving effect of carbohydrates in many industrial and medical applications. In this work, we investigated the effect of sucrose on the electrical properties of membranes. In particular, we measured the specific capacitance of palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholine membranes in aqueous solutions of sodium chloride. Different concentrations of sucrose were examined. The capacitance was assessed from the frequency-dependent deformation of giant unilamellar lipid vesicles in alternating electric field. Our measurements on giant vesicles in sugar-free aqueous solutions yield lower specific capacitance compared to values obtained for suspended and supported bilayers. This might be a result of the higher membrane tension in the latter systems, which is coupled to smaller thickness of the bilayer. We also report an increase of the bilayer capacitance upon increasing the sugar content in water. This finding is consistent with the sugar-induced thinning of membranes reported in the literature. However, the thinning is not sufficient to explain the observed capacitance increase with rising sugar concentration. We interpret the trend as resulting from an increase in the membrane dielectric permittivity.
 - 3.2. **Резюме:** Интересът към изследване въздействието на захари върху липидни мембранни структури има както фундаментален така и приложен характер във връзка с описанието на молекулната организация в такива системи, за изучаване и използване на механизмите на предпазване от засушаване при растенията в биотехнологиите за крио- и биопрезервация на тъкани и храни. В настоящата работа сме изследвали ефекта на захарозата върху електричните свойства на синтетични липидни мембрани. Измерен е специфичният капацитет на палмитил-олеил фосфатидилхолинови мембрани във водни разтвори на натриев хлорид с различни концентрации на захароза. За целта е използван електродеформационният метод,

базиран на честотно-зависимата деформация на еднослойни квазисферични везикули в променливо електрично поле. Получената стойност за мембрания капацитет в чист солеви разтвор е по-ниска от публикуваната от други автори стойност, измерена върху окачени или отложени върху твърда подложка мембрани. Така получената разлика вероятно е резултат от значително по-високото механично напрежение и свързаното с него изтъняване на липидния бислой в случая на окачени или отложени мембрани. Нашите резултати показват нарастване на специфичния мембранен капацитет при увеличаване на концентрацията на захарта във водния разтвор, което е в съгласие с докладваното в литературата изтъняване на бислоя в присъствие на захар. Намалението на дебелината на бислоя само по себе си не е достатъчно да обясни наблюдаваното нарастване на капацитета, което води до заключението, че относителната диелектрична проницаемост на мембраната също нараства.

4. **V. Vitkova, D. Mitkova, K. Antonova**, Capacitance of lipid bilayers in sugar-free aqueous solutions, *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, Vol. 70, No 10, 2017, p.1355-1362; IF: 0.251 **Q2**
- 4.1. Abstract: By analysing the deformation of 'giant' unilamellar lipid vesicles in alternating electric field at varied frequency we measured the specific capacitance of palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholine membranes in sugar-free aqueous solutions of sodium chloride. The obtained value $0.50 \pm 0.02 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ is lower than the values reported so far. This finding is in good agreement with the membrane capacitance found in the literature for the same lipid composition in sugar-containing aqueous solutions taking into account the sugar-induced membrane thinning effect. With regard to the previous data for the membrane capacitance from experiments with black lipid membranes, our result is consistent with the expected impact of the coupling of the membrane tension to its thickness.
- 4.2. Резюме: Чрез анализ на честотно-зависимите промени във формата на 'гигантски' квазисферични липидни везикули в променливо електрично поле е определен електричният капацитет на палмитил-олеил фосфатидилхолинови мембрани в разтвори на натриев хлорид. Получената стойност на специфичния мембранен капацитет, $0.50 \pm 0.02 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, е по-ниска от намерените в литературата данни за лецитинови мембрани. Това сравнение в комбинация с публикуваните от други автори доказателства за влиянието на захарите върху структурата на липидния бислой е в добро съгласие с обратнопропорционалната зависимост между електрическия капацитет на бислоя и дебелината на същия в приближение на плосък кондензатор.
5. **D. Mitkova, N. Marukovich, Y. A. Ermakov, V. Vitkova**, Bending rigidity of phosphatidylserine-containing lipid bilayers in acidic aqueous solutions, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 460, pp. 71–78 (2014); ISSN: 0927-7757; IF: 2.752 **Q2**
- 5.1. Abstract: The elastic properties of anion lipid-containing bilayers were studied in aqueous solutions with fixed ionic strength at $\text{pH} \leq 5$. Giant vesicles from stearyl-oleoyl-phosphatidylcholine (SOPC) with various contents of dioleoyl-phosphatidylserine (DOPS) were obtained via electroformation and observed in phase contrast and fluorescence. Two structural phases were found to coexist in vesicle membranes. Thermal fluctuation

spectroscopy of quasispherical vesicles with homogeneous liquid membranes was applied for the quantification of their bending rigidity. The white-noise contribution, significantly influencing the calculated value of the bending modulus, was taken into account in the analysis of the thermal shape fluctuations of vesicles. Electrokinetic measurements with SOPC/DOPS liposomes provided information about their surface potential dependence on pH and also as a function of the DOPS molar content in bilayers. The experimentally obtained values for the bending rigidity of SOPC bilayers containing various amounts of DOPS are reported and discussed in the light of the existing theory for the electrostatic contribution to the bending modulus of charged lipid membranes.

5.2. **Резюме:** Изследвани са еластичните свойства на мембрани с анионен липид в състава им, във водни разтвори с фиксирана йонна сила и $\text{pH} \leq 5$. Везикули от стеарил-олеил фосфатидилхолин (SOPC) с различно молно съдържание на диолеил фосфатидилсерин (DOPS) са получавани чрез електроформиране и са изследвани с флуоресцентна и фазовоконтрастна микроскопия. Установено е съществуването на две структурни фази в изследваните мембрани. Еластичността на огъване е измерена посредством термична флукуационна спектроскопия на квазисферични везикули с хомогенни мембрани. При анализа на флукуациите е отчетен белият шум, чийто принос при изчисляване на модула на огъване е показан в предходно изследване. Чрез електрокинетични експерименти с SOPC/DOPS липозоми е получен повърхностният потенциал на мембраните като функция на pH на водната среда при различно молно съдържание на DOPS. Измерените стойности на модула на огъване на SOPC/DOPS бислоеве са дискутирани в светлината на съществуващата теория за електростатичния принос към еластичността на огъване на заредени липидни мембрани.

6. R. Georgieva, K. Mircheva, **V. Vitkova**, K. Balashev, Tz. Ivanova, C. Tessier, K. Koumanov, P. Nuss, A. Momchilova, G. Staneva, Phospholipase A2 induced remodeling processes on liquid-ordered / liquid-disordered membranes containing docosahexaenoic or oleic acid: a comparison study, DOI:10.1021/acs.langmuir.5b03317(2016); *Langmuir* **32**, 1756–1770 (2016) IF: 3.683 **Q1**

6.1. **Abstract:** Vesicle cycling, which is an important biological event, involves the interplay between membrane lipids and proteins, among which the enzyme phospholipase A2 (PLA2) plays a critical role. The capacity of PLA2 to trigger the budding and fission of liquid-ordered (Lo) domains has been examined in palmitoyl-docosahexaenoyl phosphatidylcholine (PDPC) and palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholine (POPC)/ sphingomyelin/ cholesterol membranes. They both exhibited a Lo/liquid-disordered (Ld) phase separation. We demonstrated that PLA2 was able to trigger budding in PDPC-containing vesicles but not POPC ones. The enzymatic activity, line tension, and elasticity of the membrane surrounding the Lo domains are critical for budding. The higher line tension of Lo domains in PDPC mixtures was assigned to the greater difference in order parameters of the coexisting phases. The higher amount of lysophosphatidylcholine generated by PLA2 in the PDPC-containing mixtures led to a less-rigid membrane, compared to POPC. The more elastic Ld membranes in PDPC mixtures exert a lower counteracting force against the Lo domain bending.

6.2. Резюме: Везикуларният транспорт, един от основните транспортни механизми в клетката, е тясно свързан с взаимодействието между мембранните липиди и протеини, сред които ензимът фосфолипаза А2 (PLA2) играе критична роля. Изследвано е влиянието на PLA2 върху морфологията на течено-подредени (Lo) домени в палмитил-докозахексаноил фосфатидилхолинови (PDPC) мембрани и в мембрани от палмитил-олеил фосфатидилхолин (POPC)/ сфингомиелин/ холестерол. И двата състава показват фазово разделяне на течна подредена (Lo) и течна неподредена (Ld) фази. Показано е свойството на PLA2 да предизвиква пъпкуване (budding) в PDPC-съдържащи везикули, което не се наблюдава при везикули от POPC. Ензимната активност, линейното напрежение и еластичността на мембраната в течната неподредена фаза около Lo домените са основни фактори, повлияващи процесите на пъпкуване (budding). По-високото линейно напрежение на Lo домените в PDPC-съдържащи мембрани е обяснено с по-голямата разлика между параметрите на подреденост на двете едновременно съществуващи структурни фази. В резултат на по-високото съдържание на лизофосфатидилхолин вследствие на действието на PLA2 в PDPC-съдържащите смеси еластичността на огъване на мембраната нараства в сравнение с еластичността на POPC мембраните. По-ниският модул на огъване на PDPC-съдържащите Ld мембрани благоприятства огъването на Lo-домените.

7. P. Todorov, P. N. Peneva, St. I. Georgieva, J. Tchekalarova, **V. Vitkova**, K. Antonova, A. Georgiev, Synthesis, characterization and anticonvulsant activity of new azobenzene-containing VV-hemorphin-5 bio photoswitch, *Amino Acids*, 2019 (accepted); ISSN: 0939-4451 (Print) 1438-2199 (Online) IF: 2.906 **Q1**

7.1. Abstract: A novel analog of VV-hemorphin-5 containing azobenzene moiety has been synthesized and investigated for anticonvulsant activity in relation to its $E \rightarrow Z$ photophysical properties activated by long wavelength light at 365 nm. The synthesis was achieved by a modified SPPS by Fmoc-dimerization strategy. The electrochemical behavior before and after UV illumination was investigated using different voltammetric modes. The number of electrons transferred, heterogenic rate constant and diffusion coefficient for E - and Z -isomers were also evaluated. Revealing the governing principles involved in signaling and nerve pulse propagation requires the detailed characterization of the electrical properties of cell membranes. For probing the effect of synthesized azo-peptide on the membrane electrical properties, we measured the specific capacitance of lipid bilayers, representing a basic physical model of biomembranes with their simple reproducibility in laboratory conditions at controlled membrane composition and physicochemical parameters of the surrounding aqueous medium. Our results have shown reduced membrane capacitance in the presence of the azo-peptide, thus providing evidences for possible alterations in the dielectric permittivity of the bilayer. The (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln)₂Azo peptide was explored also in vivo for preliminary anticonvulsant activity by using the 6-Hz seizure test and pentylenetetrazol (PTZ) seizure test in mice. The Z -isomer has exhibited higher potency compared to E -isomer most pronouncedly in the 6 Hz test for psychomotor seizures where the compound had activity at all three tested doses. It was found that the Z -isomer decreased the latency for onset of clonic seizures induced by PTZ. These results demonstrate that the Z -isomer deserves further evaluation in other screening tests for anticonvulsant activity.

7.2. Резюме: Синтезиран е полипептид, произведен на VV-хеморфин-5, съдържащ азобензолна група, и е изследван за противоконвулсивна активност в контекста на фотофизичните му свойства ($E \rightarrow Z$) при ултравиолетово осветяване с дължина на вълната 365 nm. За получаването на полипептида е използван модифициран твърдотелен пептиден синтез. Електрохимичното поведение преди и след ултравиолетово осветяване е изследвано чрез волтаметрия. Направена е оценка на броя отдадени електрони, скоростната константа и коефициента на дифузия на E - и Z -изомерите. Изследването на електричните свойства на клетъчните мембрани стои в основата на описанието на механизмите на предаването на нервния импулс. За оценка на ефекта на синтезирания азопептид върху електричните свойства на липидния бислой, експериментално е определен специфичният електричен капацитет на моделни фосфатидилхолинови мембрани. В присъствие на азопептид е установено намаление на мембранный капацитет в сравнение с контролата, което свидетелства за промяна на диелектричната проницаемост на бислоя в присъствие на пептида. Проведени са и *in-vivo* изследвания за характеризиране на противоконвулсивното действие на пептида върху лабораторни мишки. Получени са доказателства за по-висок потенциал на Z -изомера в сравнение с E -изомера за отключване на психомоторни припадъци и при трите изследвани дози. Установен е потискащ ефект на Z -изомера спрямо появата на клонични припадъци, предизвикани от пентилентетразол. Тези резултати демонстрират потенциала на Z -изомера за провеждане на допълнителни скрийнинг тестове за антиконвулсивна активност.

8. J. Genova, V. Vitkova, I. Bivas, Registration and analysis of the shape fluctuations of nearly spherical lipid vesicles, *Physical Review E* 88, 022707 (2013); 1539-3755 (print); 1550-2376 (online) IF 2.288 Q1

8.1. Abstract: The analysis of shape fluctuations of giant nearly spherical lipid vesicles observed via optical microscopy is one of the widely used methods for the determination of the bending elasticity of lipid membranes. Although the method has been used already for three decades, the values of this material constant, obtained by different groups for membranes of the same composition, in identical conditions, differ significantly. The aim of the present work is the development of the method, enabling us to avoid the influence of artifacts on the value of the measured bending modulus. This is achieved by rejection of some images of the vesicle or the whole vesicle when they do not satisfy the requirements (selection criteria) of the applied theory. The bending modulus of 1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine lipid membranes is determined via the advanced method described here. The results are compared with the values in the literature and their difference is discussed.

8.2. Резюме: Анализът на флукуациите на формата на гигантски, почти сферични липидни везикули, наблюдавани с оптична микроскопия представлява един от широкоизползваните методи за определяне на еластичността на огъване на липидни мембрани. Въпреки че методът е прилаган вече в продължение на три десетилетия, стойностите на тази материална константа, получени от различни групи за мембрани с еднакъв химически състав при идентични условия, се различават значително. Целта на настоящата работа е усъвършенстването на метода за преодоляване на влиянието на различни артефакти върху измерената стойност на модула на огъване на мембраната. Това е постигнато посредством на отхвърлени по определени критерии

образи или на самата везикула в случай, че не удовлетворява изискванията (критерии за селекция) на разработената теория. Модулът на огъване на мембрани от 1-стеарил-2-олеил-sn-глицерол-3-фосфохолин е определен по описания тук метод. Резултатът е сравнен със стойностите в литературата, като са обсъдени установените разлики.

9. **V. Vitkova**, D. Mitkova, G. Staneva, Lyso- and omega-3-containing phosphatidylcholines alter the bending elasticity of lipid membranes, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 460, pp. 191–195 (2014); ISSN: 0927-7757; IF: 2.752 **Q2**
- 9.1. **Abstract:** We report on the effect of lyso- and polyunsaturated fatty acid (PUFA)-containing lipids on the bending elastic properties of lipid membranes. The bending stiffness of monounsaturated phosphatidylcholine (POPC) bilayers with various molar fractions of an omega-3-containing phosphatidylcholine (PDPC) and/or a lyso-phosphatidylcholine (lyso-PC) was measured by thermal shape fluctuation analysis (TSFA) performed on quasispherical giant unilamellar vesicles (GUV). Strong evidences of their softening effect on lipid bilayers are provided together with data suggesting different degree of influence of the two molecules on the membrane bending elasticity. The effect of lyso-PC on the bending stiffness of POPC membranes was shown to be stronger than the PDPC. We conclude that the PDPC and lyso-PC are most likely controlling the membrane deformations by modulating its elastic properties.
- 9.2. **Резюме:** Изследван е ефектът на лизолипиди и липиди с полиненаситени мастнокиселинни остатъци (PUFA) върху механичните свойства на бислоя. Еластичността на огъване на мембрани от мононенаситени фосфатидилхолини (POPC) с различни молни части омега-3-съдържащи фосфатидилхолини (PDPC) и/или лизофосфатидилхолин (lyso-PC) е получена чрез анализ на термичните флукутации на формата на квазисферични липидни везикули. Получени са доказателства за намаляване на модула на огъване на мембраната, които свидетелстват за различна степен на този ефект при двете изследвани молекули. Влиянието на лизофосфатидилхолина върху еластичната константа е по-силно в сравнение с установеното намаление на модула на огъване при PDPC-съдържащи мембрани. Получените резултати дават основание да се заключи, че PDPC и лизофосфатидилхолинът повлияват деформациите на мембраната чрез модулиране на механичните ѝ свойства.
10. **V. Vitkova**, D. Mitkova, N. Kozarev, A. Stoyanova-Ivanova, and I. Bivas, Bending rigidity of lipid membranes and the pH of the aqueous surroundings, *C. R. Acad. Bulg. Sci.* **65** (3) (2012) 329-334; ISSN 1310–1331 (Print); ISSN 2367–5535 (Online); IF 0.284 **Q2**
- 10.1. **Abstract:** The bending elasticity of synthetic lipid membranes is studied at two different values of pH of the aqueous medium. The bending elasticity modulus is measured via analysis of the thermally induced fluctuations of the shape of quasispherical vesicles. The results show that at lower pH values corresponding to higher acidity of the water environment, the bending modulus of the membrane decreases and the membrane becomes more flexible. The softening effect of sucrose solutions on the lipid bilayer is proven experimentally in accordance with our previous results. The strong influence of the antibacterial agent, imidazole, dissolved in the aqueous surroundings, on the membrane

mechanics is revealed. It is shown how the presence of 0.01 mol/L of potassium chloride in the water alters the bending rigidity of lipid bilayers.

10.2. Резюме: Модулът на еластичност на огъване на синтетични липидни мембрани е определен при две стойности на рН на водния разтвор. Материалната константа е изчислена на базата на анализ на термичните флукуации на формата на квазисферични везикули. Експерименталните резултати показват, че при ниски стойности на рН, съответстващи на киселинни свойства на средата, модулът на огъване на мембраната намалява. Получени са нови доказателства за влиянието на захарозата върху еластичността на огъване на липидния бислой в съответствие с нашите предходни резултати. Установено е, че в присъствие на антибактериалния агент имидазол се променя еластичността на огъване на мембраната. Изменения в материалната константа са получени и във воден разтвор на 0.01 мол/л калиев хлорид.

11. V. Doltchinkova and V. Vitkova, Surface charge and light scattering of thylakoid membranes and the effect of divalent cations, *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences* (accepted) Q2

11.1. Abstract: Cations are vital components of all membranes, since they are intimately concerned in protein-protein, lipid-lipid and protein-lipid interactions in cells. The effect of cations on the structural organization of chloroplast membranes and illumination may induce dramatic functional changes. For elucidation of molecular mechanisms underlying divalent cation interactions with chloroplasts, we combined microelectrophoresis and light scattering of thylakoid preparations at fixed pH values of 7.5 and of 6.3 upon addition of calcium or magnesium cations. In their presence the net negative membrane charge density and aggregation of thylakoids are obtained to increase upon illumination. The secondary ion-exchange (proton gradient formation) across the membrane is enhanced by divalent cations at pH 7.5. Our results indicate a strong effect of Mg^{2+} and Ca^{2+} on thylakoid aggregation and primary ion-exchange processes across the membrane at pH 6.3. The significance of cation interaction with thylakoid membranes at photo-activating and near-saturated illumination is discussed.

11.2. Резюме: Участието на катионите в мембранно-свързаните процеси в клетката засяга всички молекулни взаимодействия и играят важна роля за определяне на структурата на тилакоидните мембрани на хлоропластите. Ефектът на катионите върху структурната организация на хлоропластните мембрани и пигмент-белтъчните комплекси в комбинация с осветяване може да доведе до значителни функционални промени в мембраната. За да изследваме молекулните механизми на действие на двувалентните катиони върху хлоропластни мембрани, проведохме измервания чрез микроелектрофореза и светорасейване на тилакоидни образци при рН 7.5 и рН 6.3 и добавяне на калциеви или магнезиеви йони. В присъствие на двувалентните катиони е установено нарастване на нетната плътност на заряда и агрегацията на тилакоидите при осветяване. Вторичният йонен обмен (формирането на протонен градиент) през мембраната се увеличава в присъствието на двувалентните катиони при рН 7.5. Резултатите от измерванията при рН 6.3 свидетелстват за силен ефект на Mg^{2+} и Ca^{2+} върху тилакоидната агрегация и първичния йонен обмен през мембраната.

Дискутирани са получените резултати за катионното взаимодействие с тилакоидните мембрани при осветяване с фотоактивираща и близка до насищащата светлина.

12. D. Mitkova and **V. Vitkova**, The aqueous surroundings alters the bending rigidity of lipid membranes, *Russian Journal of Electrochemistry*, 2016, Vol. 52, No. 12, pp. 1172–1178; ISSN 1023-1935 [Published in Russian in *Elektrokhimiya*, 2016, Vol. 52, No. 12, pp. 1312–1319] IF: 0.828 **Q4**

12.1. Abstract: The bending elasticity is the mechanical property that characterizes the deformability of lipid bilayers. In the present study the bending elasticity of phosphatidylcholine lipid membranes is reported in aqueous media with various chemical composition and pH. The bending modulus is obtained from analysis of the thermal shape fluctuations, performed on nearly spherical giant lipid vesicles. Lower bending rigidity of phosphatidylcholine bilayers is measured in aqueous media, containing potassium or sodium chlorides, compared to its value in water without salts. The results reported here for the membrane bending elasticity at three acidic values of pH are compared with the literature data from micromanipulation measurements of giant unilamellar vesicles from the same lipid. In accordance with previous results, further evidences are provided for the softening of lipid bilayers in the presence of sucrose in the aqueous surroundings.

12.2. Резюме: Измерването на еластичността на огъване на липидната мембрана дава количествена оценка на способността ѝ да се деформира, променяйки кривината си под въздействие на външни сили. В настоящата работа е проведено експериментално изследване на еластичността на огъване на фосфатидилхолинови мембрани във водни разтвори с различни химичен състав и pH. Модулът на огъване е получен чрез анализ на термичните флуктуации на формата на почти сферични липидни везикули. Установено е намаляване на стойността на измерваната материална константа на бислоя във водни разтвори на калиев и натриев хлорид в сравнение със стойността на модула в двойнодестилирана вода. Резултатите, получени за мембранната еластичност при три стойности на pH в киселата област са дискутирани в светлината на намерените в литературата данни от микроманипулация на гигантски везикули със същия липиден състав. В съгласие с нашите предходни резултати за влиянието на нискомолекулни въглехидрати върху мембранната механика, са получени нови доказателства за намаляването на модула на огъване на бислоя в присъствие на захароза във водното му обкръжение.

13. D. Mitkova, A. Stoyanova-Ivanova, St. Georgieva, P. Todorov, N. Kozarev, Yu. A. Ermakov, and **V. Vitkova**, Charged lipid bilayers in aqueous surroundings with low pH, in Edited by Aleš Iglíč and Chandrashekhara V. Kulkarni, editors: *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* vol. 18 (Elsevier), 2013, pp. 1-20 (ISBN: 9780124115156)

13.1. Abstract: The present chapter discusses our experimental results on morphology, stability, and the mechanical properties of two-component charged lipid bilayers in aqueous solutions with controlled ionic strength at low pH. Observations by phase-contrast and fluorescent microscopy revealed coexistence of two structural phases in membranes from stearyl oleoyl phosphatidylcholine (SOPC), containing more than 10 mol% of the charged lipid dioleoyl phosphatidylserine. At temperatures lower than 29 °C, the existence of nonfluctuating “hard” domains was registered in fluid membranes at pH 5.0. The method of

shape-fluctuation analysis of quasi-spherical vesicles was applied for the determination of the bending modulus of homogeneous liquid bilayers. The value obtained for this material constant of bilayers with 0.2 molar fraction of charged lipid is around 30% higher than the bending modulus of uncharged (SOPC) membranes in the same surrounding solution. The experimental findings, presented and discussed in the chapter, qualitatively agree with our previous results for the curvature rigidity of charged bilayers as measured by vesicle micromanipulation.

13.2. Резюме: В настоящата глава са разгледани експерименталните ни резултати върху морфологията, структурната организация и механичните свойства на двукомпонентни заредени липидни мембрани във водни разтвори с контролирана йонна сила и рН. Наблюденията във фазовоконтрастна и флуоресцентна микроскопия показват съвместното съществуване на две структурни фази в мембрани от стеарил-олеил фосфатидилхолин (SOPC), съдържащи над 10 мол % от заредения липид диолеил фосфатидилсерин. При температури, по-ниски от 29 °C, е установено съществуването на нефлуктуиращи “твърди” области в течната мембрана при рН 5.0. Модулът на еластичност на огъване на хомогенни двукомпонентни мембрани е определен чрез провеждането на флукуационно-спектроскопски измервания върху квазисферични гигантски везикули. Стойността, получена за константата на огъване на бислоеве с 0.2 молни части зареден липид е с около 30% по-висока от материалната константа на незаредени (SOPC) мембрани. Установеното нарастване на модула на огъване на заредени липидни мембрани, представено в настоящата глава, е в качествено съгласие с нашите резултати, публикувани по-рано за еластичността на огъване на заредени бислоеве, определена чрез механична микроманипулация на липидни везикули.

14. **V. Vitkova** and A.G. Petrov, Lipid Bilayers and Membranes: Material Properties, in *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, in: A. Iglic, J. Genova (Eds), Academic Press: Burlington, vol.17, p. 89-138 (2013), ISBN: 9780124115163

14.1. Abstract: In this chapter, the experimental data about the mechanical and the electromechanical properties of lipid bilayers and native membranes are collected and reviewed together with the existing methodology for their measurements. The emphasis is on the important mechanical property, membrane bending rigidity. The discussion is accompanied by illustrative experimental examples for the curvature elasticity of lipid bilayers with different compositions and in various environments. Particular attention is given to the alteration of the bending stiffness of lipid membranes as a consequence of the presence of biologically significant molecules such as cholesterol, carbohydrates, or amphiphilic peptides.

14.2. Резюме: В настоящата глава е направен обзор на експерименталните данни в литературата за механичните и електромеханичните свойства на липидни бислоеве и нативни мембрани. Разгледана е и съществуващата методология за тяхното измерване. Акцентът е поставен върху еластичността на огъване на липидния бислой във връзка с ролята на механичните свойства на мембраната за описание на мембраносвързаните процеси в клетката, както и в редица приложения в технологиите и биомедицината. Дискусията е съпроводена с илюстративни примери от експеримента за определяне на еластичността на огъване на мембрани с различен

липиден състав и в различни водни разтвори. Специално внимание е отделено на резултатите за влиянието на биологичнозначими молекули като холестерол, нискомолекулни въглехидрати и амфифилен полипептид върху мембранната еластичност на огъване.

15. **V. Vitkova** and C. Misbah, “Dynamics of lipid vesicles – from thermal fluctuations to rheology” in Edited by Aleš Iglič: *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, vol. 14, (Elsevier), p. 257- 292, ISBN: 978-0-12-387720-8 (2011)

15.1. Abstract: Deformability is a key feature of the lipid membrane, being of importance for numerous processes taking place in biological cells, as well as for the flow behavior of cells in blood circulation. In the first part of the chapter, the potentials of investigating the dynamics of membrane fluctuations as an experimental tool for probing the membrane material properties are presented and discussed. By analysing the dynamics of thermally induced shape fluctuations of nearly spherical lipid vesicles, important mechanical constants of the bilayer are possible to be extracted, namely bending elasticity modules at free and blocked exchange of molecules between the two monolayers, comprising the lipid membrane, and the intermonolayer friction coefficient of the bilayer. The second part of this contribution is dedicated to the dynamics of unconfined lipid vesicles in linear hydrodynamic fields. The current state of theory and experiment of single vesicle dynamics in simple shear flows is reviewed. Special attention is given to the relation between the overall rheological properties of vesicle suspensions and the individual vesicle dynamics in the flow.

15.2. Резюме: Свойството на липидните мембрани да променят своята форма (кривина) под въздействие на външни сили е ключов фактор при множество процеси на клетъчно ниво. Значението на механичните свойства на мембраната се илюстрира и от примера за съществената роля на деформируемостта (механичните свойства) на еритроцитите за нормалната хемодинамика в организма. Първата част на главата е посветена на изследването на динамиката на флуктуациите на липидната мембрана като средство за определяне на материалните ѝ свойства. Посредством анализ на динамиката на термичните флуктуации на формата на квазисферични липидни везикули се получават основни механични константи на мембраната, а именно модулите на огъване при свободен и забранен обмен на молекули между двата монослоя, съставляващи мембраната, както коефициентът на междумонослойно триене. Във втората част на главата е разгледана и дискутирана динамиката на неограничени (далече от стените) липидни везикули в линеен хидродинамичен поток, като е обсъдено актуалното състояние на теоричните и експерименталните разработки по темата. Специално внимание е посветено на връзката между реологичните свойства на везикулни суспензии и индивидуалната динамика на везикулите в потока.

16. **V. Vitkova**, A. Farutin, B. Polack, C. Misbah, and T. Podgorski, Erythrocyte dynamics in flow affects blood rheology, *Journal of Physics: Conference Series* 398 012027 (2012); ISSN: 17426588; SJR 0.229

16.1. Abstract: Normal blood consists of highly deformable particles (red blood cells, RBC, or erythrocytes) suspended in a Newtonian fluid (blood plasma). As a rough physical model of erythrocytes, giant unilamellar vesicles (GUV) are successfully used to probe their

membrane properties. In shear flows vesicles and red blood cells show rich variety of dynamical behaviours influencing the rheological properties of their suspensions. Here, we focus on new experimental aspects of the problem in the case, when a combination of an oscillatory shear rate and a basic constant shear rate is applied to suspensions. Experimental examples with concentrated RBC suspensions are presented together with a discussion on the importance of the superposition of a constant shear flow to the pure oscillation, which is usually used to extract the viscoelastic properties of a complex fluid.

- 16.2. Резюме: Кръвта в норма представлява суспензия от силно деформируеми частици, клетки (червени кръвни телца или еритроцити) в нютонев флуид (кръвната плазма). В качеството си на базов физически модел на еритроцитите, „гигантските“ еднослойни липидни везикули (ГЛВ) успешно се използват за изследване на материални свойства на мембрани с контролиран липиден състав и физикохимични условия на експеримента. В линейни хидродинамични потоци везикулите и еритроцитите се характеризират с индивидуална динамика, която оказва влияние върху реологичните свойства на суспензията. Тук е разгледан нов експериментален аспект на проблема в случая, когато върху суспензията е приложена комбинация от стационарна и осцилаторна деформация. Обсъдени са резултатите, получени за концентрирани суспензии от еритроцити.
17. D. Mitkova, A. Stoyanova-Ivanova, Yu. A. Ermakov and **V. Vitkova**, Experimental study of the bending elasticity of charged lipid bilayers in aqueous solutions with pH5, *Journal of Physics: Conference Series* 398 012028 (2012); ISSN: 17426588; SJR 0.229
- 17.1. Abstract: Exposure to high concentrations of contaminations due to air polluting gases, vapours and aerosols and possibly altering the normal pH in the body could lead to undesirable changes in the properties of biological cells. Here, we study experimentally the mechanical properties of synthetic phospholipid bilayers containing increasing molar fractions (up to 0.15) of charged lipid (synthetic phosphatidylserine) in aqueous solutions with controlled ionic strength and at pH 5, which is slightly lower than the physiological values of pH. Our observations in phase contrast and fluorescence testified to the coexistence of two phases in membranes for temperatures below 29°C. Micro-sized inhomogeneities in vesicle membranes were systematically observed at temperatures lower than 29°C and for molar fractions of phosphatidylserine in the bilayer higher than 0.1. For the quantitative determination of the membrane bending rigidity, we applied thermal fluctuation analysis of the shape of quasispherical lipid vesicles. As far as the liquid-crystalline state of the bilayer is a necessary condition for the application of the experimental method, only vesicles satisfying this requirement were processed for determination of their membrane bending rigidity. The value obtained for the bending modulus of bilayers with 0.15 molar content of charged lipid is about two times higher than the bending modulus of uncharged membranes in the same bathing solution. These findings are in qualitative agreement with our previous results for the bending rigidity of charged bilayers, measured by vesicle micromanipulation.
- 17.2. Резюме: Излагането на високи концентрации вредни вещества в резултат на замърсяването на въздуха е само един от факторите, които биха могли да доведат до нарушения в хомеостазата и в частност, до отклонения в нормалните стойности на

pH с произтичащите от това последствия върху жизнените процеси в клетката. Механичните свойства на фосфатидилхолинови бислоеве, съдържащи до 0,15 молни части фосфатидилсерин, са определени експериментално във водни разтвори с контролирана йонна сила при pH 5. Тази стойност е по-ниска от физиологичната стойност на pH на кръвта. Наблюденията с оптична микроскопия във фазов контраст и флуоресценция доказват съществуването на двуфазна област в мембраните при температури под 29°C. Установените при тези температури микронехомогенности са наблюдавани в случая на двукомпонентни мембрани с над 10 мол % зареден липид в състава им. За количественото определяне на модула на еластичност на огъване е приложен анализ на термичните флуктуации на формата на квазисферични липидни везикули. В съответствие с изискванията на метода за целта са изследвани само хомогенни мембрани в течна неподредена фаза. Стойността на модула на огъване за мембрани с 0,15 молни части зареден липид е около два пъти по-висока от модула на огъване на контролата – незаредена еднокомпонентна мембрана в същия воден разтвор. Така полученият резултат е в съгласие с установеното по-рано чрез микроманипулация на везикули нарастване на модула на еластичност на огъване на заредени мембрани.

18. C. Minetti, V. Vitkova, F. Dubois and I. Bivas, New optical method for measuring the bending elasticity of lipid bilayers, *Journal of Physics: Conference Series* 682 (2016) 012031; ISSN: 17426588; SJR 0.229

18.1. Abstract: The knowledge of the elasticity of lipid bilayer structures is fundamental for new developments in biophysics, pharmacology and biomedical research. Lipid vesicles are readily prepared in laboratory conditions and employed for studying the physical properties of lipid membranes. The thermal fluctuation analysis of the shape of lipid vesicles (or flicker spectroscopy) is one of the experimental methods widely used for the measurement of the bending modulus of lipid bilayers. We present direct phase measurements performed on dilute vesicular suspensions by means of a new optical method exploiting holographic microscopy. For the bending constant of phosphatidylcholine bilayers we report the value of $23k_B T$ in agreement with values previously measured by micropipette aspiration, electrodeformation and flicker spectroscopy of giant lipid vesicles. The application of this novel approach for the evaluation of the bending elasticity of lipid membranes opens the way to future developments in the phase measurements on lipid vesicles for the evaluation of their mechanical constants.

18.2. Резюме: Изучаването на еластичността на липидните мембранни структури е от фундаментален и приложен интерес във фармакологията, биотехнологиите и биомедицинските изследвания. Липидните везикули са моделни системи с контролиран липиден състав и физикохимични параметри на обемната фаза, формират се по добре установени експериментални протоколи в лабораторни условия и се използват за изследване на физичните свойства на липидни мембрани. Флуктуационната спектроскопия се основава на анализ на флуктуациите на формата на квазисферични липидни везикули и представлява основен метод за измерване на модула на еластичност на липидната мембрана. В настоящата работа представяме директно измерване на фазата на комплексната амплитуда на интензитета на светлината, преминала през разрежена везикулна суспензия, чрез прилагане нов

оптичен метод, базиран на холографска микроскопия. Определен е модулът на еластичност на огъване на фосфатидилхолинови мембрани. Получената стойност на еластичната константа $23k_B T$ е в съгласие стойностите на модула на огъване, измерени чрез механична микроманипулация, електродеформация и класическа флукуационна спектроскопия. Прилагането на новия подход за получаване на еластичността на огъване на липидни мембрани отваря перспективи за бъдещи разработки във фазовите измервания на липидни везикули за оценка на материалните им константи.

19. D. Mitkova, K. Antonova and **V. Vitkova**, Mechanical and electrical properties of biomimetic membranes in the presence of sweeteners, *AIP Conference Proceedings*, 2075(1):170009; ISSN 0094243X (2019); SJR 0.165

19.1. Abstract: Understanding the basic mechanisms driving cell division, neuron growth, endocytosis, or shape changes in organelles such as the endoplasmic reticulum requires a detailed knowledge on the membrane elastic properties. Revealing the governing principles involved in other processes like signaling and nerve pulse propagation necessitates the detailed characterization of the electrical properties of membranes. With their simple reproducibility in laboratory conditions at controlled membrane composition and physicochemical parameters of the surrounding aqueous medium, lipid bilayers represent a basic physical model of biomembranes successfully applied for determination of their physical properties. Giant unilamellar lipid vesicles are widely used in biophysical research as a powerful biomimetic tool for characterization of lipid membranes. We measure the bending rigidity and capacitance of lipid bilayers in aqueous solutions of aspartame and sorbitol, which are non-saccharide sweeteners with wide application in the food industry. Our interest in these compounds is motivated by the existing issues on their influence on the human organism raising questions about the impact of these molecules at membrane level. We employ deformation of lipid vesicles in AC fields to obtain the electrical capacitance of palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholine bilayers in sorbitol solutions. Analysis of the thermal shape fluctuation of lipid vesicles is applied to determine the bending elasticity modulus of POPC membranes in the presence of aspartame or sorbitol in the aqueous solution. Their influence on the studied membrane properties is found to be different from the effect of sugars reported earlier.

19.2. Резюме: Описанието на молекулните механизми на процесите на клетъчно делене, растежа на невроните, везикуларния транспорт и други е свързано с изследване на еластичните свойства на липидната мембрана. Процесите на клетъчна сигнализация и предаване на нервния импулс от своя страна, изискват детайлно характеризиране на електричните свойства на липидния бислой. Добрата възпроизводимост в лабораторни условия при контролиран липиден състав и физикохимични параметри на водния разтвор обуславят използването на липидните бислоеве като базов физичен модел на биологичната мембрана, успешно прилаган за изследване на физичните им свойства. Гигантските еднослойни липидни везикули са широко използвани в биофизичните изследвания като гъвкав биомиметичен обект за определяне на материалните характеристики на мембраната. Изследвани са еластичността на огъване и електричният капацитет на липидни мембрани във водни разтвори на незехарните подсладители аспартам и сорбитол. Интересът към тези молекули е

продиктуван от широката им употреба в хранителната индустрия и съществуващите в литературата данни за потенциалните опасности, свързани със здравето на човека. За изследване на влиянието на сорбитола върху електричните свойства на липидния бислой се използва електродеформация на липидни везикули от палмитил-олеил фосфатидилхолин (POPC) в променливо електрично поле, а за определяне на модула на огъване се прилага флукуационен анализ на везикули от POPC в присъствие на аспартам или сорбитол във водния разтвор. Установено е, че влиянието на изследваните молекули върху механичните и електричните свойства на мембраната се различава от описания по-рано ефект на нискомолекулни въглехидрати.