



Българска академия на науките  
Институт по физика на твърдото тяло  
„Академик Георги Наджаков“

---

Бул. Цариградско шосе 72, 1784 София; <http://www.issp.bas.bg>; тел. +359 2 875 8061; факс: +359 2 416 9357

---

**Деница Миткова Бранкова**

**ТЕЧНОКРИСТАЛНИ СВОЙСТВА НА МОДЕЛНИ ЛИПИДНИ  
МЕМБРАНИ И НА ДЕФЕКТИТЕ В ТЯХ:  
Влияние на липидния състав и водната среда върху еластичността, ръбната  
енергия и електричния капацитет**

## **АВТОРЕФЕРАТ**

за придобиване на образователната и научна степен

„ДОКТОР“

Професионално направление 4.3. Биологически науки  
Научна специалност **Биофизика**

*Научен ръководител:*  
**доц. д-р Виктория Виткова Виткова**

София  
2018 г.

Дисертацията се състои от 125 страници, 33 фигури, 5 таблици и 245 цитирани литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от разширен научен семинар на Направление „Физика на меката материя“,

Институт по физика на твърдото тяло „Акад. Георги Наджаков” – БАН,

състоял се на 06.02.2018 година.

<http://www.issp.bas.bg>

ISSP-BAS-2018-PhD024

Защитата на дисертационния труд ще се състои на .....от.....часа в зала 300 на Институт по Физика на Твърдото Тяло „Акад. Г. Наджаков” – БАН, бул. „Цариградско шосе” 72,

пред научно жури в състав:

1. Акад. дфн Александър Георгиев Петров
2. Проф. дбн Албена Борисова Момчилова
3. Доц. д-р Виктория Виткова Виткова
4. Доц. д-р Кръстанка Георгиева Маринова
5. Доц. д-р Албена Георгиева Йорданова

## СЪДЪРЖАНИЕ

1. Въведение.....	5
2. Цел и задачи .....	6
2.1. Цел.....	6
2.2. Задачи .....	6
3. Методи.....	7
3.1. Методи за формиране на гигантски липидни везикули (giant unilamellar vesicles, GUVs)7	
3.2. Методи за наблюдение и запис на липидни везикули .....	7
3.3. Методи за предварителен анализ на липидните и водните разтвори .....	7
3.4. Методи за анализ на механичните и електричните свойства на GUVs .....	7
4. Резултати и дискусия.....	8
4.1. Морфология и стабилност на липидните мембрани във водни разтвори с висока киселинност .....	8
4.2. Механични свойства на липидните мембрани като функция от липидния състав на мембраната.....	10
1) Еластичност на огъване на двукомпонентни заредени липидни мембрани във водни среди с контролирана киселинност.....	10
2) Еластичност на огъване на мембрани, съдържащи полиненаситени мастни киселини и/или лизолипиди.....	12
4.3. Механични свойства на липидните мембрани като функция от киселинността и йонната сила на водната среда .....	15
1) Еластичност на огъване на бислойни липидни мембрани в среди с контролирана киселинност и йонна сила на водната среда .....	15
4.4. Механични и електрични свойства на липидните мембрани, като функция от концентрацията на захари във водната среда.....	17
1) Еластичност на огъване на мембрани в присъствието на захароза във водната среда .....	17
2) Ръбно напрежение палмитил олеил фосфатидилхолинови мембрани във водни разтвори на нискомолекулни въглехидрати.....	19
3) Електричен капацитет на палмитил олеил фосфатидилхолинова мембрана във водни разтвори, съдържащи захароза .....	22
5. Изводи.....	24
6. Приноси.....	26
Публикации във връзка с дисертацията: .....	27
Участие в научни форуми: .....	28
Списък на забелязани цитати на публикациите, свързани с дисертацията:.....	30
Стипендии и награди: .....	31

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ И ФОРМУЛИ НА ХИМИЧНИ СЪЕДИНЕНИЯ

SOPC	Стеароил олеоил фосфатидилхолин
POPC	Палмитил олеоил фосфатидилхолин
DOPS	Диолеил фосфатидилсерин
PDPC	Палмитил докозахексаеноил фосфатидилхолин
Lyso-PC	Лизо-фосфатидилхолин
DHA	Докозахексаенова киселина
PUFA	Полиненаситени мастни киселини
PLA <sub>2</sub>	Фосфолипаза А <sub>2</sub>
LPAT	Лизофосфолипидацилтрансфераза
$k_c$	Модул на еластичност на огъване на мембраната
TSFA	Анализ на термичните флуктуации на формата
GUVs	Гигантски липидни везикули
SUVs	Малки липидни везикули
Rh-DHPE	Родаминов маркер
rms	Средноквадратична стойност
PDM	Петров-Держански-Митов (модел)
$\gamma$	Ръбна енергия
fps	Образи в секунда (frames per second)
HPLC	Високоэффективна течна хроматография
(RP-)HPLC	Обратна фаза при високоэффективната течна хроматография
ЯМР	Ядрено магнитен резонанс
DOPE	Диолеил фосфатидилетаноламин
HCl	Солна киселина
C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Захароза
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Глюкоза
NaCl	Натриев хлорид
KCl	Калиев хлорид
C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	Имидазол

## 1. Въведение

Физичните свойства на липидните мембрани и тяхното структурно и функционално значение за биологичните клетки са обект на интензивни изследвания през последните няколко десетилетия [1–4]. Независимо от множеството функционални различия между отделните видове биомембрани, всички те се характеризират с основна роля в осигуряване на интегритета и компартментализацията на клетките, транспорта на вещества и обмена на информация [5]. Във връзка с изясняването на ролята на липидния бислой във функционално отношение, през последните години бяха намерени доказателства за значението на еластичността на огъване на мембраната при механотрансдукцията и молекулната организация в биомембраните [6]. Описанието и познаването на тези процеси са свързани със задълбоченото изследване на механичните свойства на биомембраните като функция на техния химичен състав и физикохимичните параметри на водната среда.

Основната структурна единица на биомембраните са липидните молекули, които в резултат на лиотропния мезоморфизъм се организират в двуслойна структура [2,3,7]. Според флуидно-мозаечния модел, биологичната мембрана може да бъде описана най-общо като двумерна матрица от липидни молекули, в която са включени протеиновите молекули [7]. Способността на липидния бислой лесно да се деформира под въздействие на външни сили, напр. в хидродинамичен поток, е предпоставка за успешното използване на функционализирани липидни везикули във фармакологията за транспортиране на лекарствени субстанции в кръвния поток на човешкия организъм. Предимствата в използването на липидните везикули (липозоми), като преносители на лекарствени препарати, е тяхната биосъвместимост с организма, в тази насока за приложението на липозомите е от особено значение изследването на всички фактори, които могат да повлияят мембраната еластичност и стабилност.

Липидният бислой представлява двумерен лиотропен течен кристал [3,4]. Транспортът на вещества през мембраната се осъществява посредством порообразуване и канали. Прилагането на електрични импулси (електропорация), е широко използван метод за инкорпорирането на големи молекули, лекарствени препарати, донорски гени и други в клетката [8].

Разкриването на фундаменталните принципи, управляващи клетъчната сигнализация и предаването на нервния импулс, предполага детайлното характеризиране на електрическите свойства на мембраните и по-специално, капацитивните свойства на липидните бислоеве.

Стабилизиращият ефект на нискомолекулните въглехидрати върху биологичните мембрани се прилага широко в медицината и индустрията, при крио- и биопрезервацията на тъкани и материали [9,10]. В настоящата дисертация е изследвано влиянието на нискомолекулни въглехидрати (захароза и глюкоза) върху мембранните свойства.

В научните изследвания липозомите се използват освен като директни преносители на лекарствени вещества, също така и като базов физичен модел на биологичната мембрана [11]. Те са лесновъзпроизводими в лабораторни условия с определен липиден състав на мембраната им.

В настоящата работа е използван течнокристален подход към структурата на мембраните [12,13]. Изследвани са три основни течнокристални свойства на липидните мембрани, а именно еластичността на огъване, ръбната енергия и електричният капацитет на мембраната. Експерименталните методи, използвани за изследване на влиянието на нискомолекулните въглехидрати върху свойствата на липидни мембрани, включват анализ на термичните флуктуации на формата на почти сферични гигантски еднослойни везикули (GUVs), електродеформация и електропорация на GUVs.

## **2. Цел и задачи**

### **2.1. Цел**

Количествено описание на механичните и електричните свойства на моделни мембрани с различен липиден състав и физикохимични параметри на водната среда посредством измерване на модула на еластичност на огъване, ръбната енергия и електричния капацитет.

### **2.2. Задачи**

- 1) Определяне на модула на еластичност на огъване на липидни мембрани, както следват:
  - Заредени двукомпонентни мембрани в зависимост от съдържанието на фосфатидилсерин и повърхностния заряд;
  - Мембрани от синтетичен фосфатидилхолин, съдържащи лизолипид и/или липид с полиненаситена ацилна верига;
  - Еднокомпонентни мембрани от синтетичен фосфатидилхолин при различна киселинност и йонна сила на водната среда;

- Еднокомпонентни мембрани от синтетичен фосфатидилхолин в присъствие на различни концентрации на захароза във водната среда;
- 2) Определяне на ръбната енергия на липидни бислоеве в присъствието на нискомолекулни въглехидрати (захароза и глюкоза);
  - 3) Определяне на електричния капацитет на липидни мембрани във водни разтвори на захароза.

### **3. Методи**

#### **3.1. Методи за формиране на гигантски липидни везикули (giant unilamellar vesicles, GUVs)**

- Електроформиране [14]
- Спонтанна хидратация (gentle hydration method) [15]

#### **3.2. Методи за наблюдение и запис на липидни везикули**

- 1) Апаратура за анализ на термичните флуктуации на почти сферични липидни везикули и електродеформация на GUVs
  - Фазово-контрастна микроскопия
  - Флуоресцентна микроскопия
- 2) Апаратура за електропорация на GUVs

#### **3.3. Методи за предварителен анализ на липидните и водните разтвори**

- Диференциална сканираща калориметрия
- Високоэффективна течна хроматография
- Измервания на киселинността на водните разтвори

#### **3.4. Методи за анализ на механичните и електричните свойства на GUVs**

- Определяне на еластичността на огъване на липидната мембрана [16]
- Измерване на ръбното напрежение на липидната мембрана [17]
- Измерване на електричния капацитет на липидната мембрана [18]

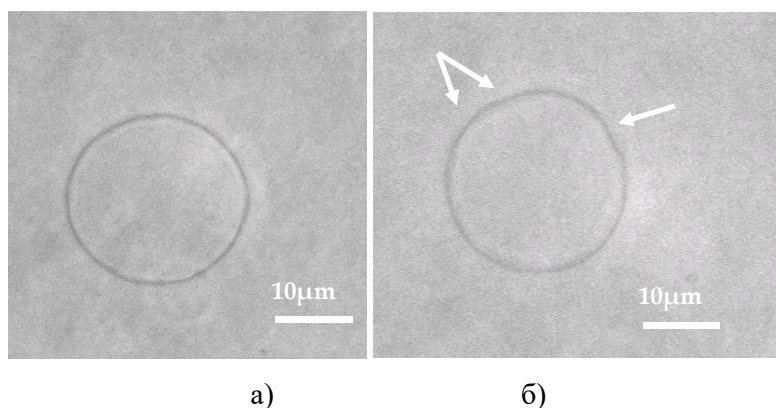
## 4. Резултати и дискусия

### 4.1. Морфология и стабилност на липидните мембрани във водни разтвори с висока киселинност

За да се установи стабилността на двукомпонентни липидни бислоеве във водни разтвори с висока киселинност беше проведена серия от експериментални изследвания, както следва. Получени бяха липидни везикули, съдържащи отрицателно зареден липид DOPS в матрица от незареден SOPC, във водни разтвори с различни стойности на рН, по-ниски от физиологичното, рН 7.

Изследванията на двукомпонентните заредени мембрани във водни разтвори с рН 3.4, систематично показват множество дефекти по мембраната. Подобни дефекти са установени при еднокомпонентни SOPC бислоеве в предходно наше изследване, както и от други автори [19,20].

При работата във фазов контраст систематично е наблюдавано наличието на нефлукутиращи участъци по SOPC/DOPS мембрани, при температури по-ниски от 29°C (фигура 13). От направения анализ, чрез диференциална сканираща калориметрия, се вижда, че няма наличие на гел фаза в мембраната, при изследваните от нас условия. Възможно съществуването на течна подредена и течна неподредена фази.

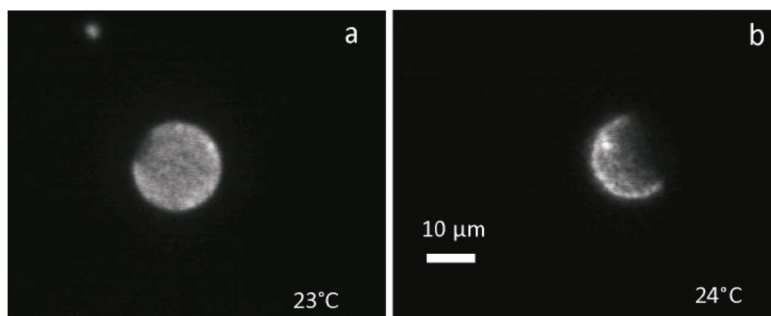


**Фигура 13** Липидни везикули от DOPS/SOPC 1:9 (mol:mol), във воден разтвор на 0,19 M  $C_{12}H_{22}O_{11}$  и 0,01 M NaCl, рН 5,0: а) везикула с хомогенна мембрана, при температура 30°C; б) везик фазово разделяне в мембраната при температура 25°C.

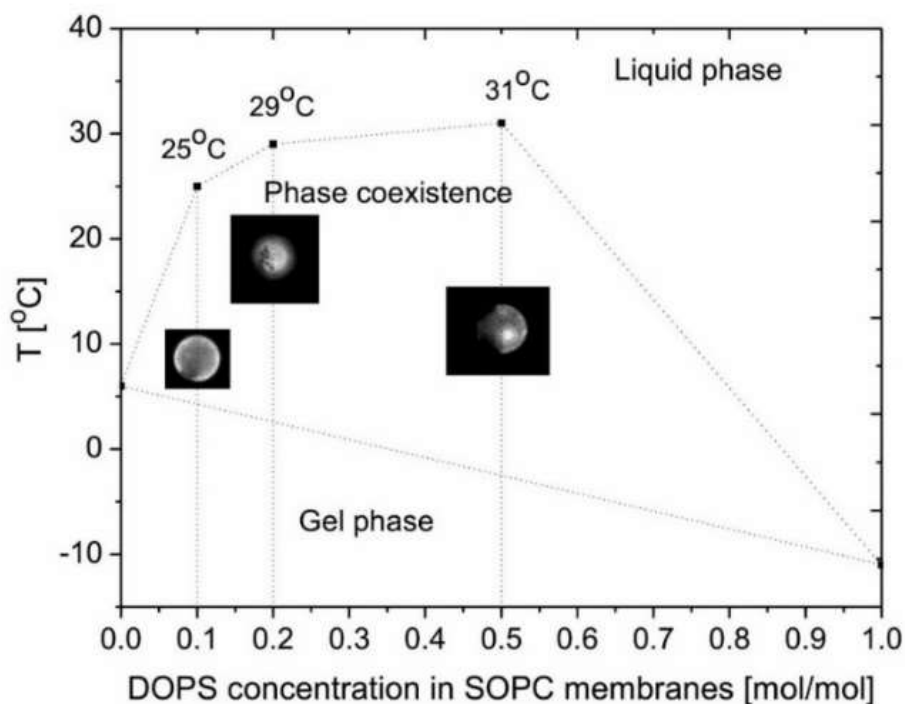
При работата във флуоресцентен режим ясно се отличават тъмните участъци по мембраната съдържаща DOPS, както е показано на фигура 15. На базата на наблюденията във фазов контраст и флуоресценция може да се заключи, че тъй като използваният родаминов маркер се разпределя в течната (неподредена) част на мембраната и понеже



във флуоресцентен режим, твърдата (неподредена) част от мембраната остава тъмна, което говори за отсъствието на маркер, то тези участъци представляват бислои в течна подредена фаза. Проведени са систематични експерименти, които целят да се получи зависимостта на фазовото поведение от температурата при различни концентрации на зареден липид. Получените данни за тази зависимост са представени в приблизителна частична фазова диаграма за използваната система, фигура 15 [21].



**Фигура 14** Флуоресцентни изображения на две липидни везикули, с мембрани, съставени от SOPC , 1,5 mol% Rh-DHPE и: (a) 20 mol% DOPS при 23°C; (b) 50 mol% при 24°C във воден разтвор на 0,19 M захароза, 0,01 M NaCl, pH 5.



**Фигура 15** Приблизителна частична фазова диаграма за SOPC/DOPS мембрани, установена чрез флуоресцентна микроскопия на липидни везикули (размер на пиксела 0.106 μm).

За да се получи информация за стабилността на липидните разтвори, с увеличаването на концентрацията на зареден липид в тях и при различни стойности на рН на водните разтвори, е проведен анализ на химичния състав на пробите чрез HPLC. В светлината на резултатите, дискутирани по-горе, е абсолютно необходимо да се определи дали методът за получаване на липидните везикули (електроформиране), оказва влияние върху химичния състав на техните мембрани. Анализът не показва изменения в качеството на използваните липидни разтвори.

#### **4.2. Механични свойства на липидните мембрани като функция от липидния състав на мембраната**

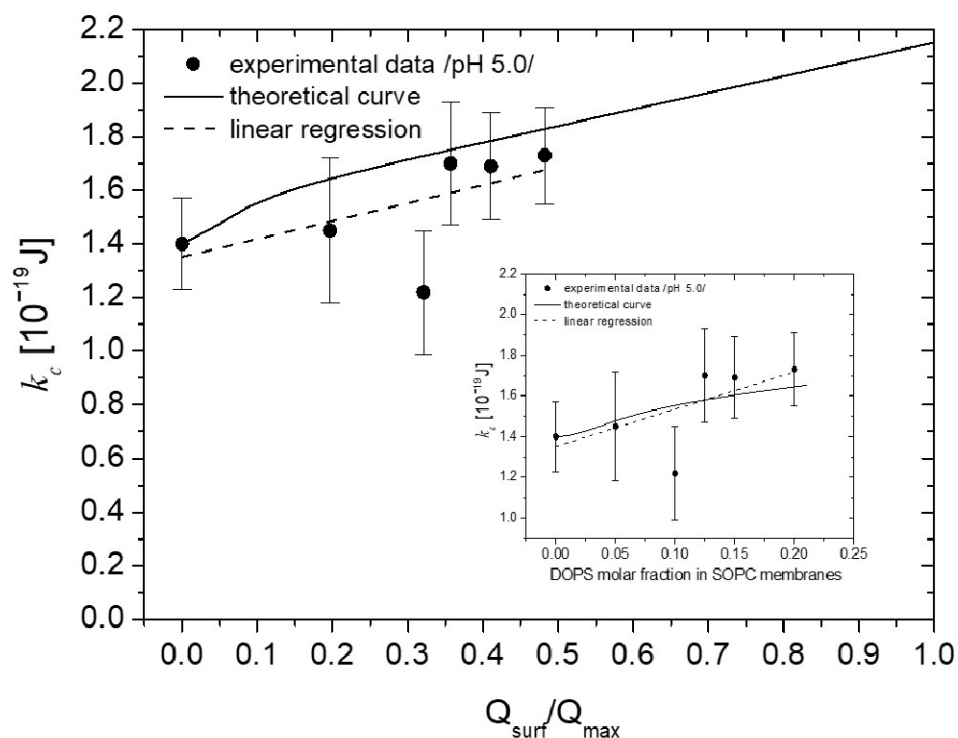
##### **1) Еластичност на огъване на двукомпонентни заредени липидни мембрани във водни среди с контролирана киселинност**

Модулът на еластичност на огъване на двукомпонентните фосфатидилсерин-съдържащи липидни мембрани е определен чрез анализ на термичните флукуации на формата на гигантски липидни везикули с хомогенни заредени мембрани, без видими дефекти. Експерименталната работа, свързана с получаването и изследването на еластичните свойства на заредени мембрани, е проведена при  $T > 31^{\circ}\text{C}$ . Изборът на тази работна температура е следствие от факта, че при провеждането на експерименти със заредени мембрани при температури по ниски от  $31^{\circ}\text{C}$ , по мембраната систематично се наблюдават твърди нефлукуиращи участъци дори и при ниски концентрации на заредения липид (10 mol % DOPS).

Получени са данни за модула на еластичност на огъване на SOPC/DOPS бислоеве, съдържащи до 20 mol% зареден липид, при  $T > 31^{\circ}\text{C}$ . Работата с по-високи концентрации изисква по-високи температури, което води до технически затруднения при натрупването на експериментални данни за еластичността на огъване на SOPC/DOPS мембрани за концентрации на DOPS, по-големи от 4/1 (mol/mol). За определянето на модула на еластичност на огъване за всяка от изследваните концентрации на зареден липид в мембраната, са записани и обработени десетки флукуиращи везикули, при съответните стойности на рН (рН 4 и рН 5).

Експерименталните резултати, поучени чрез TSFA за модула на еластичност на огъване,  $k_s$ , на DOPS-съдържащи SOPC липидни мембрани, са показани на фигура 19. Абсолютните стойности за модула на еластичност на огъване са изчислени на базата на ансамбъл от около десет везикули за всяка концентрация на зареден липид, отговарящи

на всички наложени критерии за допустимост. Съответните доверителни интервали са изчислени, като са взети предвид грешките на единичните измервания.



**Фигура 16** Модул на еластичност на огъване на мембрани във воден разтвор на 0,19 М захароза и 0,01 М натриев хлорид, като функция от повърхностната плътност на заряда на мембраната: плътни точки–зависимост на  $k_c$  от молното съдържание на DOPS в мембраната при рН 5; прекъснатата права–данните се описват с линейна зависимост  $y = a + bx$  със стойност на параметъра  $a = 1,35 \pm 0,13$  и наклон  $b = 0,67 \pm 0,39$ ; непрекъснатата линия–изчислена теоретична крива въз основа на [22,23]. *Включена графика:* Модулът на огъване като функция от концентрацията на DOPS в SOPC мембрани: с прекъснатата линия–линеен фит на данните  $y = a + bx$  със стойност на параметъра  $a = 1,35 \pm 0,11$  и наклон  $b = 1,83 \pm 0,88$ ; непрекъснатата линия–изчислена теоретична крива въз основа на [22,23].

На базата на получени резултати от електрокинетични измервания, които не са част от настоящата дисертация, е представен модулът на еластичност на огъване като функция от повърхностната плътност на заряда на мембраната. Получената зависимост е представена на фигура 19. При концентрация от 20 mol% DOPS в мембраната, повърхностната плътност на заряда достига до около 50% от максималната за мембраната [21].

**Таблица 1** Модул на еластичност на огъване на мембрани, съдържащи 10 mol% DOPS и 20 mol% DOPS, във водни разтвори на 0,19 M C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> и 0,01 M NaCl с pH 4 и pH 5.

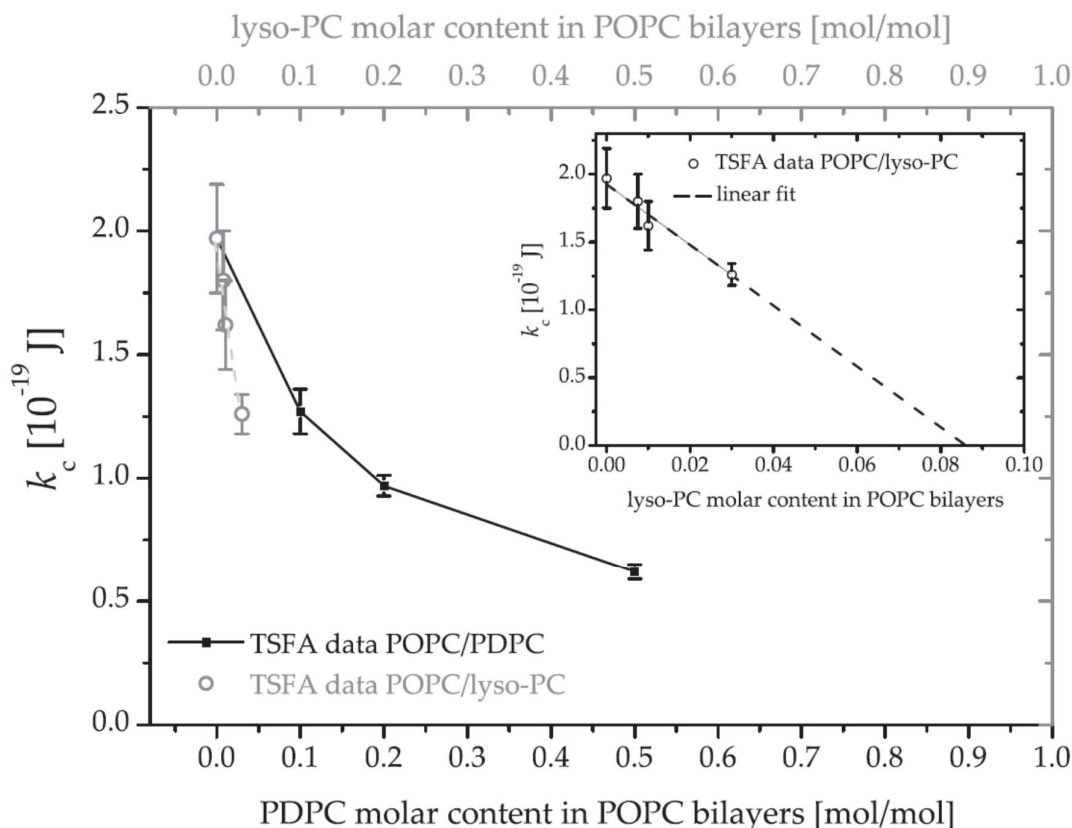
SOPC/DOPS [mol/mol]	$k_c$ [10 <sup>-19</sup> J]	
	pH 4	pH 5
9/1	1,24±0,32	1,22±0,23
4/1	1,56±0,30	1,73±0,18

Измерената стойност за модула на огъване на SOPC/DOPS 5/1 (mol/mol) мембрани при pH 4 е малко по ниска от тази при pH 5, но разликата остава в рамките на експерименталната грешка. При съотношение на SOPC/DOPS 9/1(mol/mol) в бислоя не се наблюдава промяна в модула на огъване при увеличаване на киселинността на водната среда от pH 5 до pH 4. Получените данни за еластичността на огъване, при тези липидни съотношения в мембраната, в среди с контролирана киселинност са показани в табл. 1.

## 2) Еластичност на огъване на мембрани, съдържащи полиненаситени мастни киселини и/или лизолипиди

Всички везикули, които са използвани за определяне на модула на еластичност на огъване, чрез анализ на термичните флукуации на формата, са подбрани да отговарят на наложените критерии, описани по горе и в [16].

Първата стъпка в изследванията беше да определим дали избраният метод за получаване на гигантски липидни везикули влияе върху получената стойност за модула на еластичност на огъване за даден липиден състав на мембраната. Във връзка с това бяха проведени два успоредни експеримента за определяне на  $k_c$ , веднъж на везикули, получени чрез спонтанно набъбване и втори път, на такива, получени чрез електроформиране. Двете изчислени стойности за модула на еластичност на огъване на PDPC/POPC мембрани, статистически не се различаваха. Следователно може да се направи заключение, че евентуална пероксидация, причинена от ИТО електродите, не води до измерими промени в еластичността на изследваните мембрани. Стойностите на модула на еластичност на огъване са определени чрез TSFA на везикули, получени чрез електроформиране, който се предпочита поради по-голямото количество получени квазисферични везикули, характеризиращи се с подходящи размери и униламеларност.

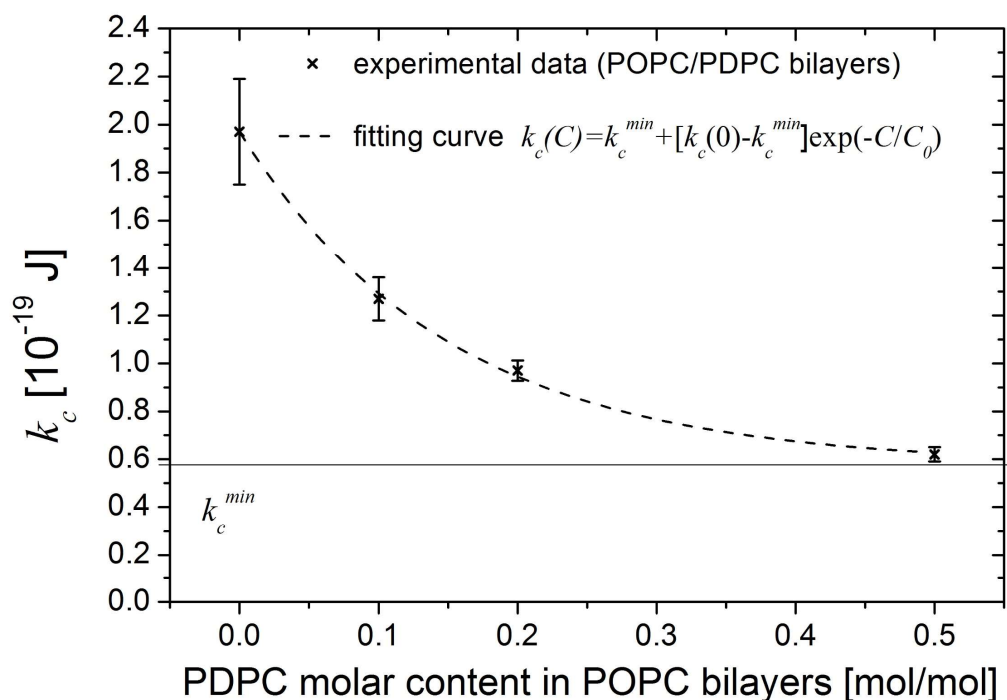


**Фигура 17** Еластичност на огъване на POPC мембрани, съдържащи различни концентрации lyso-PC или PDPC, получена чрез анализ на термичните флуктуации на формата на гигантски липидни везикули. *Включена графика:* Данните за POPC/lyso-PC мембрани са описани с линеен фит с:  $k_c(C_{lyso-PC}) = [1 - bC_{lyso-PC}]$  и параметри  $a = 1,93 \pm 0,06$  и  $b = 11,6 \pm 1,2$ ; а изчисления концентрационен праг е  $C_{cr} = (1/b) \leq 0,09$ , над който молекулите на lyso-PC в бислоя не могат да се разглеждат като идеален двумерен случай и трябва да се отчитат и междумолекулните им взаимодействия [24].

В нашето изследване, за бислоеве съставени от POPC/lyso-PC 99/1 (mol/mol), е измерено почти 20%-но намаляване на константата на огъване, в сравнение със стойността за чиста POPC мембрана (фигура 17). Теоретично е определено, че включването в бислоя на молекули, с голяма молекулна асиметрия, какъвто е случаят с lyso-PC, ще доведе до силно намаляване на константата на огъване на мембраната. Експерименталните резултати [24], показани в дисертацията, напълно потвърждават тези теоретични изчисления. От получените данни може да се определи максималната концентрация на lyso-PC в мембраната, над която се очаква включените молекули да окажат влияние върху стабилността на бислоя (фигура 17). От линейния фит на получените данни, ние определихме концентрационния праг за lyso-PC в POPC/lyso-PC мембрани, който е 9 mol% (виж фигура 17).

Експерименталните резултати, получени за твърдостта на POPC мембрани, съдържащи PDPC- и/или lyso-PC, са показани на фигура 17 [24]. Получено е силно намаляване на модула на еластичност на огъване за POPC/PDPC мембрани, в сравнение със стойността за чиста POPC мембрана. Концентрации на PDPC от порядъка на 50 mol% в мембраната, водят до редуциране на стойността за  $k_c$  с повече от две трети.

От получените резултати следва, че наличието на lyso-PC в POPC мембрани има значително по-голям ефект върху еластичността на огъване от ефекта на PDPC в бислоя. Наличието на 10 mol% PDPC в мембраната, води до около 40% намаляване на твърдостта на мембраната, докато само с 3 mol% lyso-PC се постига същият ефект.



**Фигура 18** Еластичност на огъване на POPC/PDPC мембрани, определена чрез анализ на термичните флукутации на формата на квази сферични липидни везикули [24].

Както е показано на фигура 18, експериментално определената зависимост на  $k_c$  от концентрацията на PDPC в POPC/PDPC мембрани може да се опише с експоненциална крива (с два свободни параметъра  $C_0$  и  $k_c^{min}$ ) от вида показан на фигурата, където  $C$  е моларното съдържание на PDPC в бислоя ( $C = 0$  за чисти POPC бислоеве, а  $C = 1$ , за чисти PDPC мембрани),  $C_0 = const$ ,  $k_c(0)$  е модулет на еластичност на огъване на еднокомпонентна POPC мембрана,  $k_c^{min}$  е друга константа. Стойността на  $k_c^{min}$  може да

се изчисли с помощта на фита на експерименталните данни:  $k_c^{min} = (0,58 \pm 0,03)10^{-1}$  J. Това се интерпретира като минималната възможна стойност за модула на еластичност на огъване на чисти PDPC мембрани, които на практика са недостъпни за директни изследвания, чрез TSFA, както е описано по-горе.

Получените резултати показват, че трикомпонентната мембрана POPC/PDPC/lyso-PC 4/8/1 с [ $k_c = (1,22 \pm 0,19)10^{-19}$  J], има модул на огъване, колкото и двукомпонентната POPC/lyso-PC 97/3 мембрана (виж фигура 17). Тези резултати поставят основа на бъдещи изследвания определящи мембранната структура, пропускливостта ѝ, както и механичните ѝ свойства.

#### **4.3. Механични свойства на липидните мембрани като функция от киселинността и йонната сила на водната среда**

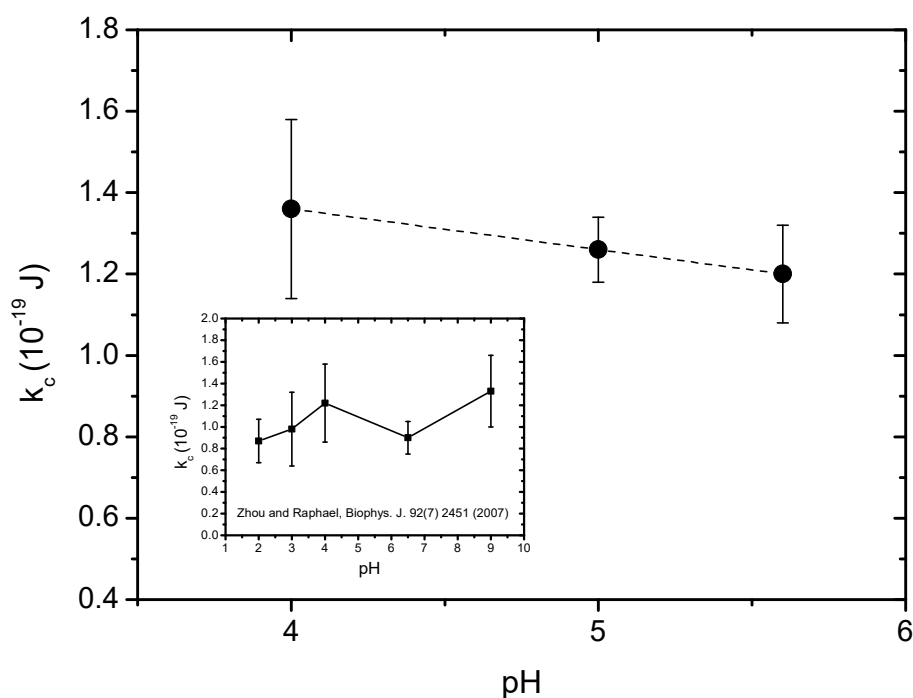
##### **1) Еластичност на огъване на бислойни липидни мембрани в среди с контролирана киселинност и йонна сила на водната среда**

Експерименталните резултати за модула на еластичност на огъване на SOPC мембрани при различни физикохимични параметри на водната среда са представени в Таблица 2. От резултатите, показани в таблицата, се вижда, че наличието на 0,01 mol/L KCl във водната среда води до почти двойно намаляване на модула на еластичност на огъване на SOPC в сравнение с модула на еластичност на огъване на SOPC мембрани в двойно дестилирана вода. Бовре и колектив публикуват данни за по-слабото влияние на натриевия хлорид върху механичните свойства на мембраните [25]. Те са наблюдавали 20% намаление на модула на еластичност на огъване на POPC мембрани в присъствието на десет пъти по-големи концентрации на натриев хлорид в сравнение с данните във вода без сол.

Модулът на еластичност на огъване на SOPC мембрани е измерен чрез анализ на термичните флукуации на формата (TSFA) на гигантски липидни везикули (GUVs) във водни разтвори с три различни стойности на рН, които са показани в таблица 2. Контролирането на рН на водните разтвори е извършено, чрез добавянето на 0,1 M HCl. На фигура 19 е представена зависимостта на модула на еластичност на огъване на SOPC мембрани от рН на водния разтвор. Данните ни показват, че с увеличаване на киселинността на водния разтвор се увеличава и модулът на еластичност на огъване на мембраната, което е в съгласие с данните получени и от други автори [20].

**Таблица 2** Данни за модула на еластичност на огъване на SOPC мембрани в различни водни разтвори и техните стойности за рН

Номер	Липид / Воден разтвор	рН	$k_c(10^{-19} \text{ J})$
1.	SOPC / Двойно дестилирана вода	5,60	1,88±0,15
2.	SOPC / 0,01 М КСl	5,60	0,85±0,22
3.	SOPC / 0,05 М C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	5,60	1,46±0,13
4.	SOPC / 0,19 М C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> + 0,01 М NaCl	5,60	1,20±0,12
5.	SOPC / 0,19 М C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> + 0,01 М NaCl	5,00 / HCl	1,26±0,08
6.	SOPC / 0,19 М C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> + 0,01 М NaCl	4,00 / HCl	1,36±0,22
7.	SOPC / 0,18 М C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> + 0,0025М C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	7,78	2,03±0,23



**Фигура 19** Модул на еластичност на огъване на SOPC мембрани във водни разтвори на 0,19 М захароза, 0,01 М NaCl при различни стойности на рН; на малката графика са показани резултатите от микроманипулационни изследвания в 0,2 М разтвори на захароза [20,26].

От данните, публикувани в литературата, за връзката между електрическите и механичните свойства на SOPC бислоеве изложени на различни стойности на рН на водната среда, става ясно, че не се наблюдава монотонна зависимост на модула на



еластичност на огъване на SOPC мембрани от рН на водната среда [20]. Нашите резултати, получени чрез анализ на термичните флуктуации, също показват ефекта на рН върху механичните свойства на мембраната в изследвания диапазон от стойности на рН. Изследването на по-широк диапазон от стойности на рН ще увеличи статистиката и ще потвърди тенденцията на ефекта на киселинността на средата върху еластичните свойства на мембраната.

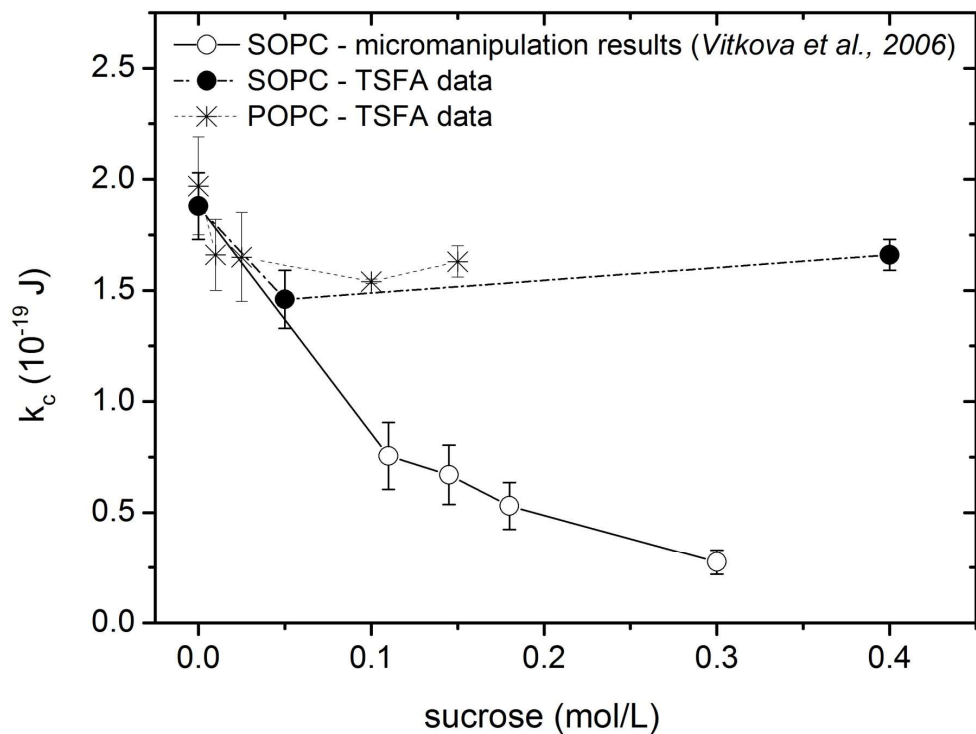
#### **4.4. Механични и електрични свойства на липидните мембрани, като функция от концентрацията на захари във водната среда**

##### **1) Еластичност на огъване на мембрани в присъствието на захароза във водната среда**

За да се изследва влиянието на захарозата върху еластичните свойства на липидните мембрани са използвани SOPC и POPC липидни бислоеве. Данните за модулите на еластичност на огъване на двата вида липидни мембрани са получени чрез анализ на термичните флуктуации на формата на квазисферични липидни везикули, както е описано в [16]. Резултатите получени чрез TSFA на гигантски везикули показват повече от 20%-но намаляване на модула на еластичност на огъване на SOPC мембрани при концентрации на захароза от 0,05 mol/L (фигура 25). Същата тенденция се наблюдава и при POPC мембраните, за този липид е получено почти 20% намаляване на модула на еластичност на огъване при наличието на 0,1 mol/L захароза във водната среда. В предходни изследвания чрез микроманипулация на гигантски липидни везикули [27,28] е измерено намаляване на еластичната константа на фосфатидилхолинови мембрани, във водни разтвори съдържащи захароза. Този ефект се потвърждава и от данните, получени чрез TSFA за двата вида липид. Нейгъл и колектив публикуват данни за отсъствието на ефект върху модула на еластичност на огъване при наличието на сравнително високи концентрации ( $\geq 0,2$  mol/L) различни моно- и дизахариди. Методът, който са използвали, е рентгеноструктурен анализ (Diffuse X-ray scattering) [29]. Данните, показващи увеличаването на еластичността на мембраната, са в пълно съгласие с направените заключения, от други автори, за комплексния механизъм на взаимодействието между захарите и мембраната. Андерсен и колектив използват неутронно разсейване (small-angle neutron scattering) и термодинамични измервания, за да покажат, че захарите могат да бъдат свързани с бислоя или отблъснати от него в зависимост от тяхната концентрация [30]. Установено е, че при ниски концентрации нискомолекулните въглехидрати се

свързват с мембраната с помощта на водородни връзки. Акумулирането на въглехидратни молекули по повърхността на мембраната, води до нейното изтъняване и разширяване. В съответствие с изтъняването на мембраната, се очаква модулът ѝ на еластичност на огъване да намалее. Именно това се наблюдава в получените от нас резултати, при анализа на термичните флуктуации на формата на квазисферични липидни везикули. При концентрации на захароза  $\sim 0,2$  mol/L, захарните молекули постепенно се отблъскват от мембранната повърхност, което противодейства на изтъняването на бислоя. Следователно, при такива концентрации на захароза не се очаква еластичността на огъване на бислоя да се изменя, ясно потвърждение на което е представено и от нашите експериментални данни.

Чрез TSFA е измерено намаляване на модула на еластичност на огъване, при двата вида мембрани, с увеличаване на концентрацията на захароза във водната среда. Този измерен ефект е по-слаб от намаляването на  $k_c$ , получено чрез микропипетна техника с гигантски везикули [28]. Измерените чрез механична микроманипулация на GUVs абсолютни стойности на модула на еластичност на огъване са значително по-ниски от стойностите получени чрез анализ на термичните флуктуации на формата на квазисферични везикули. Причините, водещи до разминаване на данните, могат да бъдат от различен произход. При модула на еластичност на огъване, измерен чрез механична микроманипулация на везикули, не са подлагани на т. нар. престресване чиято цел е да се усвои цялата скрита площ на мембраната [28]. По отношение на предишни резултати, получени чрез TSFA, за влиянието на захароза върху еластичните свойства на мембраната, които показват по ниски стойности на  $k_c$ , идващи от факта, че при тази обработка не е отчетено влиянието на белия шум при регистрирането на флуктуациите на формата на мембраната на везикулата или при наличието на неконтролирано изпарение по време на измерванията, което води до нестационарност на везикулите или от неравномерното разпределение на средния радиус на везикулата по всички направления [16]. За всички резултати за модула на еластичност на огъване на липидни бислоеве, определен чрез анализ на термичните флуктуации на формата на квазисферични везикули, получени по време на докторантурата, са взети предвид последните корекции в използвания метод [16].



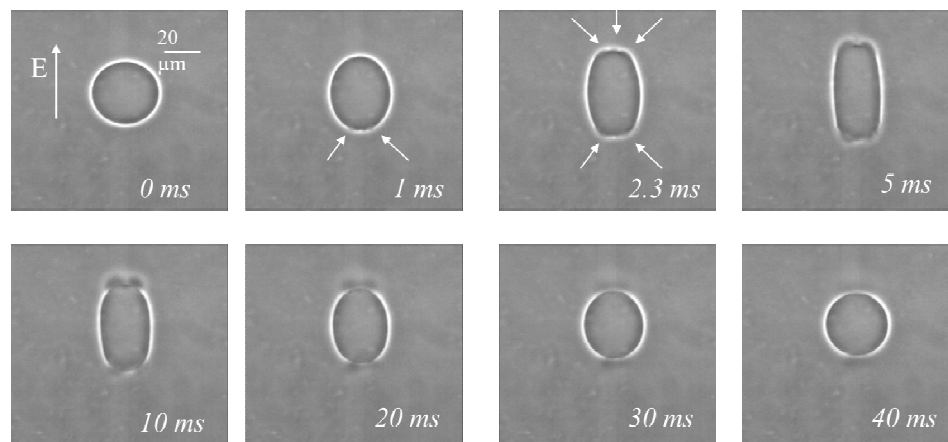
**Фигура 20** Модул на еластичност на огъване на SOPC и POPC мембрани като функция от концентрацията на захароза; за сравнение са показани данните, получени чрез микроманипулация на SOPC мембрани [28].

## 2) Ръбно напрежение палмитил олеоил фосфатидилхолинови мембрани във водни разтвори на нискомолекулни въглехидрати

Ръбното напрежение на фосфатидилхолинови мембрани е изследвано чрез анализ на динамиката на затваряне на пори на електропорирани GUVs [17]. Чрез прилагането на краткотрайни електрични импулси с интензитет 60-80 V/mm за 5 ms е инициирано формирането на пори по мембраната. Целта на експерименталните изследвания е да се изследва зависимостта на ръбната енергия на мембраната от наличието на нискомолекулни въглехидрати във водната среда. Проведени са две паралелни серии измервания, които да определят ръбната енергия на липидния бислой при симетрични и асиметрични условия на водния разтвор, а именно захароза от двете страни на мембраната, или захароза от вътре и глюкоза във външния суспендиращ разтвор. При всички проведени експерименти, разтворите от двете страни на мембраната са изотонични, за да не се внесе допълнителен фактор (осмотични ефекти), който може да

окаже влияние върху изследваното мембранно свойство. Концентрациите на захарите, при които са получени данни за ръбната енергия на мембраната, са в диапазона от 0 до 0.4 mol/L.

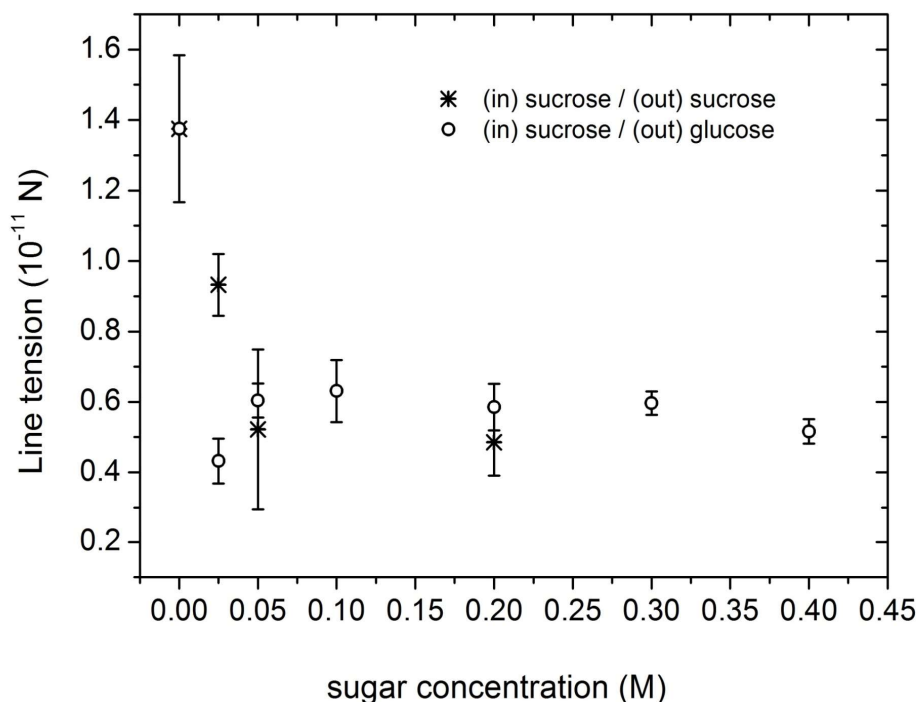
Прилагането на електрични импулси иницира образуването на пори, при достигането на трансмембрания потенциал. Порите се формират на двата полюса на везикулата, в непосредствена близост до електродите (фигура 21).



**Фигура 21** Електропорация на POPC везикули, във воден разтвор на 200 mM  $C_6H_{12}O_6$ ; от вътрешната страна на мембраната има разтвор на 200 mM  $C_{12}H_{22}O_{11}$ ; при прилагане на електричен импулс с интензитет 60-80 V/mm и продължителност 5 ms.

За всяка от концентрациите на захари е изследван ансамбъл от поне десет порирани везикули. За всяка везикула са измерени размерът на пората,  $d_{pore}$ , времето за което се е формирала пората,  $t_{pore}$ , и времето на живот на пората,  $\tau_{pore}$ , както и радиусът на везикулата. Времето на формиране на порите съответства на времето от прилагането на импулса до момента, в който е направена първата снимка с видима пора, това се случва около 1 ms след прилагане на импулса. Посредством фазово контрастна микроскопия са детектирани и записани пори, които се намират на екваториалното сечение на везикулата. Образувалите се пори, които не са във фокалната равнина на микроскопа, не могат да бъдат анализирани. За всяка везикула, по мембраната на която са формирани повече от една пора, са измерени и анализирани всички пори, намиращи се във фокалната равнина.

Риске и Димова теоретично са определили, че времето на живот на всяка пора зависи от нейния радиус, а също така и от ръбното напрежение и от вискозитета на мембраната [17].



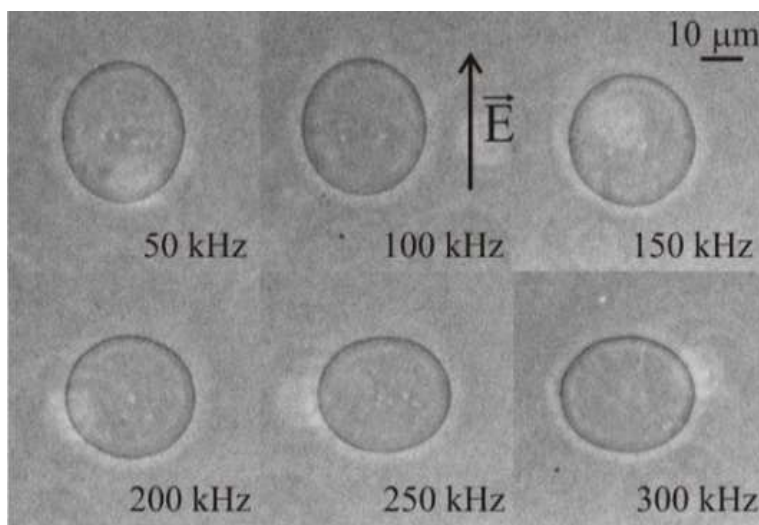
**Фигура 22** Зависимост на ръбното напрежение на липидна мембрана от концентрацията на захари във водния разтвор. При 1/ асиметрични условия (o) и 2/ симетрични условия (\*).

В резултат на проведените от нас измервания, целящи определянето на ефекта от наличието на нискомолекулни въглехидрати във водната среда върху ръбното напрежение на мембраната, установихме повече от 50%-но редуциране на ръбното напрежение на ПОРС мембрани при 50 mM захароза и съответно захароза/глюкоза. И при двете условия на водната среда ясно се вижда намаляването на ръбното напрежение с увеличаването на концентрацията на захарите до 50 mM, при по-високите концентрации се наблюдава насищане (фигура 22). Наблюдаваното насищане при по-високите концентрации се предполага, че се дължи на описаното от Андерсен и колектив [9] взаимодействие между мембраната и захарите, разтворени във водната среда.

Получените резултати за зависимостта на ръбното напрежение от концентрацията на нискомолекулните въглехидрати, разтворени във водната среда, внасят яснота в изясняването на влиянието на захарите върху мембранните свойства.

### 3) Електричен капацитет на палмитил олеил фосфатидилхолинова мембрана във водни разтвори, съдържащи захароза

Чрез електродеформационни експерименти е получена зависимостта на капацитета на едноконпонентни липидни мембрани от наличието на захароза във водната среда. Изследвани са палмитил олеил фосфатидилхолинови мембрани във водни разтвори на NaCl, съдържащи нарастваща концентрация (от 0 до 200 mM) захароза. В резултат на взаимодействието между честотата на полето и разликата в зарядите от двете страни на мембраната при ниски честоти, формата на везикулите преминава в издължен елипсоид, с дългата си ос ориентирана по посока на полето (фигура 23). Във всички експерименти, целящи определянето на електричния капацитет на мембраната, проводимостта на разтвора от вътрешната страна на мембраната е по-ниска от проводимостта на външния за мембраната, разтвор. В резултат на съотношението на проводимостите, формата на везикулите преминава от издължен към сплескан елипсоид с увеличаването на честотата на полето. При преминаването от едното издължено състояние в другото, везикулата приема квази сферична форма при определена критична стойност на честотата,  $f_{cr}$ , както е показано на фигура 23. При анализа на направените записи се определят радиусите на везикулата по посока на полето,  $a$ , и перпендикулярно на него  $b$ . За всяка серия от честоти за една везикула, степента на деформация се определя чрез съотношението  $a/b$ .

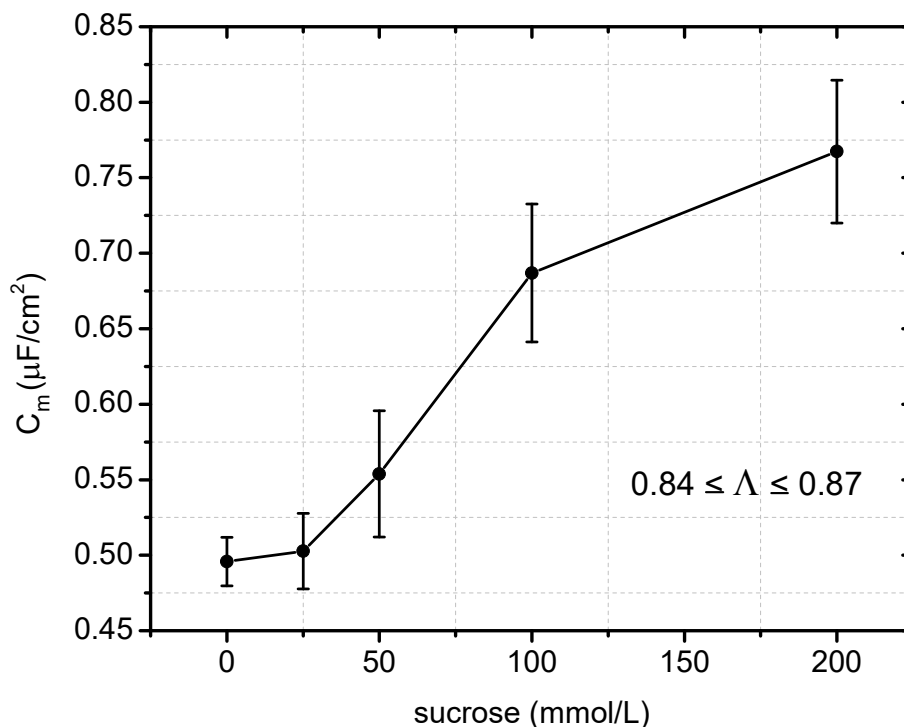


**Фигура 23** Фазово контрастна микрография на ПОРС везикула ( $r = 18 \mu\text{m}$ ) в 0.2 mol/L захароза при различни честоти на променливото електрично поле с интензитет 6 kV/m.

Отношението на проводимостите от двете страни на мембраната е  $\Lambda=0,87$ , проводимостта на вътрешния разтвор е 1,48 mS/cm, проводимостта на суспендиращата среда е 1,70 mS/cm.

Изчислената корекция за използваните концентрации на натриев хлорид, взимайки предвид капацитета на двойния електричен слой от двете страни на мембраната е  $\sim 10\%$  [31]. Сравнявайки, получената от нас стойност за капацитета на мембраната в разтвор без наличието на захароза (контролната точка)  $C_m = 0,50 \pm 0,02 \mu F/cm^2$  [31], с данните получени с плоски мембрани, можем да заключим, че нашите резултати получени при работата с GUVs дават по-ниска стойност за специфичния капацитет на мембраната, в сравнение със стойността, получена за плоски и окачени мембрани.

Измерената стойност,  $(0,69 \pm 0,05) \mu F/cm^2$ , за специфичния капацитет на мембраната във воден разтвор на  $0,1 \text{ mol/L}$  захароза е в съответствие с измерената по-рано [18], стойност за POPC мембрани, със същия метод и при същата концентрация на захароза. Получената зависимост на специфичния капацитет на мембраната от концентрацията на захароза във водната среда е показана на фигура 24. Специфичният капацитет на мембраната нараства с увеличаване на концентрацията на захароза в разтвора. За максималната използвана концентрация на захароза ( $0,2 \text{ mol/L}$ ), измерената стойност за капацитета,  $(0,77 \pm 0,05) \mu F/cm^2$ , е приблизително с  $50\%$  по-висока от стойността измерена при отсъствие на захароза във водния разтвор [31]. Чрез неутронно разсейване (small-angle neutron scattering) е изследвано изтъняването на мембраната в резултат от наличието на сравнително ниски концентрации на захароза ( $\leq 0,2 \text{ mol/L}$ ) във водния разтвор [9]. Както следва от  $C_m = \epsilon_m/h$ , изтъняването на мембраната води до увеличение на специфичния ѝ капацитет. Следователно, можем да очакваме, че капацитетът на мембраните, в среди без наличието на захароза, ще бъде по-нисък от капацитета на същите бислоеве във водни разтвори, съдържащи захароза. Нашите резултати доказват тази тенденция, но количествената разлика в стойностите за капацитета на мембрани във водна среда без захар и при наличието на захароза е много по-голяма от очакваните  $\sim 10\%$ , дължащи се на изтъняването на мембраната. Този резултат ни дава основание да предположим изменение и на други материални свойства на мембраната, каквото е тяхната относителна диелектрична проникваемост, в резултат от взаимодействието на захарните молекули с мембраната.



**Фигура 24** Зависимост на специфичния капацитет на POPC мембрана, измерен чрез електродеформация на везикули, от концентрацията на захарозата във водния разтвор.

На базата на резултатите получени от нас в рамките на настоящия дисертационен труд, формирахме следните изводи.

## 5. Изводи

- 1) Фосфатидилхолинови мембрани, съдържащи отрицателно заредения липид фосфатидилсерин, показват двуфазна хетерогенност (течна подредена и течна неподредена фази) при температури по-ниски от 29°C. Площта на течната подредена фаза, както и температурата на преход към хомогенна система, зависи от молното съдържание на фосфатидилсерина в мембраната.
- 2) Модулът на еластичност на огъване на двукомпонентни заредени мембрани се увеличава при нарастване на повърхностния заряд на мембраната, като при 50 %-на плътност на заряда на мембраната модулът на огъване се увеличава с 20% в сравнение със същата материална константа на незареден липиден бислои.
- 3) Модулът на еластичност на огъване на липидни мембрани намалява при включване в състава им на лизолипиди и/или липиди, съдържащи полиненаситени мастни киселини. Степента на регистрирания ефект е различна при двете вещества, като



намалението на еластичната константа е по-силно при лизолипид-съдържащи мембрани.

- 4) Модулът на еластичност на огъване на липидни мембрани намалява във водни разтвори с ниски стойности на рН ( $4 \leq \text{pH} < 6$ ), като получените стойности са в съгласие с данните в литературата от микроманипулация на везикули със същия липиден състав.
- 5) Модулът на еластичност на огъване на липидни мембрани в разтвор с контролирана йонна сила при 0,01 mol/L KCl намалява почти двукратно в сравнение с модула на еластичност на огъване на същите мембрани в двойно дестилирана вода.
- 6) Във водни разтвори на захароза ( $\leq 0,1$  mol/L) модулът на еластичност на огъване на липидни мембрани намалява с 20%, като при по-високи концентрации на захарта се наблюдава насищане на ефекта. Установеното от нас влияние на захарозата е по-слабо от намалението на модула на огъване, измерено по-рано чрез микроманипулация на везикули и анализ на флукуациите без отчитане на белия шум.
- 7) Електричният капацитет на липидни мембрани нараства при увеличаване на концентрацията на захароза във водната среда в резултат на изтъняването на бислоя и изменение на диелектричната му проницаемост.
- 8) Ръбната енергия на липидни мембрани намалява в присъствие на нискомолекулни въглехидрати във водната среда, като ефектът отбелязва насищане при концентрации на захарите над 0.05 mol/L.

## 6. Приноси

- I. Определена е еластичността на огъване на заредени липидни мембрани в зависимост от повърхностния заряд на мембраната при зададена йонна сила на средата и при  $pH \leq 5$  и е построена е приблизителна частична фазова диаграма на изследваните мембрани. Наблюдаваната зависимост на еластичността на мембраната от повърхностния ѝ заряд е описана въз основа на известната от литературата теоретична оценка на електростатичния принос към модула на огъване на бислоя при отчитане на положението на неутралната повърхност като функция от липидния състав на мембраната.
- II. Доказано е, че влиянието на лизолипиди върху еластичността на огъване на бислоя е по-силно в сравнение с включването в мембраната на липид, съдържащ полиненаситени мастни киселини. Установен е стабилизиращият ефект на последния върху ламеларната фаза на лизолипид-съдържащи мембрани и е определена константата на еластичност на огъване на трикомпонентна мембрана, съдържаща лизолипид и липид с полиненаситени ацилни вериги.
- III. Определена е еластичността на огъване на липидни мембрани във водни разтвори с ниски стойности на  $pH$  ( $4 \leq pH < 6$ ) и е установено намаление на модула на огъване на мембраната при намаляване на киселинността на средата.
- IV. Определени са механичните и електричните свойства на липидни мембрани във водни разтвори на захари. Установено е, че с увеличаване на концентрацията на нискомолекулните въглехидрати във водата еластичната константа на огъване и ръбната енергия намаляват, а електричният капацитет на мембраната нараства. Наблюдаваните ефекти са обяснени въз основа на данните в литературата, получени от структурни изследвания върху ламеларна липидна фаза и водни разтвори на захари.

**Публикации във връзка с дисертацията:**

1. V. Vitkova, D. Mitkova, K. Antonova, Capacitance of lipid bilayers in sugar-free aqueous solutions, *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, 70, No 10, 2017, p.1355-1362; **IF: 0.251**
2. D. Mitkova, V. Vitkova, The aqueous surroundings alters the bending rigidity of lipid membranes, *Russ. J. Electrochem.*, Vol. 52 (2016), No. 12, pp. 1172–1178; **IF: 0.828**
3. 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 (2014) 71–78, ISSN: 0927-7757; **IF: 2.714**
4. 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 (2014) 191–195, **IF: 2.714**
5. D. Mitkova, A. Stoyanova-Ivanova, S. Georgieva, P. Todorov, N. Kozarev, Y. A. Ermakov and V. Vitkova, Charged Lipid Bilayers in Aqueous Surroundings with Low pH. In Ales Iglic, editors: *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, Vol 18, ADPLAN, UK: Academic Press, 2013, pp. 1-20

### Участие в научни форуми:

1. 31st Conference of the European Colloid and Interface Society, 03-08 септември 2017 г., Мадрид, Испания, постерен доклад: "Bending elasticity, edge tension and capacitance of cell-mimetic membranes and the effect of sugars", Деница Миткова, Красимира Антонова, Румяна Димова и Виктория Виткова.
2. EMBO | EMBL Symposium: Molecular and Cell Biology of Membranes, 21-23 май 2017 г., Хайделберг, Германия, постерен доклад: "Effect of sugar on the mechanical and electrical properties of cell-mimetic giant lipid vesicles", Denitsa Mitkova, Krassimira Antonova, Rumiana Dimova and Victoria Vitkova;
3. XIV Научна постерна сесия за млади учени, докторанти и студенти на ХТМУ, 19 май 2017 г., София, Постерен доклад: "Изследване на електрохимичните и механичните свойства на моделни липидни мембрани", Д. Миткова, Кр. Антонова, А. Стоянова-Иванова, В. Виткова;
4. Sofia Electrochemical Days, 10-13 май 2017 г., София, постерен доклад: "Capacitance of Lipid Bilayers in Sugar-containing Aqueous Surroundings", Denitsa Mitkova, Krassimira Antonova, Rumiana Dimova and Victoria Vitkova;
5. X Пролетен Семинар "Интердисциплинарна химия", 21-23 април 2017г., Творчески дом – БАН, Златни мостове, София, устен доклад: " Lipid vesicles as biomimetic systems: mechanical properties of membranes at various physicochemical parameters of the aqueous medium", Denitsa Mitkova, Angelina Stoyanova-Ivanova, and Victoria Vitkova
6. XIX Зимен Семинар "ИНТЕРДИСЦИПЛИНАРНА ФИЗИКА" на докторантите и младите учени от физическите институти на комплекс 2 на БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ, 2-4 декември 2016 г., Копривщица, устен доклад: "Elastic properties of cell mimetic lipid membranes in various aqueous solutions", Denitsa Mitkova and Viktoria Vitkova
7. ТРЕТИ НАЦИОНАЛЕН КОНГРЕС ПО ФИЗИЧЕСКИ НАУКИ СОФИЯ, 29 септември – 2 октомври 2016 год., "Bending elasticity of lipid membranes in aqueous media with various chemical composition and pH value", Denitsa Mitkova and Victoria Vitkova
8. INERA Workshop 2016 "Membrane and Liquid Crystals Nanostructures – MELINA 2016" 3 – 6 September 2016 Sts Constantine and Helena Resort, Varna, Bulgaria, постерен доклад: "Sugar effect on lipid membranes measured by flicker spectroscopy, electrodeformation and electroporation of lipid vesicles", D. Mitkova, K. Antonova, R. Dimova, and V. Vitkova
9. VIII Пролетен семинар на докторантите и младите учени от БАН "Интердисциплинарна химия", 24-26 април 2015 г., устен доклад: "CELL-MIMETIC LIPID MEMBRANES – ELECTROCHEMICAL AND MECHANICAL PROPERTIES", Denitsa Mitkova, Rumiana Dimova, Krassimira Antonov, Angelina Stoyanova-Ivanova and Victoria Vitkova
10. Colloque international "Forum doctoral EUROEST", Université de Technologie Chimique et de Métallurgie – Sofia, Bulgarie, 27 – 29 ноември, 2014, София, България, постерен доклад: "Les vésicules lipidiques – un système modèle pour l'étude des propriétés des membranes biologiques", Denitsa Mitkova, Krasimira Antonova, Rumiana Dimova, Ivana Ilievska, Aleksandra Ivanova et Victoria Vitkova
11. INERA Workshop on: Transition Metal Oxide Thin Films-functional Layers in "Smart windows" and Water Splitting devices: Technology and Optoelectronic properties, 4 – 6

- септември, 2014, Варна, България, постерен и усен доклад: "Electrochemical properties of cell-mimetic lipid membranes obtained in cells consisting of indium-tin oxide coated plates and polymer spacers", D. Mitkova, R. Dimova and V. Vitkova
12. 18th International School on Condensed Matter Physics, 1 – 6 септември, 2014, Варна, България, постерен доклад: "Investigation of the electrochemical properties of cell-mimetic membranes using electrodeformation and electroporation of lipid vesicles", D. Mitkova, R. Dimova and V. Vitkova
  13. Доклад пред Лаборатория "Биомембрани", отдел "Теория и биосистеми" към Макс Планк институт по колоиди и повърхности, Голм, Германия, 10 март 2014. Тема на доклада: "Elastic properties of two-component lipid bilayers in aqueous solutions with controlled pH", Denitsa Mitkova and Victoria Vitkova
  14. Втори Национален Конгрес по физически науки, постерен доклад: "Изследване на заредени липидни мембрани във водни среди с pH 5,0", Деница Миткова и Виктория Виткова
  15. Шестнадесети зимен семинар "ИНТЕРДИСЦИПЛИНАРНА ФИЗИКА - модерната физика" на младите учени и докторанти, 06-08 декември 2013, София, усен доклад: "Elastic properties of two component lipid bilayers in aqueous solutions with controlled pH", Denitsa Mitkova and Victoria Vitkova
  16. 27th Conference of the European Colloid and Interface Society, 1–6 септември 2013, София:
    - Постерен доклад: "Bending elasticity of lipid bilayers at low pH values of the surrounding aqueous solutions", Denitsa Mitkova, Yury A. Ermakov, and Victoria Vitkova
    - Постерен доклад: "Lyso- and  $\omega$ 3-containing phosphatidylcholines affect the elastic properties of lipid membranes", Victoria Vitkova, Denitsa Mitkova, Rayna Georgieva, and Galya Staneva
  17. FEBS Workshop "Biological Surfaces and Interfaces", от 30 юни до 5 юли 2013, Сант Фелиу де Гиксолс, Испания, постерен доклад: "Bending rigidity of charged membranes studied experimentally in aqueous solutions with low pH", D. Mitkova, Y. A. Ermakov and V. Vitkova

**Списък на забелязани цитати на публикациите, свързани с дисертацията:**

- **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)**
  1. Tanja Pott, Claire Gerbeaud, Nina Barbier, Philippe Méléard, Melittin modifies bending elasticity in an unexpected way, *Chemistry and Physics of Lipids*. 05/2014; 185. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2014.05.004
  2. Genova, J., Ulrih, N.P., Kralj-Iglič, V., Iglič, A., Bivas, I., Bending elasticity modulus of giant vesicles composed of Aeropyrum pernix K1 archaeal lipid, *Life Volume 5, Issue 2*, 26 March 2015, Pages 1101-1110
  3. Gomes, M.J., Dreier, J., Brewer, J., Martins, S., Brandl, M., Sarmento, B., A new approach for a blood-brain barrier model based on phospholipid vesicles: Membrane development and siRNA-loaded nanoparticles permeability (Article), *Journal of Membrane Science*, Volume 503, April 01, 2016, Pages 8-15
  4. Reif, M.M.; Kallies, C.; Knecht, V., Effect of Sodium and Chloride Binding on a Lecithin Bilayer. A Molecular Dynamics Study. *Membranes* 2017, 7, 5.
  5. Tsang, K.-Y., Lai, Y.-C., Chiang, Y.-W., Chen, Y.-F., Coupling of lipid membrane elasticity and in-plane dynamics, *Physical Review E*, 2017, **96**, 012410
- **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)**
  6. Castagnetti, S., Božič, B., Svetina, S., Mechanical and molecular basis for the symmetrical division of the fission yeast nuclear envelope, *Physical Chemistry Chemical Physics*, Volume 17, Issue 24, 28 June 2015, Pages 15629-15636
  7. Sanket M. Shaha, Mukul Ashtikarb, Ankitkumar S. Jaina, Dinesh T. Makhijac, Yuvraj Nikamd, Rajiv P. Guded, Frank Steinigere, Aarti A. Jagtapc, Mangal S. Nagarsenkera, Alfred Fahr, LeciPlex, invasomes, and liposomes: A skin penetration study, *International Journal of Pharmaceutics* 490 (2015) 391–403
- **Mitkova, D.; Stoyanova-Ivanova, A; Georgieva, S; Todorov, P; Kozarev, N; Ermakov, YA; Vitkova, V, Charged Lipid Bilayers in Aqueous Surroundings with Low pH, In Ales Iglic, editors: Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes, Vol 18, ADPLAN, UK: Academic Press, 2013, pp. 1-2**
  8. Dimova, R., Recent developments in the field of bending rigidity measurements on membranes, *Advances in Colloid and Interface Science*, Volume 208, June 2014, Pages 225-234 (2014)

### **Стипендии и награди:**

1. **Стипендия за осъществяване на краткосрочна научна специализация** (STSM - Short-Term Scientific Mission) от **Европейски COST-договор TD1104**, за периода от 02.03.2014г. до 01.04.2014 г. в Лаборатория “Биомембрани”, отдел “Теория и биосистеми” към Макс Планк института по колоиди и повърхности, Голм, Германия.
2. **Стипендия от Европейската лаборатория по молекулярна биология** (European Molecular Biology Laboratory) за участие на EMBO|EMBL Symposium: Molecular and Cell Biology of Membranes, от 21май до 23май 2017, Хайделберг, Германия
3. **Стипендия от Европейската научна фондация** (European Science Foundation, ESF) за участие на FEBS Workshop “Biological Surfaces and Interfaces”, от 30 юни до 5 юли 2013, Сант Фелиу де Гиксолс, Испания.
4. **Награда за най-добър постер** на научен форум “Membrane and Liquid Crystals Nanostructures – MELINA 2016” INERA за постер със заглавие "Sugar effect on lipid membranes measured by flicker spectroscopy, electrodeformation and electroporation of lipid vesicles", D. Mitkova, K. Antonova, R. Dimova, and V. Vitkova

## Литература:

- [1] Lipowsky R, Sackmann E. Structure and Dynamics of Membranes: I. From Cells to Vesicles / II. Generic and Specific Interactions. Elsevier; 1995.
- [2] Petrov AG. The Lyotropic State of Matter: Molecular Physics and Living Matter Physics. 1 edition. Amsterdam, The Netherlands: CRC Press; 1999.
- [3] Петров А. Физика на живата материя. Течнокристален подход. Издателство на БАН “Проф. Марин Дринов”; 2015.
- [4] Dimova R. Recent developments in the field of bending rigidity measurements on membranes. *Adv Colloid Interface Sci* 2014;208:225–34. doi:10.1016/j.cis.2014.03.003.
- [5] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. Garland Science; 2002.
- [6] Groves JT. Bending mechanics and molecular organization in biological membranes. *Annu Rev Phys Chem* 2007;58:697–717. doi:10.1146/annurev.physchem.56.092503.141216.
- [7] Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972;175:720–31.
- [8] Miklavčič D, editor. *Handbook of Electroporation*. Springer; 2017.
- [9] Andersen HD, Wang C, Arleth L, Peters GH, Westh P. Reconciliation of opposing views on membrane–sugar interactions. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108:1874–8. doi:10.1073/pnas.1012516108.
- [10] Crowe JH. Trehalose as a “chemical chaperone”: fact and fantasy. *Adv Exp Med Biol* 2007;594:143–58. doi:10.1007/978-0-387-39975-1\_13.
- [11] Dimova R. Chapter One - Giant Vesicles: A Biomimetic Tool for Membrane Characterization. In: Igljč A, editor. *Adv. Planar Lipid Bilayers Liposomes*, vol. 16, Academic Press; 2012, p. 1–50. doi:10.1016/B978-0-12-396534-9.00001-5.
- [12] Petrov AG, Seleznev SA, Derzhanski A. Principles and methods of liquid crystal physics applied to the structure and functions of biological membranes. vol. A55, *Acta. Phys. Polonica*; 1979, p. 385–405.
- [13] de Gennes PG. *The Physics of Liquid Crystals*. Oxford Eng.: Oxford University Press; 1974.
- [14] Angelova MI, Dimitrov DS. Liposome electroformation. *Faraday Discuss Chem Soc* 1986;81:303–311. doi:10.1039/DC9868100303.
- [15] Reeves JP, Dowben RM. Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles. *J Cell Physiol* 1969;73:49–60. doi:10.1002/jcp.1040730108.
- [16] Genova J, Vitkova V, Bivas I. Registration and analysis of the shape fluctuations of nearly spherical lipid vesicles. *Phys Rev E* 2013;88:022707. doi:10.1103/PhysRevE.88.022707.
- [17] Riske KA, Dimova R. Electro-Deformation and Poration of Giant Vesicles Viewed with High Temporal Resolution. *Biophys J* 2005;88:1143–1155. doi:10.1529/biophysj.104.050310.
- [18] Salipante PF, Knorr RL, Dimova R, Vlahovska PM. Electrodeformation method for measuring the capacitance of bilayer membranes. *Soft Matter* 2012;8:3810–3816. doi:10.1039/C2SM07105C.
- [19] Vitkova V, Mitkova D, Stoyanova-Ivanova A, Kozarev N, Bivas I. Bending rigidity of lipid membranes and the pH of the aqueous surroundings. *CR Acad Bulg Sci* 2012;65:329–334.



- [20] Zhou Y, Raphael RM. Solution pH alters mechanical and electrical properties of phosphatidylcholine membranes: relation between interfacial electrostatics, intramembrane potential, and bending elasticity. *Biophys J* 2007;92:2451–2462. doi:10.1529/biophysj.106.096362.
- [21] Mitkova D, Marukovich N, Ermakov YA, Vitkova V. Bending rigidity of phosphatidylserine-containing lipid bilayers in acidic aqueous solutions. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp* 2014. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.12.059.
- [22] Winterhalter M, Helfrich W. Bending elasticity of electrically charged bilayers: coupled monolayers, neutral surfaces, and balancing stresses. *J Phys Chem* 1992;96:327–330. doi:10.1021/j100180a060.
- [23] May S. Curvature elasticity and thermodynamic stability of electrically charged membranes. *J Chem Phys* 1996;105:8314–8323. doi:10.1063/1.472686.
- [24] Vitkova V, Mitkova D, Staneva G. Lyso- and omega-3-containing phosphatidylcholines alter the bending elasticity of lipid membranes. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp* 2014;460:191–195. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.03.055.
- [25] Bouvrais H, Garvik OS, Pott T, Méléard P, Ipsen JH. Mechanics of POPC Bilayers in Presence of Alkali Salts. *Biophys J* 2010;98:272a. doi:10.1016/j.bpj.2009.12.1482.
- [26] Mitkova, Vitkova. The Aqueous Surroundings Alter the Bending Rigidity of Lipid Membranes. *Russ J Electrochem* 2016;52:1172–1178.
- [27] Vitkova V, Petrov AG. *Lipid Bilayers and Membranes: Material Properties*, Academic Press; 2013.
- [28] Vitkova V, Genova J, Mitov MD, Bivas I. Sugars in the Aqueous Phase Change the Mechanical Properties of Lipid Mono- and Bilayers. *Mol Cryst Liq Cryst* 2006;449:95–106. doi:10.1080/15421400600582515.
- [29] Nagle JF, Jablin MS, Tristram-Nagle S. Sugar does not affect the bending and tilt moduli of simple lipid bilayers. *Chem Phys Lipids* 2016;196:76–80. doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.01.003.
- [30] Andersen HD, Wang C, Arleth L, Peters GH, Westh P. Reconciliation of opposing views on membrane–sugar interactions. *PNAS* 2011;108:1874–1878. doi:10.1073/pnas.1012516108.
- [31] Vitkova V, Mitkova D, Antonova K. Capacitance of lipid bilayers in sugar-free aqueous solutions. *Comptes Rendus L'Academie Bulg Sci* 2017;70:1355–62.