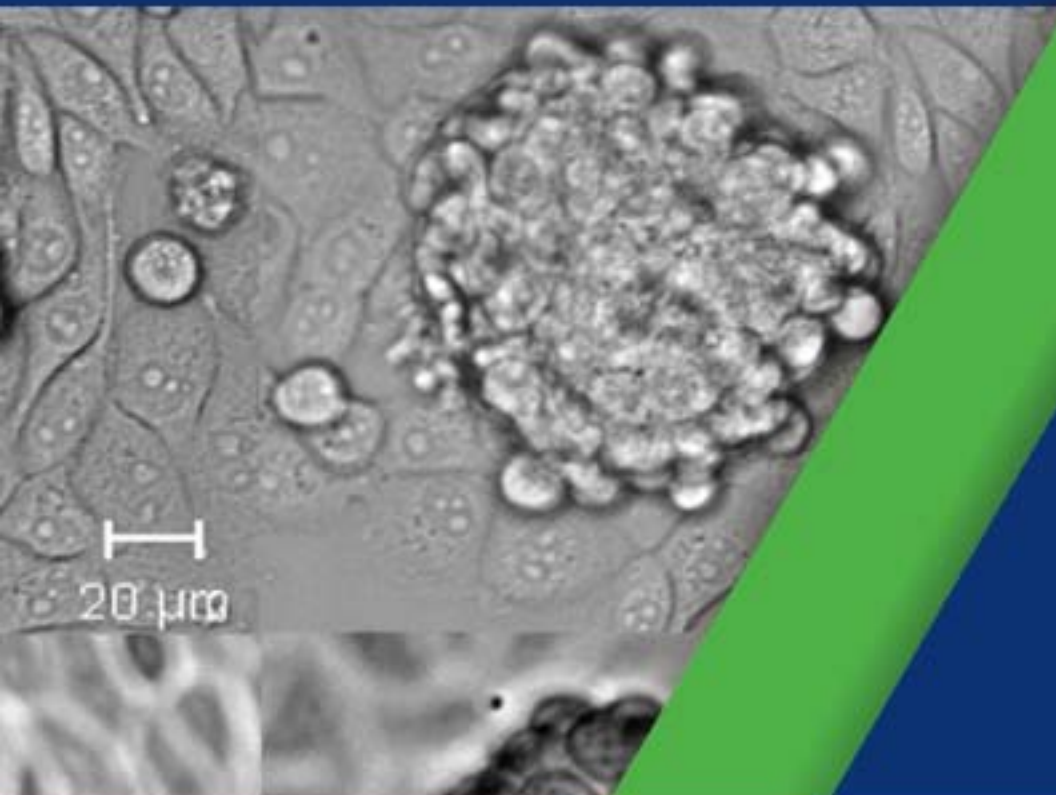




ISSN 2075-3810 (Print)
ISSN 2075-3829 (Online)



KARAZIN UNIVERSITY
CLASSICS AHEAD OF TIME

46'2021

BIOPHYSICAL BULLETIN

БІОФІЗИЧНИЙ ВІСНИК

ISSN 2075-3810 (print)
ISSN 2075-3829 (online)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Біофізичний Вісник

Випуск 46

Заснований 1998 р.

Харків 2021

Біофізичний вісник публікує наукові статті, короткі повідомлення та огляди, які містять оригінальні результати розв'язання фізико-математичних та інженерно-технічних проблем, що відносяться до біологічних систем різного рівня організації, методами експериментальної і теоретичної фізики, математичного та комп'ютерного моделювання. Журнал виходить 2 рази на рік.

Свідоцтво про державну реєстрацію: КВ № 11007 від 17.02.2006.

ISSN 2075-3829 (Online)

ISSN 2075-3810 (Print)

Біофізичний вісник є фаховим виданням України категорії «Б» у галузях наук: 10 Природничі науки за спеціальностями 104 Фізика та астрономія, 105 Прикладна фізика та наноматеріали; 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія; 16 Хімічна та біоінженерія за спеціальністю 163 Біомедична інженерія (Наказ Міністерства освіти і науки України № 1643 від 28.12.2019).

Всі статті проходять внутрішнє та зовнішнє подвійне сліпе рецензування.

Номер затверджено до друку рішенням Вченої ради Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (протокол № 15 від 28.12.2021).

Журнал має Digital Object Identifier: **10.26565/2075-3810**.

Головний редактор

Косевич М. В., Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б. І. Веркіна НАН України, Україна

Заступник головного редактора

Катрич В. О., Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна

Відповідальний секретар

Берест В. П., Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна

Члени редколегії

Аврунін О. Г., Харківський національний університет радіоелектроніки, Україна

Баранник Є. О., Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна

Горбенко Г. П., Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна

Довбешко Г. І., Інститут фізики НАН України, Україна

Злепко С. М., Вінницький національний технічний університет, Україна

Карачевцев В. О., Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б. І. Веркіна НАН України, Україна

Кнігавко В. Г., Харківський національний медичний університет, Україна

Осецький О. І., Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Україна

Павлов С. В., Вінницький національний технічний університет, Україна

Перський Є. Е., Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна

Семенов М. О., Інститут радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України, Україна

Соляник Г. І., Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Україна

Степаньян С. Г., Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б. І. Веркіна НАН України, Україна

Ткачук Р. А., Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, Україна

Трусова В. М., Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна

Узленкова Н. Є., Інститут медичної радіології ім. С. П. Григор'єва НАМН України, Україна

Шестопалова Г. В., Інститут радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України, Україна

Андрущенко В., Інститут органічної хімії та біохімії Чеської Академії Наук, Чеська Республіка

Беднарчик П., Варшавський університет сільського господарства, Польща

Біндер Х., Лейпцизький університет, Німеччина

Буркіна В., Університет Південної Богемії в Чеських Будейовицях, Чеська Республіка

Доманов Є., Центр Досліджень та інновацій Л'Ореаль, Франція

Фельдман Ю., Єврейський університет в Єрусалимі, Ізраїль

Мірошниченко Д., Онкологічний центр та науково-дослідний інститут ім. Х. Лі Моффіта, США

Рева І., Університет Коїмбри, Португалія

Руткаускас Д., Центр фізичних наук і технологій, Литва

Штис Д., Університет Південної Богемії в Чеських Будейовицях, Чеська Республіка

Яковенко С., Університет Західної Вірджинії, Медичний факультет, США

Замаратська Г., Шведський Університет аграрних наук, Швеція

Горобченко О. О., Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна – *технічний редактор*

Жигалова Н. М., Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна – *технічний секретар*

Біофізичний вісник індексується: Національною бібліотекою України імені В. І. Вернадського; Directory of Open Access Journals (DOAJ); Бібліографічною базою даних WorldCat; CAS (Chemical Abstracts Service); Google Scholar; Ulrichsweb; Bielefeld Academic Search Engine (BASE); Index Copernicus.

Адреса редколегії та видавництва:

Кафедра молекулярної і медичної біофізики,
Факультет радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем,
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,
майдан Свободи, 4, Харків, 61022, Україна

Tel: +38-057-707-55-76

E-mail: biophys-visnyk@karazin.ua

Web-page: <http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk>

ISSN 2075-3810 (print)
ISSN 2075-3829 (online)

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF UKRAINE
V. N. Karazin Kharkiv National University

Biophysical Bulletin

Issue 46

Founded in 1998

Kharkiv 2021

Biophysical Bulletin publishes original scientific articles, short communications and reviews dealing with physical, mathematical, and engineering problems pertaining to biological systems and solved by methods of experimental and theoretical physics, mathematical modeling and computer simulation. The journal is published twice a year.

Certificate of state registration: KB № 11007 of 17.02.2006.

ISSN 2075-3829 (Online) **ISSN 2075-3810** (Print)

All manuscripts are double blind peer-reviewed by at least two reviewers.

Approved for publication by the Academic Council of V. N. Karazin Kharkiv National University (December 28, 2021, Protocol No. 15).

Biophysical Bulletin has Digital Object Identifier: **10.26565/2075-3810**.

Editor-in-Chief

M. V. Kosevich, B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the NAS of Ukraine, Ukraine

Deputy Editor-in-Chief

V. A. Katrich, V. N. Karazin Kharkiv National University,
Ukraine

Executive Secretary

V. P. Berest, V. N. Karazin Kharkiv National University,
Ukraine

Editorial Board

O. G. Avrunin, Kharkiv National University of Radio Electronics,
Ukraine

E. O. Barannik, V. N. Karazin Kharkiv National University,
Ukraine

G. P. Gorbenko, V. N. Karazin Kharkiv National University,
Ukraine

G. I. Dovbeshko, Institute of Physics of the NAS of Ukraine,
Ukraine

V. O. Karachevtsev, B. Verkin Institute for Low Temperature
Physics and Engineering of the NAS of Ukraine, Ukraine

V. G. Knigavko, Kharkiv National Medical University, Ukraine

A. I. Osetski, Institute for Problems of Cryobiology and
Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Ukraine

S. V. Pavlov, Vinnytsia national technical university, Ukraine

Ye. E. Perskiy, V. N. Karazin Kharkiv National University,
Ukraine

M. O. Semenov, O. Ya. Usikov Institute for Radio Physics and
Electronics of the NAS of Ukraine, Ukraine

A. V. Shestopalova, O. Ya. Usikov Institute for Radio Physics and
Electronics of the NAS of Ukraine, Ukraine

G. I. Solyanik, R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology of the NAS of Ukraine, Ukraine

S. G. Stepanian, B. Verkin Institute for Low Temperature Physics
and Engineering of the NAS of Ukraine, Ukraine

R. A. Tkachuk, Ternopil Ivan Puluj National Technical University,
Ukraine

V. M. Trusova, V. N. Karazin Kharkiv National University,
Ukraine

N. E. Uzlenkova, SI "Grigoriev Institute for Medical
Radiology of National Academy for Medical Sciences",
Ukraine

S. M. Zlepko, Vinnytsia national technical university, Ukraine

V. Andrushchenko, Institute of Organic Chemistry and
Biochemistry of the Academy of Science of Czech
Republic, Czech Republic

P. Bednarczyk, Warsaw University of Life Sciences, Poland

H. Binder, Leipzig University, Germany

V. Burkina, University of South Bohemia in České
Budějovice, Czech Republics

Ye. Domanov, L'Oréal Research & Innovation, France

Yu. Feldman, The Hebrew University of Jerusalem, Israel

D. Miroshnichenko, H. Moffitt Cancer Center and Research
Institute, USA

I. Reva, Universidade de Coimbra, Portugal

D. Rutkauskas, Centre for Physical Sciences and Technology,
Lithuania

D. Štys, University of South Bohemia in České Budějovice,
Czech Republics

S. Yakovenko, West Virginia University, School of Medicine,
USA

G. Zamaratskaia, Swedish University of Agricultural
Sciences, Sweden

O. O. Gorobchenko, V. N. Karazin Kharkiv National
University, Ukraine – *Technical Editor*

N. M. Zhyhalova, V. N. Karazin Kharkiv National
University, Ukraine – *Technical Secretary*

Biophysical Bulletin is indexed in: Vernadsky National Library of Ukraine; Directory of Open Access Journals (DOAJ); WorldCat; CAS (Chemical Abstracts Service); Google Scholar; Ulrichsweb; Bielefeld Academic Search Engine (BASE); Index Copernicus.

Editorial Office and Publisher:

Department of Molecular and Medical Biophysics
School of Radio Physics, Biomedical Electronics and Computer Systems
V. N. Karazin Kharkiv National University,
4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine

Tel: +38-057-707-55-76

E-mail: biophys-visnyk@karazin.ua

Web-page: <http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk>

© V. N. Karazin Kharkiv National University, 2021

© A. I. Moisieiev, I. F. Kovalenko, G. A. Bozhok, O. I. Gordiyenko, the photographs of L929 cells
on the first and fourth pages of the cover, 2021

ЗМІСТ**БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ**

- А. І. Моїсєєв, І. Ф. Коваленко, Г. А. Божок, О. І. Гордієнко**
Теоретичні підходи до визначення оптимальних режимів кріоконсервування клітинних сфероїдів різних термінів культивування 7–22

МЕДИЧНА ФІЗИКА

- Т. Г. Віхтинська, К. Є. Лапітан, К. Е. Немченко**
Зворотне перетворення Радона без сингулярності для пучка з точковим фокусом 23–33

БІОМЕДИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ

- К. Г. Селіванова, О. О. Трубіцин, О. Г. Аврунін**
Розробка комплексного методу аналізу дерматоскопічних зображень шкіри обличчя з акне 34–45

CONTENTS**BIOPHYSICS OF COMPLEX SYSTEMS**

- A. I. Moisieiev, I. F. Kovalenko, G. A. Bozhok, O. I. Gordiyenko**
Approaches to determination of optimal cryopreservation regimens for cell
spheroids of different cultivation terms 7–22

MEDICAL PHYSICS

- T. G. Vikhtinskaya, K. E. Lapitan, K. E. Nemchenko**
Inverse Radon transform without singularity for rays with a point focus 23–33

BIOMEDICAL ENGINEERING

- K. G. Selivanova, A. A. Trubitsin, O. G. Avrunin**
Development of a comprehensive method for the dermatoscopic images
analysis of the facial skin with acne 34–45

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-46-01>

УДК 57.086.13:577.352.43:51-76:576.5

ТЕОРЕТИЧНІ ПІДХОДИ ДО ВИЗНАЧЕННЯ ОПТИМАЛЬНИХ РЕЖИМІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ КЛІТИННИХ СФЕРОЇДІВ РІЗНИХ ТЕРМІНІВ КУЛЬТИВУВАННЯ

А. І. Моїсєєв^{ORCID}, І. Ф. Коваленко^{ORCID}, Г. А. Божок^{ORCID}, О. І. Гордієнко^{ORCID}

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,

вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016

e-mail: olga.gordiyenko.ipcic@gmail.com

Надійшла до редакції 28 жовтня 2021 р. Переглянута 19 листопада 2021 р.

Прийнята до друку 24 листопада 2021 р.

Актуальність. Тривимірні культуральні системи — це унікальні платформи для вивчення складних біологічних процесів *in vitro*. Взаємодії клітина–клітина та клітина–позаклітинний матрикс утворюють комунікаційну мережу біохімічних та механічних сигналів, що наближує сфероїди (СФ) до нативних тканин і суттєво відрізняє їх від моношарових культур. Важливим для клітинних технологій є розробка способів кріоконсервування 3D–культур, що дозволить створювати запаси цінних клітинних зразків, економити час та матеріали, буде запобігати втраті культур через технічні збої, контамінацію, дрейф фенотипу та старіння.

Мета роботи. Розробка підходів до кріоконсервування клітинних сфероїдів. Визначення параметрів проникності сфероїдів з клітин лінії L929 різних строків культивування для теоретичної оцінки оптимальних режимів заморожування.

Матеріали і методи. У роботі були використані клітини лінії L929, які утворюють СФ різного діаметру, і можуть бути підтримані тривалий час у 3D–умовах. Для визначення інтегральних коефіцієнтів фільтрації L_p і проникності для ДМСО k_p у СФ на різних строках культивування, був використаний вольюмометричний метод. Дослідження динаміки зміни об'єму сфероїдів у часі здійснювали на конфокальному мікроскопі LSM 510 META. Чисельні значення інтегральних коефіцієнтів проникності СФ визначали шляхом апроксимації експериментальних даних зміни відносного об'єму СФ від часу експозиції в досліджуваному розчині теоретичними кривими, розрахованими на підставі фізико-математичної моделі пасивного масообміну між сфероїдом і оточуючим середовищем за умови їх максимального збігу. Прогнозування осмотичної поведінки СФ в умовах охолодження здійснювали на підставі диференціального рівняння, що описує кінетику зміни відносного об'єму клітини в процесі позаклітинної кристалізації кріопротекторного розчину, підставляючи в рівняння моделі визначені величини інтегральних коефіцієнтів проникності L_p і k_p та енергії активації E_{AL} і E_{AK} . Кінетику зміни концентрації позаклітинного розчину в процесі заморожування при розрахунках задавали аналітично шляхом апроксимації фазової діаграми плавлення розчину ДМСО.

Результати. Визначені коефіцієнти фільтрації та проникності для молекул ДМСО у СФ та показано, що вони вірогідно зменшуються зі збільшенням строків культивування. Розраховані величини енергії активації проникання молекул води та ДМСО у СФ та визначена їх залежність від строків культивування. На підставі визначених параметрів проникності розрахована динаміка зміни об'єму СФ різних строків культивування за різних швидкостей охолодження.

Як цитувати: Моїсєєв АІ, Коваленко ІФ, Божок ГА, Гордієнко ОІ. Теоретичні підходи до визначення оптимальних режимів кріоконсервування клітинних сфероїдів різних термінів культивування. Біофізичний вісник. 2021;46:7–22. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-46-01>

In cites: Moisieiev AI, Kovalenko IF, Bozhok GA, Gordiyenko OI. Theoretical approaches to determination of optimal cryopreservation regimens for cell spheroids of different cultivation terms. Biophysical Bulletin. 2021;46:722. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-46-01> (in Ukrainian)

Open Access. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

Висновки. Теоретично визначені оптимальні режими охолодження СФ з клітин лінії L929: для 7 діб культивування — 1,5–2 °C/хв з охолодженням до -80 °C і подальшим зануренням у азот; для 14 і 21 доби культивування — 0,5 °C/хв до -40 °C і подальшим зануренням у азот.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: сфероїди, кріоконсервування, фібробласти лінії L929, коефіцієнти фільтрації, коефіцієнти проникності для ДМСО, енергія активації, швидкість охолодження.

Тривимірні (3D) культуральні системи — це унікальні платформи для вивчення складних біологічних процесів *in vitro*, зокрема, проліферації, диференціювання, стресової реакції клітин, пухлинного росту, а також для застосування в якості тканино-інженерних конструкцій, біосенсорів, тест-систем для пошуку нових лікарських засобів та імунотерапії [1–3]. Дослідження останніх років показали високу функціональну активність клітин, які було культивовано у вигляді сфероїдів, а також посилення протизапальної дії, ангіогенетичні ефекти та краще виживання після трансплантації [4–6]. Очікується, що у недалекому майбутньому сфероїдні культури (spheroid-based cultures) будуть більш затребувані у регенеративній медицині, ніж існуючі моношарові [7, 8].

Унікальність тривимірних об'єктів полягає у складній регуляторно-трофічній взаємодії клітин, які входять до їхнього складу. Як відомо, взаємодії клітина—клітина та клітина—позаклітинний матрикс (ПКМ) утворюють комунікаційну мережу біохімічних та механічних сигналів, що наближує сфероїди (СФ) до нативних тканин і суттєво відрізняє від 2D-моношарових культур [9–12]. Тому за останні два десятиліття були зроблені численні спроби для розробки тривимірних моделей тканин для подолання розриву між клітинними аналізами та дослідженнями на тваринах для зменшення експериментальної невизначеності при використанні моношарових культур.

Важливим для клітинних технологій є розробка способів кріоконсервування 3D-культур, що дозволить створювати запаси цінних клітинних зразків, економити час та матеріали, необхідні для постійного пересіву культур; буде запобігати втраті культур через технічні збої, контамінацію, дрейф фенотипу та старіння; надасть можливість сертифікувати їх, транспортувати й використовувати для наукових або практичних цілей.

Зневоднення і насичення біологічних об'єктів кріопротекторами є одними з найважливіших процесів на етапі охолодження під час кріоконсервування. Коефіцієнти проникності плазматичної мембрани для води та кріопротектора визначають часові характеристики масопереносу крізь клітинні мембрани, а отже і ймовірність внутрішньоклітинної кристалізації, яка є вирішальною умовою виживання/загибелі клітини [13]. Оскільки структурна організація СФ є складнішою в порівнянні з ізольованою клітиною, параметри дифузії сполук, зокрема кріопротекторів і молекул води, у СФ будуть відрізнятися від таких для клітинної суспензії.

Наразі існує низка робіт, в яких СФ різного походження заморожували з швидкостями охолодження 1 °C/хв або нижче у присутності 5–30% кріопротектора ДМСО з додаванням сироватки або без неї [14–17]. Однак потрібно відзначити, що вибір концентрації ДМСО та швидкості охолодження відбувався у цих роботах емпірично, без застосування ґрунтового підходу, заснованого на розумінні ролі проникності мембран клітин у складі СФ на протікання процесів масообміну між клітинами і середовищем на всіх етапах кріоконсервування.

З іншого боку, існує підхід, який на основі спостереження зміни відносного об'єму клітин у часі при інкубації у кріозахисному розчині дозволяє встановити коефіцієнти проникності плазматичних мембран для води та кріопротектора [18, 19]. Це дає можливість визначити оптимальні час експозиції з кріопротектором та швидкість охолодження для успішного кріоконсервування клітинної суспензії [13]. У представленій роботі запропоновано такий підхід до кріоконсервування

багатоклітинних СФ. Для коректного вирішення цієї задачі може бути використано фізико-математичне моделювання процесів зневоднення і проникності кріопротектора у СФ. При цьому, форму клітинного СФ можна апроксимувати еліпсоїдом обертання, окремим випадком якого є сфера, що приймається у різних існуючих математичних моделях [20, 21]. СФ можна розглядати як цілісний об'єкт *in toto*. При цьому, інтегральні характеристики, що визначають часові параметри масообміну між сфероїдом і середовищем можна розглядати як аналоги коефіцієнтів проникності мембран окремих клітин.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У роботі нами були використані клітини лінії L929, які утворюють СФ різного діаметру, можуть бути підтримані тривалий час у 3D-умовах та використовуються як модельна система для підбору оптимальних умов кріоконсервування СФ [15, 22]. Клітинну лінію підтримували протягом 4 пасажів. До цього культура була кріоконсервована згідно з протоколом та зберігалася у низькотемпературному банку ПККіК НАН України. Клітини культивували на середовищі DMEM/F12 («Biowest», Франція), що містило 200 Од/мл бензилпеніциліну («Arterium», Україна), 200 мкг/мл стрептоміцину («Arterium», Україна) та 10% фетальної телячої сироватки («Biowest», Франція) при 37 °С в атмосфері з 5% CO₂ в пластикових флаконах для культивування («SPL Life Sciences», Корея). Для отримання сфероїдів використовували низькоадгезивну поверхню, для цього чашки Петрі обробляли 2%-м розчином агару («Fetac», Німеччина). Посівна концентрація клітин становила 2·10⁵ кл/мл. Сфероїди культивували протягом 21 діб.

Для визначення інтегральних коефіцієнтів проникності для молекул води L_p і проникаючого кріопротектора ДМСО k_p у сфероїди на різних строках культивування (7–14–21 доба), був використаний вольюмометричний метод. З метою фіксації сфероїди що утворились протягом 7, 14 і 21 діб культивування, переміщували на адгезивну культуральну поверхню чашки Петрі після чого інкубували в CO₂ інкубаторі протягом 24 годин за 37 °С. Дослідження динаміки зміни об'єму сфероїдів у часі в процесі їх зневоднення і відновлення в 1М розчині ДМСО у діапазоні температур 10, 15 і 25 °С здійснювали на конфокальному мікроскопі LSM 510 META. Температуру у камері, встановленій на предметному столику мікроскопа, підтримували за допомогою термостата та реєстрували за допомогою термопари. Об'єм сфероїда визначали шляхом вимірювання діаметрів сфероїда у часі за допомогою комп'ютерної програми AxioVision Rel. 4.6 («Carl Zeiss», Німеччина). Чисельні значення інтегральних коефіцієнтів фільтрації і проникності для молекул диметилсульфоксиду для сфероїдів визначали шляхом апроксимації експериментальних даних зміни відносного об'єму сфероїдів від часу експозиції в досліджуваних розчинах теоретичними кривими, розрахованими на підставі фізико-математичної моделі пасивного транспорту води і проникаючих речовин за умови їх максимального збігу [18]. Осмотично неактивний об'єм сфероїда визначали як описано в роботі [23], отримуючи залежність відносного об'єму сфероїдів від оберненого приведенного осмотичного тиску у розчинах непроникаючої речовини (хлорид натрію із концентраціями від 0,5 до 2 моль/л). За цим алгоритмом визначали осмотично неактивний об'єм сфероїдів на 7, 14 та 21 добу культивування. Час встановлення рівноваги між СФ і кріопротекторним середовищем вважали час, за який СФ відновлював свій об'єм на 90 %.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми «Statgraphics plus for Windows 2.1» («Manugistics Inc.», США) за непараметричним критерієм Манна-Уїтні. Достовірними вважались відмінності при $p < 0,05$.

ТЕОРЕТИЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

Визначення коефіцієнтів проникності плазматичних мембран клітин у складі сфероїдів

Для визначення інтегральних характеристик сфероїдів, що описують масообмін між ними і оточуючим середовищем, адаптували фізико-математичну модель, розвинуту для клітинних суспензій [18]. У випадку, коли через поверхню сфероїда проникають тільки молекули розчинника, тобто води, і однієї (s -ої) з розчинених в n -компонентному розчині речовин, рівняння мають вигляд:

$$\frac{dy}{dt} = -\frac{1}{\tau_w} \left[\sigma_s \Delta \pi_s + \frac{1 + \sigma_s \hat{\pi}_s^{in}}{1 + \hat{\pi}_s^{in}} \sum_{k=1(k \neq w, s)}^n \hat{\pi}_k \right], \quad (1)$$

$$\frac{d\pi_s}{dt} = -\frac{\sigma_s (1 + \hat{\pi}_s^{in}) \hat{\pi}_s^{in}}{(y - \alpha)} \frac{dy}{dt} + \frac{1 (1 + \hat{\pi}_s^{in}) \hat{\pi}_s^{in}}{\tau_s (y - \alpha)} \left(\Delta \hat{\pi}_s + \frac{\hat{\pi}_s^{in}}{1 + \hat{\pi}_s^{in}} \sum_{k=1(k \neq w, s)}^n \Delta \hat{\pi}_k \right), \quad (2)$$

$$\hat{\pi}_k^{in} = \hat{\pi}_{k0}^{in} \frac{(1 + \hat{\pi}_s^{in})(1 - \alpha)}{(1 + \hat{\pi}_{s0}^{in})(y - \alpha)}, \quad (3)$$

де для нашого випадку $y = V/V_0$ — відносний об'єм сфероїда, V — поточний об'єм; V_0 — початкове значення об'єму; $\tau_w = \left(\frac{S}{V_0} L_p \frac{RT}{v_s} \right)^{-1}$, $\tau_s = \left(\frac{S}{V} k_s \right)^{-1}$ — величини, що мають розмірність часу; S — площа поверхні сфероїда; L_p — інтегральний коефіцієнт фільтрації для сфероїда; R — універсальна газова константа; T — абсолютна температура; v_s (v_k) — парціальний молярний об'єм проникаючої (непроникаючої) розчиненої речовини; k_s — інтегральний коефіцієнт проникності сфероїда для проникаючої розчиненої речовини; σ_s — коефіцієнт відбиття для проникаючої розчиненої речовини; $\Delta \hat{\pi}_s$ і $\Delta \hat{\pi}_k$ — трансмембранний перепад приведенного осмотичного тиску проникаючої і непроникаючої речовин відповідно; нижні індекси s , k і w позначають величини, що відносяться відповідно до розчинених речовин (проникаючих та непроникаючих) і розчинника, $\Delta \hat{\pi}_k = \frac{\pi_k v_k}{RT}$ — приведений осмотичний тиск k -ої розчиненої речовини; π_s^{in} і π_k^{in} — осмотичний тиск проникаючої і непроникаючої внутрішньоклітинних речовин відповідно; π_{s0}^{in} і π_{k0}^{in} — початкові значення цих величин; t — час; π_s^{out} і π_k^{out} — осмотичний тиск проникаючої і непроникаючої позаклітинних речовин відповідно; $\alpha = \frac{1}{V_0} \sum_{k=1(k \neq w, s)}^n v_k N_{k0}$ — об'ємна частка непроникаючих речовин усередині сфероїда, або осмотично неактивний об'єм сфероїда.

Осмотично неактивний об'єм сфероїда

У випадку двокомпонентного розчину непроникаючої (k -ої) речовини рівняння, що описує зміну об'єму сфероїда у часі (t), має вигляд [23]:

$$\frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_w} \left[\frac{(1-\alpha)}{(y-\alpha)} - \frac{n_k^{out}}{n_{k0}^{in}} \right], \quad (4)$$

де α — осмотично неактивний об'єм сфероїда, n_k^{out} — мольна частка розчиненої в оточуючому середовищі k -ої речовини; n_{k0}^{in} — початкове значення мольної частки розчиненої всередині сфероїда речовини; τ_w — характерний час проникання молекул води в сфероїди.

При $t \rightarrow \infty$, (тобто $t \gg \tau_w$) зміна відносного об'єму сфероїда в розчині непроникаючої речовини $\frac{dy}{dt} \rightarrow 0$, отже отримуємо

$$\frac{1}{\tau_w} \left[\frac{(1-\alpha)}{(y-\alpha)} - \frac{n_k^{out}}{n_{k0}^{in}} \right] = 0, \quad (1-\alpha) = (y_\infty - \alpha) \frac{n_k^{out}}{n_{k0}^{in}} \quad (5)$$

$$\text{або} \quad y_\infty = \alpha + (1-\alpha) \frac{\pi_{k0}^{in}}{\pi_k^{out}} = \alpha + (1-\alpha)x, \quad (6)$$

де $x = \frac{\pi_{k0}^{in}}{\pi_k^{out}}$.

Визначаючи об'єм сфероїда за $t \gg \tau_w$ у серії розчинів непроникаючої речовини зі зростаючою концентрацією, знаходимо залежність асимптотичного відносного об'єму від оберненого приведенного осмотичного тиску розчину. Експериментальні дані апроксимували рівнянням (6), що описує поведінку об'єму сфероїда у розчині непроникаючої речовини методом найменших квадратів. Значення осмотично неактивного об'єму отримували за перетином апроксимованої прямої з віссю ординат.

Прогнозування осмотичної поведінки сфероїдів в умовах охолодження

Диференціальне рівняння, що описує кінетику зміни відносного об'єму клітини в процесі позаклітинної кристалізації кріопротекторного розчину, було запропоноване в роботі [24]:

$$\frac{dy}{dT} = p \exp \left[a(\hat{T} - 1) / \hat{T} \right] \left\{ \sigma_1 \hat{\pi}_1^{in} + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - \left[1 + \sigma_1 \frac{\hat{\pi}_{1\infty}(1-\alpha g_0) - \hat{\pi}_1^{in}(y-\alpha)g_0}{\hat{\pi}_{2\infty}(1-\alpha g_0) - (1-\alpha)g_0} \right] \hat{\pi}_2^{out} \right\}, \quad (7)$$

де $y = V/V_0$ — відносний об'єм клітини; g_0 — початкове значення відношення сумарного об'єму клітин до повного об'єму клітинної суспензії; α — об'ємна частка осмотично неактивних внутрішньоклітинних речовин; $p \equiv \frac{T_0}{\beta \tau_0}$; $a \equiv \frac{E_{a_0}}{R_0 T_0}$; $b \equiv \frac{E_{a_1}}{R_0 T_0}$;

$\tau_0 = (\gamma_0 L_p \pi_{20}^{in})^{-1}$; $\tau_1 = (\gamma_0 k_{pg})^{-1}$; β — швидкість охолодження; γ_0 — вихідне поверхнево-об'ємне відношення клітини; σ_1 — коефіцієнт відбиття плазматичної мембрани для проникаючої крізь мембрану речовини; $\hat{\pi}_1^{out} = \pi_1^{out} / \pi_{20}^{in}$, $\hat{\pi}_2^{out} = \pi_2^{out} / \pi_{20}^{in}$ — приведені значення позаклітинного осмотичного тиску відповідно проникаючої і непроникаючої речовин; $\hat{\pi}_1^{in} = \pi_1^{in} / \pi_{20}^{in}$ — приведені значення внутрішньоклітинного осмотичного тиску проникаючої через плазматичну мембрану речовини; π_{20}^{in} — початкове значення сумарного осмотичного тиску непроникаючих речовин всередині клітини; $\pi_{1\infty}, \pi_{2\infty}$ — асимптотичні значення осмотичного тиску відповідно проникаючої і не проникаючої

через плазматичну мембрану речовин, що відповідають рівномірному їх розподілу уздовж системи; $\hat{\pi}_{1\infty}, \hat{\pi}_{2\infty}$ — приведені асимптотичні значення осмотичного тиску відповідно проникаючої і непроникаючої речовин.

Такий алгоритм розрахунку був застосований для прогнозування осмотичної поведінки мультіклітинних сфероїдів в умовах охолодження з використанням інтегральних характеристик проникності молекул води і кріопротектора у сфероїди *in toto*. Для розрахунку також приймали, що інтегральні коефіцієнти фільтрації L_p та проникності для кріопротектора k_p зі зниженням температури системи в умовах кристалізації підпорядковуються ареніусовій залежності:

$$L_p(T) = L_p(T_0) \exp \left[\frac{E_{AL}}{R_0 T_0} \left(1 - \frac{T_0}{T} \right) \right], \quad (8)$$

$$k(T) = k(T_0) \exp \left[\frac{E_{Ak}}{R_0 T_0} \left(1 - \frac{T_0}{T} \right) \right], \quad (9)$$

де T_0 — вихідна (до початку охолодження) температура в градусах Кельвіна, E_{AL} і E_{Ak} — значення енергії активації процесу переносу через поверхню сфероїда молекул води і розчиненої речовини відповідно, R_0 — універсальна газова стала.

Прогнозування осмотичної поведінки сфероїдів при заморожуванні з різними швидкостями здійснювали, підставляючи в рівняння моделі визначені величини інтегральних коефіцієнтів проникності L_p і k_p та енергії активації E_{AL} і E_{Ak} . Кінетику зміни концентрації позаклітинного розчину в процесі заморожування при розрахунках задавали аналітично шляхом апроксимації фазової діаграми плавлення розчину ДМСО у вигляді [25]:

$$\hat{c}(\hat{T}) = -83,595\hat{T}^2 + 125,95\hat{T} - 41,355, \quad (10)$$

де $\hat{c} \equiv \frac{\tilde{c}}{c_0}$, $\tilde{c}(\hat{T})$ — концентрація позаклітинного розчину, за якої він знаходиться в

термодинамічній рівновазі з льодом при температурі T ; c_0 — вихідна (до заморожування) концентрація розчиненої речовини позаклітинного розчину; $\hat{T} = \frac{T}{T_{ko}}$ — приведена температура; T — поточне значення абсолютної температури, T_{ko} — значення температури плавлення розчину.

Вирішуючи рівняння (7) для визначених транспортних характеристик сфероїдів і вибраних швидкостей охолодження отримували залежності об'єму сфероїдів від температури заморожування. З урахуванням значень ступеня дегідратації робили висновок про оптимальну швидкість охолодження, спираючись на відповідну імовірність внутрішньоклітинної кристалізації при даному режимі охолодження СФ, як описано у роботах [13, 26].

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Протягом 21 доби культивування формувались переважно (70%) сфероїди округлої форми з діаметром 80–100 мкм. Після 7 доби спостерігалось ущільнення клітин у складі сфероїдів і більш чіткі контури (рис. 1). Відсутність некротичних зон у СФ на різних строках культивування була підтверджена за допомогою отриманих на конфокальному мікроскопі пошарових сканів СФ (рис. 2).

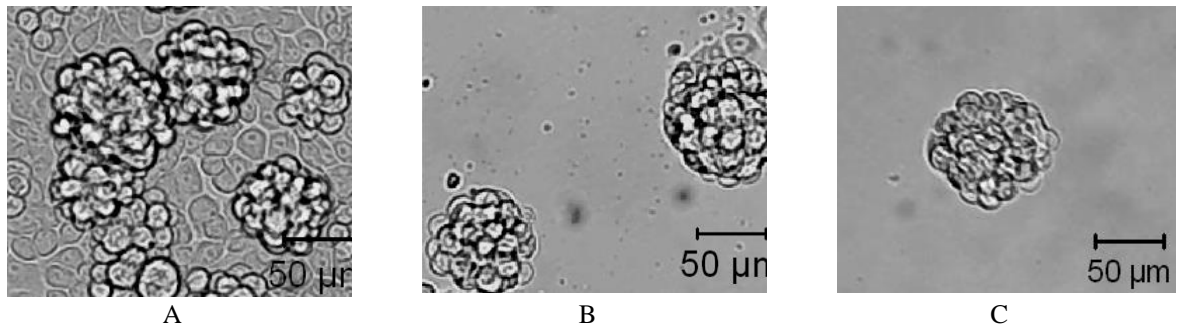


Рис. 1. Морфологія сфероїдів протягом культивування: А — 7 днів культивування, В — 14 днів культивування, С — 21 доба культивування.

Fig. 1. Spheroids morphology during cultivation: A — 7, B — 14, C — 21 days of cultivation.

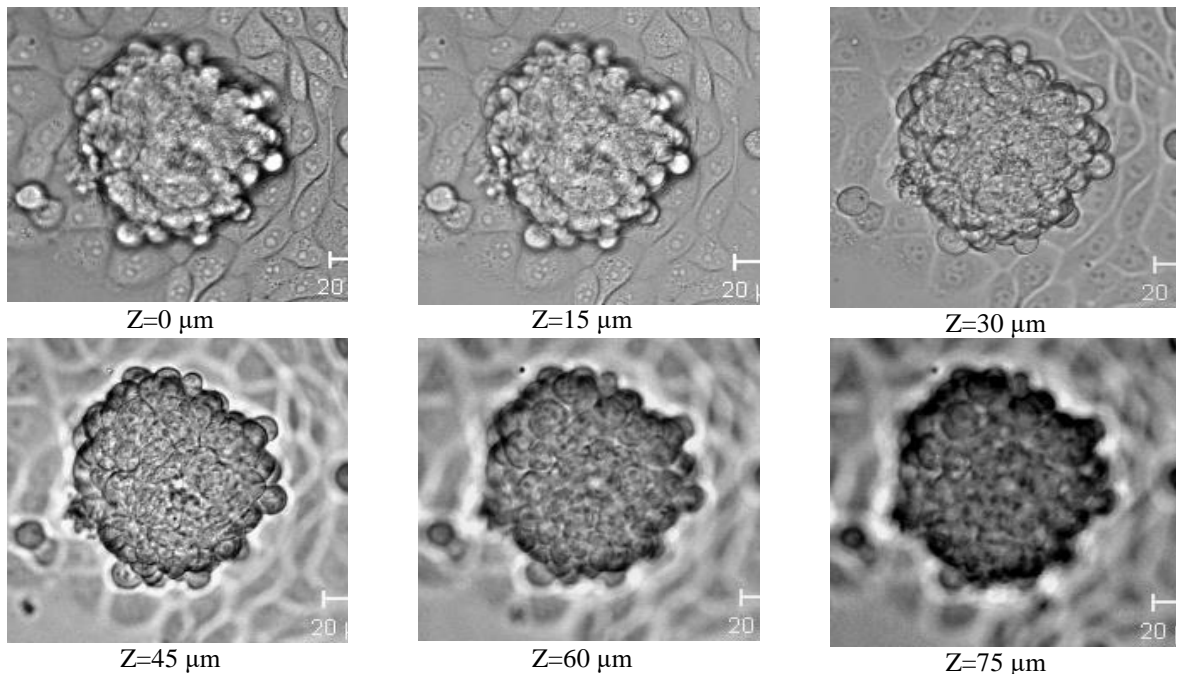


Рис. 2. Z-скани сфероїдів 14 доби культивування для різної глибини сканування (некротичних зон не виявлено).

Fig. 2. Z-scans of 14 cultivation days spheroids for different depth of scanning (necrotic zones are not revealed).

Для розрахунку параметрів проникності СФ були визначені чисельні значення їх осмотично неактивного об'єму α . Для сфероїдів 7 днів культивування $\alpha=0,41$. При збільшенні строків культивування осмотично неактивний об'єм збільшувався: на 14 добу культивування він становив $\alpha=0,485$ і на 21 добу культивування досягав значення $\alpha=0,54$, яке зберігалось і до 34 доби культивування (рис. 3). Таке збільшення осмотично неактивного об'єму СФ очевидно пов'язано з утворенням міжклітинних зв'язків. Таким чином, можна зробити висновок, що формування міжклітинного матриксу практично завершується на 21 добу культивування.

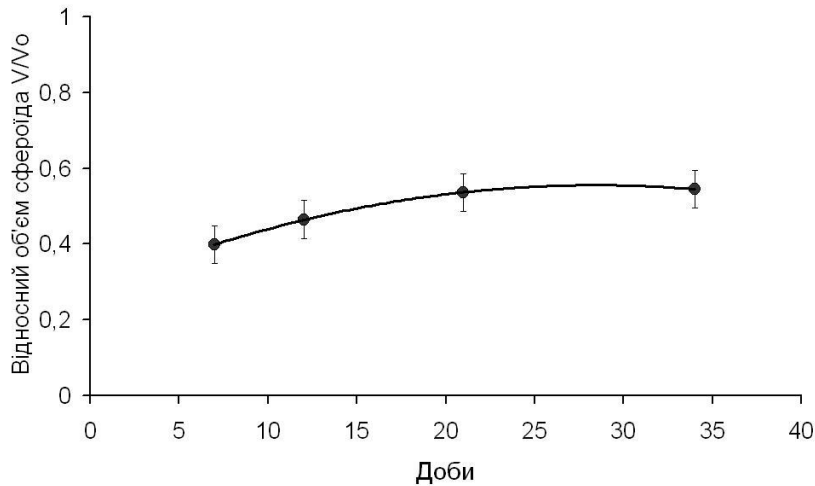


Рис. 3. Відносний осмотично неактивний об'єм сфероїдів у різні строки культивування.

Fig. 3. Relative osmotically inactive volume of spheroids at different cultivation stages.

На рис. 4 наведений приклад апроксимації експериментальних даних зміни відносного об'єму сфероїдів при експозиції в розчинах 1 М ДМСО за температур 10, 15 та 25 °С теоретичними кривими, розрахованими на підставі фізико-математичної моделі пасивного транспорту води і проникаючих речовин [18, 19].

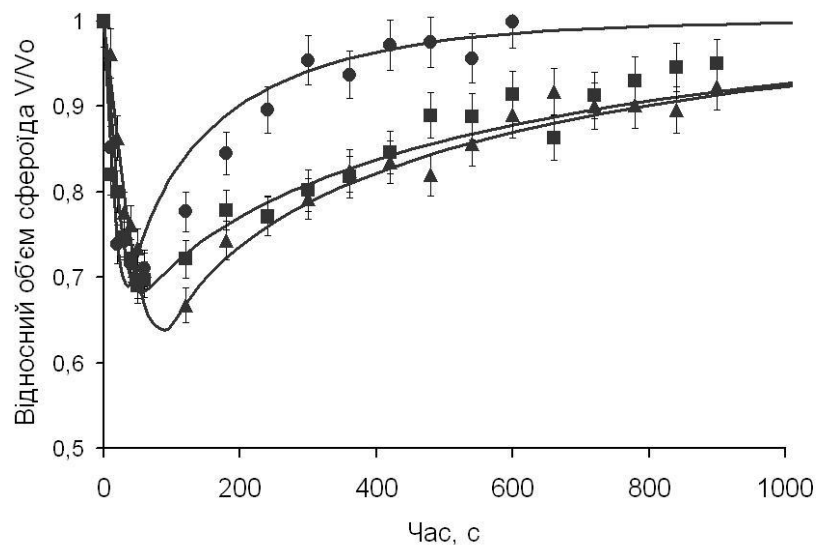


Рис. 4. Динаміка зміни відносного об'єму сфероїда 21 доби культивування в 1М ДМСО на фізіологічному розчині за різних температур (—●— 25 °С, —■— 15 °С, —▲— 10 °С).

Fig. 4. Relative volume change dynamics of 21 cultivation days' spheroids in 1M DMSO on physiological solution at different temperatures (—●— 25 °C, —■— 15 °C, —▲— 10 °C).

За апроксимацією експериментальних даних теоретичними кривими були знайдені інтегральні коефіцієнти фільтрації і проникності для ДМСО у СФ (табл. 1). Результати свідчать, що інтегральні показники проникності сфероїдів зменшуються зі збільшенням строків культивування. Так, культивування сфероїдів протягом 14 і 21 діб призводить до вірогідного ($p < 0,05$) зменшення коефіцієнтів фільтрації (L_p) і проникності для ДМСО у порівнянні з 7-ю добою культивування.

Таблиця 1. Коефіцієнти фільтрації ($L_p \times 10^{14}$, м³/Н·с) та проникності для ДМСО ($k_p \times 10^7$, м/с) сфероїдів різних строків культивуванняTable 1. Filtration ($L_p \times 10^{14}$, м³/N.s) and permeability for DMSO ($k_p \times 10^7$, m/s) coefficients of spheroids of different cultivation stages

Доба культивування	Коефіцієнт и проникності	Температура, °C		
		10	15	25
7	L_p	7,93±0,74	8,93±1,6	13,71±2,11
	k_p	2,79±0,68	6,86±2,7	8,51±1,86
14	L_p	3,46±0,06	5,16±0,8	9,50±0,86
	k_p	0,49±0,14	0,96±0,68	4,12±1,62
21	L_p	3,03±0,13	4,59±1,78	8,71±1,14
	k_p	0,43±0,20	0,64±0,63	3,27±1,30

На основі отриманих часових залежностей відносного об'єму СФ в розчинах з кріопротектором також була визначена тривалість процедури їх еквілібрації в 1 М ДМСО на фізіологічному розчині, необхідна для досягнення рівноваги між СФ і оточуючим середовищем на різних строках культивування за температур (10-15-25°C) (табл. 2). Наведені в таблиці 2 дані свідчать про те, що температура кріозахисного середовища і строки культивування суттєво впливають на необхідний оптимальний час експозиції СФ в кріопротекторному розчині.

Таблиця 2. Час досягнення рівноваги у системі СФ/кріопротекторний розчин, що містить 1 М ДМСО, у залежності від строків культивування СФ і температури еквілібрації

Table 2. Equilibrium time in the system SP / cryoprotective solution containing 1 M DMSO, depending on the cultivation time of SP and the equilibration temperature

Строки культивування сфероїдів, доби	Необхідний час експозиції у кріозахисному середовищі, с		
	25°C	15°C	10°C
7	43,0±1,8 ^a	51,8±3,6 ^a	64,8±2,9 ^a
14	67,7±8,7 ^{b,bb}	109,1±10,0 ^{b,bb}	216,2±10,9 ^{b,bb}
21	100,0±11,2 ^c	270,3±19,0 ^c	440,5±12,4 ^c

(a) — відмінності достовірні ($p < 0,05$) у порівнянні з (b) і (c); (bb) — відмінності достовірні ($p < 0,05$) у порівнянні з (c)

Вплив температури на константи швидкостей, що характеризують хімічні або біологічні процеси, часто аналізують в термінах енергії активації (E_A). Проникання води і розчинених речовин крізь штучні та природні мембрани різними структурно обумовленими шляхами характеризуються відмінними значеннями енергії активації. Тому для оцінки змінення відносного об'єму СФ впродовж охолодження, важливо враховувати залежність інтегральних значень їх проникності для молекул води та кріопротекторів від температури. Приймаючи до уваги вищесказане на наступному етапі дослідження розраховували значення енергії активації проникання молекул води і ДМСО у СФ на різних строках культивування (рис. 5).

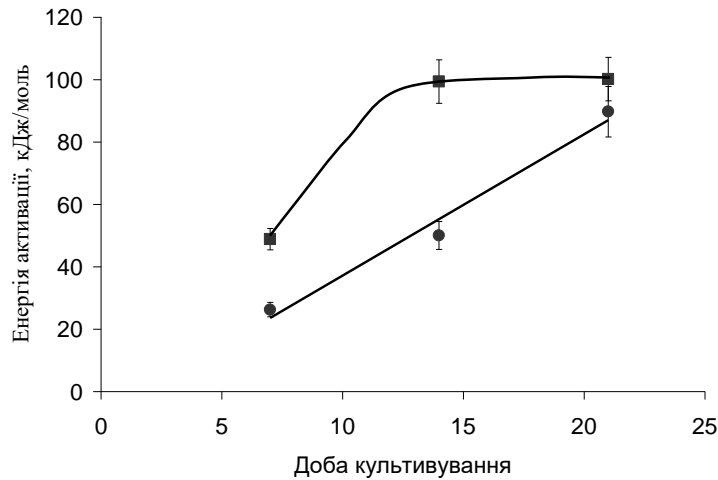


Рис. 5. Енергія активації проникання молекул води (●) та ДМСО (■) у СФ різних строків культивування.

Fig. 5. Activation energy of water (●) and DMSO (■) molecules penetration into SP at different cultivation stages.

Встановлено, що збільшення строків культивування впливає на показники енергії активації процесів переносу молекул води і ДМСО у СФ. Енергія активації проникання молекул води зростає зі збільшенням строків культивування у всьому досліджуваному діапазоні, тоді як енергія активації проникання ДМСО різко зростає на 14 добу та залишається на досягнутому високому рівні до 21 доби культивування. На здатність молекул ДМСО до проникання може впливати їх порівняно висока гідрофобність (коефіцієнт розподілу ДМСО між гідрофобною та гідрофільною фазами становить 0,247 [27]). Відомо, що формування СФ відбувається на основі міжклітинної адгезії, яка призводить до підвищення експресії білків міжклітинної адгезії (кадгерину, коннексину і паннексину) і ущільнення клітин у складі СФ протягом культивування [28], наслідком чого, зокрема, може бути обмеження дифузії гідрофобних молекул.

Хімічна рівновага між клітиною і оточуючим середовищем, що кристалізується, може досягатися або проникненням внутрішньоклітинної води крізь мембранний бар'єр у позаклітинний розчин, або утворенням внутрішньоклітинного льоду. Спосіб, за допомогою якого досягається рівновага, зумовлений швидкістю охолодження клітин та здатністю води до виходу з клітини назовні. Це масоперенесення обмежується гідравлічною проникністю (L_p) плазматичної мембрани клітини та площею її поверхні, доступної для виходу води. Якщо вихід води є достатнім (за більш низьких швидкостей охолодження), то масоперенесення превалюватиме над теплоперенесенням, зневоднення клітини буде забезпечувати підтримку хімічної рівноваги, що відтермінує утворення внутрішньоклітинного льоду. Перенос крізь клітинні мембрани проникаючої речовини, зокрема кріопротектора, вносить свої корективи у масообмін між клітиною і оточуючим середовищем. Внаслідок цього на збереженість клітин у процесі кристалізації клітинної суспензії впливають два типи пошкоджуючих чинників. Перший тип кріопшкоджень спричинюється зневодненням клітин під час кристалізації позаклітинного середовища і, отже, підвищенням концентрації поза- та внутрішньоклітинних розчинів. За збільшення швидкості охолодження ступінь пошкоджень першого типу зменшується внаслідок скорочення часу дії пошкоджуючих чинників [29–30]. Другий тип кріопшкодження клітин обумовлений утворенням внутрішньоклітинних кристалів льоду, які викликають ті ж самі ефекти, що і чинники

першого типу, і крім того здатні механічно руйнувати мембранні структури [31, 32]. Внутрішньоклітинна кристалізація, ймовірно зростає при високих швидкостях охолодження, вважається максимально згубною для клітин [33–34]. Таким чином, збереженість клітин під час кріоконсервування куполоподібно залежить від швидкості охолодження на етапі кристалізації [33]. Указані міркування можна віднести і до більш складних об'єктів, таких як мультиклітинні сфероїди [35].

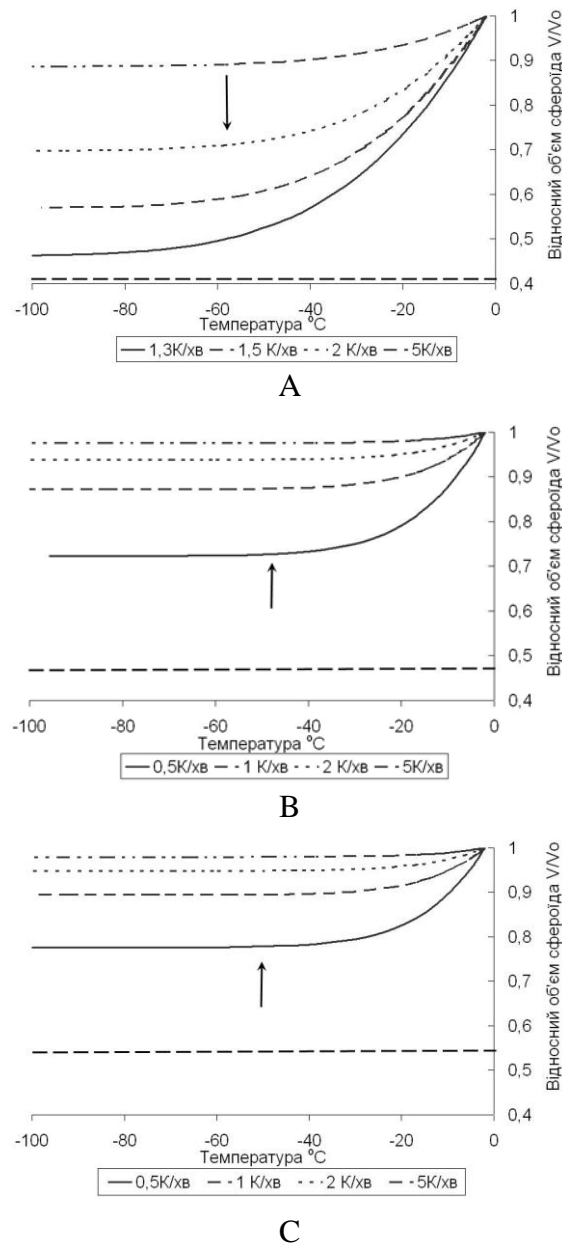


Рис. 6. Розрахована кінетика зміни об'єму СФ за швидкостей охолодження 0,5, 1, 2, 5 °C/hv; А- для СФ 7 діб; В - 14 діб; С – 21 доби; (\longrightarrow оптимальна швидкість).

Fig. 6. Calculated kinetics of SP volume change at cooling rates 0.5, 1, 2, 5 °C / min; A- for SP of 7 days; B - 14 days; C - 21 days (\longrightarrow optimal rate).

Приймаючи до уваги той факт, що швидкість охолодження, прямо пов'язана зі швидкістю, з якою внутрішньоклітинна вода може виходити з клітин, тобто з коефіцієнтом проникності клітинної мембрани для води, в подальших дослідженнях за допомогою рівняння (7) були розраховані величини відносного об'єму СФ при

заморожуванні з кріопротектором ДМСО зі швидкостями охолодження 0,5–5 град/хв (рис. 6). На підставі ступеня дегідратації СФ за різних швидкостей охолодження та значеннях їх осмотично неактивного об'єму робили попередній висновок про оптимальний режим охолодження в залежності від строків культивування.

Згідно з результатами, представленими на рис. 6, зневоднення СФ суттєво відрізняється залежно від строків культивування. Мінімальне значення відносного об'єму при швидкості охолодження 1,3 град/хв для СФ 7 діб культивування (рис. 6 А) досягає величин 0,48. За менших швидкостей охолодження об'єм СФ 7 діб культивування наближається до осмотично неактивного об'єму ($\alpha_7=0,41$). Таке зневоднення очевидно є критичним і може викликати суттєві пошкодження структури СФ. Для СФ 14 діб культивування (рис. 6 В) та СФ 21 доби культивування (рис. 6 С) відносний об'єм за цієї швидкості охолодження досягає величини $\sim 0,73$ та $0,78$ відповідно, що суттєво більше осмотично неактивного об'єму для таких строків культивування ($\alpha_{14}=0,485$, $\alpha_{21}=0,54$). Виходячи з кривих зневоднення СФ за різних швидкостей охолодження, можна зробити висновок, що для СФ 7 діб культивування оптимальні швидкості охолодження будуть знаходитись в інтервалі 1,5–2°C/хв. Відносний об'єм СФ при цьому досягає значень 0,6–0,7 до температури –60–80°C.

Таким чином, на основі аналізу осмотичної поведінки багатоклітинного СФ у кріопротекторному розчині за допомогою фізико-математичного моделювання процесів масопереносу були визначені і проаналізовані параметри проникності для молекул води і кріопротектора у СФ в залежності від строків культивування і температури кріозахисного розчину. Отримані результати свідчать про те, що процеси проникності для молекул води і ДМСО у СФ зі збільшенням строків культивування уповільнюються. Показано, що найбільш вагомі зміни наведених у роботі показників проникності відбуваються після 7 діб культивування СФ. Найбільші відмінності часу експозиції СФ у кріопротекторному розчині, необхідного для досягнення рівноваги, при зміні температури спостерігався саме для СФ на 14 і 21 добу культивування, що пов'язано зі значним зменшення коефіцієнтів проникності СФ для молекул води і кріопротектора. Такий суттєвий вплив часу культивування на приведені у роботі показники, очевидно, пов'язаний з особливостями формування сфероїдів, а саме формуванням міжклітинного матриксу, до складу якого входять речовини які впливають на його гідрофільні характеристики (протеоглікани і глікозаміноглікани).

Збільшення кількості клітин у складі сфероїдів і як наслідок міжклітинного матриксу в часі можуть впливати на проникність СФ для проникаючих речовин. Аналогічні припущення були зроблені в роботі [36], в якій було досліджено саме вплив міжклітинного матриксу на процеси злиття сфероїдів. Автори показали, що збільшення строків культивування СФ призводило до збільшення кількості позаклітинного матриксу, що призводило на їх думку, до уповільнення їхнього злиття.

Підсумовуючи, можна зробити висновок про те, що використана в роботі фізико-математична модель дозволяє проаналізувати осмотичну поведінку СФ на етапі охолодження. У роботі запропоновано алгоритм розрахунку коефіцієнтів проникності та зміни об'єму СФ під час охолодження з різними швидкостями у кріозахисному середовищі. Отримані результати можуть бути використані для визначення оптимальних режимів кріоконсервування клітинних СФ різних за клітинним складом та умовами культивування у відповідних кріозахисних розчинах.

ВИСНОВКИ

Показано, що необхідний час експозиції у 1 М ДМСО в діапазоні температур (10–25°C) для СФ 14 і 21 доби культивування вірогідно ($p < 0,05$) збільшується у

порівнянні з даним параметром для СФ 7 діб культивування незалежно від температури кріозахисного середовища.

Визначені коефіцієнти фільтрації та проникності для молекул ДМСО у СФ та показано, що вони вірогідно зменшуються зі збільшенням строків культивування.

Розраховані величини енергії активації проникання молекул води та ДМСО у СФ та визначена їх залежність від строків культивування.

На підставі визначених параметрів проникності розрахована динаміка зміни об'єму СФ різних строків культивування за різних швидкостей охолодження. Зроблено оцінку оптимальних режимів охолодження СФ: для 7 діб культивування – 1,5–2 °C/хв з охолодженням до -80°C і подальшим зануренням у азот; для 14 та 21 доби культивування – 0,5 °C/хв до -40°C і подальшим зануренням у азот.

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

Authors' ORCID ID

A. I. Moisieiev  <https://orcid.org/0000-0003-4585-1194>
 I. F. Kovalenko  <https://orcid.org/0000-0002-7063-6712>
 G. A. Bozhok  <https://orcid.org/0000-0002-4188-9286>
 O. I. Gordiyenko  <https://orcid.org/0000-0002-4459-4213>

REFERENCES

1. Woappi Y, Altomare D, Creek KE, Pirisi L. Self-assembling 3D spheroid cultures of human neonatal keratinocytes have enhanced regenerative properties. *Stem Cell Res.* 2020;49:102048. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.102048>
2. Petrenko Y, Syková E, Kubinová Š. The therapeutic potential of three-dimensional multipotent mesenchymal stromal cell spheroids. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8:94. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0558-6>
3. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol.* 2014;12(4):207–18. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>
4. Xu Y, Shi T, Xu A, Zhang L. 3D spheroid culture enhances survival and therapeutic capacities of MSCs injected into ischemic kidney. *J Cell Mol Med.* 2016;20(7):1203–13. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12651>
5. Seno K, Munakata Y, Sano M, Kawahara-Miki R., Takahashi H, Ohkuchi A, et al. Aggregation of human trophoblast cells into three-dimensional culture system enhances anti-inflammatory characteristics through cytoskeleton regulation. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):2322. <https://doi.org/10.3390/ijms19082322>
6. Baptista LS, Kronemberger GS, Cortes I, Charelli LE, Matsui RAM, Palhares TN, et al. Adult stem cells spheroids to optimize cell colonization in scaffolds for cartilage and bone tissue engineering. *Int J Mol Sci.* 2018;19:1285. <https://doi.org/10.3390/ijms19051285>
7. Dong H, Li X, Chen K, Li N, Kagami H. Cryopreserved spontaneous spheroids from compact bone-derived mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods.* 2021;27(4):253–63. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2021.0001>
8. Jensen C, Teng Y. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? *Front Mol Biosci.* 2020;7:33. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00033>
9. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology *in vitro*. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(3):211–24. <https://doi.org/10.1038/nrm1858>
10. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J.* 2008;3(9-10):1172–84. <https://doi.org/10.1002/biot.200700228>
11. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(10):839–45. <https://doi.org/10.1038/nrm2236>
12. Ryu NE, Lee SH, Park H. Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells. *Cells.* 2019;8(12):1620. <https://doi.org/10.3390/cells8121620>
13. Gordiyenko OI, Kovalenko SYe, Kovalenko IF, Ogurtsova VV, Todrin AF. Theoretical estimation of the optimum cooling rate of a cell suspension at linear freezing modes based on a two factor theory of cryodamage. *CryoLetters.* 2018;39(6):380–5. PMID: 30963155

14. Lee JH, Jung DH, Lee DH, Park JK, Lee SK. Effect of spheroid aggregation on susceptibility of primary pig hepatocytes to cryopreservation. *Transplant Proc.* 2012;44(4):1015–7. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.03.009>
15. Ehrhart F, Schulz JC, Katsen-Globa A, Shirley SG, Reuter D, Bach F, et al. A comparative study of freezing single cells and spheroids: towards a new model system for optimizing freezing protocols for cryobanking of human tumours. *Cryobiology.* 2009;58(2):119–27. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.11.005>
16. Purcell WM, Atterwill CK, Xu J. Cryopreservation of organotypic brain spheroid cultures. *Altern Lab Anim.* 2003;31(6):563–73. <https://doi.org/10.1177/026119290303100605>
17. Sundlisaeter E, Wang J, Sakariassen PO, Marie M, Mathisen JR, Karlsen BO, et al. Primary glioma spheroids maintain tumorigenicity and essential phenotypic traits after cryopreservation. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2006;32(4):419–27. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2006.00744.x>
18. Gordiyenko YeO, Gordiyenko OI, Maruschenko VV, Sakun OV. [Improved model for the passive mass transfer through the cell plasma membrane]. *Biophysical bulletin.* 2008;21(2):75–80. (in Ukrainian). <https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/article/view/16789/15479>
19. Tarusin DN, Kireyev VA, Kovalenko SYe, Kovalenko IF, Rozanov LF, Petrenko AYu. Selection of protocols to cryopreserve mesenchymal stromal cells in suspension and alginate microspheres by studying their osmotic responses in 1M DMSO. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2016;26(2):133–44. <https://doi.org/10.15407/cryo26.02>
20. Amereh M, Edwards R, Akbari M, Nadler B. In-silico modeling of tumor spheroid formation and growth. *Micromachines (Basel).* 2021;12(7):749. <https://doi.org/10.3390/mi12070749>
21. Netti PA, Baxter LT, Boucher Y, Skalak R, Jain RK. Macro- and microscopic fluid transport in living tissues: application to solid tumors. *AIChE Journal.* 1997;43(3):818–34. <https://doi.org/10.1002/aic.690430327>
22. Demuyneck R, Efimova I, Lin A, Declercq H, Krysko DV. A 3D cell death assay to quantitatively determine ferroptosis in spheroids. *Cells.* 2020;9(3):703. <https://doi.org/10.3390/cells9030703>
23. Ogurtsova VV, Kovalenko SYe, Kovalenko IF, Gordiyenko OI. Determination of osmotically inactive volume of murine enterocytes, *Probl Cryobiol Cryomed.* 2016;26(1):93–7. <https://doi.org/10.15407/cryo26.01.093>
24. Gordiyenko YeO, Pushkar NS. [Physical basis for low temperature preservation of cell suspensions]. Kyiv: Naukova dumka; 1994. 140 p. (In Russian).
25. Todrin OF, Popivnenko LI, Kovalenko SYe. Thermophysical properties of cryoprotectants. I. Temperature and Heat of Melting. *Problems of Cryobiology.* 2009;19(2):163–76. <http://cryo.org.ua/journal/index.php/probl-cryobiol-cryomed/article/view/271/304>
26. Gordienko OI, Kovalenko IF, Kovalenko SYe, Kuleshova LG, Todrin OF. Theoretical estimation of optimal linear cooling rate for PK-15 cell suspension. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2021;31(3):214–22. <https://doi.org/10.15407/cryo31.03.214>
27. Shevchenko NA, Strybul TF, Rozanov LF. Effect of multiatom alcohols, amides and DMSO on grape and potato meristems integrity. *Problems of Cryobiology.* 2004;3:79–85. <http://cryo.org.ua/journal/index.php/probl-cryobiol-cryomed/article/view/678/711>
28. Achilli T-M, Meyer J, Morgan JR. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12(10):1347–60. <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.707181>
29. Mazur P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology.* 1966;2:181–92. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(66\)80165-7](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(66)80165-7)
30. Chang T, Zhao G. Ice Inhibition for Cryopreservation: Materials, Strategies, and Challenges. *Adv Sci.* 2021;8(6):2002425. <https://doi.org/10.1002/advs.202002425>
31. Yu G, Yap YR, Pollock K, Hubel A. Characterizing Intracellular Ice Formation of Lymphoblasts Using Low-Temperature Raman Spectroscopy. *Biophys J.* 2017;112(12):2653–63. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.05.009>
32. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells at supraoptimal rates. *Cryobiology.* 1977;14(2):251–72. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(77\)90175-4](https://doi.org/10.1016/0011-2240(77)90175-4)
33. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.* 2015;1257:3–19. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_1
34. Wesley-Smith J, Walters C, Pammenter NW, Berjiak P. Why is intracellular ice lethal? A microscopical study showing evidence of programmed cell death in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*. *Ann Bot.* 2015;115(6):991–1000. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv009>
35. Li R, Yu G., Azarin SM, Hubel A. Freezing Responses in DMSO-Based Cryopreservation of Human iPS Cells: Aggregates Versus Single Cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2018;24(5):289–99. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2017.0531>

36. Kosheleva NV, Efremov YM, Shavkuta BS, Zurina IM, Zhang D, Zhang Y, et al. Cell spheroid fusion: beyond liquid drops model. Sci. Rep. 2020;10:12614. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69540-8>

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОПТИМАЛЬНЫХ РЕЖИМОВ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ РАЗНЫХ СРОКОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

А. И. Моисеев, И. Ф. Коваленко, Г. А. Божок, О. И. Гордиенко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,

ул. Переяславская, 23, Харьков, Украина, 61016

e-mail: olga.gordiyenko.ipcic@gmail.com

Поступила в редакцию 28 октября 2021 г. Пересмотрена 19 ноября 2021 г.

Принята к печати 24 ноября 2021 г.

Актуальность. Трехмерные культуральные системы — это уникальные платформы для изучения сложных биологических процессов *in vitro*. Взаимодействия клетка–клетка и клетка–внеклеточный матрикс образуют коммуникационную сеть биохимических и механических сигналов, приближает сфероиды (СФ) к нативным тканям и существенно отличает их от монослойных культур. Важным для клеточных технологий является разработка способов криоконсервирование 3D–культур, что позволит создавать запасы ценных клеточных образцов, экономить время и материалы, будет предотвращать потерю культур из-за технических сбоев, контаминации, дрейфа фенотипа и старения.

Цель работы. Разработка подходов к криоконсервированию клеточных сфероидов. Определение параметров проницаемости сфероидов из клеток линии L929 разных сроков культивирования для теоретической оценки оптимальных режимов замораживания.

Материалы и методы. В работе были использованы клетки линии L929, которые образуют СФ разного диаметра, и могут быть поддержаны длительное время в 3D–условиях. Для определения интегральных коэффициентов фильтрации L_p и проницаемости для ДМСО k_p в СФ на разных сроках культивирования был использован вольюмометрический метод. Исследование динамики изменения объема сфероидов во времени проводили на конфокальном микроскопе LSM 510 META. Численные значения интегральных коэффициентов проницаемости СФ определяли путем аппроксимации экспериментальных данных изменения относительного объема СФ от времени экспозиции в исследуемом растворе теоретическими кривыми, рассчитанными на основании физико-математической модели пассивного массообмена между сфероидом и окружающей средой при условии их максимального совпадения. Прогнозирование осмотического поведения сфероидов в условиях охлаждения осуществляли на основании дифференциального уравнения, описывающего кинетику изменения относительного объема клетки в процессе внеклеточной кристаллизации криопротекторного раствора, подставляя в уравнения модели определенные величины интегральных коэффициентов проницаемости L_p и k_p и энергии активации E_{AL} и E_{AK} . Кинетику изменения концентрации внеклеточного раствора в процессе замораживания при расчетах задавали аналитически путем аппроксимации фазовой диаграммы плавления раствора ДМСО.

Результаты. Определены коэффициенты фильтрации и проницаемости для молекул ДМСО в СФ и показано, что они достоверно уменьшаются с увеличением сроков культивирования. Рассчитаны величины энергии активации проникновения молекул воды и ДМСО в СФ и определена их зависимость от сроков культивирования. На основании определенных параметров проницаемости рассчитана динамика изменения объема СФ разных сроков культивирования при различных скоростях охлаждения.

Выводы. Теоретически определены оптимальные режимы охлаждения СФ из клеток линии L929: для 7 суток культивирования — 1,5–2 °C/мин с охлаждением до -80 °C и последующим погружением в азот; для 14 и 21 суток культивирования — 0,5 °C/мин до -40 °C и последующим погружением в азот.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сфероиды, криоконсервирование, фибробласты линии L929, коэффициенты фильтрации, коэффициенты проницаемости для ДМСО, энергия активации, скорость охлаждения.

THEORETICAL APPROACHES TO DETERMINATION OF OPTIMAL CRYOPRESERVATION REGIMENS FOR CELL SPHEROIDS OF DIFFERENT CULTIVATION TERMS

A. I. Moisieiev, I. F. Kovalenko, G. A. Bozhok, O. I. Gordiyenko

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine, 61016

e-mail: olga.gordiyenko.ipcic@gmail.com

Submitted October 28, 2021; Revised November 19, 2021;

Accepted November 24, 2021

Background: Three-dimensional culture systems are unique platforms for studying complex biological processes *in vitro*. Cell–cell and cell–extracellular matrix interactions form a communication network of biochemical and mechanical signals, bring spheroids (SP) closer to native tissues and significantly distinguish them from monolayer cultures. It is important for cell technologies to develop methods for cryopreservation of 3D cultures, that allows creating the stocks of valuable cell samples, save time and materials, and prevent the loss of cultures due to technical failures, contamination, phenotype drift and aging.

Objectives: Development of approaches to cellular spheroids cryopreservation. Determination of the permeability parameters of L929 cells spheroids at different cultivation periods for the theoretical assessment of optimal freezing regimens.

Materials and methods: We have used L929 cells, which form SPs of different diameters and can be maintained for a long time in 3D conditions. To determine the integral filtration L_p and permeability for DMSO k_p coefficients for SP at different periods of cultivation, the volumetric method was used. The study of the changes in the spheroids volume in time was carried out with a confocal microscope LSM 510 META. The numerical values of the integral SF permeability coefficients were determined by approximating the experimental data on the change in the relative volume of the SP versus the exposure time in the test solution with theoretical curves calculated on the basis of a physical and mathematical model for passive mass transfer between the spheroid and the environment, provided that they coincide as much as possible. Prediction of the osmotic behavior of spheroids under cooling conditions was carried out based on the differential equation describing the kinetics of changes in the relative cell volume during extracellular crystallization of a cryoprotective solution, substituting determined values of integral permeability coefficients L_p and k_p and activation energies E_{AL} and E_{AK} into the model equations. The kinetics of changes in the extracellular solution concentration during freezing was set analytically by approximating the phase melting diagram of the DMSO solution.

Results: The filtration and permeability for DMSO molecules coefficients in SP were determined and their significant decrease with a cultivation duration was shown. The activation energy values for the penetration of water and DMSO molecules into the SP were calculated and their dependence on the cultivation time was determined. Proceeding from the determined parameters of permeability, the dynamic of changes in the volume of SPs for different periods of cultivation at different rates of cooling was calculated.

Conclusions: The optimal cooling modes of SP from L929 cells were in theory determined: for 7 days of cultivation — 1,5-2 °C/min with cooling to -80°C and subsequent immersion in nitrogen; for 14 and 21 days of cultivation — 0.5 °C/min to -40 °C and subsequent immersion in nitrogen.

KEY WORDS: spheroids, cryopreservation, L929 line fibroblasts, filtration coefficients, permeability coefficients for DMSO, activation energy, cooling rate.

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-46-02>

УДК 51.76

ЗВОРОТНЕ ПЕРЕТВОРЕННЯ РАДОНА БЕЗ СИНГУЛЯРНОСТІ ДЛЯ ПУЧКА З ТОЧКОВИМ ФОКУСОМ

Т. Г. Віхтинська , К. Є. Лапітан , К. Е. Немченко 

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, майдан Свободи, 6,
м. Харків, 61022, Україна;

e-mail: vikhtinskaya@karazin.ua, konstantinlapitan@gmail.com, nemchenko@karazin.ua

Надійшла до редакції 14 листопада 2021 р. Переглянута 10 грудня 2021 р.

Прийнята до друку 13 грудня 2021 р.

Актуальність. Необхідність реконструкції зображень за його проєкціями багато раз впливала як засіб вивчення об'єкта у найрізноманітніших сферах науки, техніки та у медицині. Основу цього методу складає проникнення через об'єкт пучка променів під різними ракурсами та отримання на чутливій до цих променів поверхні тінювого зображення. Через те, що тканини та кістки мають різну поглинаючу густину, по таким проєкціям можливо отримати доволі точне уявлення про наявність патологічних утворень або пошкоджень.

Незважаючи на всі переваги томографії, вона має низку недоліків. Один з найсерйозніших — це перевищення дозвільної дози випромінювання для людини. Тому є декілька варіантів зниження навантаження на пацієнта, й один із них, це використання методу томосинтезу замість комп'ютерної томографії. Томосинтез займає середнє положення за інформативністю між комп'ютерною томографією та двовимірною рентгенографією, незначно перевищуючи дозу випромінювання в останньому випадку. Тому через це зараз по всьому світу ведуться роботи у напрямку покращення методу томосинтезу аби розширити кількість захворювань, які можливо діагностувати таким методом, та роботи з підвищення якості отриманих зображень.

Мета роботи — визначення ефективності методу відновлення зображення при використанні перетворення Радона у загальному вигляді порівняно з класичними методами.

Матеріали і методи. Методи математичної фізики для відновлення медичних зображень, а саме Фур'є перетворення у полярній системі координат та перетворення Радона.

Результати. В результаті виконаної роботи було отримано вираз для зворотного перетворення Радона та змодельовано роботу томографа з точковим фокусом рентгєнівських променів. При порівнянні різних методів реконструкції об'єктів з оригінальним зображенням перетворення Радона в загальному вигляді має більшу точність.

Висновки. Не зважаючи на майже трикратний зріст часу обчислення реконструкції, даний метод має свої практичні переваги у випадку виявлення патологій, що тільки розвиваються та не мають чітких границь, або у випадку виявлення об'єктів малого розміру.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: перетворення Фур'є; перетворення Радона; томографія; томосинтез; реконструкція зображень.

Як цитувати: Віхтинська ТГ, Лапітан КЄ, Немченко КЕ. Зворотне перетворення Радона без сингулярності для пучка з точковим фокусом. Біофізичний вісник. 2021;46:23–33. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-46-02>

In cites: Vikhtinskaya TG, Lapitan KE, Nemchenko KE. Inverse radon transform without singularity for rays with a point focus. Biophysical Bulletin. 2021;46:23–33. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-46-02> (in Ukrainian)

Open Access. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

Візуалізація внутрішніх структур об'єктів широко розповсюджена у багатьох сферах науки, медицині та промисловості. Тому методи рентгенології застосовуються як у виявленні патологій людини, так і для вивчення структури туманностей за даними рентгенограм з космічних апаратів, або в дефектоскопії. Такі методи здатні генерувати тривимірні данні, які надають перевагу у повноті інформації про внутрішній стан піддослідного зразку, чи то структура кісток, чи наявність мікроскопічних тріщин у шарах металу.

ТЕОРЕТИЧНА МОДЕЛЬ

Основою реконструктивної томографії є отримання великої кількості проєкцій перетинів об'єкта, для котрих розв'язують двовимірну задачу відновлення зображення і потім зіставляють для отримання точної тривимірної структури.

На рис. 1 представлено схему отримання проєкційних даних у перетині об'єкта.

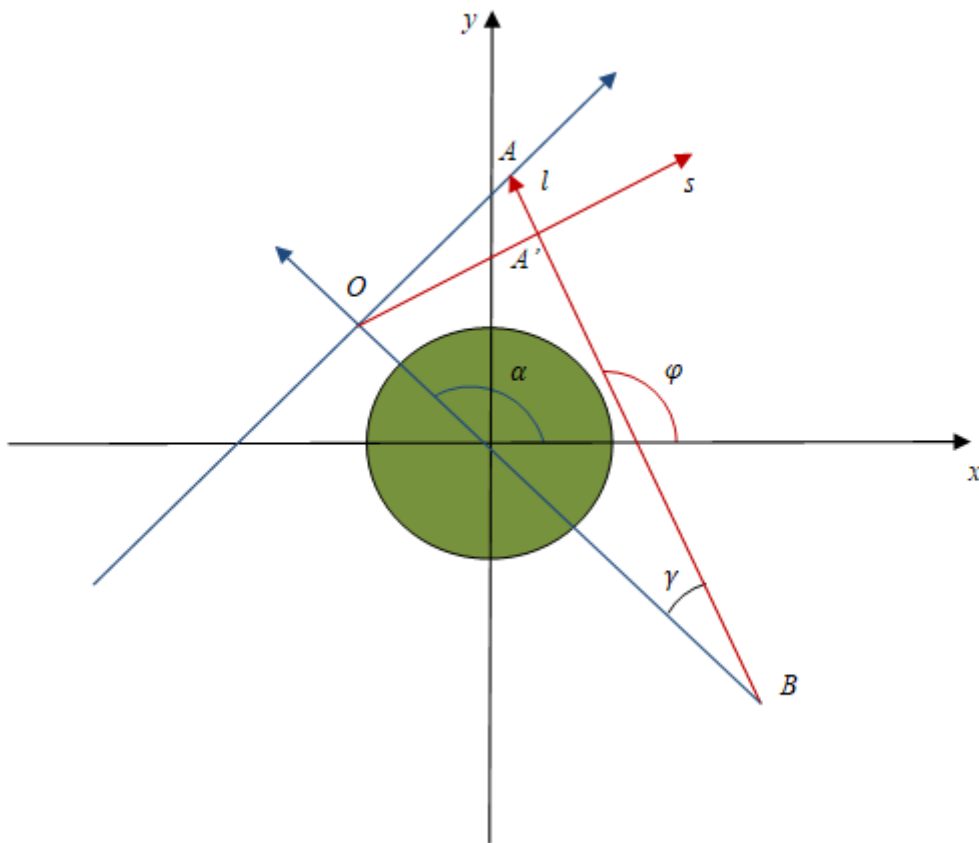


Рис. 1. Дослідження внутрішньої структури об'єкта томографом з точковим фокусом та відповідна система координат для паралельного проєктування. Тут α – кут нахилу системи детекторів та випромінювача, γ – кут нахилу променя проєктування, OA – відповідна координата детектора для кута γ , l – напрямок проєктування, s – відповідна координата детектора для паралельного вигляду проєктування, φ – кут нахилу паралельної системи проєктування.

Fig. 1. The study of the internal structure of the object with a point-focused tomograph and the corresponding coordinate system for parallel projecting. Here α is the angle of the detector and emitter system, γ is the angle of the projection beam, OA is the corresponding coordinate of the detector for the angle γ , l is the direction of the projecting, s is the corresponding coordinate of the detector for the parallel projecting, φ is the angle of the parallel projecting.

Якщо розподіл густини всередині об'єкта представити функцією $f(x, y)$, то значення проєкції, отриманої на детекторі, можна записати у вигляді інтеграла вздовж напрямку проєктування l :

$$Q(\gamma, \alpha) = \int f(x, y) dl. \quad (1)$$

Зв'язок між декартовими координатами x, y та променем проєктування l дається виразом

$$l = x \cos(\alpha - \gamma) + y \sin(\alpha - \gamma) - H \sin \gamma. \quad (2)$$

Тут H — це відстань OB від детектора до випромінювача.

Цей зв'язок надає змогу переписати інтеграл (1) у вигляді двократного інтеграла

$$Q(\gamma, \alpha) = \int \int f(x, y) \delta(x \cos(\alpha - \gamma) + y \sin(\alpha - \gamma) - H \sin \gamma) dx dy. \quad (3)$$

З теореми про центральний перетин [1] випишемо зв'язок між Фур'є простором функції $f(x, y)$ та її перетворенням Радона для паралельного проєктування.

$$F(w_1, w_2) = F(\omega \cos \varphi, \omega \sin \varphi) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \tilde{R}(\omega, \varphi) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} R(s, \varphi) e^{-i\omega s} ds. \quad (4)$$

Тут функція $F(w_1, w_2)$ є двовимірним Фур'є-зображенням функції $f(x, y)$, $R(s, \varphi)$ — радонівський образ функції $f(x, y)$, $\tilde{R}(\omega, \varphi)$ — це одновимірне перетворення Фур'є для радонівського образу по змінній s .

Розглянемо тепер задачу відновлення функції $f(x, y)$ з двовимірного Фур'є зображення $F(w_1, w_2)$.

$$f(x, y) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} F(w_1, w_2) e^{i(w_1 x + w_2 y)} dw_1 dw_2. \quad (5)$$

Використовуючи вирази (4) приведемо (5) до вигляду

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} R(X, \varphi) G(s - X) dX d\varphi. \quad (6)$$

Тут функція

$$G(s) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{\infty} |\omega| e^{i\omega s} d\omega \quad (7)$$

представляє собою ядро зворотного проєктування з фільтрацією методом згортки [1] і використовується для відновлення даних, отриманих під час паралельного проєктування. Для переходу до проєктування променями з точковим фокусом зробимо заміну змінних (див. рис. 1).

$$\begin{cases} s = H \sin \gamma \\ \varphi = \alpha - \gamma \end{cases}. \quad (8)$$

В цьому випадку формула (6) набуває вигляду

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} \int_{-\gamma_{max}}^{\gamma_{max}} H \cos \gamma Q(\gamma, \alpha) G(H \sin(\gamma)) d\gamma d\alpha, \quad (9)$$

де γ_{max} — максимальний кут відхилення променя від лінії, яка з'єднує фокус B з центром обертання.

Розпишемо тепер внутрішню функцію $G(H \sin(\gamma))$, зробивши заміну

$$\omega = \hat{\omega} \frac{\gamma}{H \sin(\gamma)}, \quad (10)$$

яка приводить до наступного виразу для функції (7):

$$G(H \sin(\gamma)) = \left(\frac{\gamma}{H \sin(\gamma)} \right)^2 G(\gamma). \quad (11)$$

Тепер рівняння (9) набуває такого вигляду:

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} \int_{-\gamma_{max}}^{\gamma_{max}} \frac{\cos \gamma}{H} \left(\frac{\gamma}{\sin(\gamma)} \right)^2 Q(\gamma, \alpha) G(\hat{\gamma} - \gamma) d\gamma d\alpha. \quad (12)$$

Цей вираз (12) використовується для відновлення зображень, отриманих під час комп'ютерної томографії, та відображає суть перетворень Радона.

Проблемою такого метода є той факт, що інтеграл (7) має особливість, і тому замість нього використовують наближені функції [2, 3] які приводять до наближеного відновлення.

Найпростіше наближення (7) полягає у введенні максимальної просторової частоти W_{max} ,

$$G(\gamma) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int_{-W_{max}}^{W_{max}} |\omega| e^{i\omega\gamma} d\omega, \quad (13)$$

що приводить до наступного вигляду функції $G(\gamma)$

$$G(\gamma) = \frac{2}{(2\pi)^2} \left[\frac{W_{max}}{\gamma} \sin(W_{max}\gamma) - \frac{1 - \cos(W_{max}\gamma)}{\gamma^2} \right]. \quad (14)$$

До недоліків введення такої моделі фільтрації під час відновлення зображень відноситься відсутність алгоритму вибору максимальної частоти W_{max} та наявність артефактів у відновленому зображенні при зашумленні проєкційних даних. Для згладжування даних можна використовувати метод помноження ядра фільтрації на швидко спадаючу функцію [4].

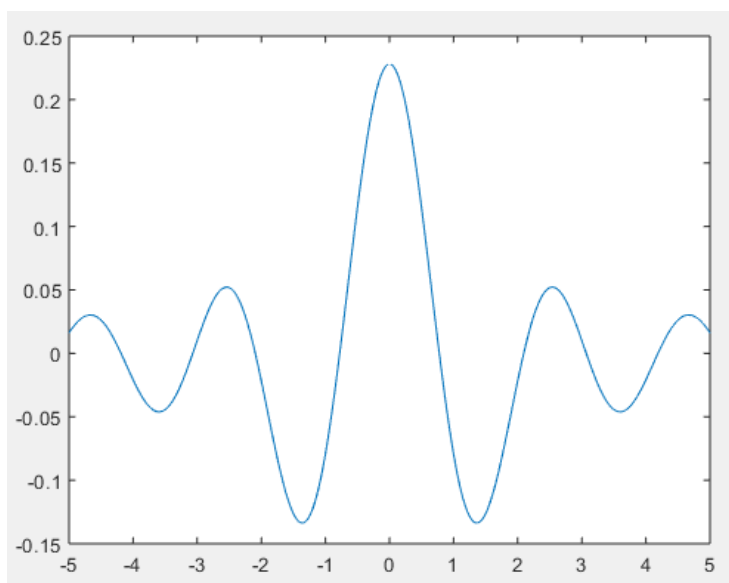
Ще один спосіб складається з комплексного представлення величини s , що входить до інтегралу у виразі (7) за умови, що уявна частина δ нової величини s є малою та позитивною:

$$s \rightarrow s + i\delta \quad (\delta > 0).$$

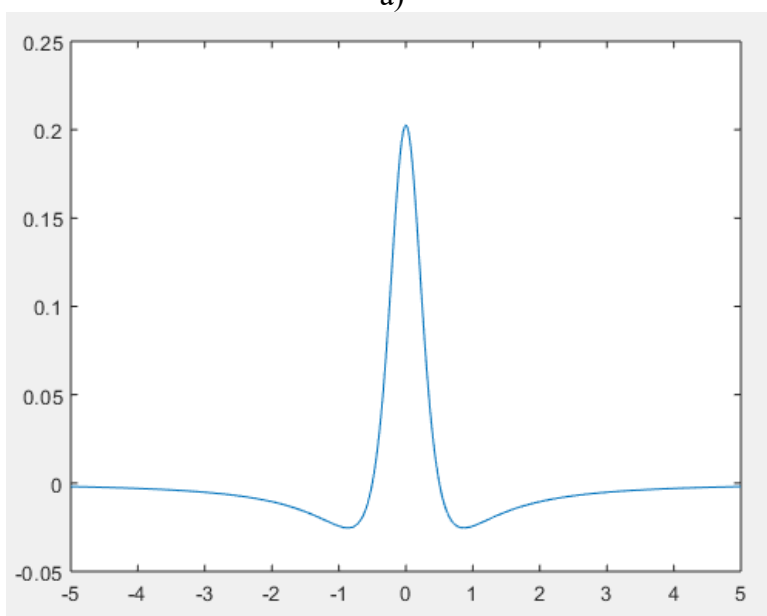
В цієї моделі отримуємо таке представлення для ядра G :

$$G(\gamma, \delta) = -\frac{1}{2\pi^2} \frac{\gamma^2 - \delta^2}{(\gamma^2 + \delta^2)^2}. \quad (15)$$

На рис. 2 представлено загальний вигляд ядра G : в обох випадках



а)



б)

Рис. 2. Ядро перетворення G : а) з обмеженням максимальної частоти інтегрування (14), б) з введенням комплексної змінної (15).

Fig. 2. The kernel of the transformation G : a) with the limitation of the maximum frequency of integration (14), b) with the introduction of a complex variable (15).

Ідея роботи полягає у використанні зворотного перетворення Радона у загальному вигляді без введення максимальної просторової частоти, та проведенні обробки початкових даних за допомогою потрібного інтегрування. Для зручності перевизначимо границі інтегрування виразу (7)

$$G(\gamma) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{\infty} |\omega| e^{i\omega\gamma} d\omega = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} |\omega| \cos(\omega\gamma) d\omega. \quad (16)$$

Тепер підставимо значення функції (16) до виразу (12)

$$f(x, y) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\pi} \int_{-\gamma_{max}}^{\gamma_{max}} \int_0^{\infty} |\omega| \frac{\cos \gamma}{H} \left(\frac{\gamma}{\sin(\gamma)} \right)^2 Q(\gamma, \alpha) \cos(\omega(\hat{\gamma} - \gamma)) d\gamma d\alpha. \quad (17)$$

У даному випадку не виникає поняття фільтра G , який використовується для попередньої фільтрації проєкцій. Такий метод позбавлений недоліків стандартного методу відновлення, зокрема відсутня необхідність підбору просторової частоти W_{max} .

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 3 зображено результати роботи алгоритмів реконструкції та оригінальне тестове зображення, з яким будемо порівнювати.

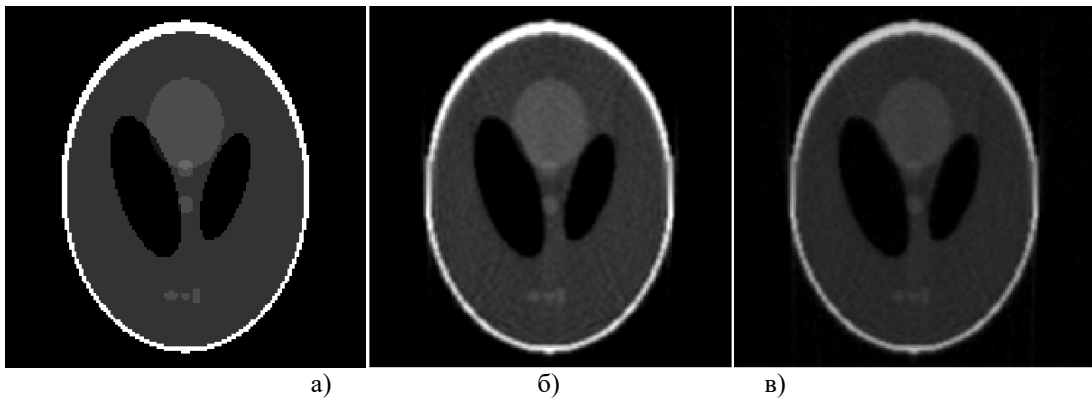


Рис. 3. Перевірка роботи алгоритмів реконструкції: а) оригінал зображення, б) результат алгоритму відновлення без фільтрації, в) результат алгоритму з одновимірною фільтрацією.

Fig. 3. Testing of the reconstruction algorithms: a) the original image, b) the result of the recovery algorithm without filtering, c) the result of the algorithm with one-dimensional filtering.

Для перевірки якості відновлення було розраховано середньоквадратичне відхилення яскравості відповідних пікселів від оригінального зображення. Для випадку перетворення Радона у загальному вигляді відхилення складає 0,0883 одиниці, а для класичного методу 0,0922 одиниці.

Окрім цього, проведено перевірку відновлення на декількох тестових зображеннях, щоб визначити пороговий контраст та просторове розподілення. На рис. 4 представлено результат роботи алгоритму для зображення з малою зміною густини об'єкта.

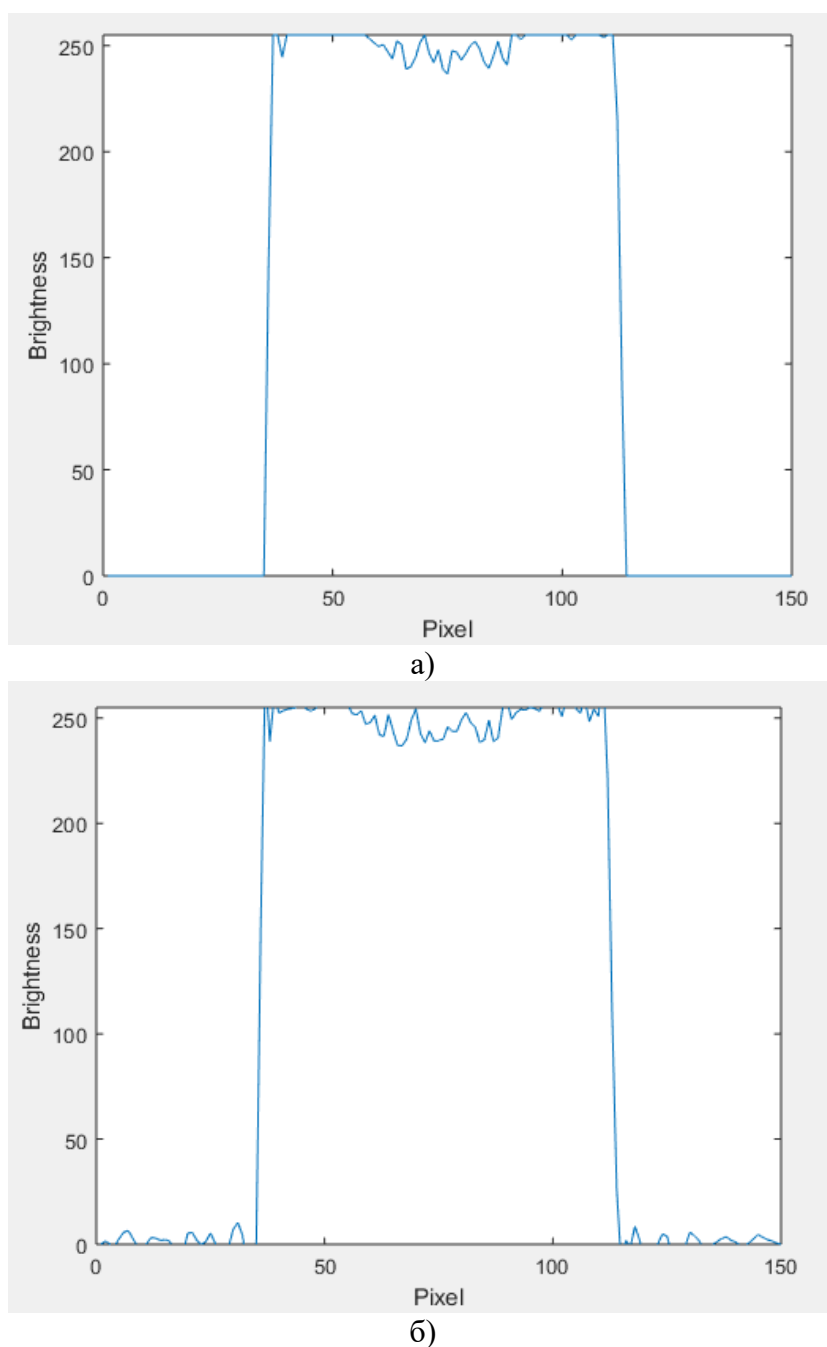


Рис. 4. Розподіл густини об'єкта з незначним дефектом: а) алгоритм відновлення без фільтрації, б) алгоритм відновлення з одновимірною фільтрацією.

Fig. 4. Density distribution of an object with a small defect: a) recovery algorithm without filtering, b) recovery algorithm with one-dimensional filtering.

В обох випадках пороговий контраст зображення складає 4% (густина дефекту 245 одиниць, густина тіла об'єкта 255 одиниць). За наявності дефектів меншого контрасту алгоритми не відокремлюють їх.

На рис. 5 представлено роботу алгоритму для об'єктів малого розміру.

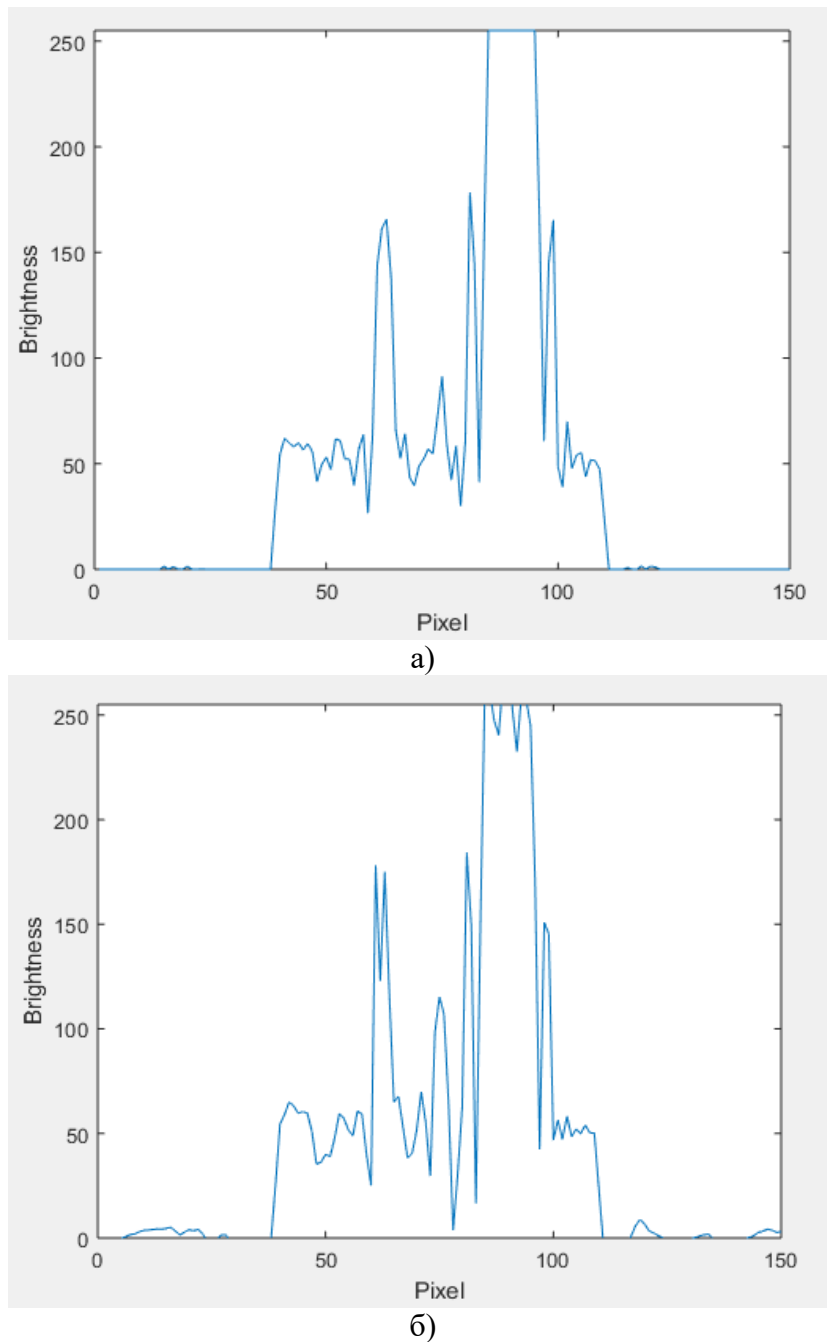


Рис. 5. Розподіл густини об'єктів малого розміру: а) алгоритм відновлення без фільтрації, б) алгоритм відновлення з одновимірною фільтрацією.

Fig. 5. Density distribution of small objects: a) recovery algorithm without filtering, b) recovery algorithm with one-dimensional filtering.

При дослідженнях об'єктів малого розміру кращий результат показав алгоритм з одновимірною фільтрацією, він розрізняє перепади густини розміром в один піксел, що складає 0,270 мм.

Отримані зображення показують, що відновлення без фільтрації має значну контрастність та точно передає границі місць зміни густини об'єкта, і тому мають більшу практичну користь при дослідженнях об'єктів, в яких наявні структури малих розмірів або структур, що незначно відрізняються за густиною. Використання такого методу відновлення має артефакти відновлення від різких границь, проте вони

відрізняються від можливих структур всередині досліджуваних об'єктів та зменшують свій вплив з підвищенням частоти інтегрування ω , що представлено на рис. 6.

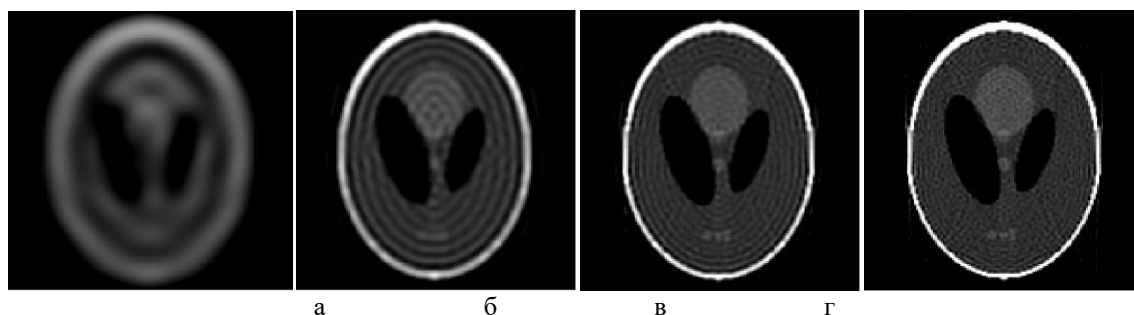


Рис. 6. Зображення отримані при різних просторових частотах ω :
а) $\omega = 5$, б) $\omega = 15$, в) $\omega = 25$, г) $\omega = 35$.

Fig. 6. Images obtained at different spatial frequencies ω :
а) $\omega = 5$, б) $\omega = 15$, в) $\omega = 25$, д) $\omega = 35$.

Також в реальних дослідженнях дані представлені у значному діапазоні і для відновлених внутрішніх структур вибирають необхідний проміжок, який відповідає за ті чи інші структури, чи то кістки, чи то м'якої тканини, чи то судини, тому в реальній томографії похибки такого роду можуть бути не критичні, але вони потребують подальшого дослідження для можливого усунення.

ВИСНОВКИ

Використання запропонованого в статті зворотного перетворення Радона в узагальненому вигляді (17) забезпечує цілу низку переваг у порівнянні з класичними методиками відновлення [1]. Перш за все, пропонується метод не містить параметрів підгонки, таких як гранична просторова частота у співвідношенні (14) або величина уявної добавки, яка модулює зменшення функції фільтрації (15) зі зростанням частоти. Це дозволяє використовувати цей метод як при відновленні великих об'єктів малого контрасту, так і об'єктів великого контрасту та малого розміру.

Таке поєднання особливо важливо для прикладних медичних досліджень, зокрема, молочної залози, де необхідно одночасно забезпечувати якісне визначення мікрокальцинатів, що є провісниками захворювань, та пухлин на ранній стадії існування.

Крім того, запропонована методика забезпечує узагальнення на більш складні алгоритми для конусної томографії, а також може бути використана в томосинтезі, де кількість проєкцій робиться малою з метою зменшення дозового навантаження на пацієнта.

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

Authors' ORCID ID

T. G. Vikhtinskaya  <https://orcid.org/0000-0001-8265-4371>

K. E. Lapitan  <https://orcid.org/0000-0003-0050-405X>

K. E. Nemchenko  <https://orcid.org/0000-0002-0734-942X>

REFERENCES

1. Herman GT. Image reconstruction from projections: The Fundamentals of Computerized Tomography. New York: Academic Press; 1980. 346 p. ISBN 0-12-342050-4.

2. Hungerbühler N. Singular Filters for the Radon Backprojection. *J Appl Anal.* 1998;5(1):17–33. <https://doi.org/10.1515/JAA.1999.17>
3. Kunyansky LA. Generalized and Attenuated Radon Transforms: Restorative Approach to the Numerical Inversion. *Inverse Probl.* 1992;8(5):809. <https://doi.org/10.1088/0266-5611/8/5/008>
4. Ershova AA. A modified regularization method for solving integral equations of the 1st kind in problems of mathematical modeling [dissertation]. Ekaterinburg: Ural Federal University, 2019. 109 p. (in Russian)

INVERSE RADON TRANSFORM WITHOUT SINGULARITY FOR RAYS WITH A POINT FOCUS

T. G. Vikhtinskaya, K. E. Lapitan, K. E. Nemchenko

V. N. Karazin Kharkiv National University, 6 Svobody Square, Kharkiv, 61022, Ukraine

Submitted November 14, 2021; Revised December 10, 2021;

Accepted December 13, 2021

Background: The need to reconstruct images from their projections has been repeated many times as a means of studying an object in a wide variety of fields of science, technology and medicine.

The basis of this method is the penetration through object of beams under different angles and the acquisition of a shadow image on the surface sensitive to these rays. Since that the tissues and bones have different absorption densities from such projections it is possible to get a reasonably accurate idea of the presence of pathological formations or lesions.

Despite all the advantages of tomography, it has disadvantages. One of the most serious is the exceedance of radiation for humans. Therefore, there are several options for reducing the burden on the patient, one of which is the use of tomosynthesis instead of CT scanning. Tomosynthesis occupies an average position in informativeness between computer tomography and radiology not much higher than the dose of the latter. As a result, work is underway worldwide to improve the tomosynthesis method to increase the number of diseases that can be diagnosed by this method and to improve the quality of the images obtained.

Objectives: Defines the efficiency of the image recovery method when using the Radon transform in general form compared to classical methods.

Materials and methods: Mathematical physics methods for reconstructing medical images, namely the Fourier transform in the polar coordinate system and the Radon transform.

Results: As a result of the work done, an expression for the reverse Radon transform was obtained and the work of the tomograph with point focus of X-ray rays was modeled. When comparing different reconstruction techniques with the original image, the Radon transform is generally more accurate.

Conclusions: Despite the considerable increase in the time of reconstruction computation, about three times, this method has practical advantages in the case of detection of pathologies that only develop and have no clear boundaries or in the case of detection of small objects.

KEY WORDS: Fourier transformation, Radon transformation, tomography, tomosynthesis, image reconstruction.

ОБРАТНОЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЕ РАДОНА БЕЗ СИНГУЛЯРНОСТИ ДЛЯ ПУЧКА С ТОЧЕЧНЫМ ФОКУСОМ

Т. Г. Вихтинская, К. Е. Лапитан, К. Э. Немченко

*Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина,
площадь Свободы, 6, г. Харьков, 61022, Украина*

Поступила в редакцию 14 октября 2021 г. Пересмотрена 10 декабря 2021 г.

Принята к печати 13 декабря 2021 г.

Актуальность. Необходимость реконструкции изображений по его проекциям много раз вытекала как средство изучения объекта в различных сферах науки, техники и в медицине. Основу этого метода составляет проникновение через объект пучка лучей под разными ракурсами и получение на чувствительной к этим лучам поверхности теневого изображения. Так как ткани и кости имеют разную впитывающую плотность, по таким проекциям можно получить довольно точное представление о наличии патологических образований или повреждений.

Несмотря на все преимущества томографии, она имеет недостатки. Один из самых серьезных — это превышение допустимой дозы излучения для человека. Тому есть несколько вариантов снижения нагрузок на пациента, и один из них — это использование метода томосинтеза вместо компьютерной томографии. Томосинтез занимает среднее положение по информативности между компьютерной томографией и двумерной рентгенографией, незначительно превышая дозу излучения по отношению к последнему случаю. По этой причине сейчас по всему миру ведутся работы по улучшению метода томосинтеза, чтобы расширить количество заболеваний, которые

можно диагностировать таким методом, и работы по повышению качества полученных изображений.

Цель работы — определить эффективность метода восстановления изображения при использовании преобразования Радона в общем виде по сравнению с классическими методами.

Материалы и методы. Методы математической физики для восстановления медицинских изображений, в частности Фурье преобразование в полярных координатах и преобразование Радона.

Результаты. В результате выполненной работы было получено выражение для обратного преобразования Радона и смоделировано роботу томографа с точечным фокусом рентгеновских лучей. При сравнении различных методов реконструкции объектов с оригинальным изображением преобразование Радона в общем виде имеет большую точность.

Выводы. Несмотря на более чем трехкратный рост времени вычисления реконструкции, данный метод имеет свои достоинства в случае определения патологий, которые только развиваются и не имеют четких границ, или в случае определения объектов малого размера.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: преобразование Фурье, преобразование Радона, томография, томосинтез, реконструкция изображений.

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-46-03>

UDC 004.932.72:616.5-002

DEVELOPMENT OF A COMPREHENSIVE METHOD FOR THE DERMATOSCOPIC IMAGES ANALYSIS OF THE FACIAL SKIN WITH ACNE

K. G. Selivanova , A. A. Trubitsin , O. G. Avrunin 

Kharkiv National University of Radio Electronics, 14, Nauky Ave., Kharkiv, 61166, Ukraine

e-mail: karina.selivanova@nure.ua

Submitted November 14, 2021; Revised December 18, 2021;

Accepted December 23, 2021

Background: One of the most common inflammatory chronic and recurrent skin diseases is acne (“acne vulgaris”), which appears itself as open or closed comedones and inflammatory skin lesions in the form of papules, pustules, nodes, etc. It has been established that acne is one of the most common dermatoses, since, according to modern data, it affects about 9.4% of the population. During adolescence, up to 90% of people suffer, and in adulthood — about 20% with varying degrees of severity. Currently, there are many approaches to treating this disease through various cosmetic treatments such as phototherapy, ultrasonic skin cleansing, Mesotherapy, chemical peels, and medication. Therefore, the development of methods and means of differential diagnosis of acne is one of the urgent tasks in the field of biomedical engineering, dermatology, and clinical medicine, since this allows timely identification of the localization of the disease, its causes, and prescribing appropriate treatment. However, the solution to the problem of monitoring the dynamics of external manifestations of the disease is possible only with the use of combined mathematical methods for image analysis.

Objectives: To develop a comprehensive method for analyzing dermatoscopic images for monitoring the external manifestations of acne disease during treatment and isolating the affected areas of the facial skin.

Materials and Methods: Dermatological preclinical researches of the skin were conducted in the laboratory of 3D-biomedical technologies of the Department of Biomedical Engineering of the Kharkiv National University of Radio Electronics, using a digital videodermatoscope BIO Bm6+ in daylight and a portable skin analyzer Skin Scope F-102 in the ultraviolet range. Clinical researches were conducted based on the Department of Pediatric Propaedeutics #2 of the Kharkiv National Medical University. The development of a software tool for image analysis was conducted out in Python programming using the libraries OpenCV, Scikit-image, Numpy, PIL, Matplotlib. Determination of the affected skin areas and calculation of the parameters of inflammation were carried out using multi-Otsu methods and morphological segmentation of digital dermatoscopic images.

Results: During the research, automated software was developed that allows to analyze in dynamics the nature of inflammatory processes and the area of facial skin lesions, as well as to carry out a differential diagnosis of acne disease. The proposed method for the analysis of dermatoscopic images makes it possible to perform color segmentation and obtain a map of the gradations of skin inflammations to control the dynamics during the prescribed treatment.

Conclusions: The comprehensive method of analysis of dermatoscopic images of the skin of the face makes it possible to effectively control the condition of the skin of the face from acne during treatment, while analyzing the degree of inflammatory processes and the area of lesions, where, using the developed

Як цитувати: Selivanova KG, Trubitsin AA, Avrunin OG. Development of a comprehensive method for the dermatoscopic images analysis of the facial skin with acne. Biophysical bulletin. 2021;46:34–45. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-46-01>

In cites: Selivanova KG, Trubitsin AA, Avrunin OG. Development of a comprehensive method for the dermatoscopic images analysis of the facial skin with acne. Biophysical bulletin. 2021;46:34–45. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-46-01>

Open Access. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

software, in an automated mode, red gradations are calculated to detect the boundaries of inflammation, geometric parameters and percentage of lesions in relation to healthy facial skin.

KEY WORDS: acne, post-acne, facial skin, dermatology, dermatoscopic imaging, color image segmentation, multi-Otsu method.

Acne ("acne vulgaris") is a chronic inflammatory disease that appears itself as open or closed comedones and inflammatory skin lesions in the form of papules, pustules, nodules, and more [1]. Acne is one of the most common dermatoses. According to current data, acne affects 9.4% of the population. This disease affects about 90% of people in adolescence and sometimes in adulthood: about 20% of people experience moderate to severe forms of the disease [2]. There are many approaches to treating acne: phototherapy, ultrasonic skin cleansing, mesotherapy, chemical peels, and medication. Today, dermatological and cosmetic offices often use a combination of these methods [1–3].

In adolescence, boys and girls suffer from acne while at a more mature age, acne is more common among women (9.8%) than among men (9%) [3]. This disease affects all ethnic groups, and there is no verified information on whether race affects the incidence of this disease [3–4]. Therefore, one of the important tasks in acne treatment is to evaluate the effectiveness of therapy by monitoring its external manifestations. The purpose of this research work is the development of a comprehensive method of dermatoscopic images analysis for monitoring the acne disease external manifestations during treatment and isolating the affected areas of the facial skin. Currently, dermatological research methods are among the most effective in identifying affected skin areas [5].

MATERIALS AND METHODS

Dermatological preclinical researches of the skin were conducted in the laboratory of 3D-biomedical technologies of the Department of Biomedical Engineering of the Kharkiv National University of Radio Electronics, using a digital videodermatoscope BIO Bm6+ in daylight and a portable skin analyzer Skin Scope F-102 in the ultraviolet range. Clinical researches were conducted based on the Department of Pediatric Propaedeutics #2 of the Kharkiv National Medical University [6].

Diagnostic research was conducted at the Department of Biomedical Engineering involving 17 people (10 males and 7 females) diagnosed with acne aged 18 to 32 years.

The survey included the patient's anamnesis and a study of the affected areas of the skin. The skin was researched with BIO Bm6+ dermatoscope. During the dermatoscopic checkup of the patients, the same light conditions were observed [7]. During the study, the device is pressed with slight pressure to the surface of the skin inflamed so that it is in the center of the contact plate. Then the image is sharpened using the focusing ring and the skin structure is examined under illumination built-in LEDs. After surveying each patient, the contact plate is disconnected from the dermatoscope and disinfected according to the standard technique [6]. Oil or liquid of the skin is removed from its surface, which makes the stratum corneum transparent and allows seeing the pigment structures in all layers of the skin, the size, and the shape of the superficial vessels of the dermis [7–8].

For diagnostic research also was used a portable skin analyzer Skin Scope F-102, which works in the ultraviolet range. When using such a device, it is possible to obtain high-quality images of the facial skin, which can be effectively used to assess the condition of the patient's skin during the first visit, and to track the effectiveness of the prescribed treatment. The use of ultraviolet radiation in skin diagnostics makes it possible to efficiently, quickly, and differentiate different skin features that cannot always be seen under normal lighting. In this case, different features appear in different colors [7–8].

Image analysis was executed using the Python language and the OpenCV, Scikit-image libraries. To study the dynamics of inflammation, dermatoscopic images were transferred from RGB to HSV color model; the ranges of colors characteristic of several stages of inflammation (severe inflammation, moderate inflammation, mild inflammation) and the investigated color h-channel of a dermatoscopic image were identified. Methods of morphological segmentation were used to isolate the affected skin areas for further assessment of the area the lesions [8].

RESULTS AND DISCUSSION

Software development for dermatoscopic image analysis based on the method multi-Otsu

The paper considers two approaches to obtaining segments of the affected skin areas. The first is the multi-Otsu method. This method is an extension of the original Otsu method with a multilevel threshold value [9]. As is known, the multi-Otsu method is a thresholding algorithm that is used to separate the pixels of an input image into several different classes, each one obtained according to the intensity of the gray levels within the image [10]. Multi-Otsu calculates several thresholds, determined by the number of desired classes. The default number of classes is 3: for obtaining three classes, the algorithm returns two threshold values.

This method presents a threshold that minimizes the variance within a class, which is defined as the weighted sum of the variances of two classes [9]:

$$\delta_{\sigma}^2(t) = \varpi_0(t)\delta_0^2(t) + \varpi_1(t)\delta_1^2(t), \quad (1)$$

where ϖ_0 and ϖ_1 probabilities of two classes separated by a threshold t , δ_0^2 and δ_1^2 – the deviation of these two classes, which value is within the range from 0 to 255 inclusively [10].

The first class is minimizing the within-class variance defined above $\delta_{\sigma}^2(t)$, the second is to maximize the between-class variance using the expression below [9–10]:

$$\delta_b^2(t) = \varpi_1(t)\varpi_2(t)[\mu_1(t) - \mu_2(t)]^2, \quad (2)$$

where μ_i is a mean of class i .

The probability P is calculated for each pixel value in two separated clusters C_1, C_2 using the cluster probability functions expressed as:

$$\varpi_1(t) = \sum_{i=1}^t P(i), \quad (3)$$

$$\varpi_2(t) = \sum_{i=t+1}^I P(i)$$

It should be noted that the image can presented as intensity function $f(x, y)$, which values are gray-level. The quantity of the pixels with a specified gray-level i denotes by i . The general number of pixels in the image is n . The pixel intensity values for the C_1 are in $[1, t]$ and for C_2 are in $[t+1, I]$, where I is the maximum pixel value (255) [10–11].

The next phase is to obtain the means for C_1, C_2 , which are denoted by $\mu_1(t), \mu_2(t)$ appropriately:

$$\mu_1(t) = \sum_{i=1}^t \frac{iP(i)}{\varpi_1(t)},$$

$$\mu_2(t) = \sum_{i=t+1}^I \frac{iP(i)}{\varpi_2(t)}.$$

Now let's remember the above equation of the within-classes weighted variance. We will find the rest of its components (δ_1^2, δ_2^2) mixing all the obtained above ingredients [11–12]:

$$\delta_1^2(t) = \sum_{i=1}^t [i - \mu_1(t)]^2 \frac{P(i)}{\varpi_1(t)},$$

$$\delta_2^2(t) = \sum_{i=t+1}^I [i - \mu_2(t)]^2 \frac{P(i)}{\varpi_2(t)}.$$

It should be noted that if the threshold was chosen incorrectly the variance of some class would be large. To get the total variance we simply need to summarize the within class and between-class variances [13–14]:

$$\delta_T^2 = \delta_w^2(t) + \delta_b^2(t)$$

$$\text{where } \delta_b^2(t) = \varpi_1(t)\varpi_2(t)[\mu_1(t) - \mu_2(t)]^2.$$

The total variance of the image (δ_T^2) does not depend on the threshold.

The developed software on based the multi-Otsu algorithm consists of these steps [8–9]:

- processing of the input dermatoscopic image in gray gradation;
- calculation the histogram and intensity level probabilities;
- determination of multiple thresholds and multiple classes for dermatoscopic image;
- replace image pixels into white in those regions, where saturation is greater than, and into black in the opposite cases [9–14].

The dynamics of acne disease in the clinical case of patient #5432 in the 1st, 7th, and 14th days of treatment is shown in Fig. 1. Obtained results of images analysis by method multi-Otsu for the clinical case of 1st, 7th, and 14th days of the treatment are shown also in Fig. 1 *a, b, c*. The input dermatoscopic images were transformed from the RGB color model to HSV. Obtained histogram demonstrates the calculation of brightness pixels for the H-channel of the HSV color model and the determination of three thresholds for the redness skin. The third picture represents a color segmentation map of the skin inflammations for the dynamic evaluation of acne and calculation of its parameters for making further decisions. The colors of the segmented areas of the dermatoscopic image by method Otsu were selected to display the determined boundaries with the most contrast using library OpenCV. Multi-Otsu results for map colors demonstrate an accurate location of acne redness.

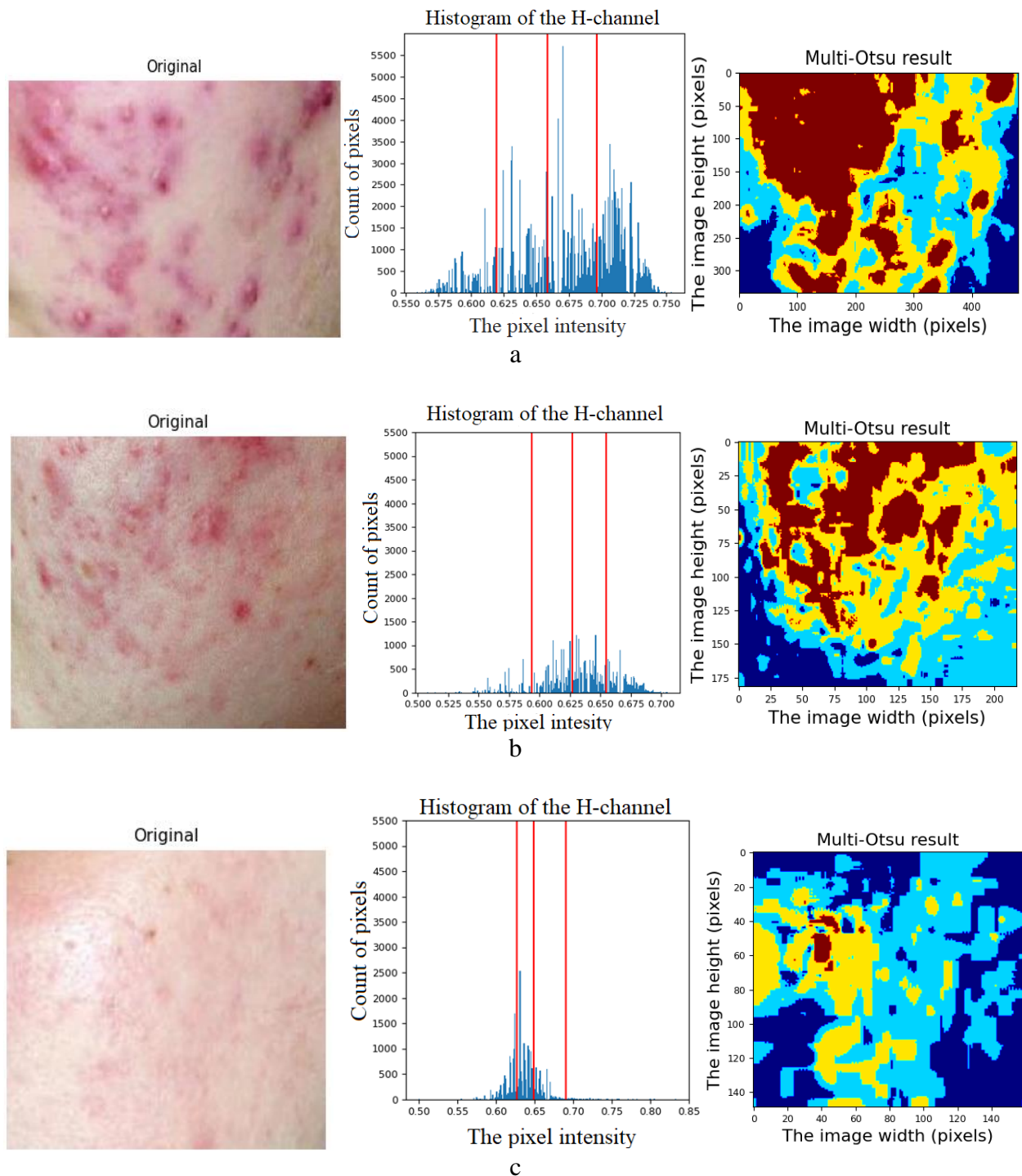


Fig. 1. An example of dermatoscopic images analysis by the multi-Otsu method of 1st (a), 7th (b), and 14th (c) day of #5432 patient acne treatments.

Software development for dermatoscopic image analysis based on the mathematical morphological operations

The second method is mathematical morphological operations, which were used for software development for dermatoscopic image analysis [15–17].

The sequence of stages of the developed software based on the second method consists of 6 basic units, which are represented in Fig. 2 [15].

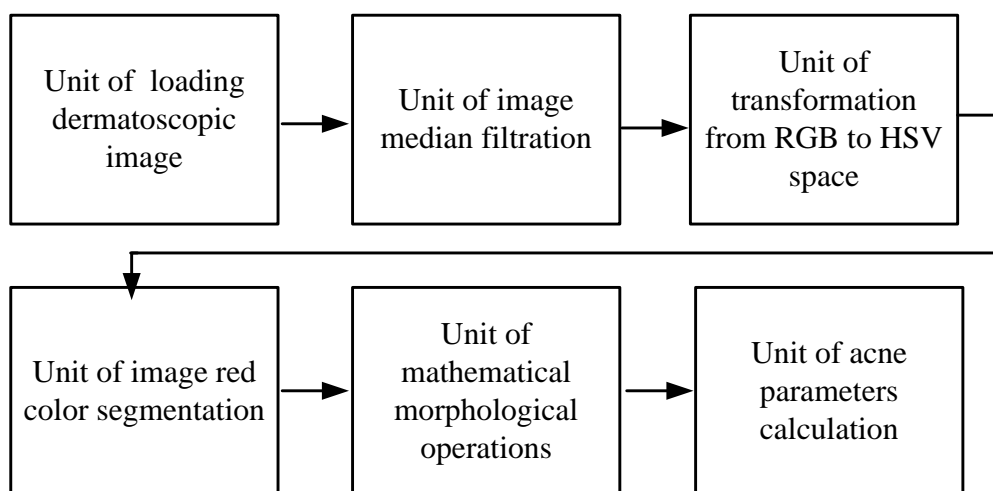


Fig. 2. A structure diagram of developed software for dermatoscopic image analysis by mathematical morphological operations.

The first step of the software is loading the dermatoscopic image on the module. Input data for analysis are 24-bit color JPG images with 422x279 resolution. This format is one of the most common formats for working with bitmaps and is supported by many modern display devices [16]. The color depth of all input images was 8 bits/pixel, with color representation in the RGB model. The second step is using a median filter, which is applied to reduce the noise level in the image [17]. The third step of digital image processing is the transformation from the RGB to HSV color model for further analysis, using standard formulas [15–17]:

$$H = \begin{cases} 0, & \text{if } \max = \min \\ 60 \times \frac{g-b}{\max-\min}, & \text{if } \max = r \text{ i } g \geq b \\ 60 \times \frac{g-b}{\max-\min} + 360, & \text{if } \max = r \text{ i } g < b \\ 60 \times \frac{b-r}{\max-\min} + 120, & \text{if } \max = g \\ 60 \times \frac{b-r}{\max-\min} + 240, & \text{if } \max = b \end{cases} \quad (7)$$

$$S = \begin{cases} 0, & \text{if } \max = 0 \\ 1 - \frac{\min}{\max} \end{cases}$$

$$V = \max$$

Components $H \in [0, 360]$, $S, V, R, G, B \in [0, 1]$. MAX is the maximum value of R, G and B, and MIN is the minimum of them.

For detection of skin inflammations on the dermatoscopic image was used segmentation by red color. For color segmentation, need select the parameters by which segmentation will be executed. For human skin with inflammation, the threshold values were [14, 75, 60] and [360, 255, 255] shades of red in the HSV color model. The obtained values will be used to find inflammation in dermatoscopic images taken under standard lighting. After segmentation, the developed module executes the morphological expansion of the image using the dilation operation. In this case, the binary gradient mask uses vertical and horizontal structural elements [18]. This operation allows filling in the gaps within the obtained limit to eliminate the probability of false boundaries [19].

The next stage is filling the contours of the resulting boundaries, it is necessary to realize mathematical operation – smoothing. Smoothing is executed using the erosion operation. It allows getting smoother and more "natural" boundaries, corresponding to the object contours without capturing neighboring pixels [20]. Most inflammations on human skin do not have clear boundaries, after localizing the point of inflammation intensity it is necessary to search for related areas to obtain more reliable information about the localization and the degree of inflammation and to objectively assess the skin lesions area [15–20].

The last step after finding the boundaries is the calculation of the technical parameters of the found boundaries (i.e. the size of the skin lesions). In this case, the informant result is the original image with the highlighted limits of inflammation in the calculated area [21].

In this article to determine the area of the lesions, the use of the method of mathematical morphology was investigated. For this, the original image was converted from an RGB color model to a binary one. Further, using the methods of erosion and dilation, the affected areas of the skin were isolated [15–25].

The erosion of the binary image A by the structural element B is defined as:

$$A \ominus B = \{z \in E | B_z \subseteq A\}, \quad (8)$$

where B_z is the transfer of B to the vector z , ie $B_z = \{b + z | b \in B\}, \forall z \in E$.

The dilation of A using the structural element B is defined as:

$$A \oplus B = \bigcup_{b \in B} A_b, \quad (9)$$

To implement both operators need to enter the kernel parameter. It is advisable to use a 5x5 core. Also using these operations it is necessary to specify the number of iterations for the most accurate result. In the case of fuzzy objects, such as inflammation on human skin, 1 iteration is used for erosion operations and 2 are used for expansion operations. Obtained results are represented in Fig. 3. The color range (upper and lower bounds of the color) for the acne areas determination corresponds to this range of the HSV image. In the clinical case of 1st, 7th, and 14th day during treatment of patient #5432 dermatoscopic images were transformed into different color models: HSV, GRAY, Binary, and BGR for detection acne boundaries and accuracy calculation geometric parameters using mathematical morphologies. All obtained images were represented by the requirements of the computer coordinate system.

Fig. 4 shows the experimental results of the survey skin in ultraviolet light for example #387 and #394 patients with closed comedones for prescribing cosmetological procedures and dermatological treatments. The resolution of the obtained digital images is 750x750 pixels. Detection of closed comedones on the skin was executed mathematical morphological operations [20–25].

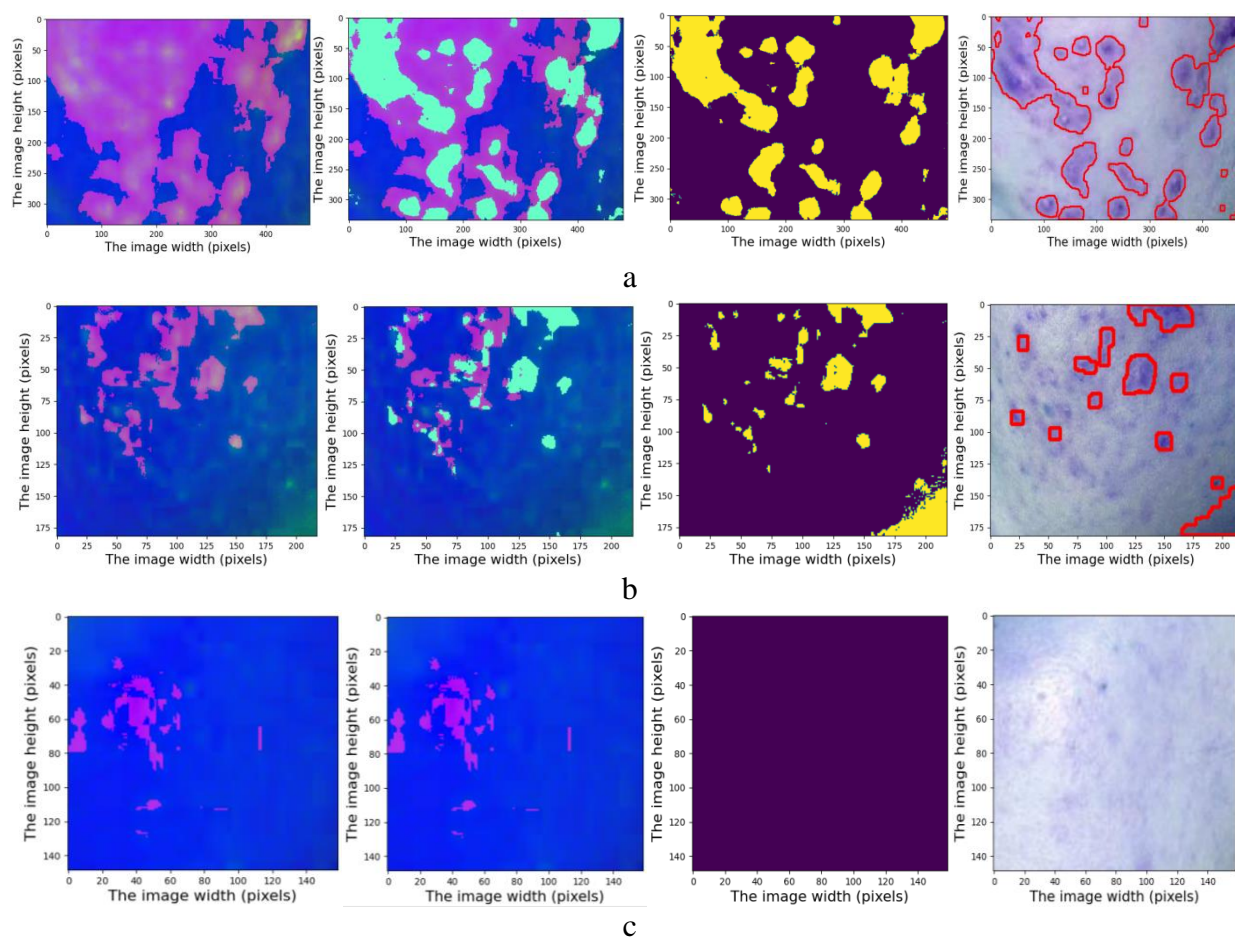


Fig. 3. An example of dermatoscopic image analysis for detection acne using morphological operations of the 1st (a), 7th (b), and 14th (c) day treatment of #5432 patient.

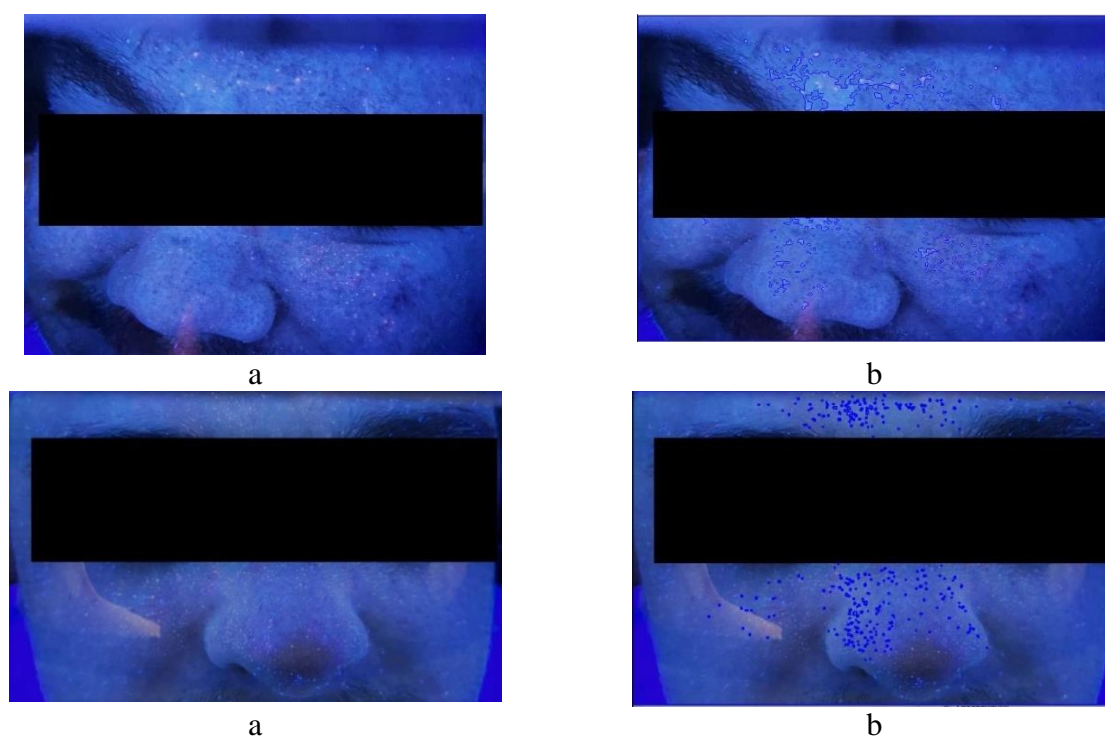


Fig. 4. An example of the patients' skin in UV illumination during the survey (a) and the result of image analysis with highlight contours of closed comedones on the skin (b).

CONCLUSIONS

The developed comprehensive method for analyzing skin lesions with acne allows automated control of the external appearance of this disease dynamics. The use of this software is especially advisable during therapy, which can make it possible to timely adjust acne intensity and treatment regimen. The developed module works with two types of images — obtained under daylight and UV illumination. The developed module makes it possible to effectively and objectively assess the degree of the disease by guiding the geometric parameters of inflammation on the skin, as well as by visualizing the highlighted contours of inflammation in images.

The investigated multi-Otsu method allows obtaining a map of the gradations of inflammation in one image. The obtained color spectrum is present in all images to interpret the results. The combined method of dermatoscopic image analysis makes it possible to effectively monitor the condition of the patient's skin by analyzing the degree of inflammatory processes and the area of the lesions but does not have the advantages of the first method for tracking the gradations of inflammation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge Master's Evgenia Cherkasova for conduction of the preclinical dermatological research and active participation in experimental studies.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

Authors' ORCID ID

Karina Selivanova ORCID <https://orcid.org/0000-0003-1002-0761>

Alexey Trubitsin ORCID <http://orcid.org/0000-0002-7581-1700>

Oleg Avrunin ORCID <https://orcid.org/0000-0002-6312-687X>

REFERENCES

1. Suva MA, Patel AM, Sharma N, Bhattacharya C, Mangi RK. A brief Review on Acne Vulgaris: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. Research & Reviews: Journal of Pharmacology. 2014;4(3):1–12.
2. Akman A, Durusoy C, Senturk M, Koc CK, Soyuturk D, Alpsoy E. Treatment of acne with intermittent and conventional isotretinoin: a randomized, controlled multicenter study. Arch Dermatol Res. 2007;299(10):467–73. <https://doi.org/10.1007/s00403-007-0777-2>
3. Capitanio B, Sinagra JL, Bordignon V, Cordiali Fei P, Picardo M, Zouboulis CC. Underestimated clinical features of postadolescent acne. J Am Acad Dermatol. 2010;63(5):782–8. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.11.021>
4. Bowe WP, Shalita AR. Effective over-the-counter acne treatments. Semin Cutan Med Surg. 2008;27(3):170–6. <https://doi.org/10.1016/j.sder.2008.07.004>
5. Tan AU, Schlosser BJ, Paller AS. A review of diagnosis and treatment of acne in adult female patients. Int J Womens Dermatol. 2018 Jun;4(2):56–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2017.10.006>
6. Avrunin O, Trubitsin A, Klymenko V. The method for predictive assessment of the condition of patients with atopic dermatitis at different stages of the disease. Innovative Technologies and Scientific Solutions for Industries. 2021;2(16):63–71. <https://doi.org/10.30837/ITSSI.2021.16.063>
7. Avrunin O, Trubitsin A, Isaeva O, Klymenko V. Possibilities for assessing the effectiveness of treatment of atopic dermatitis based on analysis of color characteristics of video dermatoscopic images. Innovative Technologies and Scientific Solutions for Industries. 2020;2(12):127–33. <https://doi.org/10.30837/2522-9818.2020.12.127>
8. Krylova EV, Krylov AV. Assessment of the functional state of the skin using autofluorescence dermoscopy. Scientific notes of St. acad. I. P. Pavlova. 2013;20(1):62–5.
9. Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms. IEEE Trans Syst Man Cybern. 1979;9(1):62–6. <https://doi.org/10.1109/TSMC.1979.4310076>
10. Barron JT. A generalization of Otsu's method and minimum error thresholding. In: Vedaldi A, Bischof H, Brox T, Frahm JM, editors. Computer Vision – ECCV 2020. ECCV 2020. Lecture Notes in Computer Science(), vol 12350. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-58558-7_27

11. Ping-Sung Liao, Tse-Sheng Chen, Pau-Choo Chung. A Fast Algorithm for Multilevel Thresholding. *J. Inf. Sci. Eng.* 2001;17(5):713–27. <https://doi.org/10.6688/JISE.2001.17.5.1>
12. Liu W, Shi H, He X, Pan S, Ye Z, Wang Y. An application of optimized Otsu multi-threshold segmentation based on fireworks algorithm in cement SEM image. *Journal of Algorithms & Computational Technology.* 2019;13:1–12. <https://doi.org/10.1177/1748301818797025>
13. Igarashi T, Nishino K, Nayar SK. The Appearance of Human Skin: A Survey. *Foundation and Trends in Computer Graphics and Vision.* 2007;3(1):1-95. <https://doi.org/10.1561/06000000013>
14. Bhandari AK, Kumar A, Singh GK. Modified artificial bee colony based computationally efficient multilevel thresholding for satellite image segmentation using Kapur's, Otsu and Tsallis functions. *Expert Systems with Applications.* 2015;42(3):1573–1601. <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2014.09.049>
15. Ramadevi Y, Sridevi T, Poornima B, Kalyani B. Segmentation and Object Recognition using edge detection techniques. *International Journal of Computer Science & Information Technology (IJCSIT).* 2010;2(6):153–61. <https://doi.org/10.5121/ijcsit.2010.2614>
16. Mutneja D, Mutneja V. Methods of Image Edge Detection: A Review. *J Electr Electron Syst.* 2015;4(2):150. <https://doi.org/10.4172/2332-0796.1000150>
17. Yuncong Feng, Haiying Zhao, Xiongfei Li, Xiaoli Zhang, Hongpeng Li. A multi-scale 3D Otsu thresholding algorithm for medical image segmentation. *Digital Signal Processing.* 2017;60:186–99. <https://doi.org/10.1016/j.dsp.2016.08.003>
18. Sarkar S, Das S, Chaudhuri SS. A multilevel color image thresholding scheme based on minimum cross entropy and differential evolution. *Pattern Recognition Letters.* 2015;54:27–35. <https://doi.org/10.1016/j.patrec.2014.11.009>
19. Tymkovich M, Gryshkov O, Selivanova K, Nosova Y, Mutsenko V, et al. Application of SOFA Framework for Physics-Based Simulation of Deformable Human Anatomy of Nasal Cavity. In: Jarm T, Cvetkoska A, Mahnič-Kalamiza S, Miklavcic D. (eds) 8th European Medical and Biological Engineering Conference. EMBEC 2020. IFMBE Proceedings, vol. 80. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-64610-3_14
20. Heijmans HJAM. Mathematical morphology: A modern approach in image processing based on algebra and geometry. *SIAM Review.* 1995;37(1):1-36. <https://doi.org/10.1137/1037001>
21. Tymkovich M, Gryshkov O, Selivanova K, Mutsenko V, Avrunin O, Glasmacher B. Application of artificial neural networks for analysis of ice recrystallization process for cryopreservation. In: Jarm, T., Cvetkoska, A., Mahnič-Kalamiza, S., Miklavcic, D. (eds) 8th European Medical and Biological Engineering Conference. EMBEC 2020. IFMBE Proceedings, vol 80. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-64610-3_13
22. Li X, Zhou Z, Keller P, Zeng H, Liu T, Peng H. Interactive exemplar-based segmentation toolkit for biomedical image analysis. *IEEE 12th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI); 2015; Brooklyn.* p. 168–71. <https://doi.org/10.1109/ISBI.2015.7163842>
23. Avrunin OG, Tymkovich MY, Moskovko SP, Romanyuk SO, Kotyra A, Smailova S. Using a priori data for segmentation anatomical structures of the brain. *Przegląd Elektrotechniczny.* 2017;93(5):102–5. <https://doi.org/10.15199/48.2017.05.20>
24. Avrunin O, Tymkovich M, Drauil J. Automated technique for three-dimensional reconstruction of cranial implant based on symmetry, *Proceedings of the Information Technologies in Innovation Business Conference (ITIB).* 2015. p. 39–42.
25. Selivanova KG, Avrunin OG, Tymkovich MY, Manhora TV, Oleh S, Bezverkhyi OS, et al. 3D visualization of human body internal structures surface during stereo-endoscopic operations using computer vision techniques. *Przegląd Elektrotechniczny.* 2021;97(9):30–3. <https://doi.org/10.15199/48.2021.09.06>

РОЗРОБКА КОМПЛЕКСНОГО МЕТОДУ АНАЛІЗУ ДЕРМАТОСКОПІЧНИХ ЗОБРАЖЕНЬ ШКІРИ ОБЛИЧЧЯ З АКНЕ

К. Г. Селіванова, О. О. Трубіцин, О. Г. Аврунін

Харківський національний університет радіоелектроніки, 14, пр. Науки, Харків, 61166, Україна

e-mail: karina.selivanova@nure.ua

Надійшла до редакції 14 листопада 2021 р. Переглянута 18 грудня 2021 р.

Прийнята до друку 23 грудня 2021 р.

Актуальність. Одним із найпоширеніших запальних хронічних та рецидивних захворювань шкіри є акне (“*acne vulgaris*”), що проявляється як відкриті або закриті комедони і запальні ураження шкірного покриву у вигляді папул, пустул, вузлів тощо. Встановлено, що акне є одним із розповсюджених дерматозів, оскільки вражає, за сучасними даними, близько 9,4% населення. У підлітковому віці страждають до 90% людей, а в зрілому — близько 20% з різними ступенями тяжкості. Наразі існує багато підходів до лікування цього захворювання за допомогою різноманітних косметологічних засобів, таких як: фототерапія, ультразвукове очищення шкіри,

мезотерапія, хімічний пілінг та медикаментозне лікування. Тому розробка методів та засобів диференціальної діагностики акне є однією з актуальних задач в галузі біомедичної інженерії, дерматології та клінічної медицини, оскільки це надає змоги, своєчасно виявити локалізацію захворювання, його причини та призначити відповідне лікування. Однак вирішення задачі моніторингу за динамікою зовнішніх проявів захворювання можливе лише при застосуванні комбінованих математичних методів аналізу зображень.

Метою роботи є розробка комплексного методу аналізу дерматоскопічних зображень для моніторингу за перебігом зовнішніх проявів захворювання акне під час лікування та виділення уражених ділянок шкіри обличчя.

Матеріали й методи. Дерматологічні доклінічні дослідження шкіри обличчя були проведені на базі лабораторії 3D-біомедичних технологій кафедри біомедичної інженерії Харківського національного університету радіоелектроніки із використанням цифрового відеодерматоскопа ВІО Вm6+ при денному світлі та портативного аналізатора шкіри Skin Scope F-102 в ультрафіолетовому діапазоні. Клінічні дослідження були проведені на базі кафедри пропедевтики педіатрії № 2 Харківського національного медичного університету. Розробка програмного засобу для аналізу зображень була виконана у середовищі програмування Python із використанням бібліотек OpenCV, Scikit-image, Numpy, PIL, Matplotlib. Визначення уражених ділянок шкіри обличчя та розрахунок параметрів запалень проводились методами мульти-Отцу та морфологічної сегментації цифрових дерматоскопічних зображень.

Результати. У ході досліджень був розроблений автоматизований програмний засіб, який дозволяє проаналізувати у динаміці характер запальних процесів та площу уражень шкіри обличчя, а також провести диференційну діагностику захворювання акне. Запропонований метод аналізу дерматоскопічних знімків дозволяє виконати кольорову сегментацію та отримати карту градацій запалень шкіри для контролю за динамікою під час призначеного лікування.

Висновки. Комплексний метод аналізу дерматоскопічних зображень шкіри обличчя дозволяє ефективно контролювати стан шкіри обличчя з акне під час лікування, аналізуючи при цьому ступінь запальних процесів і площу уражень, де за допомогою розробленого програмного засобу в автоматизованому режимі розраховуються градації червоного кольору для детектування границь запалень, геометричні параметри та відсоткова частка уражень стосовно до здорової шкіри обличчя.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: акне, постакне, шкіра обличчя, дерматологія, дерматоскопічні зображення, сегментація кольорових зображень, метод мульти-Отцу.

РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСНОГО МЕТОДА АНАЛИЗА ДЕРМАТОСКОПИЧЕСКИХ ИЗОБРАЖЕНИЙ КОЖИ ЛИЦА С АКНЕ

К. Г. Селиванова, О. О. Трубицын, О. Г. Аврунин

Харьковский национальный университет радиоэлектроники, 14, пр. Науки, Харьков, 61166, Украина
e-mail: karina.selivanova@nure.ua

Поступила в редакцию 14 ноября 2021 г. Пересмотрена 18 декабря 2021 г.

Принята к печати 23 декабря 2021 г.

Актуальность. Одним из наиболее распространенных воспалительных хронических и рецидивирующих заболеваний кожи является акне (“acne vulgaris”), которое проявляется в виде открытых или закрытых комедонов и воспалительных поражений кожного покрова — папул, пустул, узлов и т.д. Установлено, что акне является одним из распространенных дерматозов, поскольку поражает, по современным данным, около 9,4% населения. В подростковом возрасте страдают до 90% людей, а в зрелом – около 20% с разными степенями тяжести. В настоящее время существует много подходов к лечению этого заболевания с помощью различных косметологических средств, например как: фототерапия, ультразвуковая очистка кожи, мезотерапия, химический пилинг и медикаментозное лечение. Поэтому разработка методов и средств для дифференциальной диагностики акне является одной из актуальных задач в области биомедицинской инженерии, дерматологии и клинической медицины, поскольку это позволяет своевременно выявить локализацию заболевания, его причины и назначить соответствующее лечение. Однако решение поставленной задачи мониторинга за динамикой внешних проявлений заболевания возможно только при применении комбинированных математических методов анализа изображений.

Цель работы. Разработка комплексного метода анализа дерматоскопических изображений для мониторинга внешних проявлений заболевания акне во время лечения и выделения пораженных участков кожи лица.

Материалы и методы. Дерматологические доклинические исследования кожи были проведены в лаборатории 3D-биомедицинских технологий кафедры биомедицинской инженерии Харьковского национального университета радиоэлектроники с использованием цифрового видеодерматоскопа BIO Vm6+ при дневном свете и портативного анализатора кожи Skin Score F-102 в ультрафиолетовом диапазоне. Клинические исследования были проведены на кафедре пропедевтики педиатрии №2 Харьковского национального медицинского университета. Разработка программного средства для анализа изображений была выполнена в среде программирования Python с использованием библиотек OpenCV, Scikit-image, Numpy, PIL, Matplotlib. Определение пораженных участков кожи и расчет параметров воспалений проводились методами мульти-Отцу и морфологической сегментации цифровых дерматоскопических изображений.

Результаты. Во время проведения исследований было разработано автоматизированное программное средство, позволяющее проанализировать в динамике характер воспалительных процессов и площадь поражений кожи лица, а также провести дифференциальную диагностику заболевания акне. Предлагаемый метод анализа дерматоскопических снимков позволяет выполнить цветовую сегментацию и получить карту градаций воспалений кожи для контроля динамики во время назначенного лечения.

Выводы. Комплексный метод анализа дерматоскопических изображений кожи лица позволяет эффективно контролировать состояние кожи лица с акне во время лечения, анализируя при этом степень воспалительных процессов и площадь поражений, где с помощью разработанного программного средства в автоматизированном режиме рассчитываются градации красного цвета для детектирования границ воспалений, геометрические параметры и процентная доля поражений по отношению к здоровой коже лица.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: акне, постакне, кожа лица, дерматология, дерматоскопические изображения, сегментация цветных изображений, метод мульти-Отцу.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ

В редакцію подається електронний варіант статті (MS Word 2007 і вище) українською або англійською мовою через сайт журналу <http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk> з направленням установи і експертним висновком у вигляді відсканованих файлів.

Текст набирається на аркушах формату А4 через один інтервал. Використовується шрифт Times New Roman 12 pt, вирівнювання тексту по ширині. Поля справа і зліва по 2,5 см, зверху – 3,5 см, знизу – 2 см. Математичні та хімічні символи вводяться до тексту статті за допомогою редактора MathType або Microsoft Equation. Рисунки, придатні до репродукції, у форматі *.emf, *.wmf, *.jpg, *.jpeg, *.png вставляються до тексту в межах площі сторінки, вказаної вище. Рисунки розміщувати в межах таблиці з прозорими зовнішніми границями у першому рядку, підпис та коментарі до рисунку – у другому рядку таблиці. Графіки будуються у програмних пакетах, призначених для обробки і візуалізації наукових даних: Origin, Mathcad тощо. Використання офісного пакету MS Excel для побудови графіків не допускається. Цифри і підписи на осях та надписах повинні мати шрифт 9 pt. Підписи під рисунками друкуються шрифтом 10 pt. Формули, таблиці й рисунки нумеруються послідовно арабськими цифрами, наприклад, (1); Табл. 1; Рис. 1. Якщо стаття написана українською мовою, підписи до рисунків і таблиць дублюються англійською мовою.

На першій сторінці зверху на першому рядку в лівому верхньому куті наводиться УДК (курсив, 11 pt). Після пропуску одного рядка, розміщується назва статті (великі літери, прямий напівжирний шрифт, 12 pt, вирівнювання по центру). Після пропуску одного рядка набираються ініціали, прізвища авторів (прямий напівжирний шрифт, 12 pt, вирівнювання по центру). На наступному рядку розміщуються повні назви й адреси установ, де виконувалась робота, адреса електронної пошти автора – контактної особи (курсив, 10 pt, вирівнювання по центру). Потім вміщується дата надходження статті до редакції: число – цифрами, місяць – прописом, рік – цифрами (шрифт прямий, 10 pt, вирівнювання по центру). На наступному рядку вміщується дата прийняття статті до друку (заповнюється редколегією).

Після пропуску одного рядка вміщуються три реферати (українською, англійською, російською мовами). Реферат мовою статті розміщується першим. Перед другим та третім рефератами з нових рядків пишуться назви статей (великими літерами, шрифт прямий, 10 pt, напівжирний, вирівнювання по центру), ініціали та прізвища авторів (шрифт прямий 10 pt, напівжирний, вирівнювання по центру), назви організацій та їх адреси (курсив 9 pt., вирівнювання по центру). Реферат повинен бути структурованим та містити наступні частини з заголовками: **Актуальність, Мета роботи, Матеріали і методи, Результати, Висновки**, які починаються з нового рядка. Слова “Реферат” і “Abstract” не пишуться. Заголовки структурних частин пишуться напівжирним шрифтом, після заголовка ставиться крапка. Текст реферату складає не менше 1800 та не більше 2000 фонетичних символів, тобто без проміжків між словами; прямий шрифт 10 pt. Реферати двома іншими мовами також повинні мати обсяг не менше 1800 на не більше 2000 фонетичних символів. На наступному рядку вміщуються 5-8 ключових слів, які розділяються між собою крапкою з комою (10 pt – перший реферат, 9 pt – другий та третій реферати). З початку рядка великими літерами, шрифт напівжирний, пишеться заголовок з двокрапкою “**КЛЮЧОВІ СЛОВА:**”. Тексти рефератів і ключові слова мають ширину на 1 см меншу, ніж основний текст (по 0,5 см з кожного боку). Реферати розділяються одним пустим рядком.

Основний текст статті наводиться після пропуску одного рядка шрифтом Times New Roman (Cyr), 12 pt. Абзаци починаються з червоного рядка (0,75 см). Рекомендується розбиття статті на такі розділи: вступ (назва розділу не пишеться), **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** (обов'язково для експериментальних робіт), **РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ, ВИСНОВКИ**. Для теоретичних робіт передбачається більш вільне розташування матеріалу, наприклад, замість розділу **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** рекомендуються розділи **ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ, МОДЕЛЬ** та ін. Розділи не нумеруються, літери великі, напівжирні, вирівнювання по центру. При необхідності розділи поділяються на підрозділи. Назви підрозділів пишуться з великої літери і виділяються напівжирним шрифтом, вирівнювання по центру. Розділи або підрозділи розділяються одним пустим рядком. Після назв розділів і підрозділів крапка не ставиться. У кінці тексту статті після пропуску одного рядка у розділі **ПОДЯКА** зазначається назва фонду, який фінансував роботу, і номер гранту. Потім розміщується розділ **КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ**, у якому автори декларують наявність фінансових або інших конфліктів інтересів, які могли вплинути на результати, інтерпретацію та висновки дослідження. Якщо немає конфлікту інтересів, так і потрібно заявити: "Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів". Потім розміщується розділ **Authors' ORCID ID**, у якому автори вказують адреси своїх профілів ORCID.

Літературні посилання нумеруються в порядку цитування в тексті, номер посилання пишеться у квадратних дужках. Не допускаються посилання на неопубліковані роботи, підручники та навчальні посібники. Список літератури (шрифт 10 pt.) розміщується за основним текстом статті, виділяється як розділ **REFERENCES** і оформлюється згідно з міжнародним стилем оформлення списку наукових публікацій **Vancouver**. Приклади оформлення бібліографічних посилань можна подивитись на сайті журналу у розділі «Керівництво для авторів»: <https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/about/submissions>.

Рукописи оформлені не у відповідності до наведених правил не розглядатимуться!

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Electronic files of the contributions (created in MS Word 2007 and later versions) written in English or Ukrainian, scans of the expert inference directive and directive from the author's institution should be sent to the Editorial Office online via the website <http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk>.

A manuscript should be typed in single spacing on A4 paper. Use the MS Word with following options: 12 points Times New Roman font, text justified. Left and right margins should be 2.5 cm, the upper margin should be 3.5 cm, and bottom one should be 2 cm. Mathematical and chemical symbols, equations, and formulae should be inserted in the text by computer means (MathType or Microsoft Equation). Figures should be computer-generated in software packages intended for processing and visualization of scientific data: Origin, Mathcad, etc. The use of the MS Office Excel is not recommended. Use computer printed symbols for axes labeling. Insert prepared images into an MS Word file as files in *.emf, *.wmf, *.jpg, *.jpeg, *.png format within the area of the page specified above. We recommend the following layout: images are placed in the first row of the table with transparent outer borders, legends and comments to figures are placed in the second row of the table. The font size of figure legends should be 9 points. Formulae, tables, figures should be numbered consecutively using Arabic numerals, e.g. (1), Table 1, Fig 1. If the article is written in Ukrainian, captions to figures and tables are duplicated in English.

Insert UDK in the first line on the left of a first page (11 pt, Italic). Leave one line blank. Place the title of the paper in capital letters (12 pt, bold, centered) on the next line. After one blank line type initials and surnames of the authors (12 pt, bold, centered). On the next line type the authors' affiliation and postal addresses of the institution where the actual work was done, including an e-mail address of the corresponding author (10 pt, Italic, centered). Then, place the date of the paper submission: day — in numbers, month — in words, year — in numbers (straight font, 10 pt, centered). Then, place the date of the paper submission (to be filled by editor).

After one blank line place three abstracts of the paper (written in Ukrainian, Russian and English). The first abstract should be written in the language of the manuscript. On the next line provide second, and then on the next line — third abstracts (capital letters, straight font, 10 pt, bold, centered). Above the second and third abstracts place the titles of the paper in two languages (capital letters, straight font, 10 pt, bold, centered), then — initials and surnames of the authors (straight font, 10 pt, bold, centered), and finally — the authors' affiliation names and addresses (9 pt, Italic, centered), every time starting from a new line. The abstract should be structured and consist of the following parts with headings: **Background, Objectives, Materials and Methods, Results, Conclusions**, each placed on a new line. The words "Резюме" and "Abstract" should be omitted. The headers of structural parts are written in bold letters, putting a dot after the header. All the three abstracts of the paper should contain not less than 1,800 and not more than 2,000 phonetic symbols (i.e., without taking into account the spacing between words); straight font, 10 pt. On the next line type 5-8 key words, separated by a semicolon (10 pt — first abstract, 9 pt — second and third abstracts). Next, the header "**KEY WORDS:**" should be typed in bold capital letters at the beginning of the line. The texts of the abstracts and key words should be indented 0.5 cm from the left and right margins. The abstracts should be separated by a blank line.

Then, leave one blank line before starting to type the text of the paper with following options: Times New Roman font, 12 pt, text justified. The first line of each paragraph should be indented 0.75 cm from the left margin. Each manuscript should contain the following elements: an introduction (heading of this section should be omitted), **MATERIALS AND METHODS** (obligatory for experimental studies), **RESULTS AND DISCUSSION**, **CONCLUSIONS**. For theoretical less specified text organization is envisaged, e.g., instead of section **MATERIALS AND METHODS**, the sections **PROBLEM FORMULATION** or **MODEL** are recommended, etc. The sections are not numbered, capital letters, bold, centered. Sections may be subdivided into subsections, if necessary. Subsection Headings are centered and should be bold and capitalized. Leave one blank line after each section or subsection. A dot should be omitted after headings of sections and subsections. Names of the foundations and grant numbers should be included in the section **ACKNOWLEDGMENTS** at the end of the text after one blank line. The next section should be **CONFLICT OF INTEREST** in which you should declare financial or any other conflict of interest. If there is no conflict of interest you can state: "The authors declare that there is no conflict of interest." The next section should be **Authors' ORCID ID** in which you should include ORCID internet addresses of all authors.

References to the literature should be cited in the text consecutively by Arabic numerals in square brackets. The citation of unpublished papers, textbooks and tutorials are prohibited. List of references (10 pt) should be given at the end of the manuscript as a separate section **REFERENCES**, formatted according to the **Vancouver** style for scientific publications.

The examples for reference formats are given on the journal's website in the "Author Guidelines": <https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/about/submissions>.

Manuscripts that do not meet the requirement mentioned above will not be considered for publication!

Наукове видання

“Біофізичний вісник”

Вип. 46

Збірник наукових праць

Укр. та англ. мовами.

Комп’ютерне верстання к.ф.-м.н. Горобченко О. О.

Підписано до друку 03.01.2022. Формат 60×84 1/8.
Папір офсетний. Друк ризографічний.
Ум. друк. арк. 3,79. Обл.-вид. арк. 4,41. Наклад 50 пр.

61022, Харків, майдан Свободи, 4
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Надруковано: Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна
61022, Харків, майдан Свободи, 4, тел. +38-057-705-24-32
Свідоцтво суб’єкта видавничої справи ДК № 3367 від 13.01.09