

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

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

Біофізичний Вісник

Випуск 51

Заснований 1998 р.

Харків 2024

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

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

Biophysical Bulletin

Issue 51

Founded in 1998

Kharkiv 2024

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. УДК 577. Засновник журналу Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна. Рік заснування 1998. Періодичність виходу 2 рази на рік.

Ідентифікатор медіа у Реєстрі суб'єктів у сфері медіа: **R30-04481** (Рішення № 1538 від 09.05.2024 р. Національної ради України з питань телебачення і радіомовлення. Протокол № 15).

ISSN 2075-3829 (Online)

ISSN 2075-3810 (Print)

Біофізичний вісник є фаховим виданням України категорії «А» 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 № 220 від 21.02.2024).

Всі статті проходять внутрішнє та зовнішнє подвійне сліпе рецензування.

Номер затверджено до друку рішенням Вченої ради Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (протокол № 10 від 27.05.2024).

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

Головний редактор

Косевич М. В., д.ф.-м.н., с.н.с., п.н.с., Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна Національної академії наук України, Харків, Україна – головний редактор

Заступник головного редактора

Катрич В. О., д.ф.-м.н., професор, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

Відповідальний секретар

Берест В. П., д.ф.-м.н., доцент, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

Члени редколегії

Аврунін О. Г., д.т.н., професор, Харківський національний університет радіоелектроніки, Харків, Україна

Andrushchenko V., PhD, Senior Scientist, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry Czech Academy of Science, Prague, Czech Republic

Bednarczyk P., Dr. hab., Assistant professor, Warsaw University of Life Sciences, Poland

Binder H., PhD, Dr. rer. nat. habil., Universität Leipzig, Germany

Burkina V., PhD, Researcher, University of South Bohemia in Czech Republic

Вашенко О. В., д.ф.-м.н., с.н.с., п.н.с., Інститут сцинтиляційних матеріалів Національної академії наук України, Харків, Україна

Горбенко Г. П., д.ф.-м.н., професор, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна

Гордієнко О. І., д.ф.-м.н., професор, зав. відділу, Інститут проблем кріобіології та кріомедицини Національної академії наук України, Харків, Україна

Гуцол Т. Д., д.т.н., професор, Поліський національний університет, Житомир, Україна

Довбешко Г. І., д.ф.-м.н., професор, Інститут фізики Національної академії наук України, Київ, Україна

Domanov Ye. A., PhD, Head of Skin Biophysics Group, L'Oréal Research & Innovation, Aulnay-sous-Bois, France

Zamaratskaia G., PhD, Associate Professor, Senior Lecturer, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden

Жолос О. В., д.б.н., професор, зав. каф., Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Зленко С. М., д.т.н., професор, Вінницький національний технічний університет, Вінниця, Україна

Кавок Н. С., к.б.н., с.н.с., Інститут сцинтиляційних матеріалів Національної академії наук України, Харків, Україна

Карачевцев В. О., д.ф.-м.н., професор, член-кор. НАН України, Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна Національної академії наук України, Харків, Україна

Корнелюк О. І., д.б.н., професор, член-кор. НАН України, зав. відділу, Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України, Київ, Україна

Лисецький Л. М., д.ф.-м.н., професор, п.н.с., Інститут сцинтиляційних матеріалів Національної академії наук України, Харків, Україна

Ніколов М. О., к.т.н., с.н.с., доцент, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Київ, Україна

Павлов С. В., д.т.н., професор, Вінницький національний технічний університет, Вінниця, Україна

Попов А. О., к.т.н., доцент, доцент, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Київ, Україна

Reva I., PhD, Dr. Hab., Investigador Principal, Departamento de Quimica, Universidade de Coimbra, Portugal

Rutkauskas D., Ph.D., Senior Researcher, Centre for Physical Sciences and Technology, Vilnius, Lithuania

Соляник Г. І., д.ф.-м.н., професор, Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.С. Кавецького Національної академії наук України, Київ, Україна

Степаньян С. Г., д.ф.-м.н., с.н.с., Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна Національної академії наук України, Харків, Україна

Štys D., Prof. RNDr. CSc. Institute of Complex Systems FFPW, University of South Bohemia, Czech Republic

Ткачук Р. А., д.т.н., професор, Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, Тернопіль, Україна

Томашевський Р. С., д.т.н., професор, директор навчально-наукового інституту, Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», Харків, Україна

Трусова В. М., д.ф.-м.н., професор, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

Feldman Y., Prof., PhD (Phys. & Math.), Director Dielectric Spectroscopy LAB, The Hebrew University of Jerusalem, Israel

Шестопалова Г. В., д.ф.-м.н., професор, Інститут радіофізики та електроніки ім. О.Я. Усикова Національної академії наук України, Харків, Україна

Шуба Я. М., д. б. н., професор, академік НАН України, зав. відділу, Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця Національної академії наук України, Київ, Україна;

Yakovenko S., PhD, Associate Professor, West Virginia University, School of Medicine, USA

Горобченко О. О., к.ф.-м.н., доцент, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна – *технічний редактор*

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

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

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>

© Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, 2024

© Н. В. Хміль, А. В. Шестопалова, В. Г. Колесніков, А. О. Боєчко-Немовча, рисунок потенційних сайтів зв'язування гідрокортизону на головній протеазі SARS CoV -2 Mpro на першій сторінці обкладинки, 2024

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. UDC 577. The founder of the Journal is V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine. Year of foundation 1998. The journal is published twice a year.

Media identifier in the Register of the field of Media Entities: **R30-04481** (Decision № 1538 dated May 9, 2024 of the National Council of Television and Radio Broadcasting of Ukraine, Protocol № 15)

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 (May 27, 2024, Protocol No. 10).

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

Editor-in-Chief

M. V. Kosevich, Dr. Sci. (Phys. & Math.), B.I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Deputy Editor-in-Chief

V. A. Katrich, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Prof., V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

Executive Secretary

V. P. Berest, Dr. Sci. (Phys. & Math.), V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

Editorial Board

O. G. Avrunin, Dr. Sci. (Engin.), Prof., Kharkiv National University of Radio Electronics, Kharkiv, Ukraine

V. Andrushchenko, PhD, Senior Scientist, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry Czech Academy of Science, Prague, Czech Republic

P. Bednarczyk, Dr. hab., Assistant professor, Warsaw University of Life Sciences, Poland

H. Binder, PhD, Dr. rer. nat. habil., Universitat Leipzig, Germany

V. Burkina, PhD, Researcher, University of South Bohemia, Czech Republic

O. V. Vashchenko, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Institute for Scintillation Materials of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

G. P. Gorbenko, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Prof., V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

O. I. Gordienko, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Prof., head Department, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

T. D. Hutsol, Dr. Sci. (Engin.), Prof., Polissia National University, Zhytomyr, Ukraine

G. I. Dovbeshko, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Prof., Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Ye. A. Domanov, PhD, Head of Skin Biophysics Group, L'Oréal Research & Innovation, Aulnay-sous-Bois, France

G. Zamaratskaia, PhD, Associate Professor, Senior Lecturer, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden

A. V. Zholos, Dr. Sci. (Biol.), Prof., head Chair, Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

S. M. Zlepko, Dr. Sci. (Engin.), Vinnytsia National Technical University, Vinnytsia, Ukraine

N. S. Kavok, PhD (Biol.), senior researcher, Institute for Scintillation Materials of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

V. A. Karachevtsev, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Prof., Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Ukraine, B. I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

A. I. Kornelyuk, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Ukraine, Institute of Molecular Biology and Genetics of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

L. N. Lysetskyi, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Prof., leading research fellow, Institute for Scintillation Materials of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

N. A. Nikolov, PhD (Engin.), senior researcher, associate professor, National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute", Kiev, Ukraine

S. V. Pavlov, Dr. Sci. (Engin.), Vinnytsia National Technical University, Vinnytsia, Ukraine

A. A. Popov, PhD (Engin.), Associate professor, National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute" disabled, Kyiv, Ukraine

I. Reva, PhD, Dr. Hab., Investigator Principal, Departamento de Quimica, Universidade de Coimbra, Portugal

Danielis Rutkauskas, PhD, Senior Researcher, Centre for Physical Sciences and Technology, Vilnius, Lithuania

G. I. Solyanik, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Prof., R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, Kiev, Ukraine, Ukraine

S. G. Stepanian, Dr. Sci. (Phys. & Math.), B.I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

D. Štys, Prof. RNDr., CSc., Institute of Complex Systems FFPW, University of South Bohemia, Czech Republic

R. A. Tkachuk, Dr. Sci. (Engin.), Ternopil Ivan Puluj National Technical University, Ternopil, Ukraine

R. S. Tomashevskiy, Prof. Dr. Sci. (Engin.), Director of the Educational and Scientific Institute, National Technical University "Kharkiv Polytechnic Institute" disabled, Kharkiv, Ukraine

V. M. Trusova, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Prof., Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Ukraine, V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

Y. Feldman, PhD (Phys. & Math.), Prof., Director Dielectric Spectroscopy LAB, The Hebrew University of Jerusalem, Israel

A. V. Shestopalova, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Prof., O. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Y. M. Shuba, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of the National Academy of Sciences of Ukraine, Head of the Department, Bogomolets Institute of Physiology disabled of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

S. Yakovenko, PhD, Associate Professor, West Virginia University, School of Medicine, USA

O. A. Gorobchenko, PhD (Phys. & Math.), V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 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; Scopus; Directory of Open Access Journals (DOAJ); WorldCat; CAS (Chemical Abstracts Service); Google Scholar; Ulrichsweb; Bielefeld Academic Search Engine (BASE)

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: <https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk>

© V. N. Karazin Kharkiv National University, 2024

© N. V. Khmil, A. V. Shestopalova, V. G. Kolesnikov, A. O. Boiechko-Nemovcha, photo of potential hydrocortisone binding sites on SARS CoV-2 main protease Mpro on the first page of the cover, 2024

ЗМІСТ**БІОФІЗИКА КЛІТИНИ****O. I. Dotsenko, G. V. Taradina**

Ion homeostasis in the regulation of intracellular pH and volume of human erythrocytes

7–25

БІОМЕДИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ**J. Hankun, O. G. Avrunin**

Determining the relationship between the speed of motion of large permanent magnets and the trajectory of implants in magnetic stereotaxic systems

26–38

МЕДИЧНА ФІЗИКА**Т. Г. Віхтинська, К. Є. Лапітан, К. Е. Немченко**

Алгоритм тривимірної реконструкції для лінійної геометрії сканування

39–52

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА**N. V. Khmil, A. V. Shestopalova, V. G. Kolesnikov, A. O. Boiechko-Nemovcha**Identification of potential corticosteroid binding sites on the SARS CoV-2 main protease Mpro — *in silico* docking study

53–63

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ**Д. М. Ноздренко, В. Нан, Т. Ю. Матвієнко, К. І. Богуцька, Т. Я. Шевчук, В. П. Берест, Ю. І. Прилуцький**C₆₀ фулерен покращує відновлення біомеханічних параметрів скорочення *muscle soleus* щурів після хронічної алкоголізації

64–74

ХРОНІКА**S. M. Perepelytsya, T. L. Bubon**The 2nd Scientific workshop for students “Computational physics of DNA”

75–76

CONTENTS**CELL BIOPHYSICS****O. I. Dotsenko, G. V. Taradina**

Ion homeostasis in the regulation of intracellular pH and volume of human erythrocytes

7–25

BIOMEDICAL ENGINEERING**J. Hankun, O. G. Avrunin**

Determining the relationship between the speed of motion of large permanent magnets and the trajectory of implants in magnetic stereotaxic systems

26–38

MEDICAL PHYSICS**T. G. Vikhtinskaya, K. E. Lapitan, K. E. Nemchenko**

Segmented algorithm for three-dimensional reconstruction in linear scan geometry

39–52

MOLECULAR BIOPHYSICS**N. V. Khmil, A. V. Shestopalova, V. G. Kolesnikov, A. O. Boiechko-Nemovcha**Identification of potential corticosteroid binding sites on the SARS CoV-2 main protease Mpro — *in silico* docking study

53–63

CELL BIOPHYSICS**D. M. Nozdrenko, W. Nan, T. Yu. Matvienko, K. I. Bogutska, T. Ya. Shevchuk, V. P. Berest, Yu. I. Prylutsky**C₆₀ fullerene improves the recovery of biomechanical parameters of *muscle soleus* contraction in rats after chronic alcoholization

64–74

CHRONICLE**S. M. Perepelytsya, T. L. Bubon**The 2nd Scientific workshop for students “Computational physics of DNA”

75–76

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-51-01>

UDC 576.342+577.352.4+577.12

ION HOMEOSTASIS IN THE REGULATION OF INTRACELLULAR pH AND VOLUME OF HUMAN ERYTHROCYTES

O. I. Dotsenko*^{ORCID}, G. V. Taradina^{ORCID}

Vasyl' Stus Donetsk National University, 21 600-richchia Str, Vinnytsia, 21021, Ukraine

*Corresponding author: o.dotsenko@donnu.edu.ua

Submitted September 17, 2023; Revised March 4, 2024;

Accepted March 20, 2024

Background: Cell volume maintenance by regulating the water and ion content is crucial for the survival and functional fullness of human erythrocytes. However, cells are incredibly complex systems with numerous, often competing, reactions occurring simultaneously. Hence, anticipating the overall behavior of the system or acquiring a new understanding of how the subcomponents of the system interact might pose a considerable challenge in the absence of employing mathematical modeling methods.

Objectives: Creation of a mathematical metabolic model of erythrocyte ion homeostasis to study the mechanisms of erythrocyte volume stabilization and intracellular pH in *in vitro* experiments.

Material and Methods: The mathematical model was developed using general approaches to modeling cellular metabolism, which are based on systems of ordinary differential equations describing metabolic reactions, passive and active ion fluxes. The generation of the model and all computations, relying on the model, were executed utilizing the COPASI 4.38 simulation environment. Changes in intracellular pH, Na⁺/K⁺-ATPase, and Ca²⁺-ATPase activities of donor erythrocytes incubated in saline solutions in the absence and presence of Ca²⁺ ions were used to test the model.

Results: The kinetic model of erythrocyte ion homeostasis was created. Using realistic parameters of the system changes over time in cell volume, concentrations of metabolites, ions fluxes and transmembrane potential were calculated. The simulation results were used to analyze the reasons for changes in the resistance to acid hemolysis of erythrocytes under the conditions of their incubation in saline solutions of different compositions.

Conclusion: We show that cation homeostasis in erythrocytes is maintained mainly by the active movement of Na⁺ and K⁺ through Na⁺, K⁺-ATPase, combined with relatively lower passive permeability through other transport pathways. In the presence of Ca²⁺ ions and the activation of potassium release through Gardos channels, the cell volume is stabilized due to a change in the transmembrane potential and activation of electrodiffusion ion fluxes. The study demonstrated that the reduction in acid resistance of erythrocytes during incubation in a saline solution is associated with a decrease in their cell volume, whereas the increase in acid resistance during incubation in the presence of Ca²⁺ ions is linked to the activation of the Na⁺/H⁺ exchanger.

KEY WORDS: mathematical metabolic modeling; ion transport; osmotic processes; electrochemical membrane potential; permeant ions; Na⁺/K⁺-ATPase; Ca²⁺-ATPase; calmodulin; Band3 protein (AE1); Gardos channels.

The viability and functional completeness of human erythrocytes is determined by their ability to stabilize their volume. The volume of erythrocytes is about 60% of the maximum possible value for a given surface area [1]. This is what determines its ability to strong

In cites: Dotsenko OI, Taradina GV. Ion homeostasis in the regulation of intracellular pH and volume of human erythrocytes. Biophysical Bulletin. 2024;51:7–25. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-51-01>

Open Access. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

deformation, which is necessary to pass through capillaries and transport oxygen [1, 2]. In this regard, the erythrocyte must have special mechanisms to stabilize its volume against changes in the permeability of the cell membrane [3].

It is believed that the erythrocyte volume is completely determined by ion homeostasis [3, 4]. Ion transport is crucial for maintaining ion-water balance and establishing the electrical potential difference between the cell and its surroundings [1]. This is indicated by the fact that the consequence of hereditary and acquired disorders is a change in ion homeostasis and hydration of cells. Overall, the extent of disruption in water and ion content plays a crucial role in determining the severity of hemolytic anemia [4, 5].

Genomic and proteomic studies identify numerous channels, transporters, and regulatory proteins that respond to changes in the osmolality of the environment and are involved in volume control in normal and diseased erythrocytes. The erythrocyte membrane contains a number of carrier proteins that carry out the transport of monovalent cations and anions by the mechanism of facilitated diffusion (Na^+ , K^+ , 2Cl^- , K^+ , Cl^- -cotransport, Na^+/H^+ and $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchange). These systems account for 20% of the total flux of monovalent ions, so it is believed that their main physiological value consists in the regulation of cell volume and control of intracellular pH. It has been shown that swelling of erythrocytes activates K^+ , Cl^- cotransport, while a decrease in cell volume leads to activation of Na^+/H^+ exchange and Na^+ , K^+ , 2Cl^- -cotransport [6, 7]. Activated by Ca^{2+} ions potassium channels are also involved in autoregulation of erythrocyte volume [8, 9]. Investigating the connection between erythrocyte membrane permeability and cell volume holds significant importance in unraveling the mechanisms that govern the functional integrity and viability of these cells.

Erythrocyte homeostasis encompasses a specific set of vital cellular processes aimed at preserving and repairing cell volume and integrity amid the dynamic alterations induced by physiological stress. [10]. The main participants of the erythrocyte's homeostasis-related processes are a complete set of passive and active membrane transporters, hemoglobin as the main macromolecular colloid osmotic factor, proton and calcium buffer, cellular metabolites affecting fixed negative charges and additional buffering capacity of the cytoplasm of erythrocytes. Cells are incredibly complex systems with numerous, often competing, reactions occurring simultaneously. Therefore, predicting the overall behavior of the system or gaining a new understanding of how the components of the system interact is quite challenging without the use of mathematical modeling methods.

Mathematical models have been instrumental in advancing the understanding of cell volume regulation [11–15]. The models answered many questions that were either very difficult or impossible to answer experimentally, predicted a number of unexpected relationships in cellular metabolism, and helped to understand how cells use certain biochemical processes. Most of them consider the dynamics of changes in cell volume and pH in the process of blood circulation. We are particularly interested in the application of mathematical models for the interpretation of experimental data obtained in *in vitro* experiments.

The work aimed to create a mathematical metabolic model of erythrocyte ion homeostasis to study the mechanisms of stabilization of erythrocyte volume and intracellular pH in an *in vitro* experiment. The developed model represents only a subsystem of a much more complex real system, which has already been described by mathematical models [16 – 18]. In this work, we model only ion homeostasis and will not consider the metabolic processes that contribute to its regulation. We demonstrate that this model is sufficient for analyzing the role of ion homeostasis in the regulation of pH and volume in erythrocytes. It enables us to identify the factors contributing to changes in the hemolytic resistance of erythrocytes during their incubation in various saline solutions.

MATHEMATICAL MODEL AND MODELING METHODS

Common approaches to modeling cellular metabolism typically rely on coupled systems of ordinary differential equations (ODEs), where the cell can be considered a well-mixed chemical reactor. Each ODE represents the sum of all rates of change of a single cellular component.

The model describes the dynamic behavior of a suspension of identical erythrocytes in a saline buffer medium. The extracellular space was treated as a well-mixed compartment and the unmixed layers around the cells were not considered. The size of the extracellular compartment was precisely calculated and expressed in μ^3 . The physiologically normal volume of erythrocytes was taken as $90 \mu^3$ [11, 13].

The physical laws limiting the behavior of such a system are the conservation of charge and mass.

The incubation medium electroneutrality of (Na-phosphate buffer, NaCl) is represented as a linear combination of extracellular ion concentrations. Subscripts *in* and *out* denote intracellular and extracellular concentrations, respectively.

$$(Na_{out}^+ + K_{out}^+ + 2 \cdot Ca_{out}^{2+}) - (Cl_{out}^- + HCO_{3out}^- + 2 \cdot HPO_{4out}^{2-} + H_2PO_{4out}^-) = 0. \quad (1)$$

The ratio between the ion concentrations of the proton-binding buffer:

$$H_2PO_{4out}^- = \frac{H_{out}^+ \cdot HPO_{4out}^{2-}}{6.2 \cdot 10^{-8}}. \quad (2)$$

The electroneutrality of the intracellular medium was described by the equation:

$$(Na_{in}^+ + K_{in}^+ + 2 \cdot Ca_{in}^{2+} + 2 \cdot Mg_{in}^{2+} + H_{in}^+) - (Cl_{in}^- + HCO_{3in}^- + 2HPO_{4in}^{2-} + H_2PO_{4in}^- + z(Hb) \cdot Hb + z(2,3BPG) \cdot 2,3BPG) = 0, \quad (3)$$

$z(Hb)$ — the total charge on the hemoglobin molecule, represented by the Cass-Dahlmark equation [12]

$$z(Hb) = a \cdot (pH_{in} - pI), \quad (4)$$

a corresponds to the linear segment of the proton titration curve of hemoglobin in intact erythrocytes [13], pI — pH at the isoelectric point of hemoglobin. Hb — total hemoglobin concentration.

$$z(2,3BPG) = -5 + \frac{10^{pK_1 - pH_{in}} + 2 \cdot 10^{2 \cdot (pK_2 - pH_{in})}}{1 + 10^{pK_1 - pH_{in}} + 2 \cdot 10^{2 \cdot (pK_2 - pH_{in})}}, \quad (5)$$

$$pK_1 = 7.31, pK_2 = 6.2.$$

The osmolarity of the external and intracellular environment was described by equations (6), (7):

$$Os_{out} = Na_{out}^+ + K_{out}^+ + Ca_{out}^{2+} + Cl_{out}^- + HCO_{3out}^- + HPO_{4out}^{2-} + H_2PO_{4out}^- \quad (6)$$

$$Os_{in} = Na_{in}^+ + K_{in}^+ + Ca_{in}^{2+} + Mg_{in}^{2+} + Cl_{in}^- + HCO_{3in}^- + H_{in}^+ + HPO_{4in}^{2-} + H_2PO_{4in}^- + A + f(Hb) \cdot Hb + 2,3BPG + N, \quad (7)$$

$f(Hb)$ — osmotic coefficient of hemoglobin, represented by the equation [12]:

$$f(Hb) = 1 + 0.0645 \cdot Hb/\alpha + 0.0258 \cdot (Hb/\alpha)^2, \quad \alpha = \frac{V}{V_0}, \quad (8),$$

A — the intracellular osmolytes content (20 mM), N — total concentration of cellular nucleotides.

The processes involved in the model are shown in Table 1 and Figure 1

The dissolution of CO_2 and O_2 in a buffered extracellular solution, the process of CO_2 hydration was described as in [16] under the experimental conditions: $T=293$ K, $PO_2=160$ mmHg, $PCO_2 = 0.3$ mmHg.

The Jacobs-Stewart cycle is described in detail by us in [16]. In this model, the kinetic equation of the HCO_3^- / Cl^- exchange involving AE1 was adjusted, considering the data on the activation of the exchanger by intracellular Ca^{2+} [19]

$$v = \left(k_1 \cdot HCO_3^-_{out} - \frac{k_2 \cdot (1 + 10^{pH_{in} - pK_a})}{1 + \frac{10^{pH_{in} - pK_a}}{r}} HCO_3^-_{in} \right) \cdot \left(1 + \frac{Ca_{in}^{2+}}{Ka} \right), \quad (9)$$

$k_1 = k_2 = 6,9 \cdot 10^{-6} c^{-1}$, $pK_a = 6.3$, r — Donnan's ratio, $Ka = 10 nM$ (activation constant, $K_{1/2}$).

The transport of CO_2 , the hydration of CO_2 with the participation of carbonic anhydrase (CA), the buffering processes of H^+ and CO_2 by hemoglobin have been described in detail by us previously [16] and are used without modification in this model.

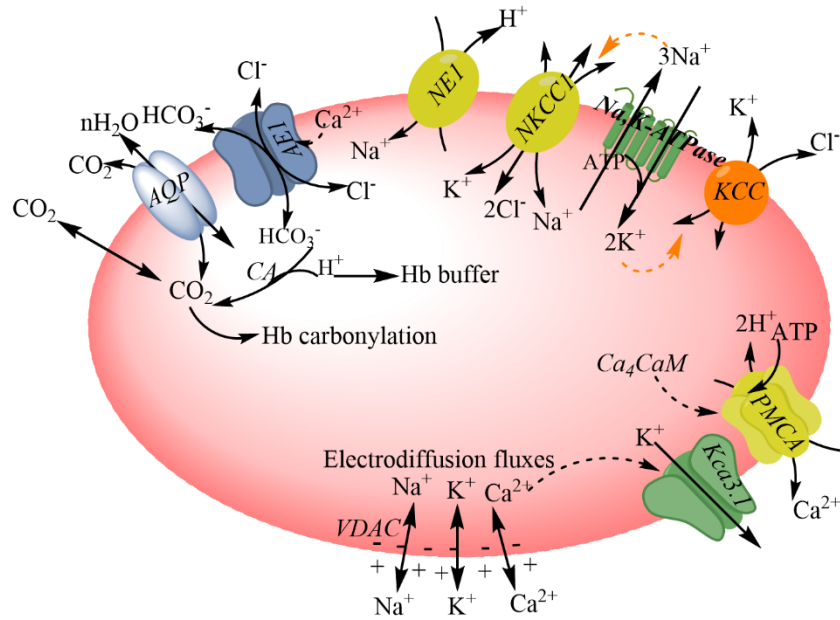


Fig. 1. Scheme of ion transport pathways of the human erythrocyte used in the model. Gradient-driven transport pathways include AE1 (the anion exchange protein 1, band 3), NKCC1 (Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ -cotransporter 1); KCC (K^+ , Cl^- -cotransporters), NHE1 (the sodium/hydrogen exchanger 1), VDAC — voltage-regulated ions channels. Membrane channels are the aquaporins (AQP1), $K_{Ca3.1}$ (KCNN4, the Gardos channel, a calcium-activated potassium channel). Active transporters are the Ca^{2+} -ATPase (PMCA), sodium-potassium ATPase. CA — Carbonic Anhydrase.

Transport of ions

There are several types of channels and carriers that carry out passive transport of ions in the erythrocyte membrane. These are Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ -cotransport K^+ , Cl^- -cotransport, Na^+/H^+ -exchanger, HCO_3^-/Cl^- -exchanger.

K^+ , Cl^- - and Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ -cotransport was described as in works [14, 15]:

$$J_{K^+, Cl^-} = k_{K, Cl} \cdot (K_{out}^+ \cdot Cl_{out}^- - K_{in}^+ \cdot Cl_{in}^-), \quad (10)$$

$k_{K, Cl}$ — the transport rate constant, $k_{K, Cl} = 4.56 \cdot 10^{-3} M^{-1} \cdot s^{-1}$.

$$J_{K^+, Na^+, 2Cl^-} = k_{K, Na, 2Cl} \cdot (K_{out}^+ \cdot Na_{out}^+ \cdot Cl_{out}^{-2} - K_{in}^+ \cdot Na_{in}^+ \cdot Cl_{in}^{-2}), \quad (11)$$

$k_{K, Na, 2Cl}$ — the transport rate constant, $k = 4.37 \cdot 10^{-4} M^{-3} \cdot s^{-1}$.

The rate of transport through the Na^+/H^+ -exchanger was described by kinetics, according to [20, 21]:

$$J_{\text{Na}^+/\text{H}^+} = (7.2 - pH_{in}) \cdot \frac{V \cdot H_{in}^{+n}}{K + H_{in}^{+n}}, \quad (12)$$

$$V = 1.78 \cdot 10^{-5} \text{ M / s}, \quad K = 0.285 \text{ mM}, \quad n = 1.85.$$

Table 1. Reactions involved in the model (arrow type, \rightarrow or \leftrightarrow , indicates whether the reaction is considered irreversible or reversible in the analysis)

N	Reactions	Enzymes	Effectors
<i>Medium</i>			
1	$\text{CO}_{2out} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_{3out}^- + \text{H}^+$	Non enzymatic reaction	P_{CO_2}, T
2	$\text{HPO}_{4out}^{2-} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{H}_2\text{PO}_{4out}^-$	Non enzymatic reaction	
<i>Cell</i>			
<i>Jacobs-Stewart cycle</i>			
3	$\text{CO}_{2in} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_{3in}^- + \text{H}^+$	CA	
4	$\text{CO}_{2in} \leftrightarrow \text{CO}_{2out}$	Transport	
5	$\text{HCO}_{3out}^- + \text{Cl}_{in}^- \leftrightarrow \text{HCO}_{3in}^- + \text{Cl}_{out}^-$	AE1 transport	Ca_{in}^{2+}
<i>Ion's transport</i>			
<i>Electrodifusional flux</i>			
6	$\text{Na}_{out}^+ \leftrightarrow \text{Na}_{in}^+$	VDAC transport	E
7	$\text{K}_{in}^+ \leftrightarrow \text{K}_{out}^+$	VDAC Transport	E
8	$\text{K}_{in}^+ \leftrightarrow \text{K}_{out}^+$	Gardos channel (KCNN4)	Ca_{in}^{2+}, E
9	$\text{Ca}_{out}^{2+} \leftrightarrow \text{Ca}_{in}^{2+}$	VDAC transport	E
<i>Electroneutral transport</i>			
10	$\text{K}_{out}^+ + \text{Cl}_{out}^- \leftrightarrow \text{K}_{in}^+ + \text{Cl}_{in}^-$	$\text{K}^+ \text{Cl}^-$ cotransporter (KCC)	
11	$\text{K}_{out}^+ + \text{Na}_{out}^+ + 2\text{Cl}_{out}^- \leftrightarrow \text{K}_{in}^+ + \text{Na}_{in}^+ + \text{Cl}_{in}^-$	$\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ cotransporter (NKCC1)	
12	$\text{Na}_{out}^+ + \text{H}_{in}^+ \leftrightarrow \text{Na}_{in}^+ + \text{H}_{out}^+$	Na^+ / H^+ exchanger (NE1)	pH, Ca_{in}^{2+}
<i>ATPase</i>			
13	$2\text{K}_{out}^+ + 3\text{Na}_{in}^{++} \leftrightarrow 2\text{K}_{in}^+ + 3\text{Na}_{out}^+$	$\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATPase}$	ATP
14	$\text{Ca}_{in}^{2+} + 2\text{H}_{out}^+ \rightarrow \text{Ca}_{out}^{2+} + 2\text{H}_{in}^+$	$\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ (PMCA1)	$\text{ATP}, \text{Ca}_4\text{CaM}$
<i>Hb-buffer's capacity</i>			
15	$\text{deoxyHb} + \text{H}_{in}^+ \leftrightarrow \text{HdeoxyHb}$		
16	$\text{oxyHb} + \text{H}_{in}^+ \leftrightarrow \text{HoxyHb}$		
17	$\text{deoxyHb} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{carbHb} + \text{H}_{in}^+$		

N	Reactions	Enzymes	Effectors
18	$oxyHb + CO_2 \rightleftharpoons carbHb + H_{in}^+$		
<i>Binding of metabolites to hemoglobin</i>			
19	$deoxyHb + 23BPG \rightleftharpoons deoxyHb23BPG$		
20	$deoxyHb + ATP \rightleftharpoons deoxyHbATP$		
21	$deoxyHb + ADP \rightleftharpoons deoxyHbADP$		
22	$deoxyHb + MgATP \rightleftharpoons deoxyHbMgATP$		
23	$oxyHb + 23BPG \rightleftharpoons oxyHb23BPG$		
24	$oxyHb + ATP \rightleftharpoons oxyHbATP$		
25	$oxyHb + ADP \rightleftharpoons oxyHbADP$		
26	$oxyHb + MgATP \rightleftharpoons oxyHbMgATP$		
<i>Ca²⁺, Mg²⁺ interactions</i>			
27	$Mg_{in}^{2+} + ATP \rightleftharpoons MgATP$		pH
28	$Ca_{in}^{2+} + ATP \rightleftharpoons CaATP$		pH
29	$Ca_{in}^{2+} + 23BPG \rightleftharpoons Ca23BPG$		pH
30	$MgADP + ADP \rightleftharpoons MgATP + AMP$	AK	pH
<i>Ca²⁺-calmodulin interactions</i>			
31	$CaM + 2Ca_{in}^{2+} \rightleftharpoons Ca_2CaM$		pH
32	$Ca_2CaM + 2Ca_{in}^{2+} \rightleftharpoons Ca_4CaM$		pH

The electrodiffusion flux Na^+ , K^+ , Ca^{2+} was described by the Goldman equation:

$$J_j = -\frac{P_j \cdot z \cdot E \cdot F}{R \cdot T} \frac{C_j^{out} - C_j^{in} \cdot e^{\frac{z \cdot E \cdot F}{R \cdot T}}}{1 - e^{\frac{z \cdot E \cdot F}{R \cdot T}}}, \quad (13)$$

P_j — the ion permeabilities. $P_{Na^+} = 3.38 \cdot 10^{-6} s^{-1}$, $P_{K^+} = 3.44 \cdot 10^{-6} s^{-1}$ [11]. In the absence of Ca^{2+} in the incubation medium $P_{Ca^{2+}} = 2.11 \cdot 10^{-7} s^{-1}$, in the presence of Ca^{2+} $P_{Ca^{2+}}$ was calculated as function of Ca^{2+} [14]:

$$P_{Ca^{2+}} = \left(\frac{Ca_{in}^{2+}}{0.04 + Ca_{in}^{2+}} \right) \cdot \left(\frac{Ca_{out}^{2+}}{0.8 + Ca_{out}^{2+}} \right). \quad (14)$$

The K^+ permeability through the Gardos channel was calculated as [11]:

$$P_{K^+ \text{ Gardos}} = P \cdot \left(\frac{Ca^{2+}}{K + Ca^{2+}} \right)^4, \quad (15)$$

$P = 4.72 \cdot 10^{-4} s^{-1}$, $K = 0.25 \mu M$ [11].

E — the transmembrane potential was calculated as:

$$E = -\frac{R \cdot T}{F} \ln \frac{P_{K^+} \cdot K_{in}^+ + P_{Na^+} \cdot Na_{in}^+ + P_{Cl^-} \cdot Cl_{out}^-}{P_{K^+} \cdot K_{out}^+ + P_{Na^+} \cdot Na_{out}^+ + P_{Cl^-} \cdot Cl_{in}^-}, \quad (16)$$

in the presence of Ca^{2+} in the incubation medium

$$E = -\frac{R \cdot T}{F} \ln \frac{(P_{K^+} + P_{K^+ \text{ Gardos}}) \cdot K_{in}^+ + P_{Na^+} \cdot Na_{in}^+ + P_{Cl^-} \cdot Cl_{out}^-}{(P_{K^+} + P_{K^+ \text{ Gardos}}) \cdot K_{out}^+ + P_{Na^+} \cdot Na_{out}^+ + P_{Cl^-} \cdot Cl_{in}^-}, \quad (17)$$

F — the Faraday constant; R — universal gas constant; T — absolute temperature; P_{K^+} , P_{Na^+} , P_{Cl^-} — erythrocyte membrane passive permeabilities of the K^+ , Na^+ , Cl^- respectively, K^+ , Na^+ , Cl^- — the ion concentrations in the extracellular environment and in the cell.

Active transport of ions

Ca^{2+} -ATPase transports Ca^{2+} independently and irreversibly, and when it binds to the Ca-calmodulin complex, it transports Ca^{2+} with a much higher affinity and rate of exchange [22]. It is known that the activity of the Ca^{2+} -ATPase is depended on the concentration of ATP [23] and is inhibited by high concentrations of intracellular calcium [24]. The equation for the rate of active Ca^{2+} transport given in [23] was modified by us as follows:

$$v = \frac{V \cdot (Ca^{2+})^n \cdot ATP}{(K + Ca^{2+})^n \left(1 + \frac{Ca^{2+}}{K_I}\right)} \cdot \left(1 + \frac{Ca_4 CaM}{K_a}\right), \quad (18)$$

$V = 0.03 M / s$, $K = 1.1 \mu M$ [23], $K_a = 1 \mu M$, $K_I = 0.6 \mu M$ (was set during simulation). n — the cooperativity factor that characterize Ca^{2+} activation of the enzyme ($n = 2$ in the absence of Ca^{2+} ions, $n = 4$ in the presence of Ca^{2+} in the incubation medium [11, 14]).

Na^+ , K^+ -ATPase activity was described by using the kinetic equation given in [18], taking into account the inactivation of the enzyme by Ca^{2+} ions [25].

$$v = \frac{\left(\frac{ATP}{ATP + K_m}\right) \cdot \left(\frac{V_m}{2}\right) \cdot \left((K_{out}^+)^2 + \frac{z \cdot B_2 \cdot K_{out}^+}{2}\right)}{Pump \cdot \left(1 + \frac{Ca^{2+}}{K_I}\right)}, \quad (19)$$

$$Pump = B_1 \cdot B_2 + 2B_2 \cdot K_{out}^+ + (K_{out}^+)^2 + \left(\frac{B_3}{Na_{in}^+} + 1\right) \cdot (B_1 \cdot B_2 \cdot k_1 \cdot k_2 + k_1 \cdot k_3 (K_{out}^+)^2 + z \cdot B_2 \cdot K_{out}^+),$$

$V_m = 0.452 mM / s$, $B_1 = 6.17 \cdot 10^{-8} M$, $B_2 = 1.33 \cdot 10^{-5} M$ (was adjusted during simulation), values of other parameters of the equation are taken from [18] without changes. $K_I = 0.398 \mu M$ (Na^+ , K^+ -ATPase inhibition constant ($K_{1/2}$) by Ca^{2+} ions).

The kinetics of 2,3BPG, ATP, ADP, Mg-ATP binding with oxy- and deoxyhemoglobin, Mg^{2+} and Ca^{2+} binding with ATP and 2,3BPG are described in works [17, 18], and the parameters and kinetic equations of these reactions are applied in the model without modification.

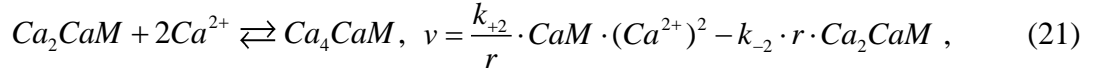
Interaction of Ca^{2+} with calmodulin

The interaction of calcium with calmodulin was described by mass action kinetics. The rate constants given in [26] were normalized by the parameter r (cooperativity factor), which considers the dependence of Ca^{2+} binding with calmodulin on pH . Experimental dependences of r on pH for two types of Ca^{2+} binding centers with calmodulin are given in [27]. The regression dependence of r on pH was obtained by us and applied in the model

$$CaM + 2Ca^{2+} \rightleftharpoons Ca_2CaM, \quad v = \frac{k_{+1} \cdot CaM \cdot (Ca^{2+})^2 - k_{-1} \cdot r \cdot Ca_2CaM}{r}, \quad (20)$$

$$k_{+1} = 2.669 \cdot 10^{12} M^{-2} \cdot s^{-1}, \quad k_{-1} = 2.682 s^{-1} [26],$$

$$r = -0.0403 pH^3 + 1.0126 pH^2 - 8.5561 pH + 25.966.$$



$$k_{+2} = 1.704 \cdot 10^{14} M^{-2} \cdot s^{-1}, \quad k_{-2} = 1.551 s^{-1} [26].$$

The change in intracellular ATP content was specified as a time dependence obtained by a result of approximating experimental data [28] with the 4th-order regression equation.

The kinetics of adenylate kinase (AK) was described by the equation used in the model of human erythrocyte metabolism [17], which is in the BioModels Database (www.ebi.ac.uk/biomodels/MODEL5950552398#Files). The flux through this reaction is represented as *pH*-dependent kinetics.

The volume of the erythrocyte is determined by the balance of osmotic values inside (Os_{in}) and outside (Os_{out}) the cell. The volume of the cell was described by the equation:

$$\frac{dV}{dt} = J_w = P_w \cdot R \cdot T (Os_{in} - Os_{out}), \quad (22)$$

$$P_w = 6.02 \cdot 10^{-6} \mu / s,$$

P_w — permeability coefficient for water.

The developed model is a system of differential and algebraic equations that describes changes in ion concentrations, cell's volume and transmembrane potential, fluxes through all regulatory elements depending on ion permeability, kinetic parameters of enzymatic and non-enzymatic reactions, concentrations of impermeable ions and osmolarity of the extracellular medium.

Model creation and all numerical calculations based on the model were performed using the COPASI 4.38 simulation environment.

The determination of numerical values for certain kinetic parameters within the reaction rate equation, along with the initial values of intracellular CO_2 and HCO_3^- , involved a search for optimal conditions that yielded the best agreement between the experimental and calculated dependencies of pH_{in} values. This process was carried out during the solution of the systems of equations incorporated in the model [16].

The objective function has the form:

$$O(p) = \sum_j \sum_k (pH_{k,j} - pH_{k,j}(p))^2, \quad (23)$$

$pH_{k,j}$ the experimental value of pH_{in} when measuring j in experiment k and the corresponding calculated value $pH_{k,j}(p)$, p — vector of estimated parameters during modeling [16].

In the work, the search for some parameters of the model is performed using the Evolutionary Programming method. The result of searching for parameters is a set of kinetic parameters characterizing the speed of each process in the system.

Using of the model, families of kinetic curves describing changes in concentrations of substrates and products, fluxes of relevant processes over time for the studied system were obtained.

EXPERIMENTAL STUDIES

The experimental protocol in this study adheres to the principles of biological ethics and has received approval from the Local Ethics Committee of the Vasyl Stus Donetsk National University, Faculty of Chemistry, Biology and Biotechnology (Vinnytsia, Ukraine) [30–32].

The experiments employed freshly obtained blood from donors within a similar age group and of the same gender [30]. Erythrocytes were separated from plasma by

centrifugation and washed three times with Na-phosphate buffer (0.015 M, pH 7.4) containing 0.15 M NaCl (medium 1) [31, 32]. The total hemoglobin content in the acquired packed erythrocytes was assessed through the standardized cyanmethemoglobin method.

Erythrocytes were incubated for 3 hours at a temperature of 20°C:

- in medium 1,
- in medium 1 with the addition of calcium chloride in the amount of 2 mM (simulation of changes in calcium hemostasis). During the experiment, the investigated system was in contact with ambient air.

The hemoglobin content in the studied suspensions was at the level of 3 ± 0.18 mg/ml.

Determination of intracellular pH value

pH_{in} levels were examined in hemolysates of erythrocytes before the initiation of the experiment and subsequently every 20 minutes during the incubation in a buffer solution, with and without Ca^{2+} ions. After certain time intervals, 2 ml of erythrocyte suspension was subjected to centrifugation at 3000 rpm for 1 min. The supernatant was carefully removed; the cells were lysed by adding 1 ml of deionized water. The pH value was measured using a laboratory ionomer using a combined electrode (ESK-10614/7) [16, 18].

The study of the dynamics of acid hemolysis

The study of the dynamics of acid hemolysis was carried out as in [33]. Every 20 min of cell incubation, 2 ml of the suspension was taken. Changes in the optical density of the erythrocyte suspension after adding an equal amount of hemolytic agent (4 mM HCl) were recorded at a wavelength of 650 nm with a time interval of 1 s in automatic mode. As the main kinetic parameters characterizing the structural properties of erythrocytes, the kinetic parameters of hemolysis were used: lag phase time (t_{lag}) and the rate constant of hemoglobin release from the cell (k). A sample without incubation was used as a control.

Study of the activities of Na^+, K^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase

Enzymes activities were determined in the hemolysate of cells, which was added to the medium containing ATP. The composition of the medium for determining Na^+, K^+ -ATPase: 3 mM $MgCl_2$, 125 mM NaCl, 25 mM KCl, 3 mM ATP, 0.5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, ± 0.5 mM ouabain [34]. The composition of the medium for determining Ca^{2+} -ATPase: 3 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 3 mM ATP, 0.06 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, ± 0.9 mM $CaCl_2$.

Samples were incubated for 15 minutes. The reaction was stopped by adding 0.1 ml of cold trichloroacetic acid. A color reaction with ammonium molybdenum was used to determine the content of inorganic phosphate (Pn) [28]. The optical density of the solutions was recorded spectrophotometrically at a wavelength of 590 nm in cuvettes with a thickness of 1 cm. The pH value was determined using a calibration graph constructed for a standard solution of the exact concentration. The activity of Na^+, K^+ -ATPase was evaluated by the difference in the accumulation of Pn in the medium without ouabain and with ouabain. Ca^{2+} -ATPase activity according to the difference in Pn accumulation in Ca^{2+} -containing and Ca^{2+} -free media. The activity of marker enzymes was expressed in μM Pn, formed for 1 minute, related to the amount of protein (Hb) in the sample ($\mu M/min \cdot mg$ Hb).

All experiments were carried out in triplicate. Experimental data were analyzed in the Statistica 8.0 program (StatSoft Inc., USA). Experimental data are presented as $x \pm SE$ (x is the mean, SE is the standard error of mean) [16]. The regression dependence of the studied parameters on the time of the experiment was constructed using the Distance Weighted Least Squares function, $p=0.25$.

RESULTS AND DISCUSSION

pH regulation in erythrocytes (a comparison between experiment and theory)

Changes in intracellular pH (pH_{in}) during incubation of erythrocytes in the absence and presence of Ca^{2+} in the medium are shown in Figure 2 a, b. The calculations (Figure 2 a, b, solid lines) show that, under the chosen parameters, the model accurately describes the obtained experimental data, which indicates its adequacy and the possibility of its application to the analysis of ion homeostasis and prediction.

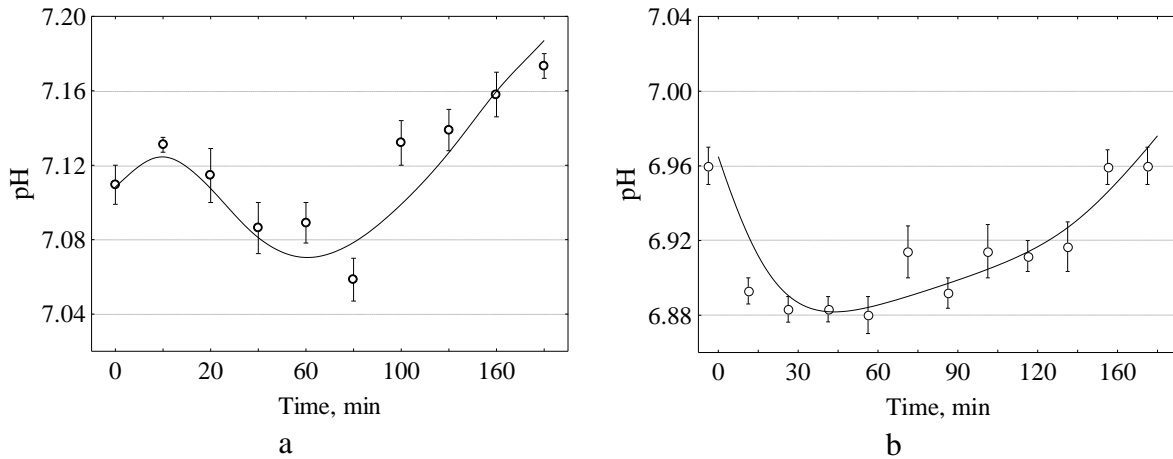


Fig. 2. Changes in pH in erythrocytes during their incubation in Na-phosphate buffer medium (0.015 M, pH 7.4) containing 0.15 M NaCl without Ca^{2+} (a), in the same medium containing 2 mM Ca^{2+} (b). Each point is represented as $x \pm m$ for $n = 5$. The solid line is the calculated dependence of pH in obtained by the model.

As we have shown previously [16], the main contribution to pH regulation is made by the Jacobs-Stewart cycle (reactions 3–5, Table 1) and the combined processes of H^+ buffering and carbonylation (reactions 15–18, Table 1). The intracellular and extracellular activity of HCO_3^- is related to the corresponding activity of H^+ through hydration/dehydration reactions between HCO_3^- and carbon dioxide. This reaction is catalyzed by the enzyme carbonic anhydrase in the intracellular compartment [35] and proceeds at an uncatalyzed rate in the extracellular compartment (reaction 1), which makes extracellular reactions limiting for acid balance across the erythrocyte membrane [36].

Calculation of the flux through the HCO_3^-/Cl^- anion exchanger

The calculated flux through the HCO_3^-/Cl^- anion exchanger (AE1, CDB3) is shown in Fig. 3 a. During incubation in an environment without Ca^{2+} , the outflux of Cl^- from the cell gradually slows down (Fig. 6 a) and the reverse process of exchanging intracellular HCO_3^- for extracellular Cl^- becomes dominant. It is known that the presence of Ca^{2+} in the medium activates AE1 [19]. The mechanism of AE1 activation has not been precisely investigated. It is believed that AE1 can be activated either during the direct interaction of Ca^{2+} with AE1 or with the participation of intracellular enzymes sensitive to an increase in the content of Ca^{2+} in the cell. It is known that CDB3 serves as a binding site for phosphatases and kinases that regulate protein activity [19, 37]. An intracellular rise in Ca^{2+} causes phosphotyrosine phosphatase to dissociate from CDB3, leaving a tyrosine kinase that activates CDB3.

AE1 (CDB3) activation is modeled by us using Michaelis–Menten kinetics, which formally describes the stimulated activation of CDB3. The activation constant ($K_a = 1 \mu M$) was found by us in the process of parameters optimization. Based on the simulation results, as intracellular Ca^{2+} levels rise, the flux through AE1 rapidly undergoes a sign change (with the

reverse flux direction prevailing, as indicated in Table 1) and attains a steady-state level 18 times higher than the flux of HCO_3^- through the carrier in the absence of Ca^{2+} in the incubation medium.

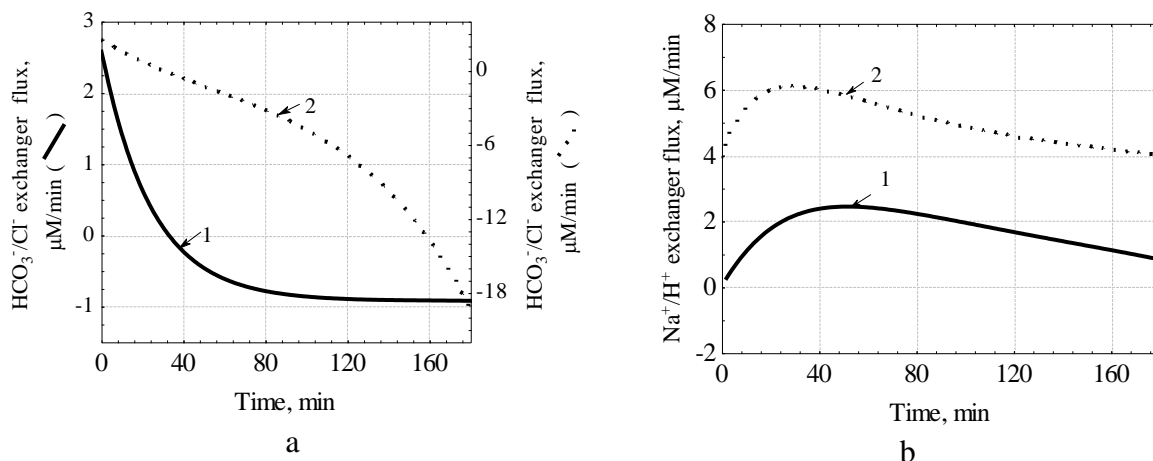


Fig. 3. Fluxes through an $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ anionic exchanger (a) and Na^+/H^+ exchanger (b) in the absence (1) and presence of Ca^{2+} (2) in the incubation medium. Dependencies obtained during mathematical modeling.

The present model incorporates the Na^+/H^+ transport system, a shared feature among eukaryotic cells, as a regulatory element for intracellular $p\text{H}$ and volume control in erythrocytes. The contribution of this carrier has not been considered in existing models. The activity of the Na^+/H^+ exchanger in human erythrocytes is very low [21]. It is believed that the expression of this transporter in mature anucleated erythrocytes may be a remnant of its activity in progenitor stem cells, which at later stages of differentiation receive hemoglobin and an anion exchanger [21] to transport H^+ from the tissue to the lungs. However, it was shown [20] that an increase in cytosolic calcium, a decrease in intracellular $p\text{H}$, and osmotic compression of cells stimulate the influx of Na through this transporter. The sodium gradient across the erythrocyte membrane contributes to the general outflux of protons, Na^+/H^+ exchange creates opportunities to increase intracellular $p\text{H}$ [38]. Na^+/H^+ exchange causes a net influx of Na^+ and efflux of H^+ , displacing H^+ from electrochemical equilibrium within the first minutes of activation. This is possible, even though anion exchange is functional because the rate of Na^+/H^+ exchange approaches the rate of extracellular uncatalyzed hydration/dehydration reactions between HCO_3^- and carbon dioxide. Thus, a large number of protons can be extruded through the Na^+/H^+ exchanger and accumulate in the extracellular compartment before the carbonic acid formed from the accumulated H^+ and HCO_3^- is largely dehydrated to carbon dioxide [35].

The flux through the Na^+/H^+ exchanger of erythrocytes incubated in the absence and presence of Ca^{2+} ions is shown in Figure 3 b. In the presence of Ca^{2+} , the intracellular $p\text{H}$ is lower (Fig. 2 b), so the flux through the Na^+/H^+ exchanger increases. The inverse correlation of the flux through Na^+/H^+ with intracellular $p\text{H}$ shows its contribution to the regulation of the latter.

Na^+ , K^+ - and Ca^{2+} -ATPases

To verify the simulation results, we obtained experimental dependences of Na^+ , K^+ and Ca^{2+} -ATPase activities. Fluxes through these enzymes obtained by model (a) and experiment (b) are shown in Figures 4 and 5. Despite the fact that these indicators have different units of measurement (the flux is determined by the kinetic equation of the model, and the activity is

the change in the concentration of the substrate per unit of time), there is much in common in the nature of the change of these indicators.

According to modern views, the human erythrocyte maintains its volume due to the unbalanced distribution of ions created by the transporter $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ between the intracellular compartment and the extracellular environment [1, 23], if changes in the permeability of the cell membrane are relatively small.

The kinetic behavior of $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ is very complex, and has been studied in detail, and many rate equations describing this behavior are proposed in the literature. In the model, we use the kinetic rate equation [18], that considers additional regulation of $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ due to changes in ATP concentration, which are responsible for changes in the adenylate pool. The value of the adenylate pool depends on the ratio of ATP to AMP, which, in turn, depends on the rate of ATP consumption by $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ [1, 23]. The importance of ATP for Na^+K^+ - and $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ functioning is indicated by the fact that ATP is located in a structurally isolated compartment formed by proteins of the cytoskeleton of erythrocytes, which is the main source of the latter for both enzymes [39]. As shown [23], this regulation provides a good stabilization of intracellular concentrations of ions and, accordingly, the volume of erythrocytes.

We tried to model the changes in the adenylate pool with reactions 27–30 (Table 1), however, using only the adenylate kinase reaction (reaction 28, Table 1) turned out to be insufficient, since the ATP content is regulated by many processes. Previously, we investigated in detail the changes in ATP content in erythrocytes incubated in medium 1 without glucose [28]. To reproduce the similar nature of changes in fluxes through $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ with experimental data, in the model we set the dependence of the change in ATP concentration on the incubation time, which was obtained for the experimental data.

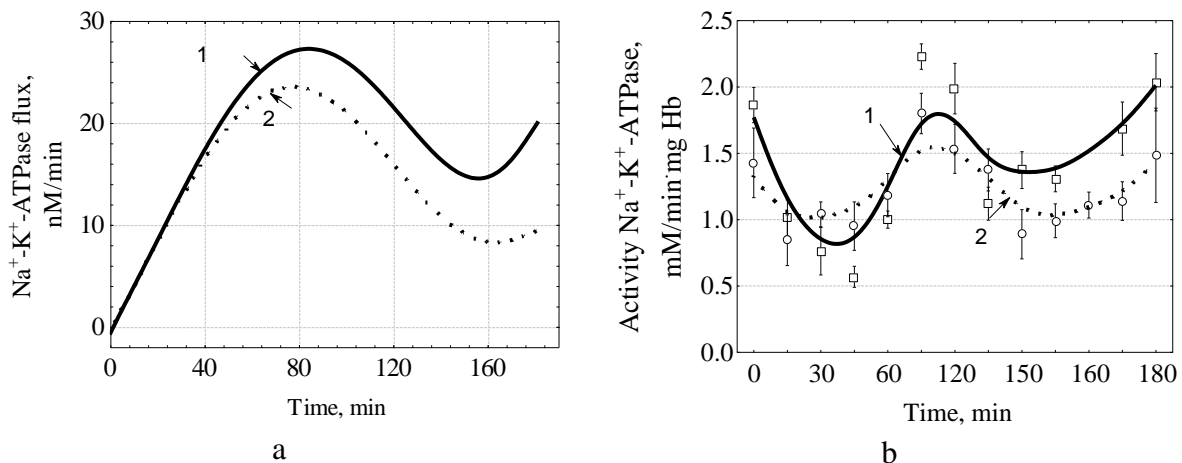


Fig. 4. Fluxes through Na^+ , K^+ -dependent ATPase obtained during simulation (a). Experimental dependences of Na^+ , K^+ -ATPase activity (b). 1 — Ca^{2+} is absent, 2 — 2 mM Ca^{2+} in the incubation medium

Based on the information about the inactivation of $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ by high concentrations of intracellular Ca^{2+} , the kinetic equation for $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ was modified (Equation 19, Research Materials and Methods). In the model, we use the inactivation constant (K_I) for Ca^{2+} ions equals 0.398 μM .

According to literature [25], K_I is within 1–10 μM . According to [25], at least part of the inhibitory effects of the internal calcium of $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ is secondary to calcium-induced changes in the level of ATP in the cell, which arise because of $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ -mediated ATP hydrolysis, which exceeds, at least temporarily, the rate of glycolytic production of ATP. In

this model, we believe that the level of ATP in erythrocytes does not depend on Ca in the incubation medium. It is known that the activation of PMCA leads to a rapid depletion of ATP [11], so this effect is compensated by a smaller value of K_I .

The mechanism of Ca^{2+} ion extrusion is mediated by Ca^{2+} -ATPase (PMCA). The presence of the B-splice isoform of PMCA1 was shown for the membrane of human erythrocytes [40]. The latter contains a Ca^{2+} -calmodulin-binding domain, phosphorylation sites and a PDZ-binding domain, which is a docking terminal for a number of proteins [40]. An increase in intracellular free Ca^{2+} is sensed by PMCA and occurs in response to the interaction of the Ca^{2+} calmodulin complex with the C-terminus of the enzyme. In Ca^{2+} -loaded erythrocytes, the limiting factor of PMCA transport capacity is the availability of ATP.

The activity of Ca^{2+} -ATPases (Fig. 5) significantly depends on Ca^{2+} . According to the simulation results, the flux through this enzyme is an order of magnitude lower in the absence of Ca^{2+} (Fig. 5 a). In the absence of Ca^{2+} , an increase in flux (calculation) and enzyme activity (experiment, Fig. 5 b) is observed at the beginning of incubation. It is possible that Ca^{2+} ions appear in the cytosol due to a decrease in intracellular pH and increased dissociation of the Ca^{2+} -calmodulin complex.

In the presence of Ca^{2+} , we detect cooperative Ca^{2+} effects manifestations. Since the exact kinetic equation for Ca^{2+} -ATPase is unknown, we propose a kinetic equation that considers the literature data regarding the direct effect of Ca^{2+} on the enzyme (we increase the degree of cooperativity to 4). We also consider the cooperative effects of Ca^{2+} binding to calmodulin. This made it possible to obtain similar time dependences for the flux and activity of this enzyme. The decrease in Ca^{2+} -ATPase activity at the end of the experiment is associated with a decrease in ATP content.

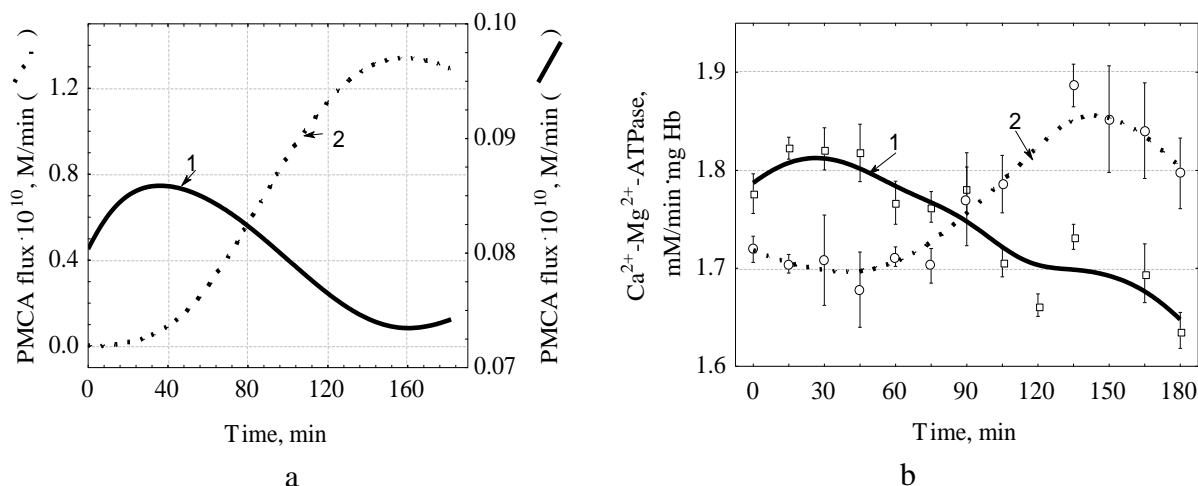


Fig. 5. Fluxes through Ca^{2+} -ATPase obtained during simulation (a). Experimental dependencies of Ca^{2+} -ATPase activity (b). 1 — Ca^{2+} is absent, 2 — 2 mM Ca^{2+} in the incubation medium.

Ionic homeostasis

The results of calculations of changes in the content of K^+ , Na^+ , Ca^{2+} and Cl^- in cells during incubation in saline solutions, in the absence (1) and presence (2) of Ca^{2+} ions are shown in Figure 6 a, b. Under the conditions of incubation in a medium without glucose and calcium (1), cells lose K^+ and Cl^- ions and increase the content of Na^+ , but the influx of Na^+ ions is very small (0.4 mM after 3 hours of incubation). Incubation with Ca^{2+} increases the intracellular Ca^{2+} content due to a sudden increase in calcium permeability ($P_{\text{Ca}^{2+}}$) caused by a steep inward gradient. It is believed that the influx of Ca^{2+} occurs through an electrodiffusion conductive pathway [40, 41]. It is known that an increase in intracellular Ca^{2+} leads to

activation of Gardos channel (known as KCa3.1 or KCNN4 channels [42]) and outflux of K^+ from cells. The calculated flux through the Gardos channel for erythrocytes incubated in the presence of Ca^{2+} ions is shown in Figure 8 b. The outflux of K^+ ions occurs in parallel with the outflux of Cl^- and osmotically bound water. The result of these processes is a decrease in cell volume (Fig. 7 a). However, based on the simulation results, the content of K^+ ions in erythrocytes under conditions of Ca^{2+} activation remains higher than when the Gardos channel is not activated.

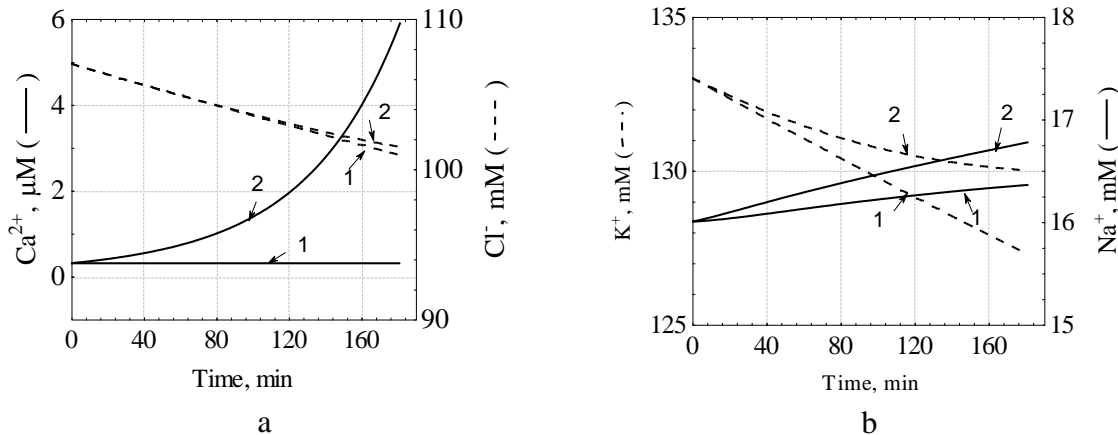


Fig. 6. Changes in the content of Ca^{2+} and Cl^- (a) and K^+ , Na^+ (b) ions in erythrocytes during 3 hours of incubation in saline solutions in the absence (1) and presence (2) of Ca^{2+} ions.

According to the calculations, the activation of the Gardos channel leads to a decrease in the membrane potential (Fig. 7 a), which results in an increase in electrodiffusion fluxes into the cell, especially for Na^+ ions (Fig. 7 b). A significant part of passive ion fluxes occurs by the mechanism of electrodiffusion. Under physiological conditions, full experimental activation of Gardos channels induces a massive outward flux of K^+ and membrane hyperpolarization. A shift in the membrane potential creates a driving force for the extrusion of ions through conductive pathways. In this regard, the cell volume decreases equally during incubation without and in the presence of Ca^{2+} ions. Cell volume loss upon Gardos channel activation is largely limited by the rate of Cl^- efflux after K^+ efflux [41].

Na^+ , K^+ , $2Cl^-$, K^+ , Cl^- -cotransport

Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ -cotransporter is a member of the cation-chloride cotransporter (CCC) superfamily. It moves one Na^+ ion, one K^+ , and two Cl^- ions in one direction across the cell membrane in an electroneutral fashion. The operation of the transporter does not generate a current and changes in the transmembrane potential do not affect the flows mediated by the cotransporter [43]. A cotransporter can work in either direction, moving ions into or out of cells depending on chemical gradients. When the carrier is in equilibrium, the fraction: $[Na^+]_{out} \cdot [K^+]_{out} \cdot [Cl^-]_{out}^2 / [Na^+]_{in} \cdot [K^+]_{in} \cdot [Cl^-]_{in}^2 = 1$.

If the quotient is >1 , activation of the transporter causes ions to enter the cell (positive flux value), and if it is <1 , they leave of cell (negative flux value). The calculated flux through the Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ -transporter of erythrocytes incubated without Ca^{2+} and in the presence of Ca^{2+} ions are shown in Figure 8 a. Since the incubation medium did not contain K^+ ions, the flux of ions out of the cell takes place under the experimental conditions, which becomes slower over time. A negative correlation was shown between the maximum speed of cotransport and the potassium content in the cells, which indicates that the erythrocyte transporter can work in the efflux mode in vivo [43]. Activation of the Gardos channel by

Ca^{2+} ions (Fig. 8 b) creates an additional flux of K^+ from the cell, therefore, under these conditions, the flux through the Na^+ , K^+ , 2Cl^- -transporter reaches equilibrium faster (Fig. 8 a, dependence 2).

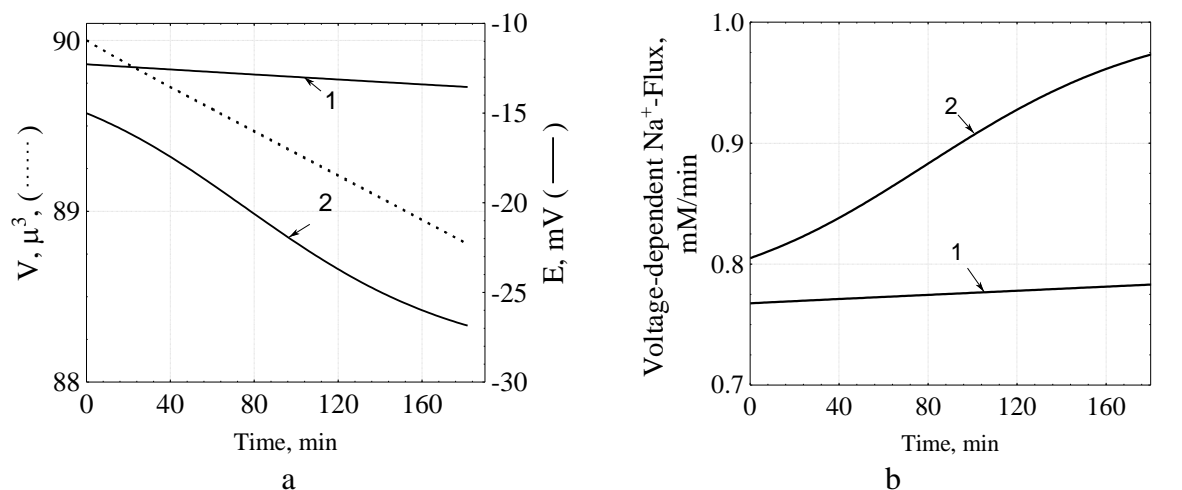


Fig. 7. Calculation of changes in volume (V) and membrane potential (E) of erythrocytes (a), electrodiffusion flux for Na^+ ions (b) during incubation in the absence (1) and presence (2) of Ca^{2+} ions.

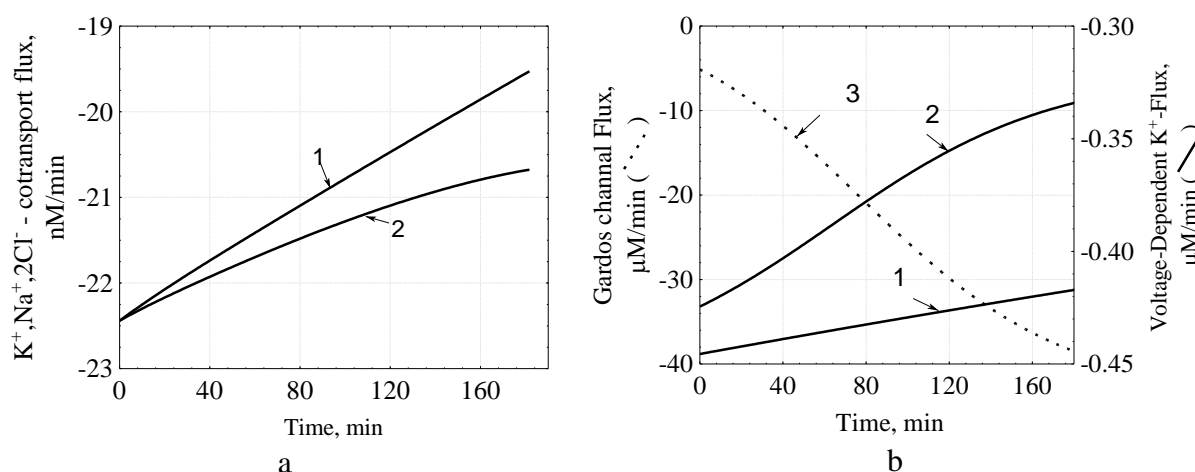


Fig. 8. The flux through the Na^+ , K^+ , 2Cl^- -cotransporter (a), electrodiffusion flux for K^+ ions (b) in erythrocytes during 3 hours of incubation in saline solutions in the absence (1) and presence (2) of ions Ca^{2+} . The flow through the Gardos channel (b, dependence 3) is modeled only for erythrocytes activated by Ca^{2+} ions.

Analysis of erythrocytes acid resistance

Next, we apply the simulation results to the analysis of acid resistance data of erythrocytes incubated in media of the same composition. The change in the time of the lag phase of hemolysis and the rate constant of hemolysis are shown in Fig. 9. According to experimental data, under the conditions of the presence of Ca^{2+} ions in the incubation medium, the time of the lag phase of hemolysis is reduced, but this reduction is reliably smaller compared to erythrocytes incubated in a medium without Ca^{2+} .

The entry of H^+ into the erythrocyte takes place with the participation of the Jacobs-Stewart cycle. The passage of H^+ through the anion exchanger is the limiting stage of hemolysis. Lysis of erythrocytes in an acidic environment is caused by denaturation and subsequent aggregation of membrane proteins [33]. As we show, during incubation, the volume of erythrocytes decreases, and the time of the lag phase is shortened compared to the

control, since for the same amount of transported H^+ , their content in dehydrated cells will be higher. It is known that dehydrated cells have increased fragility and are more prone to hemolysis [4]. All the listed processes are the cause of both the reduction of the lag phase and the increase in the rate of hemolysis.

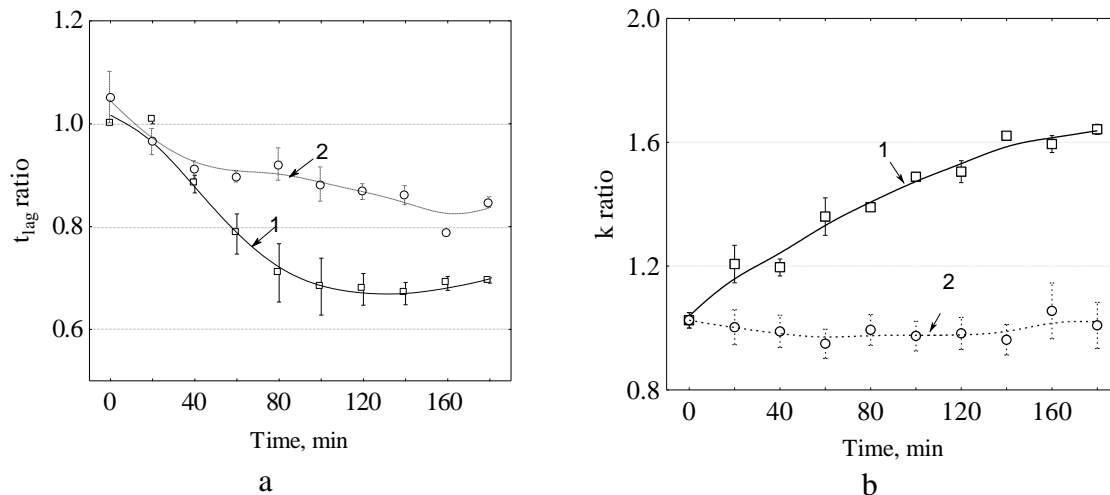


Fig. 9. Changes in the time of the lag phase of hemolysis (a) and the hemolysis rate constant (b) of erythrocytes during 3 hours of incubation in saline solutions, in the absence (1) and presence (2) of Ca^{2+} ions relative to the control level. Indicators in freshly isolated erythrocytes before the start of incubation were taken as the control level.

In erythrocytes incubated in the presence of Ca^{2+} ions, Ca^{2+} -ATPase is activated, intracellular pH decreases and Na^+/H^+ exchange is activated. High activity of the Na^+/H^+ exchanger can remove a certain amount of H^+ from the cell, which will reduce the efficiency of hemoglobin denaturation, and subsequently, less reduction of the lag phase is observed together with a decrease in the hemolysis rate constant.

However, it cannot be ignored that the effects of increasing the content of intracellular Ca^{2+} are more extensive. Increased intracellular Ca^{2+} activates Ca^{2+} -sensitive proteases, cross-linking of the cytoskeleton and formation of heme radicals. Therefore, Ca^{2+} homeostasis is an integrative function, and all processes regulating the content Ca_{in}^{2+} and their interactions must be taken into account when considering the activation of erythrocytes by Ca^{2+} ions.

CONCLUSIONS

The developed model is a tool for the quantitative analysis of the homeostasis of ions important for the regulation of intracellular pH and erythrocyte volume. The result of calculations based on the model are the time dependences of fluxes, concentrations of ions and metabolites, which allow to reproduction of the behavior of the metabolic system after disturbance in the conditions of the in vitro experiment and to establish the mechanisms of cell volume recovery.

We demonstrate that cation homeostasis in erythrocytes is primarily sustained by the active transport of Na^+ and K^+ through Na^+ , K^+ -ATPase, supplemented by comparatively lower passive permeability through alternative transport pathways. We show that with the presence of Ca^{2+} ions in the incubation medium and the activation of potassium release through Gardos channels, the cell volume is stabilized due to a change in the transmembrane potential and activation of electrodiffusion ion fluxes. We model the operation of the Na^+/H^+ exchanger and show its role in the presence of Ca^{2+} -ATPase activation. We show that a decrease in the acid resistance of erythrocytes during their incubation in a saline solution is

associated with a decrease in their cell volume and an increase in the acid resistance of erythrocytes during their incubation in the presence of Ca^{2+} ions is associated with the activation of the Na^+/H^+ exchanger.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

Authors' ORCID ID

O. I. Dotsenko <https://orcid.org/0000-0003-3946-3515>

G. V. Taradina <https://orcid.org/0000-0001-8931-8370>

REFERENCES

- Ataullakhanov FI, Martinov MV, Shi Q, Vitvitsky VM. Significance of two transmembrane ion gradients for human erythrocyte volume stabilization. *PLoS One*. 2022 Dec 21;17(12):e0272675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272675>
- Svetina S. Theoretical bases for the role of red blood cell shape in the regulation of its volume. *Front Physiol*. 2020 Jun 9;11:544. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00544>
- Glogowska E, Gallagher PG. Disorders of erythrocyte volume homeostasis. *Int J Lab Hematol*. 2015 May;37 Suppl 1:85–91. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12357>
- Gallagher PG. Disorders of erythrocyte hydration. *Blood*. 2017 Dec 21;130(25):2699–708. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-590810>
- Badens C, Guizouarn H. Advances in understanding the pathogenesis of the red cell volume disorders. *Br J Haematol*. 2016 Sep;174(5):674–85. <https://doi.org/10.1111/bjh.14197>
- Flatt JF, Bruce LJ. The molecular basis for altered cation permeability in hereditary stomatocytic human red blood cells. *Front Physiol*. 2018;9:367. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00367>
- Shatrova A, Burova E, Pugovkina N, Domnina A, Nikolsky N, Marakhova I. Monovalent ions and stress-induced senescence in human mesenchymal endometrial stem/stromal cells. *Sci Rep*. 2022;12:11194. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15490-2>
- Kaestner L, Bogdanova A, Egee S. Calcium channels and calcium-regulated channels in human red blood Cells. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1131:625–48. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_25
- Fermo E, Bogdanova A, Petkova-Kirova P, Zaninoni A, Marcello AP, Makhro A, et al. 'Gardos Channelopathy': a variant of hereditary Stomatocytosis with complex molecular regulation. *Sci Rep*. 2017 May 11;7(1):1744. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01591-w>
- Svetina S, Švelc Kebe T, Božič B. A model of Piezo1-based regulation of red blood cell volume. *Biophys J*. 2019 Jan 8;116(1):151–64. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.11.3130>
- Ataullakhanov FI, Korunova NO, Spiridonov IS, Pivovarov IO, Kalyagina NV, Martinov MV. How erythrocyte volume is regulated, or what mathematical models can and cannot do for biology. *Biochem. Moscow Suppl. Ser.* 2009;A3:101–15. <https://doi.org/10.1134/S1990747809020019>
- Brumen M, Heinrich R. A metabolic osmotic model of human erythrocytes. *Biosystems*. 1984;7(2):155–69. [https://doi.org/10.1016/0303-2647\(84\)90006-6](https://doi.org/10.1016/0303-2647(84)90006-6)
- Rogers S, Lew VL. PIEZO1 and the mechanism of the long circulatory longevity of human red blood cells. *PLoS Comput Biol*. 2021 Mar 10;17(3):e1008496. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008496>
- Lew VL. The circulatory dynamics of human red blood cell homeostasis: Oxy-deoxy and PIEZO1-triggered changes. *Biophys J*. 2023 Feb 7;122(3):484–495. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.12.038>
- Yurinskaya VE, Moshkov AV, Marakhova II, Vereninov AA. Unidirectional fluxes of monovalent ions in human erythrocytes compared with lymphoid U937 cells: Transient processes after stopping the sodium pump and in response to osmotic challenge. *PLoS One*. 2023;18(5):e0285185. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0285185>
- Dotsenko OI. The whole-cell kinetic metabolic model of the pH regulation mechanisms in human erythrocytes. *Regul. Mech. Biosyst*. 2022;13:272–80. <https://doi.org/10.15421/022235>
- Mulquiney PJ., Kuchel PW. Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations: equations and parameter refinement. *Biochem J*. 1999 Sep 15;342(3):581–96. <https://doi.org/10.1042/bj3420581>
- Nishino T, Yachie-Kinoshita A, Hirayama A, Soga T, Suematsu M, Tomita M. Dynamic simulation and metabolome analysis of long-term erythrocyte storage in adenine-guanosine solution. *PLoS One*. 2013 Aug 16;8(8):e71060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071060>

19. Yastrebova ES, Konokhova AI, Strokotov DI, Karpenko AA, Maltsev VP, Chernyshev AV. Proposed Dynamics of CDB3 Activation in Human Erythrocytes by Nifedipine Studied with Scanning Flow Cytometry. *Cytometry A*. 2019 Dec;95(12):1275–84. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23918>
20. Pontremoli R, Zerbini G, Rivera A, Canessa M. Insulin activation of red blood cell Na^+/H^+ exchange decreases the affinity of sodium sites. *Kidney Int*. 1994 Aug;46(2):365–75. <https://doi.org/10.1038/ki.1994.283>
21. Semplicini A, Spalvins A, Canessa M. Kinetics and stoichiometry of the human red cell Na^+/H^+ exchanger. *J Membr Biol*. 1989 Mar;107(3):219–28. <https://doi.org/10.1007/BF01871937>
22. Bazanovas AN, Evstifeev AI, Khaiboullina SF, Sadreev II, Skorinkin AI, Kotov NV. Erythrocyte: A systems model of the control of aggregation and deformability. *Biosystems*. 2015 May;131:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2015.03.003>
23. Martinov MV, Vitvitsky VM, Ataullakhanov FI. Volume stabilization in human erythrocytes: combined effects of Ca^{2+} -dependent potassium channels and adenylate metabolism. *Biophys Chem*. 1999 Aug 30;80(3):199–215. [https://doi.org/10.1016/s0301-4622\(99\)00079-4](https://doi.org/10.1016/s0301-4622(99)00079-4)
24. Yang YC, Yingst DR. Effects of intracellular free Ca and rate of Ca influx on the Ca pump. *Am J Physiol*. 1989 Jun;256(6 Pt 1):C1138–44. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1989.256.6.C1138>
25. Brown AM, Lew VL. The effect of intracellular calcium on the sodium pump of human red cells. *J Physiol*. 1983 Oct;343:455–93. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1983.sp014904>
26. Dolan AT, Diamond SL. Systems modeling of Ca^{2+} homeostasis and mobilization in platelets mediated by IP_3 and store-operated Ca^{2+} entry. *Biophys J*. 2014 May 6;106(9):2049–60. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.03.028>
27. Iida S, Potter JD. Calcium binding to calmodulin. Cooperativity of the calcium-binding sites. *J Biochem*. 1986 Jun;99(6):1765–72. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135654>
28. Dotsenko OI, Troshchynskaya YA. Role of AMP catabolism enzymes in the energetic status of erythrocytes under conditions of glucose depletion. *Biosystems Diversity*. 2014;22(1):46–52. (In Russian). <https://doi.org/10.15421/011406>
29. Mendes P, Hoops S, Sahle S, Gauges R, Dada J, Kummer U. Computational modeling of biochemical networks using COPASI. *Methods Mol Biol*. 2009;500:17–59. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-525-1_2
30. Dotsenko OI, Mykutska IV, Taradina GV, Boiarska ZO. Potential role of cytoplasmic protein binding to erythrocyte membrane in counteracting oxidative and metabolic stress. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2020;11(3):455–62. <https://doi.org/10.15421/022070>
31. Dotsenko OI, Mischenko AM, Taradina GV. Vibration influence on the O_2 -dependent processes activity in human erythrocytes. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2021;12(3):452–8. <https://doi.org/10.15421/022162>
32. Dotsenko OI, Taradina GV, Mischenko AM. Peroxidase activity of erythrocytes hemoglobin under action of low-frequency vibration. *Studia Biologica*. 2021;15(4):3–16. <https://doi.org/10.30970/sbi.1504.666>
33. Dotsenko OI, Mischenko A.M. Influence of low-frequency vibration on the erythrocytes acid resistance. *Biosystems Diversity*. 2011;19(1):22–30 (In Russian). <https://doi.org/10.15421/011104>
34. Kherd AA, Helmi N, Balamash KS, Kumosani TA, Al-Ghamdi SA, Qari M, et al. Changes in erythrocyte ATPase activity under different pathological conditions. *Afr Health Sci*. 2017 Dec;17(4):1204–10. <https://doi.org/10.4314/ahs.v17i4.31>
35. Nikinmaa M. Gas transport. In: Bernhardt I, Ellory JC, editors. *Red cell membrane transport in health and disease*. Berlin, Germany: Springer; 2003. p. 489–509. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-05181-8>
36. Geers C, Gros G. Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle. *Physiol Rev*. 2000 Apr;80(2):681–715. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.2.681>
37. Ugurel E, Goksel E, Cilek N, Kaga E, Yalcin O. Proteomic analysis of the role of the adenylyl cyclase-camp pathway in red blood cell mechanical responses. *Cells*. 2022 Apr 6;11(7):1250. <https://doi.org/10.3390/cells11071250>
38. Chi Y, Mo S, Mota de Freitas D. Na^+/H^+ and Na^+/Li^+ exchange are mediated by the same membrane transport protein in human red blood cells: an NMR investigation. *Biochemistry*. 1996 Sep 24;35(38):12433–42. <https://doi.org/10.1021/bi960814l>
39. Chu H, Puchulu-Campanella E, Galan JA, Tao WA, Low PS, Hoffman JF. Identification of cytoskeletal elements enclosing the ATP pools that fuel human red blood cell membrane cation pumps. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012 Jul 31;109(31):12794–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209014109>
40. Bogdanova A, Makhro A, Wang J, Lipp P, Kaestner L. Calcium in red blood cells – A perilous balance. *Int J Mol Sci*. 2013;14(5):9848–9872. <https://doi.org/10.3390/ijms14059848>

41. Thomas SL, Bouyer G, Cueff A, Egée S, Glogowska E, Ollivaux C. Ion channels in human red blood cell membrane: Actors or relics? *Blood Cells Mol Dis.* 2011 Apr 15;46(4):261–5. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2011.02.007>
42. Föller M, Lang F. Ion transport in eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Jul 8;8:597. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00597>
43. Flatman PW. Regulation of Na-K-2Cl cotransport in red cells. In: Lauf PK, Adragna NC, editors. *Cell Volume and Signaling. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 559. Springer, Boston, MA; 2004. P. 77–88. https://doi.org/10.1007/0-387-23752-6_7

ІОННИЙ ГОМЕОСТАЗ В РЕГУЛЮВАННІ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО рН ТА ОБ'ЄМУ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ

О. І. Доценко*, Г. В. Тарадіна

Донецький національний університет імені Василя Стуса, вул. 600-річчя, 21, Вінниця, 21021, Україна

**e-mail: o.dotsenko@donnu.edu.ua*

Надійшла до редакції 17 вересня 2023 р. Переглянута 4 березня 2024 р.

Прийнята до друку 20 березня 2024 р.

Актуальність. Підтримка клітинного об'єму шляхом регулювання вмісту води та іонів має вирішальне значення для виживання і функціональної повноцінності еритроцитів людини. Разом з тим, клітини є неймовірно складними системами з численними, часто конкуруючими реакціями, що відбуваються одночасно. Тому, прогнозувати загальну поведінку системи або отримати нове розуміння того, як взаємодіють підкомпоненти системи, достатньо складно без застосування методів математичного моделювання.

Мета роботи. Створення математичної метаболічної моделі іонного гомеостазу еритроцитів для дослідження механізмів стабілізації об'єму еритроцитів і внутрішньоклітинного рН в експериментах *in vitro*.

Матеріали і методи. Математична модель створена з використанням загальних підходів до моделювання клітинного метаболізму, які базуються на системах звичайних диференціальних рівнянь, що описують метаболічні реакції, пасивні й активні потоки іонів. Для розробки моделі та розрахунків за моделлю використано середовище моделювання COPASI 4.38. Для перевірки моделі використовували зміни внутрішньоклітинного рН, активності Na^+/K^+ -АТФази та Ca^{2+} -АТФази еритроцитів донора, інкубованих у сольових розчинах за відсутності та присутності іонів Ca^{2+} .

Результати. Створена кінетична модель іонного гомеостазу еритроцитів. З використанням реалістичних параметрів системи розраховані зміни у часі об'єму клітини, концентрацій і потоків метаболітів та іонів, трансмембранного потенціалу. Результати моделювання використані для аналізу причин змінення стійкості до кислотного гемолізу еритроцитів за умов їх інкубування у сольових розчинах різного складу.

Висновки. Ми показуємо, що катіонний гомеостаз в еритроцитах підтримується в основному активним рухом Na^+ і K^+ через Na^+, K^+ -АТФазу у поєднанні з відносно нижчою пасивною проникністю через інші транспортні шляхи. За присутності іонів Ca^{2+} і активації виходу калію через Гардос-канали, об'єм клітин стабілізується за рахунок змінення трансмембранного потенціалу і активації електродифузійних потоків іонів. Показано, що зниження кислотної резистентності еритроцитів при їх інкубуванні у сольовому розчині зв'язано зі зменшенням об'єму клітин, а підвищення кислотної резистентності клітин при їх інкубуванні в присутності іонів Ca^{2+} — з активацією Na^+/H^+ -обмінника.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: математичне метаболічне моделювання; транспорт іонів; осмотичні процеси; електрохімічний мембранний потенціал; проникність іонів; Na^+/K^+ -АТФазе; Ca^{2+} -АТФазе; кальмодулін; білок смуги 3 (AE1); Гардос-канали.

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-51-02>

UDC 616-72+616.8-089

DETERMINING THE RELATIONSHIP BETWEEN THE SPEED OF MOTION OF LARGE PERMANENT MAGNETS AND THE TRAJECTORY OF IMPLANTS IN MAGNETIC STEREOTAXIC SYSTEMS

J. Hankun^{ORCID}, O. G. Avrunin^{ORCID}

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

e-mail: 1350829683@qq.com, oleh.avrunin@nure.ua

Submitted November 9, 2023; Revised January 17, 2024;

Accepted March 20, 2024

Background: The magnetic stereotaxic system is a new type of neurosurgical intervention that is in the experimental stage. This method allows the implant to be controlled non-contact by an external magnetic field, allowing it to move along an arbitrary trajectory to a lesion located in a deep structure of the brain tissue to deliver hyperthermia to the lesion site or deliver medication through a catheter. In previous studies, we have found that it is completely feasible for the implant to move along the arc trajectory, so we need to determine the relationship between the movement speed of the large permanent magnet that constitutes the external magnetic field and the implant movement trajectory, so as to control the implant movement more precisely.

Objectives: Investigate the effect of the speed of motion of large permanent magnets, which constitute the external magnetic field, on the trajectory of implants (small permanent magnets).

Materials and Methods: Firstly, three sets of computer simulation experiments were conducted, each group of experiments only changed the operating speed of large permanent magnets, and the changes in the trajectories of small and medium-sized permanent magnets in the three sets of experiments were observed and compared. After that practical experiments are carried out to validate the results of the computer simulation experiments by means of the slide rail system controlled by an Arduino microcontroller.

Results: The relationship between the moving speed of the large permanent magnet and the trajectory of the small permanent magnet was determined by simulation experiments, and the changes in the strength of the surrounding magnetic field during the movement of the implant were calculated. Afterwards, it was verified by practical experiments. The faster the large permanent magnet moves, the shorter the distance that the small permanent magnet moves along the linear trajectory, and the longer the distance that moves along the arc trajectory; The slower the large permanent magnet moves, the longer the small permanent magnet travels along a straight trajectory and the shorter the distance it travels along an arc trajectory.

Conclusions: In this research, we have determined the relationship between the running speed of the large permanent magnet that constitutes the external magnetic field and the implant's moving trajectory by combining computer simulation experiments with practical experiments, i.e., the faster the large permanent magnet moves, the shorter the implant's moving distance is along a straight line trajectory, and the longer the moving distance is along a curved line trajectory. This means that we can control the distance and steering angle of the implant more accurately, which makes the study of the magnetic stereotaxic system further, and lays a theoretical foundation and provides a large amount of experimental data for the implant to be able to reach the diseased site located in the deep structure of the brain tissue along complex pathways in neurosurgical interventions with the participation of the magnetic stereotaxic system.

In cites: Hankun J, Avrunin OG. Determining the relationship between the speed of motion of large permanent magnets and the trajectory of implants in magnetic stereotaxic systems. Biophysical Bulletin. 2024;51:26–38. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-51-02>

Open Access. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

KEY WORDS: human health; magnetic field; COMSOL software; permanent magnets; force analysis; Arduino; microcontrollers.

Magnetic stereotaxic system [1–3] is a new experimental high-precision neurosurgical method. In traditional high-precision neurosurgery, stereotaxic devices [4–6] are often used to guide directly surgical intervention by mechanically controlled surgical instruments. However, due to the fact that mechanically controlled surgical instruments can only move along a straight trajectory, the surgical access is limited, which is more harmful to the surrounding tissues on the movement path of the surgical instruments, and it is difficult to reach the deep structure of the brain tissue. As a result, it is difficult to effectively treat brainstem tumors and many extrapyramidal nervous system disorders.

In contrast to traditional surgical methods, the magnetic stereotaxis system consists of a computer-controlled, variable external magnetic field and an implant connected by a catheter. The idea of this method is to first probe the catheter-connected micro-magnetic implant into the brain tissue, and then control the external magnetic field changes through the computer, and guide the implant to move to the lesion located in the deep structure of the brain tissue along the pre-calculated trajectory, so as to provide hyperthermia to the lesion site or deliver drugs through the catheter.

The advantage of this method is that the patient's brain tissue can be scanned by CT and MRI to build an accurate model [7, 8], non-contact control allows the implant to reach almost any position in the brain along any trajectory, less harmful to the surrounding tissues on the path. Therefore, the magnetic stereotaxic system is one of the most promising methods for neurosurgical intervention of brain tissue under current conditions, and at the same time one of the least invasive.

The purpose of this research was to investigate the effect of the speed of motion of large permanent magnets, which constitute the external magnetic field, on the trajectory of implants (small permanent magnets) in the magnetic stereotaxic system. In order to achieve this, we designed a new experimental protocol [9, 10].

MATERIAL AND METHODS

Experimental design: Use two cylindrical large permanent magnets [11–13] to form an external magnetic field, small permanent magnets as implants, and at the same time construct a cylindrical shape with a diameter of 0.1 [m] as a boundary, according to the previous experimental results, the first large permanent magnet is located on the boundary side, the second large permanent magnet is located on the adjacent other side, when the first large permanent magnet runs 0.05 [m], the second large permanent magnet is started, and the two large permanent magnets have the same speed. We set three different sets of large permanent magnet moving speeds, compare the moving distance and angle of small permanent magnets at three speeds, and draw conclusions.

First of all, we carried out computer simulation experiments in COMSOL 6.0 software [14, 15].

Computer simulation experiments

Experimental Objective: To explore the influence of the running speed of large permanent magnets on the motion trajectory of small permanent magnets.

Experimental design: Establish a three-dimensional spatial coordinate system, set small permanent magnets in the center position, set boundary conditions, and set large permanent magnets on the +X and +Y axes respectively. Three sets of experiments were carried out, each of which only changed the running speed of large permanent magnets, and the changes

of the movement trajectories of small and medium-sized permanent magnets in the three groups of experiments were observed and compared.

Parameter settings:

Large permanent magnet radius: $R_{ion} = 50$ [mm] = 0.05 [m];

Large permanent magnet height: $H_{ion} = 10$ [mm] = 0.01 [m];

Small permanent magnet radius: $r_{NFB} = 0.5$ [mm] = 0.0005 [m];

Small permanent magnet height: $h_{NFB} = 2$ [mm] = 0.002 [m];

The distance that a small permanent magnet travels along a straight trajectory: $0[m] < ds < 0.1$ [m].

The angle between the small permanent magnet and the +X axis after moving along the arc trajectory: $0^\circ < n < 90^\circ$.

Distance from a large permanent magnet on the +X-axis to the center of three-dimensional space: 0.11 [m] $< dis_{ion} < 0.41$ [m], That is, the range of movement of large permanent magnets in the X-axis is 0.11–0.41 [m];

Distance from a large permanent magnet on the +Y-axis to the center of three-dimensional space: 0.11 [m] $< dis_{ion1} < 0.41$ [m], that is, the range of movement of large permanent magnets in the Y-axis is 0.11–0.41 [m];

Diameter of cylindrical container: $d_{con} = 200$ [mm] = 0.2 [m];

Cylindrical container height: $h_{con} = 500$ [mm] = 0.5 [m];

Before the simulation experiment, we actually measured the existing rail system and used the code “delayMicroseconds” to control the speed of the slide rail, and the results were as follows:

Slide rail system running distance: $S = 0.3$ [m];

DelayMicroseconds (1200), the running time of the slide rail is 57.3 [s], and the speed of the slide rail is 0.0052 [m/s];

DelayMicroseconds (800), the running time of the slide rail is 38.16 [s], and the speed of the slide rail is 0.0079 [m/s];

DelayMicroseconds (400), the running time of the slide rail is 18.7 [s], and the speed of the slide rail is 0.016 [m/s];

Simulation experiment material property settings:

Conductivity $\sigma = 1/1.4$ [S/m];

Relative permittivity $\epsilon_r = 1$ [1];

Recovery permeability $\mu_{rec} = 1.02$;

Residual flux density norm $B_r = 1.3$ [T];

The above parameters can be changed according to the actual material data. Based on the above parameters, the geometry is established in COMSOL, as shown in Fig. 1.

In this simulation experiment, we choose a permanent magnet as the external magnetic field, so we need to select “mfnc” (magnetic field, no current) in the software, and select the magnetization model — residual flux density in constitutive relations B-H, and the required equation is as follows:

$$B = \mu_0 \mu_{rec} H + B_r \quad (1)$$

$$B_r = \|B_r\| \frac{e}{\|e\|} \quad (2)$$

Where H is the magnetic field strength, B is the magnetic flux density, μ_0 is the vacuum permeability, μ_{rec} is recoil permeability, B_r is residual flux density, $\|B_r\|$ is residual flux density norm, e is residual flux direction.

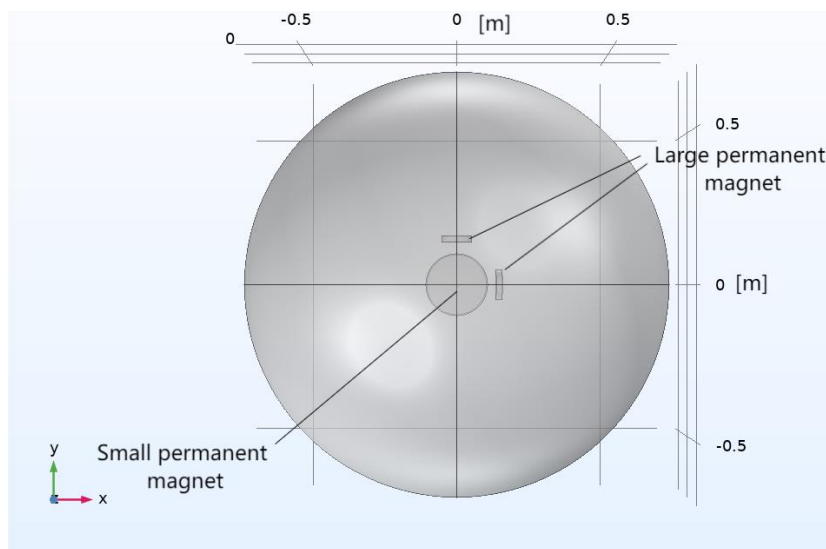


Fig 1. Geometric models based on parameters in COMSOL software.

The first set of experiments

We set up large permanent magnets to move at a slower speed, i.e. 0.0052 [m/s], after the first large permanent magnet moves 0.05 [m], the second large permanent magnet begins to approach the center position, when the first large permanent magnet is 0.18 [m] from the center position, its magnetic field touches the small permanent magnet, the small permanent magnet is affected by its magnetic field, and begins to move to the first large permanent magnet along a straight trajectory, until the first large permanent magnet reaches the maximum moving distance, that is, $dis_ion = 0.11$ [m], and then the first large permanent magnet begins to gradually move away from the center position, The second large permanent magnet is still approaching the center, which is $dis_ion < dis_ion1$ in the process, as shown in Fig. 2. The coloured bands on the right indicate the strength of the magnetic field in [T] represented by the different coloured areas in the picture.

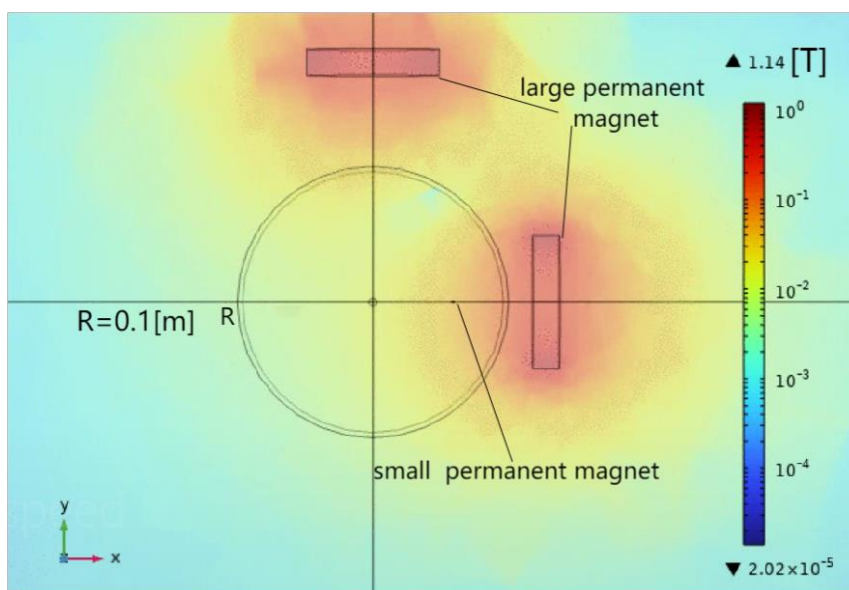


Fig 2. The small permanent magnet begins to move along a straight trajectory towards the first large permanent magnet. The boundary radius is R . The maximum radius of motion of a small permanent magnet is R .

When the first large permanent magnet gradually moves away from the center position, 0.13 [m] from the center position, and the second large permanent magnet gradually approaches the center position, 0.14 [m] from the center position, that is, $dis_ion = 0.13$ [m], $dis_ion1 = 0.14$ [m], at this time the small permanent magnet stops moving, 0.09 [m] from the center position, that is, the small permanent magnet moves 0.09 [m] along a straight trajectory, that is, $ds = 0.09$ [m], as shown in Fig. 3, a.

After that, the first large permanent magnet continues away from the center position, the second large permanent magnet is close to the center position until it is 0.11 [m] from the center position, that is, $dis_ion1 = 0.11$ [m], and the second large permanent magnet begins to gradually move away from the center position. In the process, $dis_ion > dis_ion1$, the small permanent magnet begins to move along an arc trajectory towards the second large permanent magnet. When the second large permanent magnet moves 0.2 [m] from the center position, and the first large permanent magnet moves 0.25 [m] from the center position, the small permanent magnet is free from the influence of the external magnetic field and stops moving, at this time the angle between the small permanent magnet and the +X axis is $n=30^\circ$, that is, the small permanent magnet moves $\frac{1}{12}$ of a circle along the arc trajectory, as shown in Fig. 3, b.

The second set of experiments

We set large permanent magnets to run at moderate speeds, i.e. 0.0079[m/s], other conditions remain unchanged. When $dis_ion < dis_ion1$, the small permanent magnet moves along a straight trajectory towards the first large permanent magnet. When $dis_ion = 0.13$ [m], $dis_ion1 = 0.14$ [m], we can clearly see that the small permanent magnet has not reached the position of the previous set of experiments, and the small permanent magnet is $ds = 0.0675$ [m] from the center, as shown in Fig. 3, c.

After that, the first large permanent magnet continues away from the center, the second large permanent magnet first approaches and then moves away from the center, and at this stage, the $dis_ion > dis_ion1$, small permanent magnet begins to move along an arc trajectory towards the second large permanent magnet. When $dis_ion1 = 0.2$ [m], $dis_ion = 0.25$ [m], the small permanent magnet breaks away from its magnetic field and stops moving. At this time, we can clearly observe that the angle between the small permanent magnet and the +X axis exceeds the data of the previous set of experiments, and the angle between the small permanent magnet and the +X axis is $n=45^\circ$, that is, the small permanent magnet moves $\frac{1}{8}$ of a circle along the arc trajectory, as shown in Fig. 3, d.

The third set of experiments

We set large permanent magnets to run at a relatively fast speed, i.e. 0.016 [m/s], other conditions remain unchanged. When $dis_ion < dis_ion1$, the small permanent magnet moves along a straight trajectory towards the first large permanent magnet. When $dis_ion=0.13$ [m], $dis_ion1 = 0.14$ [m], we can clearly see that the small permanent magnet has not reached the position of the previous two set of experiments, and the small permanent magnet is $ds = 0.045$ [m] from the center, as shown in Fig. 3, e.

After that, the first large permanent magnet continues to move away from the center, the second large permanent magnet first approaches and then moves away from the center, and at this stage, the small permanent magnet $dis_ion > dis_ion1$ begins to move along an arc trajectory towards the second large permanent magnet. When $dis_ion = 0.25$ [m], $dis_ion1 = 0.2$ [m], the small permanent magnet breaks away from its magnetic field and stops moving. At this point, we can clearly see that the angle of movement of the small permanent magnet

along the arc trajectory exceeds the angle of the previous two sets of experiments, and the angle between the small permanent magnet and the +X axis is $n = 60^\circ$, that is, the small permanent magnet moves $\frac{1}{6}$ of a circle along the arc trajectory, as shown in Fig. 3, f.

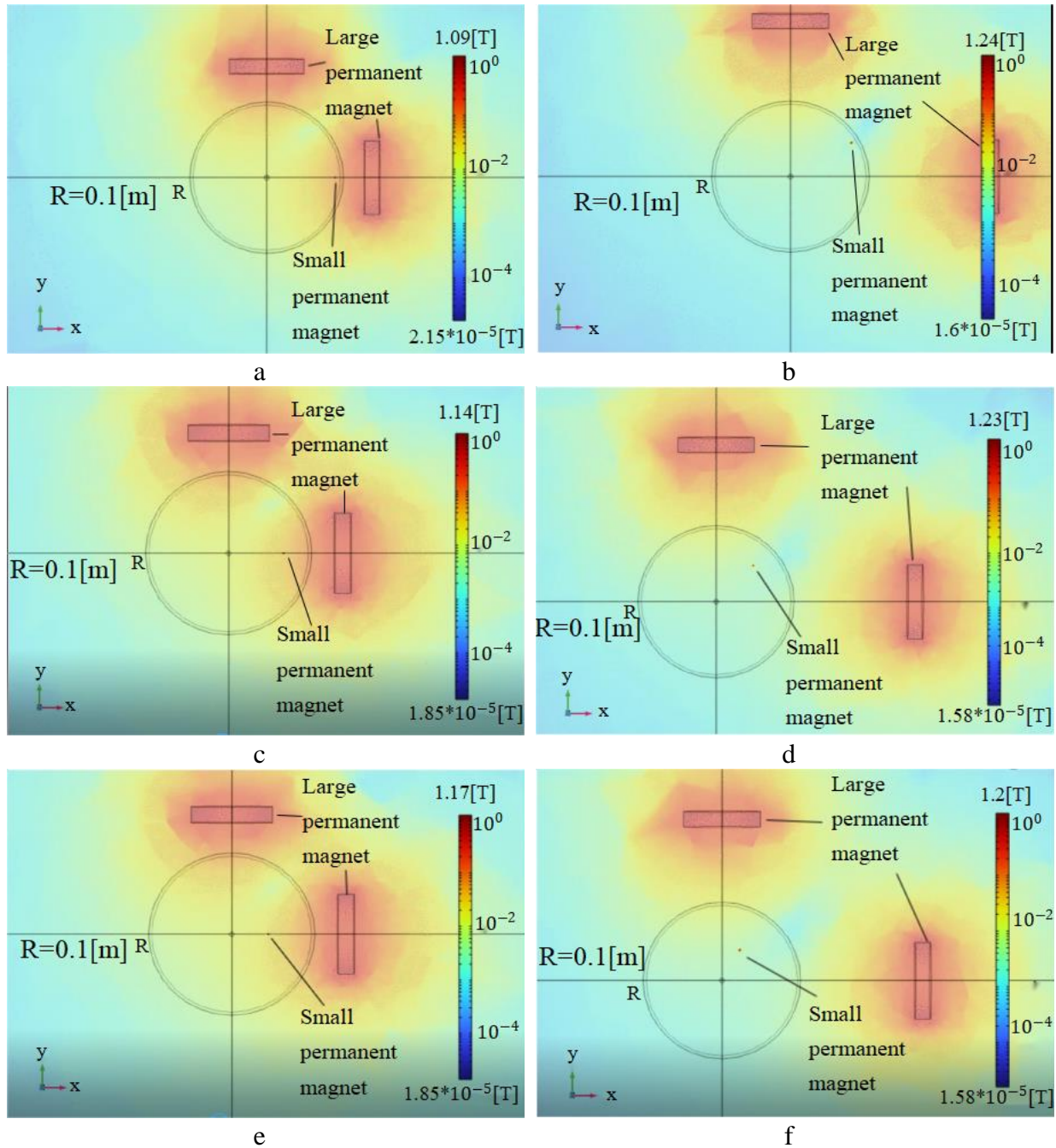


Fig 3. a, b are the first set of simulation experiments; c, d are the second set of simulation experiments; e, f are the third set of simulation experiments. The boundary radius is R . The maximum radius of motion of a small permanent magnet is R . Fig 3, a. $dis_ion = 0.13$ [m], $dis_ion1 = 0.14$ [m], the small permanent magnet stopped moving, and $ds = 0.09$ [m]. Fig 3, b. $dis_ion = 0.25$ [m], $dis_ion1 = 0.2$ [m], the small permanent magnet stops moving, and the angle to the +X axis is $n = 30^\circ$. Fig 3, c. $dis_ion = 0.13$ [m], $dis_ion1 = 0.14$ [m], the small permanent magnet stopped moving, and $ds = 0.0675$ [m]. Fig 3, d. When the movement stops, the angle between the small permanent magnet and the +X axis is $n = 45^\circ$. Fig 3, e. $dis_ion = 0.13$ [m], $dis_ion1 = 0.14$ [m], the small permanent magnet stopped moving, and $ds = 0.045$ [m]. Fig 3, f. $dis_ion = 0.25$ [m], $dis_ion1 = 0.20$ [m], $n = 60^\circ$, the small permanent magnet stops moving.

In order to see the results of the computer simulation experiments more intuitively, we made tables of the moving speed of the large permanent magnet, the distance moved by the small permanent magnet along the straight line trajectory, and the angle between the final resting position of the small permanent magnet and the +X axis according to the above experimental data as shown in the table below.

Table 1. Effect of large permanent magnet movement speed on small permanent magnet movement trajectory.

V [m/s]	Ds [m]	N [°]
0.0052	0.09	30
0.0079	0.0675	45
0.016	0.045	60

Where V is the operating speed of the large permanent magnet; ds is the distance moved by the small permanent magnet along the straight line trajectory; n is the angle between the location of the small permanent magnet after moving along the arc trajectory and the +X axis.

Practical experiments

Experimental Objective: The results of computer simulation experiments were verified to determine the influence of the movement speed of large permanent magnets on the movement trajectory of small permanent magnets.

Experimental design: The working environment of the implant is simulated by a slightly solidified jelly-like gelatin solution, and a small permanent magnet connected by a catheter is placed in the center of the container containing the gelatin solution, and the external magnetic field consists of two slide rail systems equipped with large permanent magnets, which are controlled by the Arduino UNO [16, 17]. Three sets of experiments were carried out, and the slide rail system was based on 0.0052 [m/s], 0.0079 [m/s], 0.016 [m/s] three speed movements, observe the running trajectories of small permanent magnets in each group of experiments and compare them.

Equipment and materials required for the experiment: Two Arduino UNO microcontrollers, two large permanent magnets, one small permanent magnet, 5% gelatin solution, two sets of ball screw slides with 57×56 stepper motors, stepper motor controller, external power supply, cylindrical container with a diameter of 0.2 [m], conduit, several wires.

Experimental equipment assembly: The ball screw slide rail equipped with a large permanent magnet is controlled by the Arduino controller, and the slide rail system is driven by a 57×56 stepper motor with a running distance of 0.3[m]. The stepper motor has four wires that connect it to the four interfaces of the stepper motor controller: The red wire is connected to A+; Green wire is connected to A-; Yellow wire connected to B+; Blue wire connection to B-. Then connect the stepper motor controller with the Arduino controller: Connect PUL-, DIR-, EN- together, and connect to the Arduino's GND, PUL+ is connected to the 9-pin of the Arduino and controls stepper motor operation, DIR+ is connected to the Arduino's 8-pin and controls the stepper motor's direction of rotation, EN+ is connected to the Arduino's GND or can also be left unconnected. Then connect the V+ of the external power supply to the V+ of the stepper motor controller, connect the V- of the external power supply to the GND of the stepper motor controller, and finally connect the computer and the arduino controller through the data line, so that a set of slide rail system is completed. The two sets of assembled slide rail systems were placed on the adjacent sides of the container, the configured 5% gelatin solution was poured into the container, and it stood for two hours, and after the

gelatin solution in the container was jelly-like, the small permanent magnet was connected to the catheter and placed in the center of the container, at this point, the experimental equipment is assembled. The practical experimental equipment is shown in Fig. 4.

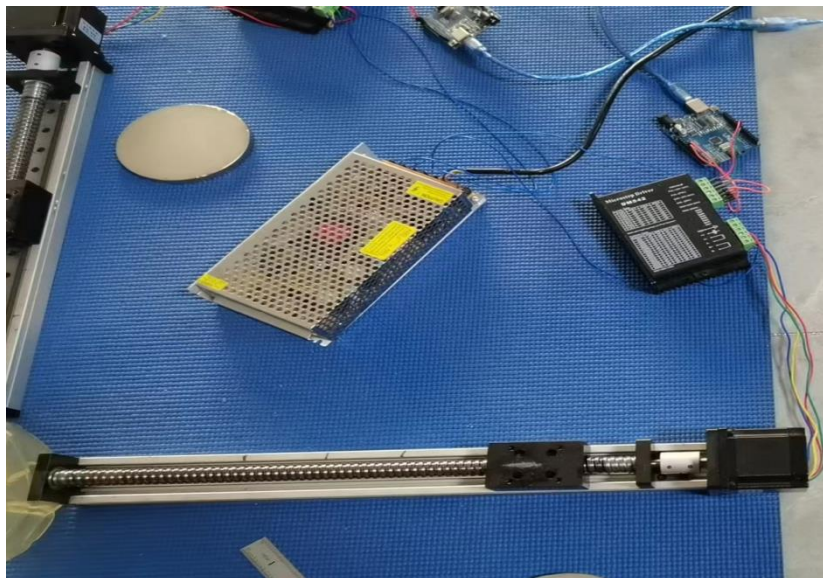


Fig 4. Slide rail system controlled by an Arduino controller.

The first set of experiments

First we set the slide rail system to run at a slower speed, that is, the large permanent magnet runs at a 0.0052 [m/s] movement. Start the first slide rail system after the power is applied, and start the second slide rail system after it runs 0.05 [m]. When the distance from the first large permanent magnet to the container boundary is less than the distance from the second large permanent magnet to the container boundary, that is, $dis_ion < dis_ion1$, as shown in Fig. 5, a, we can clearly see that the small permanent magnet has moved a long distance along a straight trajectory and is very close to the container boundary.

After that, the first large permanent magnet continues to move away, and the second large permanent magnet first approaches and then moves away, that is, $dis_ion > dis_ion1$, the small permanent magnet moves along the arc trajectory towards the second large permanent magnet. When they were far enough away, the small permanent magnets stopped moving, and we could clearly see that the small permanent magnets had only moved a short distance along the arc trajectory, as shown in Fig. 5, b.

The second set of experiments

We set the slide rail system to run at a moderate speed with a movement speed of 0.0079 [m/s]. After the first large permanent magnet runs 0.05 [m], the second large permanent magnet begins to move. In the $dis_ion < dis_ion1$ phase, it is clear that the small permanent magnets move along a straight trajectory, but the distance is less than the distance that the small permanent magnets moved along the straight trajectory in the first set of experiments. As shown in Fig. 5, c.

After that, in the $dis_ion > dis_ion1$ phase, the small permanent magnet begins to move along an arc trajectory towards the second large permanent magnet. When they were far enough away from the small permanent magnets to stop moving, we were able to observe that the small permanent magnets moved a distance along the arc trajectory, significantly more than the distance the small permanent magnets in the first set of experiments moved along the arc trajectory. As shown in Fig. 5, d.

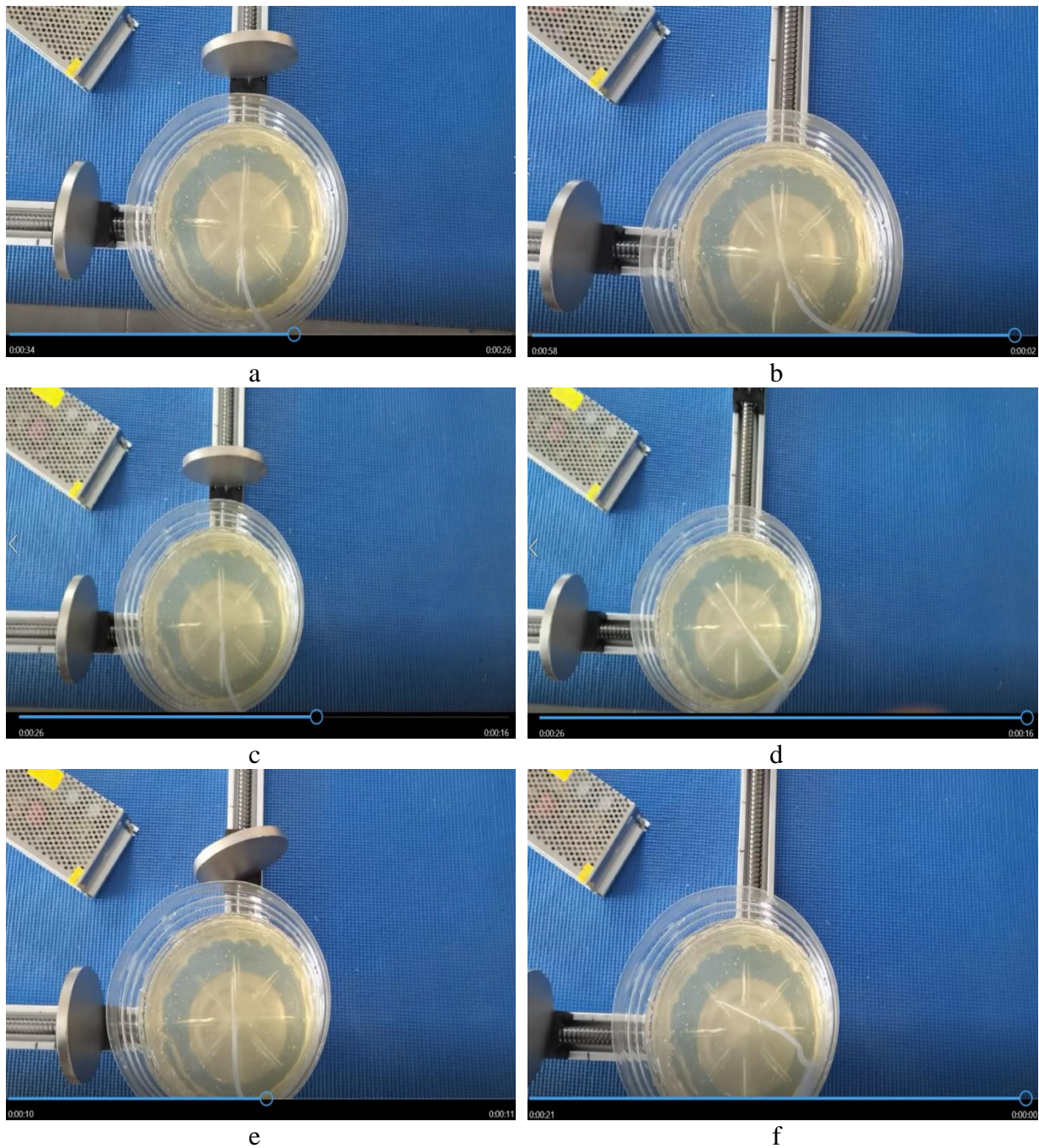


Fig 5. a, b are the first set of experiments; c, d are the second set of experiments; e, f are the third set of experiments.

Fig a. When the slide system runs at a slower speed, small permanent magnets move along a straight trajectory and approach the container boundary.

Fig b. At $dis_ion > dis_ion1$, small permanent magnets can only move a short distance along an arc trajectory.

Fig c. When the slide rail system moves at moderate speeds, the small permanent magnets move less distance along a straight trajectory than the results of the first set of experiments.

Fig d. The small permanent magnet moved some distance along the arc trajectory.

Fig e. Small permanent magnets move shorter distances in a straight line than in the first two sets of experiments.

Fig f. The small permanent magnet traveled a long distance along the arc trajectory.

The third set of experiments

We set the slide rail system to run at a faster speed, i.e. move at a speed of 0.016 [m/s]. During the $dis_ion < dis_ion1$ phase, as shown in Fig. 5, e we were able to see the small permanent magnets moving along a straight trajectory, but the distance traveled was the shortest of the three sets of experiments.

After that, in the $dis_ion > dis_ion1$ phase, the small permanent magnet begins to move along the arc trajectory towards the second large permanent magnet. When they moved far enough from the small permanent magnets to stop moving, we could clearly see that the small permanent magnets moved significantly farther along the arc trajectory than the previous two sets of experiments. As shown in Fig. 5, f.

In addition, it should be noted that because the gelatin solution will gradually solidify with time, and the change of external temperature will also have a certain impact on the gelatin solution, which leads to certain errors between the results of the actual experiment and the results of the computer simulation experiment, so it is necessary to try to ensure that the three sets of experiments are completed within a certain time.

RESULTS AND DISCUSSION

Simulation experiment conclusion

Through computer simulation experiments we found:

1. When large permanent magnets move slowly, i.e. 0.0052 [m/s], in the $dis_ion < dis_ion1$ stage, the small permanent magnet traveled the longest distance along the linear trajectory, $ds = 0.09$ [m]. In the $dis_ion > dis_ion1$ stage, the angle between the small permanent magnet and the +X axis is the smallest after moving along the arc trajectory, $n = 30^\circ$.

2. When large permanent magnet moves at a moderate speed, i.e. 0.0079 [m/s], in the $dis_ion < dis_ion1$ stage, the small permanent magnet moved along a straight trajectory in the middle position of the three sets of experiments, $ds = 0.0675$ [m]. In the $dis_ion > dis_ion1$ stage, the angle between the small permanent magnet and the +X axis after moving along the arc trajectory is also in the middle position of the three sets of experiments, $n = 45^\circ$.

3. When large permanent magnets move at a relatively fast speed, i.e. 0.016 [m/s], in the $dis_ion < dis_ion1$ stage, the small permanent magnet travels the shortest distance along the linear trajectory, $ds = 0.045$ [m]. In the $dis_ion > dis_ion1$ stage, the angle between the small permanent magnet and the +X axis after moving along the arc trajectory is the largest, $n = 60^\circ$.

Practical experimental conclusions

The results of this practical experiment show that the results of computer simulation experiments are real and reliable. By comparing the three sets of actual experiments, we found that:

1. The slide rail system starts with 0.0052 [m/s] speed operation, in the $dis_ion < dis_ion1$ stage, small permanent magnets move along a straight trajectory, and their travel distance is the longest in the three sets of experiments; In the $dis_ion > dis_ion1$ stage, the small permanent magnet moves along the arc trajectory, and the angle between the position of the small permanent magnet and the linear trajectory is the smallest in the three sets of experiments, that is, the distance of the small permanent magnet moving along the arc trajectory is the shortest.

2. The slide rail system starts with 0.0079 [m/s] speed operation, in the $dis_ion < dis_ion1$ phase, small permanent magnets move along a straight trajectory, and their moving distance is in the middle position in the three sets of experiments; In the $dis_ion > dis_ion1$ stage, the small permanent magnet moves along the arc trajectory, and the angle between the position of

the small permanent magnet and the linear trajectory is also in the middle position in the three sets of experiments, that is, the distance of the small permanent magnet moving along the arc trajectory is in the middle position of the three sets of experimental results.

3. The slide rail system starts with 0.016 [m/s] speed operation, in the $dis_ion < dis_ion1$ stage, small permanent magnets move along a straight trajectory, and their travel distance is the shortest of the three sets of experiments; In the $dis_ion > dis_ion1$ stage, the small permanent magnet moved along the arc trajectory, and the angle between the position of the small permanent magnet and the linear trajectory was the largest in the three sets of experiments, that is, the distance traveled by the small permanent magnet along the arc trajectory was the longest in the three sets of experimental results.

Through computer simulation experiments and practical experiments, we get the following conclusions: the faster the moving speed of the large permanent magnet that constitutes the external magnetic field in the magnetic stereotaxic system, the shorter the distance that the small permanent magnet as an implant moves along the straight line trajectory, and the longer the distance that it moves along the arc trajectory; the slower the moving speed of the large permanent magnet, the longer the distance that the small permanent magnet moves along the straight line trajectory, and the shorter the distance that it moves along the arc trajectory.

CONCLUSION

In this research, we have determined the relationship between the running speed of the large permanent magnet that constitutes the external magnetic field and the implant's moving trajectory by combining computer simulation experiments with practical experiments, i.e., the faster the large permanent magnet moves, the shorter the implant's moving distance is along a straight line trajectory, and the longer the moving distance is along a curved line trajectory. This means that we can control the distance and steering angle of the implant more accurately, which makes the study of the magnetic stereotaxic system further, and lays a theoretical foundation and provides a large amount of experimental data for the implant to be able to reach the diseased site located in the deep structure of the brain tissue along complex pathways in neurosurgical interventions with the participation of the magnetic stereotaxic system.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

Authors' ORCID ID

Hankun Jiao  <https://orcid.org/0000-0003-0992-5344>

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

REFERENCES

1. Grady SM, Howard III MA, Broaddus WC, Molloy JA, Ritter RC, Quate EG, Gillies GT. Magnetic stereotaxis: a technique to deliver stereotactic hyperthermia. *Neurosurgery*. 1990 Dec 1;27(6):1010–6. <https://doi.org/10.1097/00006123-199012000-00026>
2. Nelson BJ, Gervasoni S, Chiu PW, Zhang L, Zemmar A. Magnetically actuated medical robots: An in vivo perspective. *Proceedings of the IEEE*. 2022 Apr 28;110(7):1028–37. <https://doi.org/10.1109/JPROC.2022.3165713>
3. Grady MS, Howard MA, Dacey RG, Blume W, Lawson M, Werp P, Ritter RC. Experimental study of the magnetic stereotaxis system for catheter manipulation within the brain. *Journal of neurosurgery*. 2000 Aug 1;93(2):282–8. <https://doi.org/10.3171/jns.2000.93.2.0282>
4. Avrunin O, Tymkovich M, Semenets V, Piatyokop V. Computed tomography dataset analysis for stereotaxic neurosurgery navigation. In: 2019 IEEE 8th International Conference on Advanced Optoelectronics and Lasers (CAOL); 2019 Sep 6; IEEE. p. 606–9. <https://doi.org/10.1109/CAOL46282.2019.9019459>

5. Avrunin OG, Alkhorayef M, Saied HF, Tymkovych MY. The surgical navigation system with optical position determination technology and sources of errors. *Journal of Medical Imaging and Health Informatics*. 2015 Aug 1;5(4):689–96. <https://doi.org/10.1166/jmihi.2015.1444>
6. Avrunin OG, Tymkovych MY, Moskovko SP, Romanyuk SO, Kotyra A, Smailova S. Using a priori data for segmentation anatomical structures of the brain. *Przegląd Elektrotechniczny*. 2017 May 1;3:102–5. <https://doi.org/10.15199/48.2017.05.20>
7. Chen Y, Godage I, Su H, Song A, Yu H. Stereotactic systems for MRI-guided neurosurgeries: a state-of-the-art review. *Annals of biomedical engineering*. 2019 Feb 15;47:335–53. <https://doi.org/10.1007/s10439-018-02158-0>
8. Withers PJ, Bouman C, Carmignato S, Cnudde V, Grimaldi D, Hagen CK, Maire E, Manley M, Du Plessis A, Stock SR. X-ray computed tomography. *Nature Reviews Methods Primers*. 2021 Feb 25;1(1):18. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00015-4>
9. Hankun J, Avrunin O. Explore the feasibility study of magnetic stereotaxic system. *Optoelectronic Information-Power Technologies*. 2023 Sep;45(1):86–96. <https://doi.org/10.31649/1681-7893-2023-45-1-86-96>
10. Hankun J, Avrunin O. Possibilities of Field Formation by Permanent Magnets in Magnetic Stereotactic Systems. In: 2022 IEEE 3rd KhPI Week on Advanced Technology (KhPIWeek); 2022 Oct 3; IEEE. p. 1–4. <https://doi.org/10.1109/KhPIWeek57572.2022.9916450>
11. O'Reilly T, Teeuwisse WM, de Gans D, Koolstra K, Webb AG. In vivo 3D brain and extremity MRI at 50 mT using a permanent magnet Halbach array. *Magnetic resonance in medicine*. 2021 Jan;85(1):495–505. <https://doi.org/10.1002/mrm.28396>
12. Brown D, Ma BM, Chen Z. Developments in the processing and properties of NdFeB-type permanent magnets. *Journal of magnetism and magnetic materials*. 2002 Aug 1;248(3):432–40. <https://doi.org/10.1002/chin.200311225>
13. Calin MD, Helerea E. Temperature influence on magnetic characteristics of NdFeB permanent magnets. In: 2011 7th international symposium on advanced topics in electrical engineering (ATEE); 2011 May 12; IEEE. p. 1–6.
14. Multiphysics CO. Introduction to COMSOL multiphysics®. COMSOL Multiphysics, Burlington, MA, accessed Feb. 1998 Feb;9(2018):32.
15. Pepper DW, Heinrich JC. The finite element method: basic concepts and applications with MATLAB, MAPLE, and COMSOL. CRC press; 2017 Apr 11. <http://doi.org/10.1201/9781315395104>
16. Badamasi YA. The working principle of an Arduino. In: 2014 11th international conference on electronics, computer and computation (ICECCO); 2014 Sep 29; IEEE. p. 1–4. <https://doi.org/10.1109/ICECCO.2014.6997578>
17. Banzi M, Shiloh M. Getting started with Arduino. Maker Media, Inc.; 2022 Feb 15.
18. Sokol Y, Avrunin O, Kolisnyk K, Zamiatin P. Using medical imaging in disaster medicine. In: 2020 IEEE 4th International Conference on Intelligent Energy and Power Systems (IEPS); 2020 Sep 7; IEEE. p. 287–90). <https://doi.org/10.1109/IEPS51250.2020.9263175>
19. Avrunin O, Kolisnyk K, Nosova Y, Tomashevskiy R, Shushliapina N. Improving the methods for visualization of middle ear pathologies based on telemedicine services in remote treatment. In: 2020 IEEE KhPI Week on Advanced Technology (KhPIWeek); 2020 Oct 5; IEEE. p. 347–50. <https://doi.org/10.1109/KhPIWeek51551.2020.9250090>

ВИЗНАЧЕННЯ ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКУ МІЖ ШВИДКІСТЮ РУХУ ВЕЛИКИХ ПОСТІЙНИХ МАГНІТІВ І ТРАЄКТОРІЄЮ РУХУ ІМПЛАНТАТІВ У МАГНІТНИХ СТЕРЕОТАКСИЧНИХ СИСТЕМАХ

Ц. Ханькунь^{id}, О. Г. Аврунін^{id}

Харківський національний університет радіоелектроніки, проспект Науки, 14, Харків, 61166, Україна

e-mail: 1350829683@qq.com, oleh.avrunin@nure.ua

Надійшла до редакції 9 листопада 2023 р. Переглянута 17 січня 2024 р.

Прийнята до друку 20 березня 2024 р.

Актуальність. Магнітна стереотаксична система — це новий вид нейрохірургічного втручання, який знаходиться на стадії експерименту. Цей метод дозволяє безконтактно керувати імплантатом за допомогою зовнішнього магнітного поля, дозволяючи йому рухатися по довільній траєкторії до вогнища ураження, розташованого в глибоких структурах мозкової тканини, щоб доставити гіпертермію до місця ураження або доставити ліки через катетер. У попередніх дослідженнях ми виявили, що рух імплантату по дуговій траєкторії цілком можливий, тому нам необхідно

визначити зв'язок між швидкістю руху великого постійного магніту, що становить зовнішнє магнітне поле, і траєкторією руху імплантату, щоб більш точно керувати рухом імплантату.

Мета — дослідити вплив швидкості руху великих постійних магнітів, що складають зовнішнє магнітне поле, на траєкторію руху імплантатів (малих постійних магнітів).

Матеріали і методи. Спочатку було проведено три серії комп'ютерних імітаційних експериментів, в кожній групі експериментів змінювалася тільки швидкість роботи великих постійних магнітів, а також спостерігалися і порівнювалися зміни траєкторій малих і середніх постійних магнітів в трьох серіях експериментів. Після цього були проведені практичні експерименти для перевірки результатів комп'ютерного моделювання експериментів за допомогою рейкової системи, керованої мікроконтролером Arduino.

Результати. За допомогою імітаційних експериментів визначено зв'язок між швидкістю переміщення великого постійного магніту та траєкторією руху малого постійного магніту, а також розраховано зміни напруженості навколишнього магнітного поля під час руху імплантату. Після цього це було перевірено практичними експериментами. Чим швидше рухається великий постійний магніт, тим меншу відстань малий постійний магніт проходить по лінійній траєкторії, а більшу — по дуговій; чим повільніше рухається великий постійний магніт, тим більшу відстань малий постійний магніт проходить по прямій траєкторії, а меншу — по дуговій траєкторії.

Висновки. У цьому дослідженні ми визначили взаємозв'язок між швидкістю руху великого постійного магніту, що становить зовнішнє магнітне поле, і траєкторією руху імплантату, поєднавши комп'ютерні симуляційні експерименти з практичними експериментами, тобто чим швидше рухається великий постійний магніт, тим коротша відстань переміщення імплантату по прямій траєкторії, і тим довша відстань переміщення по криволінійній траєкторії. Це означає, що ми можемо більш точно контролювати відстань і кут повороту імплантату, що сприяє подальшому вивчення магнітної стереотаксичної системи, а також закладає теоретичний фундамент і забезпечує велику кількість експериментальних даних для того, щоб імплантат міг досягти хворої ділянки, розташованої в глибокій структурі тканини мозку по складних шляхах при нейрохірургічних втручаннях за участю магнітної стереотаксичної системи.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: здоров'я людини; магнітне поле; програмне забезпечення COMSOL; постійні магніти; силовий аналіз; Arduino; мікроконтролери.

Original article<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-51-03>

УДК 51.76:620.179:577.34

АЛГОРИТМ ТРИВИМІРНОЇ РЕКОНСТРУКЦІЇ ДЛЯ ЛІНІЙНОЇ ГЕОМЕТРІЇ СКАНУВАННЯ

Т. Г. Віхтинська , К. Є. Лапітан , К. Е. Немченко *Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, м. Харків, 61022, Україна**e-mail: konstantinlapitan@gmail.com*

Надійшла до редакції 8 лютого 2024 р. Переглянута 3 травня 2024 р.

Прийнята до друку 18 травня 2024 р.

Актуальність. Комп'ютерна томографія (КТ) визнана одним із найпотужніших методів діагностики та контролю над процесом лікування широкого ряду захворювань. Вона забезпечує можливість отримати детальну інформацію про внутрішню структуру органів та кісток. При цьому, не дивлячись на успіх в застосуванні комп'ютерної томографії у таких сферах дослідження як тривимірна рентгенографія або рентгенографія легень, не вдається досягти такого поширення як, наприклад, у випадку використання магнітно-резонансної томографії, навіть попри більшу точність КТ. Це пов'язано, в першу чергу, з обмеженнями, з точки зору безпеки, на допустиму кількість досліджень через шкідливість рентгеновського опромінення для пацієнта. Однією з головних проблем, які досі стоять перед дослідниками, є необхідність зменшення часу повного дослідження та зменшення радіаційного навантаження на пацієнта. Подолання цих задач має вирішальне значення для підвищення загальної ефективності медичних послуг, оптимізації планів лікування та, зрештою, покращення результатів лікування пацієнтів. Таким чином, вирішення цих проблем за допомогою інноваційних алгоритмів і методів комп'ютерної томографії має значні перспективи для революції в медичній діагностиці та забезпечення постійного прогресу сучасної охорони здоров'я.

Мета роботи. Метою даної роботи стала розробка алгоритму тривимірної реконструкції, який не залежить від конусності пучка випромінювання, а тому дозволяє проводити точну реконструкцію всього об'єкта, за єдине обертання джерела випромінювання навколо об'єкта дослідження.

Матеріали і методи. У роботі використовуються методи інтегральних перетворень та комп'ютерне моделювання для розв'язання обернених задач, що виникають у комп'ютерній томографії.

Результати. Отримано аналітичну формулу обернення для тривимірної комп'ютерної томографії з лінійною геометрією сканування з сегментацією, також було перевірено можливість практичного застосування розробленого алгоритму та розроблено методику дослідження з використанням лінійного руху конусного випромінювача та детекторів.

Висновки. Розроблений алгоритм дозволяє покращити реконструкцію шарів об'єкта, що значно віддалені від площини, в якій рухаються випромінювач та детектор, у порівнянні з існуючими алгоритмами.

Як цитувати: Віхтинська ТГ, Лапітан КЄ, Немченко КЕ. Алгоритм тривимірної реконструкції для лінійної геометрії сканування. Біофізичний вісник. 2024;51:39–52. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-51-03>

In cites: Vikhtinskaya TG, Lapitan KE, Nemchenko KE. Segmented algorithm for three-dimensional reconstruction in linear scan geometry. Biophysical Bulletin. 2024;51:39–52. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-51-03> (in Ukrainian)

Open Access. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

КЛЮЧОВІ СЛОВА: комп'ютерна томографія; конусний промінь; алгоритм Фельдкамп; тривимірна реконструкція; медична діагностика.

Основи комп'ютерної томографії (КТ) були закладені в піонерській роботі Радона [1], в якій було запропоновано розв'язання задачі про відновлення функцій в площині з набору проєкційних даних. Цей метод дозволяє відновлювати двовимірну функцію за її проєкційними даними й належить до аналітичних підходів, які в свою чергу можна поділити на точні та наближені. До точних методів [2–6] відносяться такі, що мають повну геометрію сканування об'єкта, тобто такі, що задовольняють умові, що кожна з площин, яка перетинає об'єкт, має співпадати з кривою руху конуса випромінювання [3, 11].

Повна геометрія сканування має основну перевагу в тому, що вона дозволяє отримати інформацію про об'єкт з різних кутів і перспектив. Це призводить до якісної і точної реконструкції об'єкта та допомагає візуалізувати його структуру.

Однак повна геометрія сканування може бути більш вимогливою до обчислювальних ресурсів і часу, оскільки вимагає збору більшої кількості даних та обробки їх для отримання реконструкції. Крім того, вона може бути складнішою для реалізації та використання порівняно з обмеженими геометричними конфігураціями. У практичних застосуваннях вибір між повною геометрією сканування та обмеженою геометрією залежить від конкретних вимог та обмежень системи, включаючи обчислювальні ресурси, швидкість сканування та потрібну якість реконструкції. Отже, точні методики мають той недолік, що їхнє практичне застосування виявляється сильно обмежене технологічними труднощами та вимогами медичного характеру, зокрема, обмеженням радіаційного навантаження на пацієнта.

До наближених відносять такі методи, де використовується не повний набір даних сканування, в такому випадку має виконуватись умова достатності для реконструкції: площина реконструкції перетинається з траєкторією руху випромінювача хоча б один раз. А тому застосовують екстраполяцію та проводять фільтрацію небажаних артефактів у реконструкції зображень [7–9]. Наближені методики природно мають свої внутрішні обмеження відновлення контрастів та просторової роздільної здатності, які обумовлені характером цих наближень. Задля кращого наближення останнім часом набирає популярність використання штучного інтелекту, для синтезу відсутніх проєкційних даних [10].

В той самий час існує певний клас методик у конусній томографії, який задовольняє математичним умовам відновлення, але при цьому характер траєкторій досить простий для їх технологічної реалізації [11–15]. До таких методів відноситься використання спіральної траєкторії [16] та траєкторії, що складається з двох перпендикулярних кілець [17], але на практиці більшого поширення та подальші вдосконалення отримала саме спіральна томографія через її зручність застосування при дослідженнях довгих тіл.

Ще однією із таких методик конусної томографії є рух джерела вздовж прямої лінії, паралельної плоскому детектору [11, 14]. Така геометрія повністю задовольняє умовам повноти для відновлення тривимірної структури об'єкта, тобто умовам існування розв'язку зворотної задачі відновлення тривимірного розподілу густини об'єкта за його двовимірними проєкціями.

У цьому методі зрізи об'єкта, що відновлюються, являють собою множину площин, які походять через одну загальну задану пряму. Понад те, ця загальна пряма співпадає з прямолінійною траєкторією джерела. У кожній з таких площин відновлення двовимірного розподілу зводиться до звичайної віялової задачі Радона. Вперше така методика була запропонована у роботі [13].

Незважаючи на простоту та очевидність цього методу не менш очевидні його недоліки. Перше — це обмеження за довжиною траєкторії руху джерела, яке викликано складнощами практичної реалізації достатнього великого шляху джерела, а також труднощами у виготовленні компактних пристроїв. Другий недолік безпосередньо пов'язаний із медичним застосуванням — це забезпечення граничних радіаційних навантажень на далеких від об'єкта місцях розташування джерела та приймача.

Подолання цих недоліків призвело до появи модифікованих методик, у яких траєкторія джерела є кусково-лінійною і замкненою. Така технологія вже близько наближається до класичної конусної томографії, в якій джерело рухається за колом і за один оберт збирає достатню кількість інформації для відновлення.

У цій роботі ми розглядаємо методику, в якій джерело рухається по периметру квадрата. У роботі показано, що такий підхід може забезпечити досить якісне відновлення тривимірної структури об'єкта і, не дивлячись на свою наближеність, дає результати, що перевищують результати інших конусних методик.

ДВОВИМІРНИЙ ВИПАДОК ЛІНІЙНОГО СКАНУВАННЯ

Основа більшості алгоритмів комп'ютерної томографії полягає в тому, що дослідження проводиться по колу, обертаючи випромінювач та детектор навколо об'єкта. Але ті самі проекційні дані можливо отримати не тільки якщо випромінювач буде рухатись по круговій траєкторії, а й у випадку руху вздовж прямої.

Розглянемо випадок коли випромінювач рухається вздовж прямої на фіксованій відстані від детектора, а дослідження проводиться вузьким в'яловим пучком рентгенівського випромінювання як це зображено на Рис. 1.

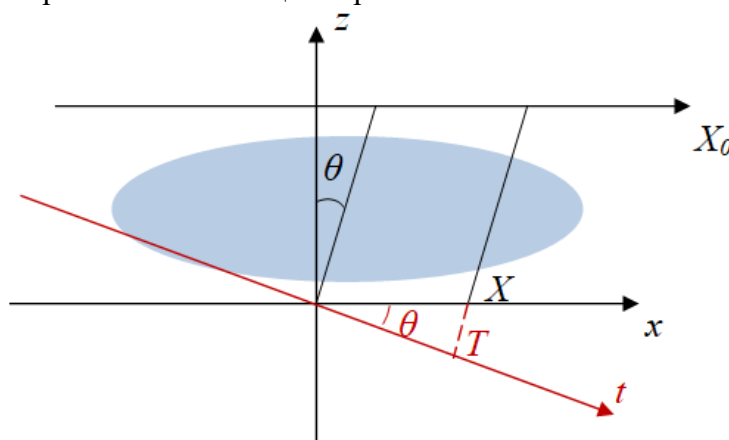


Рис. 1. Лінійна геометрія сканування в площині.

Fig. 1. Linear scanning geometry in the plane.

Положення променя в такому випадку задається двома параметрами X — це координата потрапляння променя в статичний детектор, та X_0 — це координата випромінювача.

З Рис. 1 можна побачити, що лінійна геометрія сканування може надати такий самий набір даних як у випадку паралельного сканування з кільцевою траєкторією випромінювача. Координата t на детекторі з геометрії сканування по колу пов'язана з горизонтальним напрямком співвідношенням $t = X \cos(\theta)$.

Позначимо відстань між лінійкою детекторів та випромінювачем як H та запишемо рівняння $x \cos(\theta) + y \sin(\theta) - t = 0$, що визначає промінь вздовж якого інтегруємо:

$$x \cos(\theta) + y \sin(\theta) - X \cos(\theta) = x - X + y \tan(\theta) = x - X + y \frac{X - X_0}{H}. \quad (1)$$

Звідки отримаємо вираз для перетворення Радона у параметрах лінійного сканування:

$$I(X, X_0) = \iint f(x, y) \delta \left(x - X - y \frac{X_0 - X}{H} \right) dx dy. \quad (2)$$

Тепер за допомогою теореми про зв'язок перетворення Фур'є та перетворення Радона запишемо обернену функцію:

$$f(x, y) = \frac{1}{4\pi^2} \iiint_{-\infty}^{\infty} I(X, X_0) \frac{q}{H} e^{iq \left[x - X - y \frac{X_0 - X}{H} \right]} dX dX_0 dq, \quad (3)$$

де q виступає в якості просторової частоти, яка відповідає за перетворення Фур'є.

Вираз (3) є шуканий результат для визначення розподілу густини при дослідженні в'язовим пучком, коли детектор рухається вздовж прямої лінії. В якості степея експоненти виступає вираз, що відповідає променю (1), з якого реконструюємо зображення об'єкта.

ТРИВИМІРНИЙ ВИПАДОК ГЕОМЕТРІЇ ЛІНІЙНОГО СКАНУВАННЯ (LSG)

Розглянемо тепер узагальнення на дослідження об'єкта конусним пучком та тривимірний алгоритм реконструкції. Припустимо, що точковий випромінювач рентгенівського проміння рухається вздовж нескінченної прямої у напрямку X_0 . На відстані H від випромінювача знаходиться пласка матриця детекторів, що позначаються координатами (X, Y) . Схему такого дослідження зображено на Рис. 2.

В такому випадку отримаємо такий вигляд для тривимірного перетворення Радона функції густини об'єкта $f(x, y, z)$:

$$I(X, Y, X_0) = \iiint_{-\infty}^{\infty} f(x, y, z) \delta \left(x - X - z \frac{X_0 - X}{H} \right) \delta \left(y - Y - Y \frac{z}{H} \right) dx dy dz. \quad (4)$$

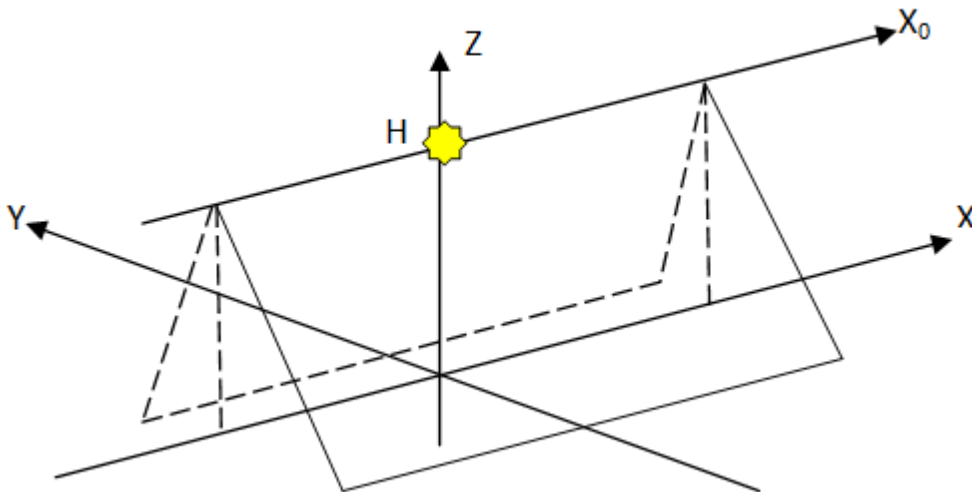


Рис. 2. Тривимірне дослідження конусним пучком вздовж прямої лінії.
Fig. 2. Three-dimensional scanning with a cone beam in a straight line.

У випадку коли випромінювач рухається вздовж прямої лінії об'єкт дослідження розбивається на похилі площини, що вирізаються дельта функцією, і не відбувається змішування даних з різних площин. В такому випадку тривимірна задача реконструкції зводиться до набору двовимірних задач реконструкції в похилих площинах, які мають

точне розв'язання у випадку лінійного сканування, оскільки виконується умова повноти геометрії сканування. Саме тому результуюче зображення не зазнає наближень та артефактів, як у випадку звичних алгоритмів реконструкції конусного променя, а сама обернена функція має такий вигляд:

$$f(x, y, z) = \frac{1}{4\pi^2} \iint_{-\infty}^{\infty} \frac{H-z}{H^2} I\left(X, Y = \frac{yH}{H-z}, X_0\right) G\left(x - X\left(1 - \frac{z}{H}\right) - X_0 \frac{z}{H}\right) dXdX_0. \quad (5)$$

Тут $G(x) = \int |q| e^{iqx} dq$ — це ядро лінійної фільтрації перетворення Радона [18].

Використання прямої лінії в якості геометрії сканування забезпечує проекційну повноту даних, оскільки всі точки об'єкта можуть бути зіскановані з будь-якого кута, та виконується умова повноти даних. Це дозволяє отримати більш детальну та точну реконструкцію об'єкта, що особливо важливо для складних структур або областей зі змінною щільністю.

Загалом, використання безкінечної прямої в якості повної геометрії сканування є привабливим варіантом для отримання високоякісних реконструкцій об'єктів. Однак, вибір між безкінечною прямою геометрією та іншими варіантами залежить від конкретних вимог та обмежень системи.

АЛГОРИТМ FDK

В якості контрольного дослідження будемо використовувати алгоритм, запропонований Фельдкампом, Девісом та Крейсом (FDK) [9]. Цей наближений алгоритм широко застосовується в практичних дослідженнях у більшості існуючих томографів. FDK алгоритм дозволяє отримати точку реконструкції у середній площині (площина, яка містить кругову орбіту), а також достатньо якісно реконструювати зображення під малими кутами конуса, хоча у площинах, що віддалені від серединної площини, якість значно знижується.

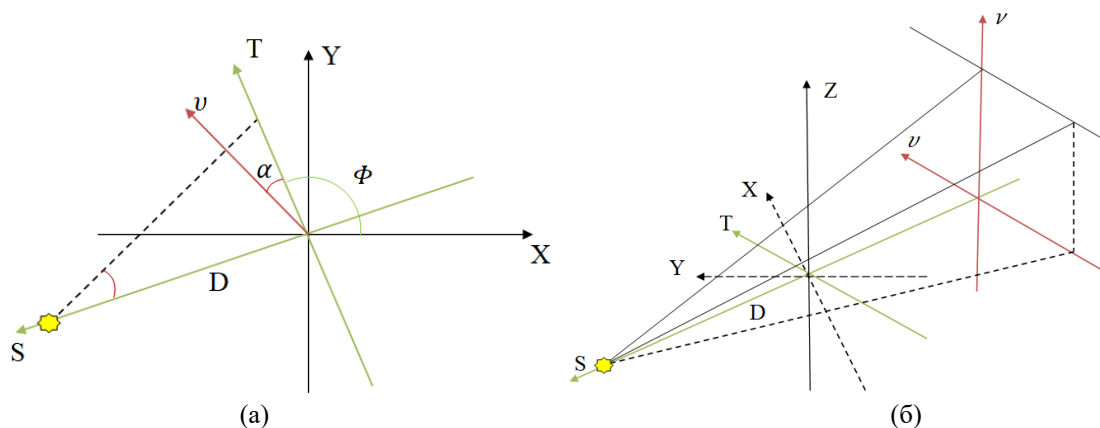


Рис. 3. (а) сканування у серединній площині, (б) геометрія сканування конусного променя.
Fig. 3. (a) mid-plane scan, (b) cone beam scanning geometry.

Алгоритм зворотного проектування для конусного випромінювача, що зображено на Рис. 3 б, отримується з віялового випадку шляхом застосування формул перетворення координат.

$$f(x, y, z) = \iiint \frac{D}{\sqrt{D^2 + u^2 + v^2}} I(u, v, \Phi) * \frac{D^2}{(D-s)^2} G_y\left(\frac{Dt}{D-s} - u\right) G_z\left(\frac{Dz}{D-s} - v\right) dudvd\Phi, \quad (6)$$

$$\text{де } G_y(u) = \int |q| e^{iqu} dq \text{ та } G_z(v) = \frac{\sin(q_{0z}v)}{\pi v} \begin{cases} t = x \cos(\Phi) + y \sin(\Phi) \\ s = -x \sin(\Phi) + y \cos(\Phi) \end{cases}$$

КОМП'ЮТЕРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ

Перевірку роботи алгоритмів будемо проводити за допомогою мови програмування C# на моделі тіла з твердою оболонкою, що складається з 13 шарів товщиною в 1 воксел та розмірами зображення в поперечному перетині 198×198 пікселів з розміром одного пікселя 1 мм^2 , тіло вписується в загальну матрицю розмірами $256 \times 256 \times 20$ вокселів, де розмір одного вокселя 1 мм^3 .

Основною проблемою при дослідженні з лінійною траєкторією руху є обмеженість фізичних розмірів установки. Оскільки для точного відновлення необхідне використання нескінченної прямої, то в реальному досліді реконструкція буде неякісною, як це зображено на Рис. 4. Введемо довжину проходу для випромінювача над детектором такої довжини, щоб при фіксованій висоті прольоту рівній 256 мм над детектором відповідати дослідженню на кути відносно нормалі до детектора від -45 до $+45$ градусів у випадку а), від -60 до $+60$ градусів у випадку б), від -70 до 70 градусів у випадку в), та від -80 до $+80$ градусів у випадку г).

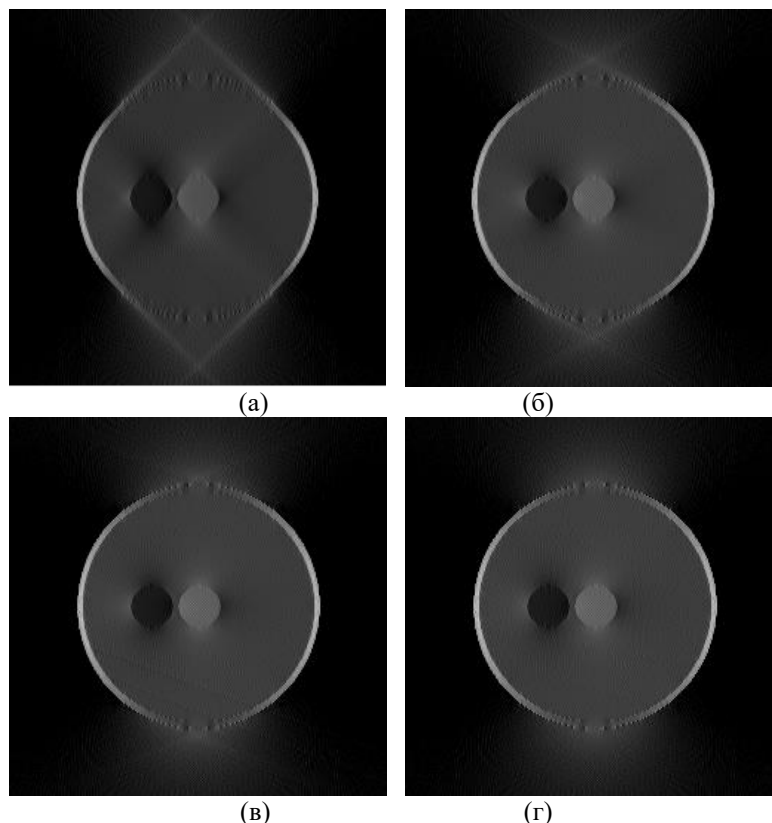


Рис. 4. Результат дослідження з різною довжиною ходу для випромінювача:
(а) 768 мм, (б) 1142 мм, (в) 1662 мм, (г) 3159 мм.

Fig. 4. The result of the scanning with different lengths of the emitter stroke:
(a) 768 mm, (b) 1142 mm, (c) 1662 mm, (d) 3159 mm.

Цю проблему можна подолати використовуючи кілька серій дослідів, тобто послідовних досліджень з довжиною ходу випромінювача у 768 мм та поворотом системи випромінювача та детектора на кут кратний 90 градусам. В такому випадку дослідження в дві серії дорівнює дослідженню від 0 до 180 градусів, дослідження в 4 серії відповідає дослідженню від 0 до 360 градусів. Оскільки дані отримані від 180 до

360 градусів дублюють розподіл густини отриманий від 0 до 180, то недоцільно робити дослідження в три серії. В такому випадку ми продублюємо тільки частину проєкцій, які внесуть артефакти відновлення. На Рис. 5 представлено результати реконструкції порівняно з оригінальним зображенням.

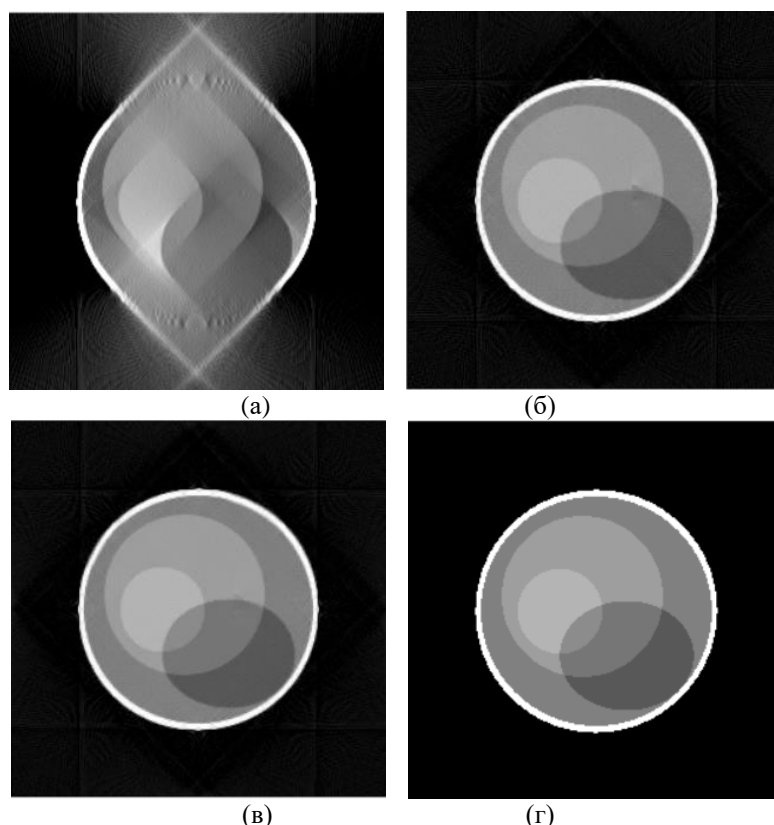


Рис. 5. Результат реконструкції для (а) однієї, (б) двох серій дослідів (в) чотирьох серій дослідів, (г) оригінал зображення.
Fig. 5. The reconstruction result for (a) one, (b) two series of experiments (c) four series of experiments, (d) original image.

Щоб переконатись в якості реконструкції для різних умов порахуємо середньо квадратичне відхилення, що представлено в табл. 1.

Таблиця 1. Порівняння середньоквадратичного відхилення реконструкції для різних умов сканування
Table 1. Comparison of standard deviation of reconstruction for different scanning conditions

	Одна серія дослідів	Дві серії дослідів	Чотири серії дослідів
Нульовий шар	13,48	6,4	3,04
Шостий шар	13,41	6,06	3,54
Дванадцятий шар	11,40	7,73	7,18

В даному експерименті ріст похибки у дальніх шарах пов'язаний з тим, що частина променів, які проходять крізь об'єкт, проходить повз детектора, як зображено на Рис. 6. Рішенням цієї проблеми може стати використання матриці детекторів більшого розміру, або використання рухомого набору детекторів.

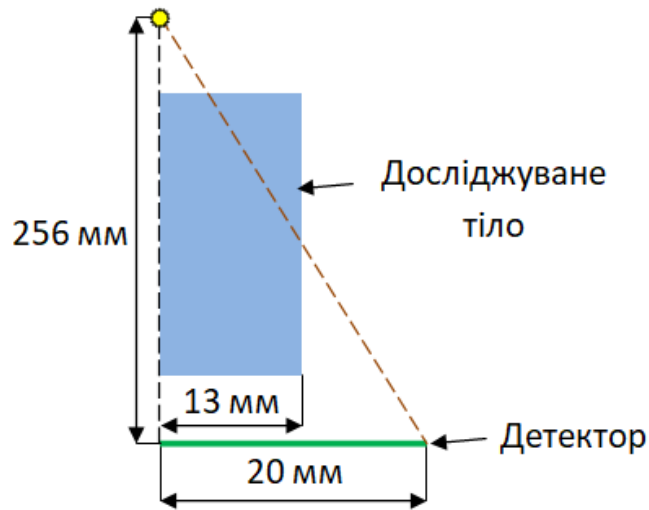


Рис. 6. Недостатність розміру детектора.
Figure 6. Detector size insufficiency.

Для кільцевої геометрії сканування відбувається з кроком обертання в один градус. Обертання випромінювача та детекторів відбувається навколо нульового шару об'єкта. Для лінійної геометрії сканування відбувається так, щоб відповідати променям кільцевої геометрії сканування в похилих площинах з кроком в 1 градус. Розмір сітки детекторів становить 256×20 мм з площиною однієї клітинки 1 мм^2 . Довжина проходу випромінювача для алгоритму з лінійною геометрією сканування складе 768 мм. Реконструкція проводилась з 360 проєкцій для кожного з алгоритмів. У випадку лінійного сканування 360 проєкцій розбиваються на 4 серії по 90 проєкцій при дослідженні на кути $-45-45$, $45-135$, $135-225$, $225-315$ градусів, що забезпечує повне сканування в 360 градусів в параметрах кільцевого сканування.

На Рис. 7. представлено результати роботи.

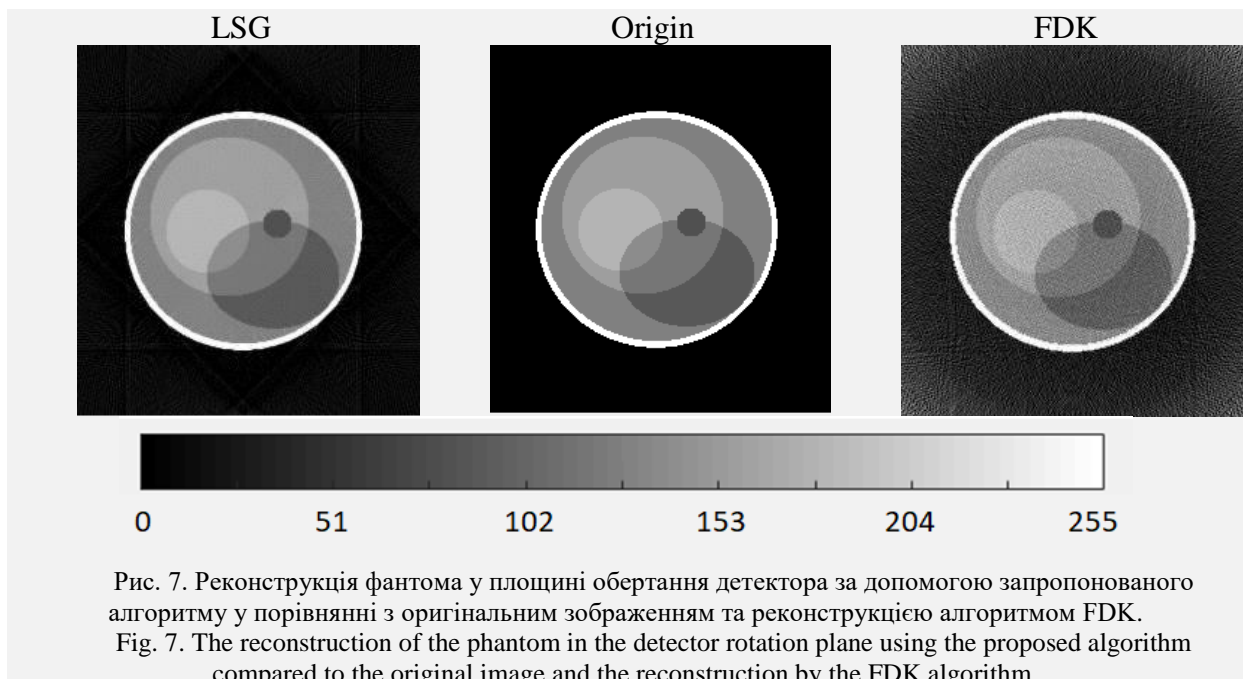


Рис. 7. Реконструкція фантома у площині обертання детектора за допомогою запропонованого алгоритму у порівнянні з оригінальним зображенням та реконструкцією алгоритмом FDK.

Fig. 7. The reconstruction of the phantom in the detector rotation plane using the proposed algorithm compared to the original image and the reconstruction by the FDK algorithm.

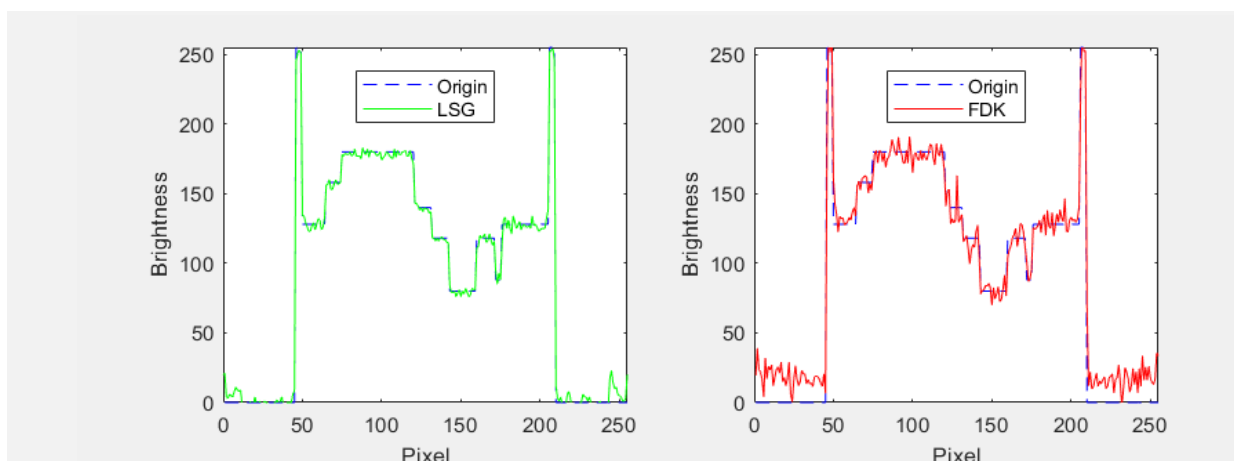


Рис. 7. Продовження. Реконструкція фантома у площині обертання детектора за допомогою запропонованого алгоритму у порівнянні з оригінальним зображенням та реконструкцією алгоритмом FDK.

Fig. 7. Continuation. The reconstruction of the phantom in the detector rotation plane using the proposed algorithm compared to the original image and the reconstruction by the FDK algorithm.

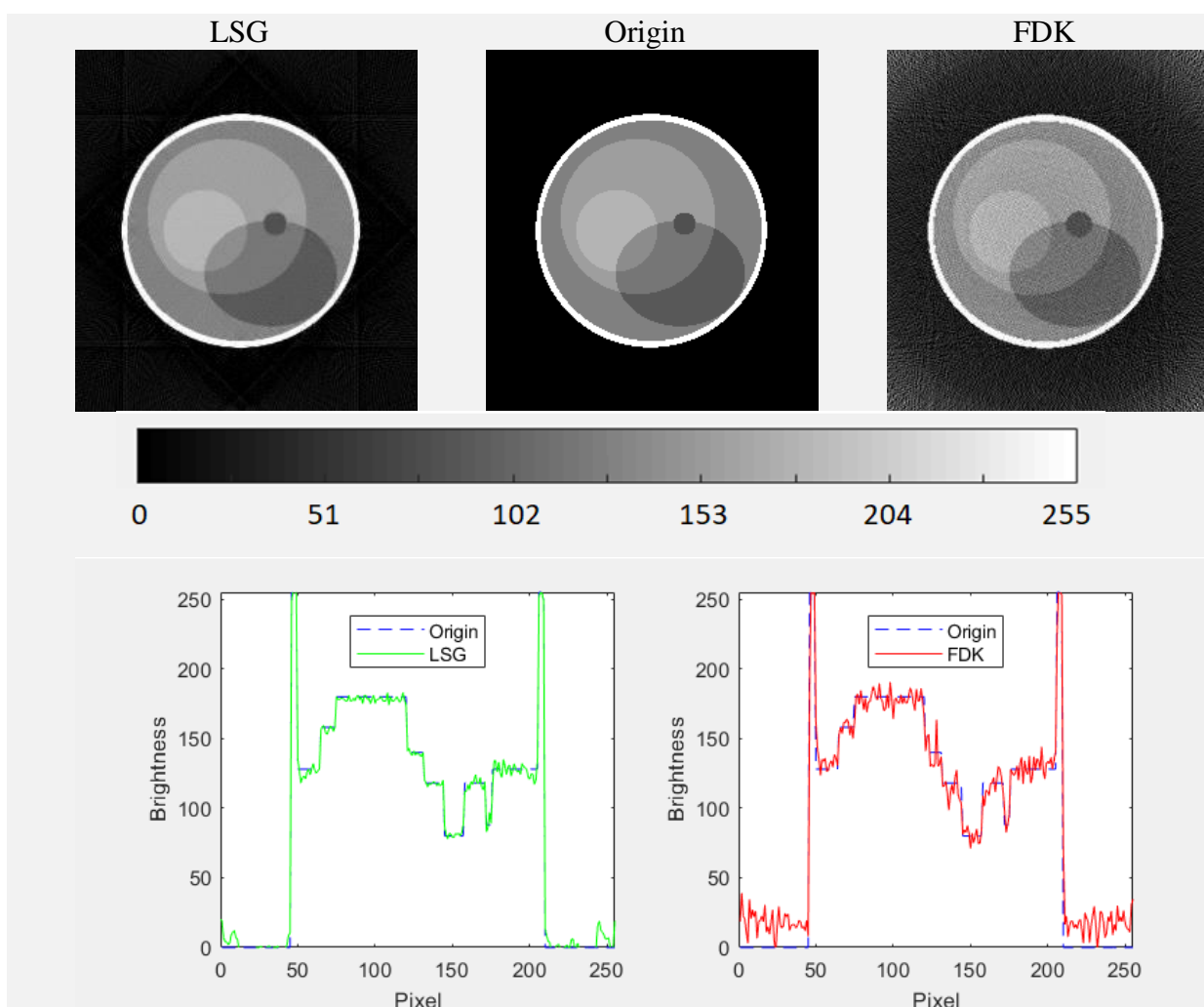


Рис. 8. Реконструкція фантома третього шару за допомогою запропонованого алгоритму у порівнянні з оригінальним зображенням та реконструкцією алгоритмом FDK.

Fig. 8. Reconstruction of the phantom's third-layer using the proposed algorithm compared to the original image and the reconstruction by the FDK algorithm.

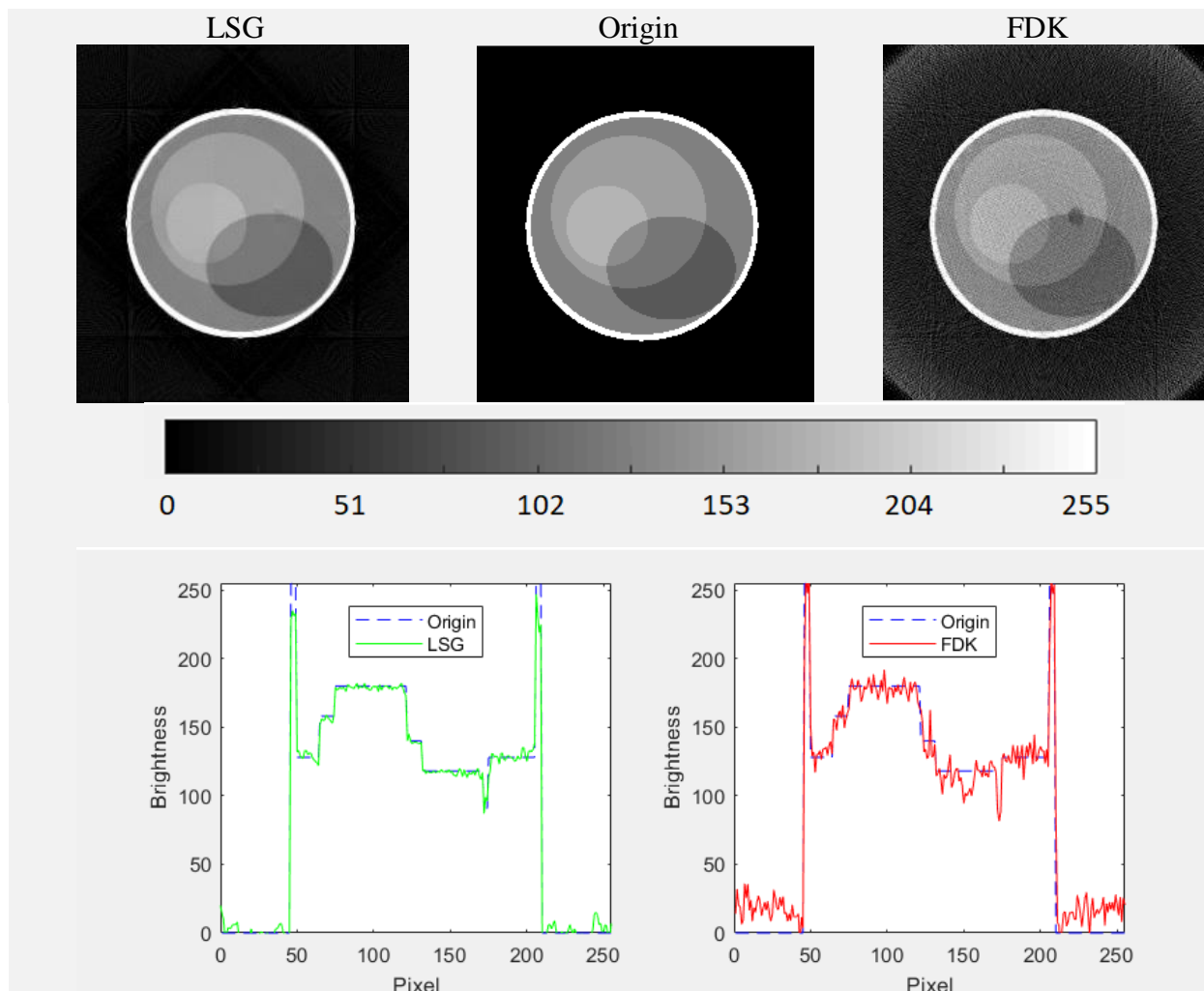


Рис. 9. Реконструкція фантома шостого шару за допомогою запропонованого алгоритму у порівнянні з оригінальним зображенням та реконструкцією алгоритмом FDK.
 Fig. 9. Reconstruction of the phantom's sixth-layer using the proposed algorithm compared to the original image and the reconstruction by the FDK algorithm.

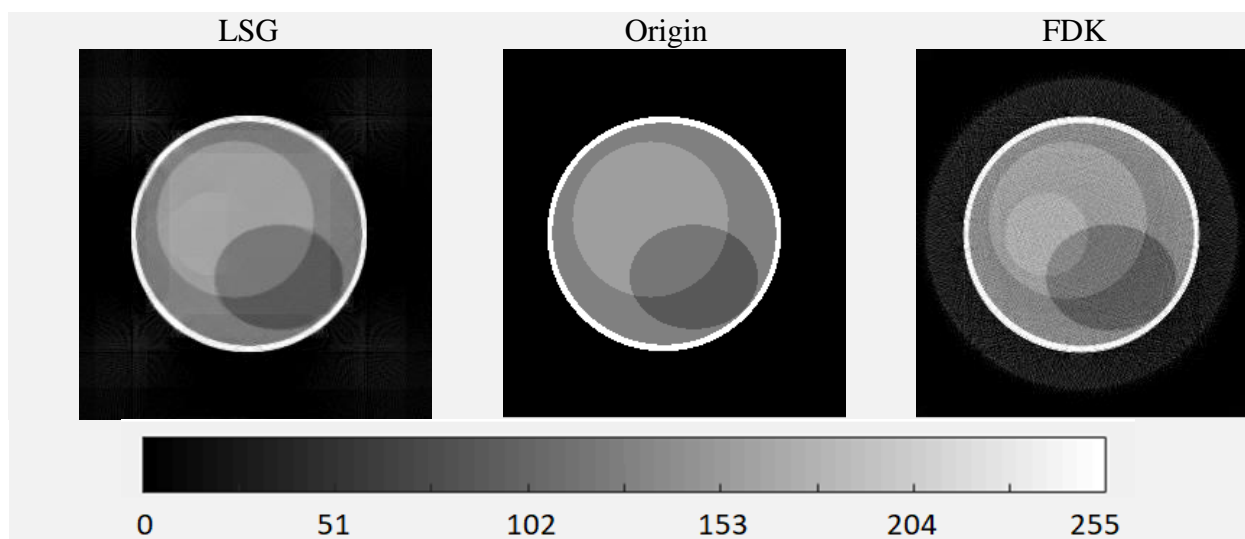


Рис. 10. Реконструкція фантома дев'ятого шару за допомогою запропонованого алгоритму у порівнянні з оригінальним зображенням та реконструкцією алгоритмом FDK.
 Fig. 10. Reconstruction of the phantom's ninth-layer using the proposed algorithm compared to the original

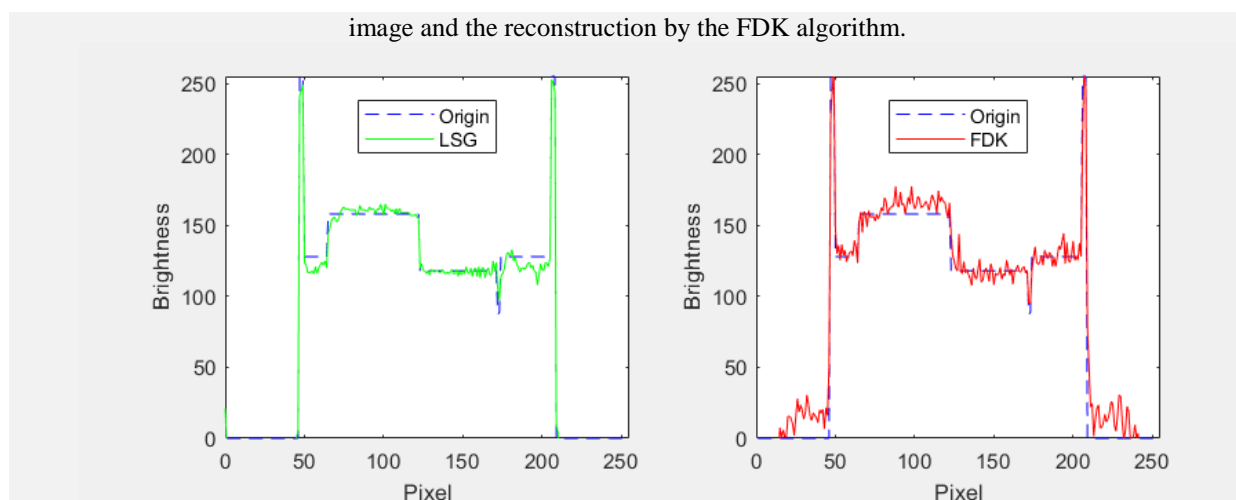


Рис. 10. Продовження. Реконструкція фантома дев'ятого шару за допомогою запропонованого алгоритму у порівнянні з оригінальним зображенням та реконструкцією алгоритмом FDK.

Fig. 10. Continuation. Reconstruction of the phantom's ninth-layer using the proposed algorithm compared to the original image and the reconstruction by the FDK algorithm.

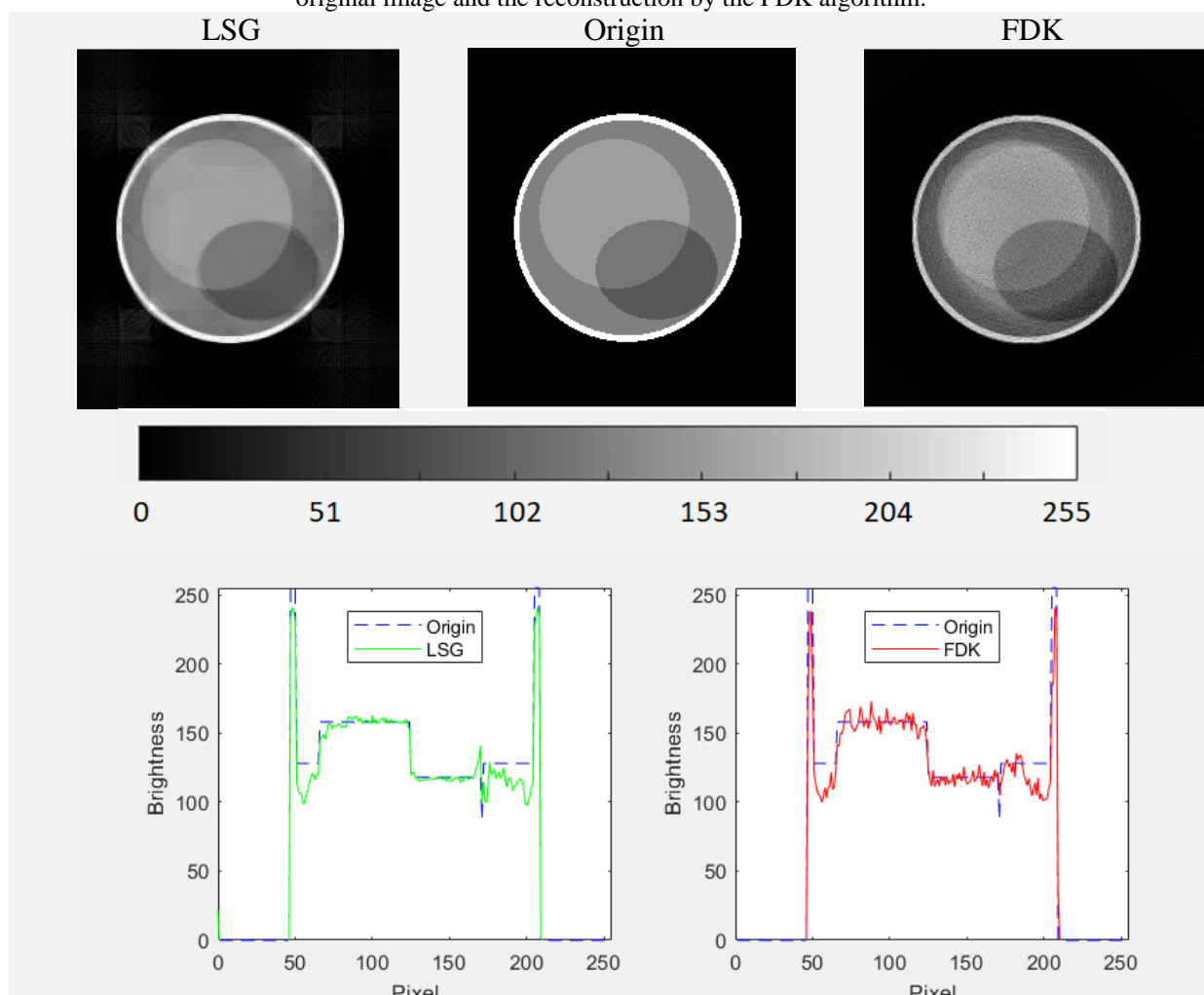


Рис. 11. Реконструкція фантома дванадцятого шару за допомогою запропонованого алгоритму у порівнянні з оригінальним зображенням та реконструкцією алгоритмом FDK.

Fig. 11. Reconstruction of the phantom's twelfth-layer using the proposed algorithm compared to the original image and the reconstruction by the FDK algorithm.

Результати реконструкції об'єктів за допомогою алгоритмів відображають ефективність їхнього застосування, і важливою характеристикою є час, який потрібен для виконання процесу. У цій роботі розрахунки виконувалися на центральному процесорі 11-th Gen Intel(R) Core i5-11400H із тактовою частотою 2,70 ГГц. Виконання коду відбувалось в одному потоці без використання паралельних обчислень.

У випадку обробки одного шару досліджуваного об'єкту, що представлений зображенням розмірами 256×256 пікселів, час реконструкції з використанням стандартного алгоритму FDK складає 2,7 хвилини, в той час як обрахунок зворотної проєкції за допомогою алгоритму LSG складає 1,2 хвилини. Отже, можна відзначити прискорення у часі виконання між цими двома алгоритмами у 2,25 рази.

Причиною такої різниці є менша кількість змінних інтегрування в розробленому алгоритмі LSG, що призводить до меншої кількості операцій і, відповідно до цього, прискорює процес реконструкції. Такі відмінності в ефективності алгоритмів важливо враховувати при виборі методів обробки даних у медичній та інших областях, де важливий швидкий та точний аналіз інформації.

ВИСНОВКИ

У статті було наведено нову методику сканування, алгоритм реконструкції для конусного пучка та представлено порівняння з класичним алгоритмом тривимірної реконструкції. Дослідження показало, що використання прямої лінії як геометрії сканування забезпечує більшу проєкційну повноту даних і дозволяє отримати більш точну та детальну реконструкцію об'єкта. Порівняно з коловим рухом, лінійна геометрія сканування хоч і зазнає артефактів через наближення, але вони виявляються значно меншими і водночас дозволяють отримати якісне представлення про розподіл особливостей структури тіла при більших кутах конусності променя ніж при звичних методах дослідження.

Ще одною перевагою розробленого алгоритму LSG є швидша обробка даних порівняно з класичним алгоритмом FDK, так було отримано прискорення обрахунку реконструкції у 2,25 рази. Така перевага запропонованого алгоритму є дуже важливою у випадку, коли необхідно обробити великий обсяг даних або ж проводити багато реконструкцій у реальному часі. Такий підхід дозволить використовувати томографію більш ефективно в клінічній та науковій практиці, сприяючи точнішим та швидшим діагностичним процедурам.

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. Radon J. On the determination of functions from their integral values along certain manifolds. IEEE Transactions on Medical Imaging. 1986;5(4):170–6. <https://doi.org/10.1109/TMI.1986.4307775>
2. Proksa R, Kohler T, Grass M, Timmer J. The n-PI-method for helical cone-beam CT. IEEE Transactions on Medical Imaging. 2000;19(9):848–63. <https://doi.org/10.1109/42.887834>
3. Tuy HK. An inversion formula for cone-beam reconstruction. SIAM Journal on Applied Mathematics. 1983;43(3):546–52. <https://doi.org/10.1137/0143035>
4. Clack R, Defrise M. Cone-beam reconstruction by use of Radon transform intermediate functions. Journal of the Optical Society of America A. 1994;11(2):580–5. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.11.000580>

5. Smith BD. Image reconstruction from cone-beam projections: Necessary and sufficient conditions and reconstruction methods. *IEEE Transactions on Medical Imaging*. 1985;4(1):14–25. <https://doi.org/10.1109/tmi.1985.4307689>
6. Kudo H, Noo F, Defrise M. Quasi-exact filtered backprojection algorithm for long-object problem in helical cone-beam tomography. *IEEE Transactions on Medical Imaging*. 2000;19(9):902–21. <https://doi.org/10.1109/42.887838>
7. Jacobson C. Fourier methods in 3D-reconstruction from cone-beam data. Linköping: Department of Electrical Engineering, Linköping University; 1996. 256 p.
8. Grangeat P. *Analysis of a 3D imaging device by reconstruction from cone beam X ray radiographs [dissertation]*. Ecole Nationale Supérieure des Telecommunications. 1987. 458 p.
9. Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW. Practical cone-beam algorithm. *Journal of the Optical Society of America A*. 1984;1(6):612–9. <https://doi.org/10.1364/josaa.1.000612>
10. Fu Z, Tseng HW, Vedantham S. An attenuation field network for dedicated cone beam breast CT with short scan and offset detector geometry. *Scientific Reports*. 2024;14:319. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-51077-1>
11. Wu Weiwen, Quan Chao, Liu Fenglin. Filtered back-projection image reconstruction algorithm for opposite parallel linear CT scanning. *Acta Optica Sinica*. 2016;36(9):0911009. <https://doi.org/10.3788/aos201636.0911009>
12. Smith BD. Cone-beam tomography: Recent advances and a tutorial review. *Optical Engineering*. 1990;29(5):524–34. <https://doi.org/10.1117/12.55621>
13. Kowalski G. Fast 3-D scanning systems using a limited tilting angle. *Applied Optics*. 1977;16(6):1686–90. <https://doi.org/10.1364/ao.16.001686>
14. Zeng GL, Clack R, Gullberg GT. Implementation of Tuy's cone-beam inversion formula. *Physics in Medicine and Biology*. 1994;39(3):493–507. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/39/3/014>
15. Hatamikia S, Biguri A, Herl G, Kronreif G, Reynolds T, Kettenbach J, et al. Source-detector trajectory optimization in cone-beam computed tomography: A comprehensive review on today's state-of-the-art. *Physics in Medicine and Biology*. 2022;67(16):16TR03. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/ac8590>
16. Reynolds T, Ma YQ, Kanawati AJ, Constantinidis A, Williams Z, Gang G, et al. Extended intraoperative longitudinal 3-dimensional cone beam computed tomography imaging with a continuous multi-turn reverse helical scan. *Investigative Radiology*. 2022;57(11):764–72. <https://doi.org/10.1097/rli.0000000000000885>
17. Hatamikia S, Biguri A, Kronreif G, Kettenbach J, Russ T, Furtado H, et al. Optimization for customized trajectories in cone beam computed tomography. *Medical Physics*. 2020;47(10):4786–99. <https://doi.org/10.1002/mp.14403>
18. Zeng GL. Revisit of the ramp filter. *IEEE Transactions on Nuclear Science*. 2015;62(1):131–6. <https://doi.org/10.1109/tns.2014.2363776>

SEGMENTED ALGORITHM FOR THREE-DIMENSIONAL RECONSTRUCTION IN LINEAR SCAN GEOMETRY

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

V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Square, Kharkiv, 61022, Ukraine

e-mail: konstantinlapitan@gmail.com

Submitted February 8, 2024; Revised May 3, 2024;

Accepted May 18, 2024

Background: Computer tomography is recognized as one of the most powerful methods for diagnosis, and monitoring of a wide range of diseases. It provides the ability to obtain detailed information about the internal structure of organs and bones. Despite the success of computed tomography in areas such as three-dimensional mammography or lung radiography, it has not achieved the same level of widespread as, for example, magnetic resonance imaging, even if CT offers greater accuracy. This is primarily due to safety limitations on the permissible number of examinations due to the harmfulness of X-ray radiation to the patient. One of the main challenges facing researchers is the need to reduce the time of the entire examination and decrease the radiation exposure to the patient. Overcoming these challenges is crucial for improving the overall efficiency of medical services, optimizing treatment plans, and ultimately enhancing patient outcomes. Thus, addressing these issues through innovative algorithms and methods in computed tomography holds significant potential for revolutionizing medical diagnostics and ensuring continuous progress in modern healthcare.

Objectives: The aim of this work was to develop an algorithm for three-dimensional reconstruction that is independent of the conicity of the radiation beam. Therefore, it allows for accurate reconstruction of the entire object with a single rotation of the radiation source around the investigated object.

Materials and Methods: The work utilizes methods of integral transforms and computer modeling to solve inverse problems arising in computer tomography.

Results: An analytical inversion formula was obtained for three-dimensional computer tomography with linear scan geometry and segmentation. The feasibility of the developed algorithm was verified, and a methodology for research with linear motion of the conical emitter and detectors was developed.

Conclusions: The developed algorithm improves the reconstruction of object layers significantly distant from the plane in which the emitter and detector move, compared to existing algorithms.

KEY WORDS: computed tomography; conical beam; Feldkamp algorithm; three-dimensional reconstruction; medical diagnostics.

Original article<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-51-04>

UDC 577.322:[578.834.1:615.2]

IDENTIFICATION OF POTENTIAL CORTICOSTEROID BINDING SITES ON THE SARS COV-2 MAIN PROTEASE MPRO — *IN SILICO* DOCKING STUDY**N. V. Khmil^{1,2}, A. V. Shestopalova², V. G. Kolesnikov²,
A. O. Boiechko-Nemovcha¹**¹*Kharkiv National University of Radio Electronics, 14 Nauky Ave., Kharkiv, 61166, Ukraine;*²*O. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics National Academy of Sciences of Ukraine, 12 Acad. Proskura str., Kharkiv, 61085, Ukraine*e-mail: khmilnatali@gmail.com

Submitted December 14, 2023; Revised February 19, 2024;

Accepted May 1, 2024

Background: Currently, an increase in the number of new cases of Covid-19 caused by the severe acute respiratory syndrome virus (SARS-CoV-2) is recorded in Ukraine and the world. SARS-CoV-2 provokes exacerbation of chronic diseases and activates inflammatory and allergic reactions. A severe course of Covid-19 increases the duration of hospitalization and the mortality rate among the population. Pathogenetic therapy is carried out with systemic corticosteroids, which suppress the cytokine storm by mitigating the SARS-CoV-2-induced systemic inflammatory response and inhibit SARS-CoV-2 main protease Mpro, a key component of viral replication.

Objectives: The aim of this study is to identify the potential corticosteroid binding sites on SARS CoV-2 main protease Mpro based on the analysis of the energetic and topological characteristics of the complexes as well as to investigate the inhibitory activity of selected corticosteroids against Mpro.

Material and Methods: The crystal structure of Mpro (ID: 6LU7 from Protein Data Bank) (www.rcsb.org) was chosen as a docking target. Molecular docking methods (AutoDock Tools 1.5.7, AutoDock Vina 1.1.2) were used to gain insight into the binding affinity Mpro with systemic corticosteroids such as dexamethasone (DEX), prednisone (PRED), prednisolone (PNL), methylprednisolone (Medrol), triamcinolone (TAC), and hydrocortisone (HCT). Visualization of docking results was done in PyMol 2.5. The protein-ligand interaction profiler (PLIP) and the LigPlot+ web tool were used to identify non-covalent interactions between Mpro and ligands (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de>).

Results: *In silico* docking study demonstrated that all selected corticosteroids bound with amino acid residues of II and III domains of Mpro with binding energy in the range -7.8...-6.6 kcal/mol. The high binding affinity is found for dexamethasone-Mpro (-7.8 kcal/mol); for prednisone, prednisolone, methylprednisolone, triamcinolone, and hydrocortisone the binding energies were -7.4, -7.0, -7.5, -7.6 and -6.6 kcal/mol, respectively. It was shown that hydrogen bonds and hydrophobic interactions were involved in the formation of ligand-protein complexes mainly through residues such as Arg131, Lys137, Thr199, Asp289, Leu272, Leu286, Leu287, Tyr239, and Gly275, which formed the catalytic and distal sites for ligand binding. The inhibition constant of corticosteroids has ranged from 1.90×10^{-6} to 14.4×10^{-6} M.

Conclusion: Our results showed that the favorable binding sites for dexamethasone, prednisone, methylprednisolone, and triamcinolone are located in the catalytic site of domain II and the distal site of domain III of SARS-CoV-2 main protease Mpro with high binding affinities confirming the stability of

In cites: Khmil NV, Shestopalova AV, Kolesnikov VG, Boiechko-Nemovcha AO. Identification of potential corticosteroid binding sites on the SARS CoV-2 main protease Mpro — *in silico* docking study. Biophysical Bulletin. 2024;51:53–63. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-51-04>

Open Access. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

the complexes. The low inhibition constants values for dexamethasone, prednisone, methylprednisolone, and triamcinolone further confirm the effectiveness of the selected corticosteroids as inhibitors of Mpro activity. Based on the binding energy as well as inhibition constants values dexamethasone, prednisone, methylprednisolone, and triamcinolone were identified as potential inhibitors for Mpro.

KEY WORDS: Covid-19; SARS CoV-2 main protease Mpro; systemic corticosteroids; molecular docking; human health.

Since the summer of 2023, COVID-19 infections and hospitalizations have been on the rise worldwide. While they have remained below previous peaks, the World Health Organization has reported over 1.4 million new COVID-19 cases and over 1800 deaths. The Omicron variant is responsible for the recent rise in infection cases; its several subvariants such as BA.2.86 (Pirola), EG.5 (Eris), FL.1.5.1 (Fornax) are spreading significantly faster than the Delta variant B.1.617.2 [1].

Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2 (SARS-CoV-2) is the etiological agent of COVID-19 that causes respiratory illness ranging in severity from the common cold to fatal pneumonia. SARS-CoV-2 is a positive-sense single-stranded genomic RNA virus (+ssRNA) that uses +ssRNA to store and replicate its genetic information [2]. The SARS-CoV-2 genome comprises about 30,000 nucleotides flanked by two untranslated regions (UTR) at the 5'- and 3'- ends. The 5' UTR contains the 5' cap structure as well as 3' UTR consists of the poly(A) tail. SARS-CoV-2 RNA genome contains at least 14 open reading frames (ORFs) and encodes 29 viral proteins, among which sixteen non-structural proteins (NSPs), four structural proteins including spike glycoprotein (S), envelope protein (E), membrane protein (M), nucleocapsid (N) protein, and eight accessory proteins [3]. The +ssRNA genome expression starts with the 5' cap end of two ORFs (ORF1a and ORF1b) which comprise about two-thirds of the genome [4]. As a result, the synthesis of two large overlapping precursor polyproteins pp1a and pp1ab (molecular weights of 486 kDa and 790 kDa, respectively), is realized on cellular ribosomes. Differences exist in the translation of the SARS-CoV-2 +ssRNA due to a programmed -1 ribosomal frameshifting (-1 PRF) between ORF1a and ORF1b [5]. Thereby, an overexpression of ORF1a-encoded pp1a protein relative to ORF1b-encoded pp1ab protein occurs.

Then polyproteins pp1a and pp1ab undergo the proteolytic processing into 16 NSPs by two viral proteases — a papain-like protease (PLpro) and a 3-chymotrypsin-like cysteine protease (3CLpro) also known as main protease Mpro. Among the two, the main protease Mpro is a key protease of SARS-CoV-2 involved in viral RNA replication and transcription and is important in the life cycle of COVID-19. The crystal structures revealed that Mpro is a dimer, formed by two monomers. Each monomer consists of three domains — domain I (amino acid residues 8–101) and domain II (amino acid residues 102–184) have an antiparallel β -barrel structure. Domain III (amino acid residues 201–303) contains five α -helices connected to domain II by a long loop (amino acid residues 185–200) [6, 7]. The Mpro is highly conserved in its amino acid sequence and three-dimensional structure, making it a suitable drug target, especially for small molecules that have an inhibitory effect [8]. Most inhibitors targeted the enzyme catalytic site, which has four sub-pockets (S1, S1', S2, S3) and located in a cleft between domain I (amino acid residues 10–99) and domain II (amino acid residues 102–182). Cysteine (Cys145) and histidine (His41) compose the catalytic dyad and are two key residues of the catalytic site. In addition, in stabilizing the catalytic site of the SARS-CoV-2 Mpro and in the binding of ligands are involved amino acid residues such as Ser10, Gly11, Glu14, Thr24, Asn28, Ser139, Phe140, Ser147, His163, Met165, Glu166, His172, Gln189, and Gln192. However, there are distal sites on the SARS CoV-2 Mpro for inhibitors binding through an allosteric mechanism, especially non-covalent inhibitors with high selectivity for Mpro [9, 10].

Corticosteroids have been considered the effective inhibitors of the replication of influenza A and B viruses, herpes simplex virus as well as SARS-CoV-2 by binding and inhibiting the catalytic activity of Mpro [11]. In the case of COVID-19, pathogenetic therapy is carried out in the middle and severe course of the disease with systemic corticosteroids, which suppress the cytokine storm by mitigating the SARS-CoV-2-induced systemic inflammatory response. At the same time, systemic corticosteroids inhibit SARS-CoV-2 main protease Mpro, which is a key component of viral replication. The cytokine storm has been suggested to be associated with high levels of several key pro-inflammatory cytokines, such as IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α , IFN- γ , IP-10, GM-CSF, MCP-1, IL-10, and chemokines (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXC [12, 13, 14]. However, the mechanism of corticosteroid inhibitory action against Mpro is currently unclear due to insufficient study of ligand-binding sites of the main protease Mpro.

The aim of this study is to identify the potential corticosteroid binding sites on SARS CoV-2 main protease Mpro based on the analysis of the energetic and topological characteristics of the complexes as well as to investigate the inhibitory activity of selected corticosteroids against Mpro.

MATERIALS AND METHODS

As a docking target was the SARS-CoV-2 main protease Mpro. The 3-dimensional (3D) structure of Mpro was downloaded from the Protein Data Bank (www.rcsb.org) (ID: 6LU7), which is the result of X-ray diffraction at 2.16 Å resolution. After deleting water molecules and adding missing hydrogens, the protein in PDB format was converted to PDBQT format using AutoDock Tools 1.5.7. Six well-known corticosteroids — dexamethasone (DEX), prednisone (PRED), prednisolone (PNL), methylprednisolone (Medrol), triamcinolone (TAC), and hydrocortisone (HCT) were downloaded in SDF format from an open chemistry database PubChem at the National Institutes of Health and were subjected for molecular docking studies as ligands. The ligands in SDF format were converted to PDB format using the Open Babel 3.1.1 computer program. The structures of corticosteroids were optimized using the Open Babel 3.1.1. The Gasteiger-Marsili partial charges were computed using the UFF force field [15]. Protonation of amino acid residues at pH=7 was checked using Propka 3.1 [16]. First, the blind docking with the grid box dimensions set of 126 Å x 126 Å x 126 Å was performed. The center grid box had fixed coordinates $x = -25.995$, $y = 12.591$, and $z = 59.151$. The exhaustiveness parameter was 50; the distance between the grid points was 0.503 Å. Following this, sequential docking was performed to explore whether any allosteric mechanism of inhibition of the main protease among the considered ligands. AutoDock Vina (version 1.1.2) was used to calculate the predicted docking poses and binding energies [17]. For the identification of non-covalent interactions between Mpro and ligands, the protein-ligand interaction profiler (PLIP) and the LigPlot+ web tool were applied (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de>) [18]. DoGSiteScorer from Proteins Plus was used to detect some characteristics of potential binding pockets such as the surface area, volume, and depth of binding pocket [19]. Visualization of docking results was done in PyMol 2.5 [20]. To convert PyMol files to PDB format, the interactive converter MichelANGLo was used (<https://michelangelo.sgc.ox.ac.uk/pymol>).

RESULTS AND DISCUSSION

The molecular docking methods are being used to predict energetically favorable conformations and the orientations of ligands within the binding site of the protein as well as to assess the binding affinity at the molecular level. The AutoDock Vina program searches the topological space of the ligand relative to the receptor until a scoring function is minimized.

The result is an affinity score. Then an affinity score is used to rank ligand poses; the top-ranked conformation is selected as the predicted ligand-protein complex. In our recent work, we have demonstrated the efficiency and accuracy of the AutoDock Vina tool to determine the binding energies and amino acid residues involved in the interaction of penicillin G determinants with human serum albumin [21].

In this study, corticosteroids — DEX, PRED, PNL, Medrol, TAC, and HCT were subjected to docking studies. Autodock results demonstrated that DEX, PRED, PNL, Medrol, TAC, and HCT can dock SARS-CoV-2 main protease Mpro by AutoDock Vina scores of -7.8, -7.4, -7.0, -7.5, -7.6, -6.6 kcal/mol, respectively (Tabl. 1). The inhibition constant (k_i) was calculated to evaluate the inhibition potency of systemic corticosteroids toward Mpro using Van't Hoff equation:

$$k_i = \exp\left(\frac{\Delta G}{RT}\right)$$

where ΔG is the binding energy in kcal/mol; R is the universal gas constant ($1.987 \text{ cal}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$); T is the temperature (298 K).

It has been shown that the inhibition constants of six corticosteroids ranged from 1.9×10^{-6} to 14.4×10^{-6} M (Table 1).

The highest affinity was reported for DEX-Mpro with AutoDock Vina score of -7.8 kcal/mol and interacting amino acids of Arg131, Lys137, Thr199, and Asp289 through hydrogen bonds and Leu272, Leu286, Leu287, Tyr239, and Gly275 through hydrophobic interactions. For DEX is predicted to sit in the domains II and III of Mpro (Fig. 1). Therefore, DEX showed favorable interactions with several residues of the catalytic pocket of domain II and several residues of the distal site of domain III.

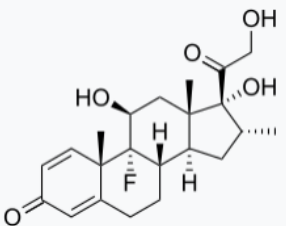
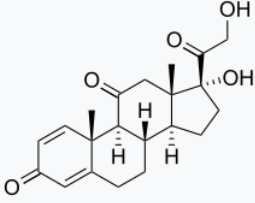
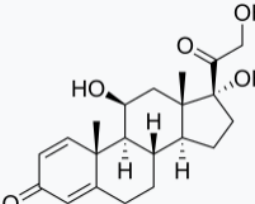
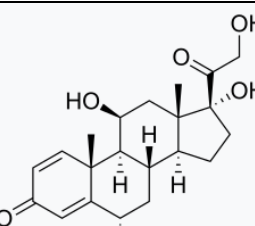
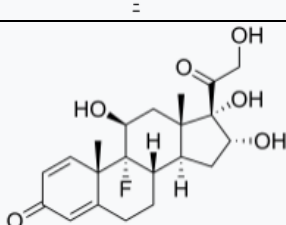
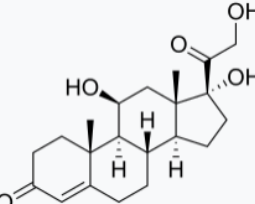
Recently Ghosh R. and colleagues have reported that dexamethasone exhibits a high binding affinity of -7.9 kcal/mol toward Mpro; k_i value at 298 K was 1.6×10^{-6} M [22]. Therefore, it can be considered as a high-quality drug to reduce the mortality rate of COVID-19 patients [23]. According to our calculations, the inhibition constant for DEX was 1.9×10^{-6} M. It was evidenced that DEX efficiently interacted with different amino acid residues of domain I as well as domain II of Mpro. Ghosh R. et al. [22] showed that DEX formed hydrogen bonds with His163, His164, and Cys145 of domain II of Mpro. In contrast to R. Ghosh's findings, our results suggested that DEX was docked to the distal active site of Mpro with high binding energy (-7.8 kcal/mol). Our results align with the general trend identified in [22], although with some notable distinctions that are primarily connected to the different preparation and optimization of corticosteroids. While there are similarities between our results and those of R. Ghosh, concerning the binding energy, it's important to note that high binding energy can indicate the importance of the involvement of the distal domain in dexamethasone binding to inhibit Mpro through an allosteric regulation.

From our molecular docking simulation, Medrol also demonstrated strong interactions with Mpro. The binding energy of Medrol was found to be -7.5 kcal/mol, which was lower compared to Ghosh R. et al. data which ranged from -5.1 to -5.5 kcal/mol [22]. The Medrol formed hydrogen bonds and had hydrophobic interaction with the identical residues of the catalytic pocket of domain II and the distal site of domain III of Mpro as DEX. In addition, in the case of Medrol, the carbonyl oxygen of Leu287 was involved in the interaction through the hydrogen bond.

In general, the binding energies of different amino acid residues that bind the same ligand can vary due to specific interactions and contributions of each residue in the binding site. However, if the binding energies are observed to be relatively similar for different residues binding the same ligand, it might be attributed to the following factors.

- *Conservation of binding motifs:* proteins often exhibit conservation in their binding sites or motifs. If different amino acid residues are part of a conserved motif that interacts with a specific ligand, the overall binding energy may be similar because the essential interactions are maintained.

Table 1. List of the potential inhibitors against the main protease SARS-CoV-2 Mpro with their binding energy and inhibition constant

Corticosteroids interacting with Mpro	2D corticosteroid structure	Binding energy, ΔG , kcal/mol	Inhibition constant, $k_i \times 10^{-6}$, M
Dexamethasone		-7.8	1.90
Prednisone		-7.4	3.74
Prednisolone		-7.0	7.35
Methylprednisolone		-7.5	3.16
Triamcinolone		-7.6	2.66
Hydrocortisone		-6.6	14.4

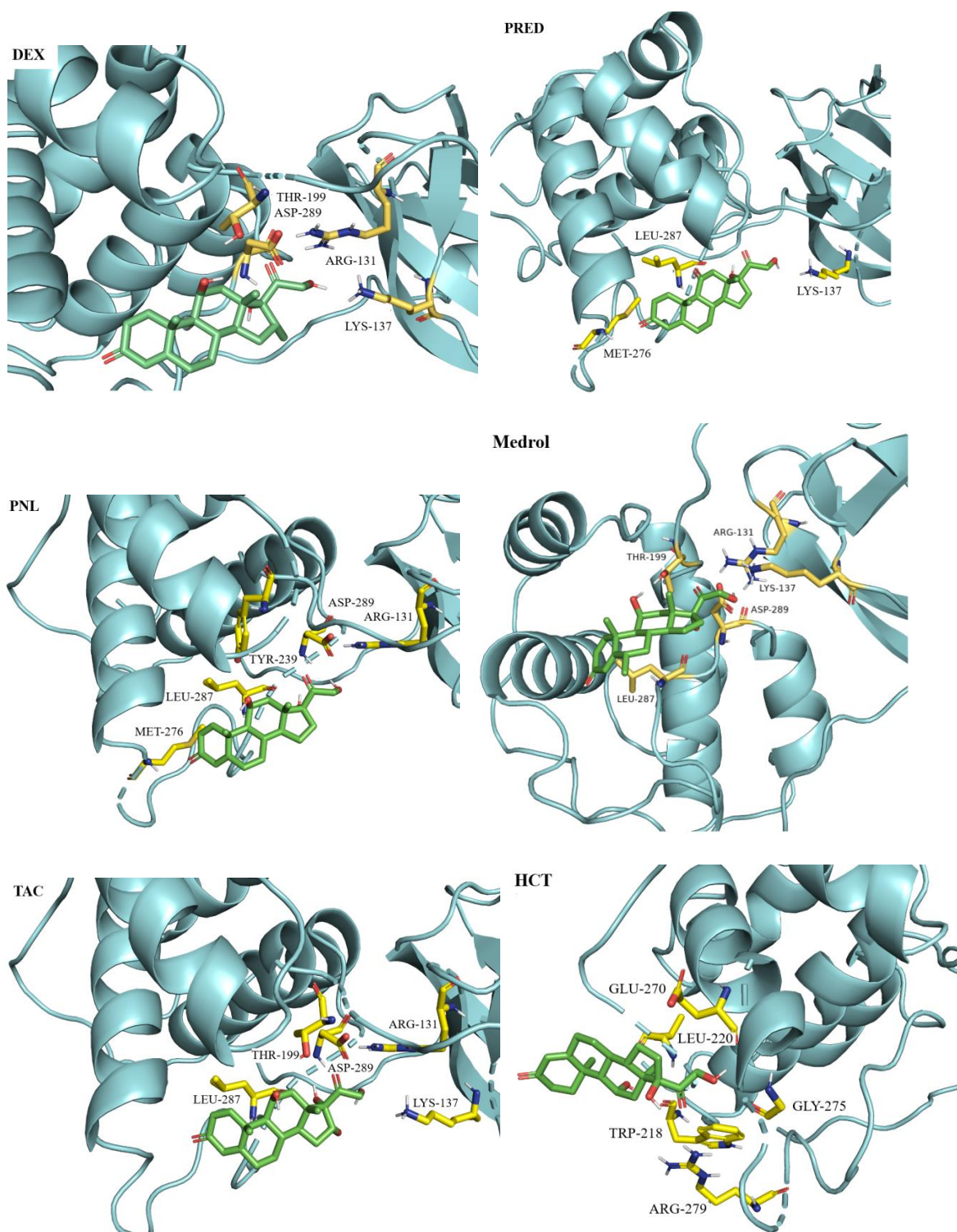


Fig. 1. The predicted docking poses of different corticosteroids in cyan cartoons rendering (coloring by element, all C atoms of ligands are in green, red — O, gray — H, dark gray — F). Cyan ribbons represent SARS-CoV-2 main protease Mpro; yellow-orange sticks are interacting amino acid residues (coloring by element, all C atoms of Mpro are in yellow-orange, red — O, blue — N, gray — H). The amino acid residues of Mpro forming hydrogen bonds with the ligand are colored in yellow-orange.

- *Structural constraints*: the three-dimensional structure of the binding site can impose constraints on the types of interactions that can occur. If the ligand interacts with a protein's specific region, the available amino acid side chains in this region may be limited, leading to similar binding energies.

- *Functional requirements*: different amino acids can have similar physicochemical properties. If the binding site requires specific characteristics, such as a particular charge or hydrophobicity, different residues with similar properties may contribute similarly to the binding energy.

- *Adaptability of proteins*: proteins can exhibit a degree of adaptability in their structures. This adaptability allows different amino acids to fulfill similar roles in terms of ligand binding, resulting in comparable binding energies.

- *Compensatory changes*: even if individual amino acid residues change in the binding site, compensatory changes in neighboring residues may occur to maintain overall binding energy. This compensation can lead to similar net effects on ligand binding. It's important to note that while the binding energies may be similar, the specific contributions and details of the interactions can still differ among different amino acids. Additionally, experimental techniques, such as site-directed mutagenesis combined with biophysical methods, are often used to study and quantify the contributions of individual residues to binding affinity.

Among all ligands, TAC showed a sufficient binding affinity energy of -7.6 kcal/mol and an inhibition constant of $k_i = 2.66 \times 10^{-6}$ M. These data are consistent with the findings about the binding affinity and stability reported by Mishra A. et al. [24]. The high affinity of TAC with Mpro is associated with the presence of hydrogen bonds with Arg131, Lys137, Thr199, Leu287, and Asp289. There are also hydrophobic interactions with Tyr239, Leu272, and Leu286, which are responsible for the conformational stability of TAC-Mpro complex.

The prednisone interacts with the Mpro with a binding energy of -7.4 kcal/mol and an inhibition constant of 3.74×10^{-6} M. In the case of PRED, the molecular binding stabilized through hydrogen bonds with Lys137, Met276, and Leu287 as well as hydrophobic interactions through four residues such as Leu286, Tyr239, Leu271, Gly275. The prednisolone interacts with SARS-CoV-2 Mpro with a binding energy of -7.0 kcal/mol and an inhibition constant of 7.35×10^{-6} M. The molecular interaction is facilitated through hydrogen bonds with Arg131, Tyr239, Met276, Asp289, Leu287, and hydrophobic interactions through residues (Gly286, Leu286, and Thr199).

Mpro showed the least binding affinity with HCT at -6.6 kcal/mol. For HCT is predicted to sit in the domain III of Mpro; there is a hydrogen bond with Trp218, Glu270, Gly275, Leu220 and Arg279. Tiwari G. et al. [25] performed screening of several anti-inflammatory drugs, including hydrocortisone and dexamethasone as the SARS-CoV-2 inhibitors, and reported higher binding energy compared to our study. At the same time, Fadaka A. O. et al. [26] reported that three amino acid residues (Asn142, Glu166, and Cys44) in the Mpro active site were involved in the formation of hydrogen bonds with DEX atoms with a binding energy of -6.7 kcal/mol.

Our study offers additional insights beyond the scope of publication [22] work by estimating the surface area, volume, and depth of the ligand binding pockets that have high binding affinity, such as dexamethasone, prednisone, methylprednisolone, and triamcinolone (Fig. 2).

In general, the difference in binding pocket surface area, volume, and depth is due to several factors. The first is steric hindrance, as even minor structural differences can lead to variations in how the ligand fits into the binding pocket. Differences in the arrangement of functional groups can result in steric hindrance, where certain parts of one ligand may come into contact with residues lining the pocket, influencing its effective surface area and volume.

Second, ligands with similar structures may interact differently with residues within the binding pocket due to hydrogen bonding or hydrophobic interactions. These differences can lead to alterations in the conformation of the ligand or the surrounding protein residues, affecting the overall shape and size of the binding pocket. In addition, ligands may exhibit inherent flexibility, allowing them to adopt different conformations upon binding to the protein. Small structural differences can influence the preferred conformation of the ligand within the binding pocket, leading to variations in the surface area and volume occupied by the ligand-protein complex.

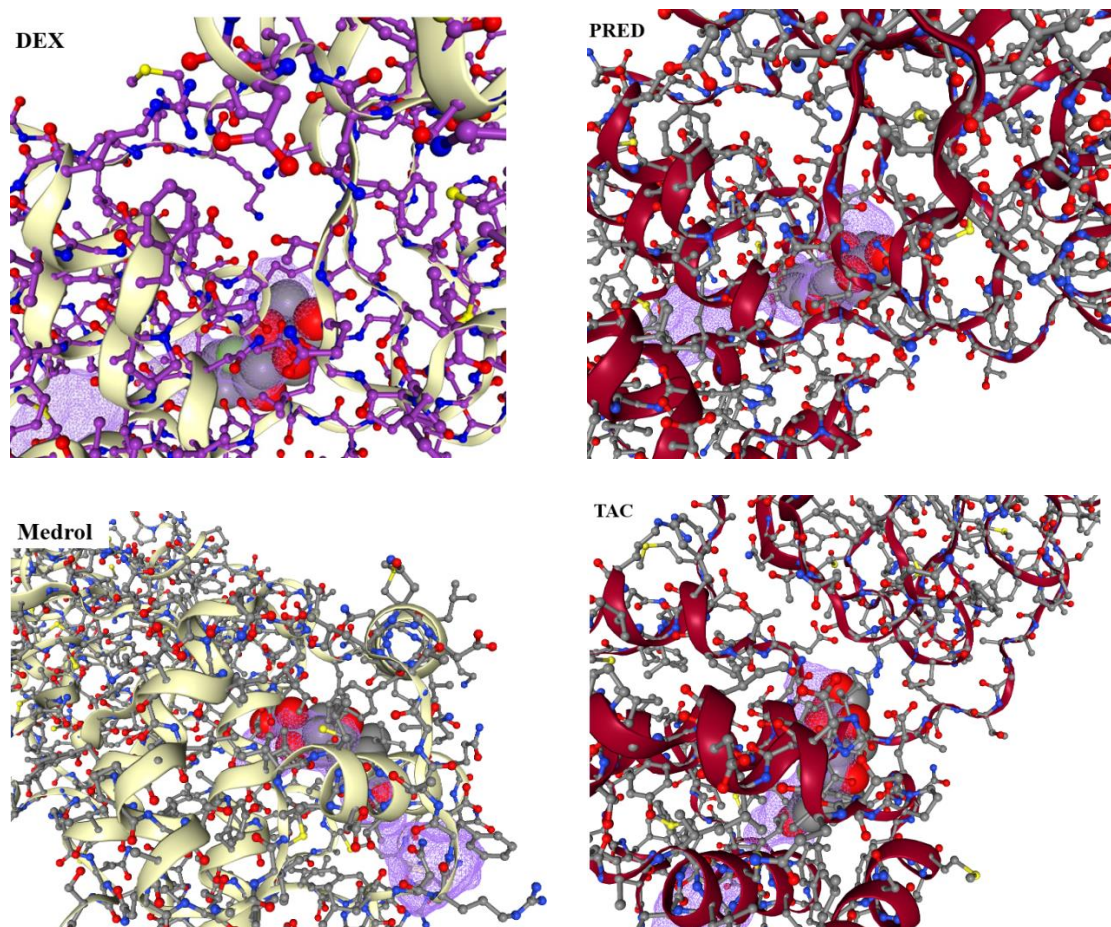


Fig. 2. The Mpro-ligand complexes. The ligand binding pocket of Mpro is marked in pale purple. The structure of Mpro is represented by ribbons; the ligand is represented as balls. The Mpro-dexamethasone ligand binding pocket has a depth of 20.59 Å, the surface area and volume of the binding site are 595.23 Å² and 416.19 Å³, respectively. The Mpro-prednisone ligand binding pocket has a depth of 19.86 Å, the surface area and volume of the binding site are 582.67 Å² and 425.15 Å³, respectively. The Mpro-methylprednisolone ligand binding pocket has a depth of 19.45 Å, the surface area and volume of the binding site are 578.47 Å² and 439.25 Å³, respectively. The Mpro-triamcinolone ligand binding pocket has a depth of 20.45 Å, the surface area and volume of the binding site are 586.77 Å² and 420.34 Å³, respectively.

Our results show the significance of distal sites in the ligand–Mpro affinity, especially domain III, through an allosteric mechanism. Domain II (Asp153-Asp155 and Leu167-Val171) and III (Asn277-Thr292) exhibit high flexibility and elasticity compared to the stable catalytic residues, His41 (from domain I) and Cys145 (from domain II) as was found by Weng Y.L. et al. [27]. We showed that the amino acid residue such as Thr199 is included in the Phe185-Thr201 linker loop (domain II-III) and can also cover the catalytic site in Mpro beside the Cys44-Pro52 loop. Dexamethasone, prednisone, methylprednisolone, and

triamcinolone were more stable due to the favorable packing and hydrophobic interaction with Thy239, Leu272, and Leu286. Hydrocortisone was quite stable in domain III with a well-packed hydrophobic structure formed by Phe223, Phe219, Val227, and Gly275.

CONCLUSIONS

In this study, the potential binding sites of systemic corticosteroids on SARS CoV-2 main protease Mpro were investigated. In silico docking studies were performed in the blind and sequential docking mode using the AutoDock Vina program. Screening of six systemic corticosteroids revealed that dexamethasone, prednisone, methylprednisolone, and triamcinolone had the best interaction with the Mpro among all others. Dexamethasone, prednisone, methylprednisolone, and triamcinolone showed promising results with binding affinities -7.8, -7.4, -7.5, and -7.6 kcal/mol, respectively, confirming the stability of the complexes. The low inhibition constants values for dexamethasone, prednisone, methylprednisolone, and triamcinolone confirm the effectiveness of the selected corticosteroids as inhibitors of Mpro activity. Considering the findings in [22], our research provides further evidence that the favorable binding sites for dexamethasone, prednisone, methylprednisolone, and triamcinolone may be located in the catalytic site of domain II and especially in the distal site of domain III of the SARS-CoV-2 main protease Mpro. The results of our study complement R. Ghosh's conclusions that dexamethasone, prednisone, methylprednisolone, and triamcinolone are promising inhibitors of the main protease Mpro and can be potential candidates for the treatment of COVID-19 or drug development against SARS-CoV-2.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Miroshnichenko E. V. for useful consultation and practical advice.

CONFLICT OF INTEREST

The authors report that there is no conflict of interest.

Authors' ORCID ID

N. V. Khmil  <https://orcid.org/0000-0001-7916-5921>
 A. V. Shestopalova  <https://orcid.org/0000-0001-7613-7212>
 A. O. Boiechko-Nemovcha  <https://orcid.org/0009-0009-8221-1373>




REFERENCES

1. Shrestha LB, Foster C, Rawlinson W, Tedla N, Bull RA. Evolution of the SARS-CoV-2 omicron variants BA.1 to BA.5: Implications for immune escape and transmission. *Rev Med Virol.* 2022;32(5):e2381. <https://doi.org/10.1002/rmv.2381>
2. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y, Wang W, Song Z, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China [published correction appears in *Nature.* 2020 Apr;580(7803):E7]. *Nature.* 2020;579(7798):265–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
3. Kangarshahi ZT, Lak S, Ghadam M, Motamed N, Sardari S, Rahimi S. The proteins of SARS- CoV-2 and their functions. *Mil. Med. Sci. Lett.* 2021;90(4):172–90. <http://doi.org/10.31482/mmsl.2021.018>
4. Grellet E, L'Hôte I, Goulet A, Imbert I. Replication of the coronavirus genome: A paradox among positive-strand RNA viruses. *J Biol Chem.* 2022;298(5):101923. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101923>
5. Bhatt PR, Scaiola A, Loughran G, Leibundgut M, Kratzel A, Meurs R, et al. Structural basis of ribosomal frameshifting during translation of the SARS-CoV-2 RNA genome. *Science.* 2021;372(6548):1306–13. <https://doi.org/10.1126/science.abf3546>
6. Jin Z, Du X, Xu Y, Deng Y, Liu M, Zhao Y, et al. Structure of M^{Pro} from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature.* 2020;582(7811):289–93. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>

7. Zhang L, Lin D, Sun X, Curth U, Drosten C, Sauerhering L, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science*. 2020;368(6489): 409–12. <https://doi.org/10.1126/science.abb3405>
8. She Z, Yao Y, Wang C, Li Y, Xiong X, Liu Y. M^{pro}-targeted anti-SARS-CoV-2 inhibitor-based drugs. *J Chem Res*. 2023;47(4):17475198231184799. <https://doi.org/10.1177/17475198231184799>
9. Alzyoud L, Ghattas MA, Atatreh N. Allosteric Binding Sites of the SARS-CoV-2 Main Protease: Potential Targets for Broad-Spectrum Anti-Coronavirus Agents. *Drug Des Devel Ther*. 2022;16:2463–78. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S370574>
10. Hien TT Lai, Toan T Nguyen. Investigating structural features of dimeric SARS-CoV-2 M^{pro} catalytic site with bound covalent ligands at physiological temperature. *J. Phys.: Conf. Ser.* 2023;2485:012006. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2485/1/012006>
11. Barnes PJ. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol*. 2006;148(3):245–54. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706736>
12. Murdaca G, Paladin F, Tonacci A, Isola S, Allegra A, Gangemi S. The Potential Role of Cytokine Storm Pathway in the Clinical Course of Viral Respiratory Pandemic. *Biomedicines*. 2021;9(11):1688. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111688>
13. Zanza C, Romenskaya T, Manetti AC, Franceschi F, La Russa R, Bertozzi G, et al. Cytokine Storm in COVID-19: Immunopathogenesis and Therapy. *Medicina (Kaunas)*. 2022;58(2):144. <https://doi.org/10.3390/medicina58020144>
14. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
15. O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminform*. 2011;3:33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>
16. Søndergaard CR, Olsson MHM, Rostkowski M, Jensen JH. Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of pK_a values. *J Chem Theory Comput*. 2011;7(7):2284–95. <https://doi.org/10.1021/ct200133y>
17. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*. 2010;31(2):455–61. <http://doi.org/10.1002/jcc.21334>
18. Adasme MF, Linnemann KL, Bolz SN, Kaiser F, Salentin S, Haupt VH, et al. PLIP 2021: expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(W1):W530–34. <http://doi.org/10.1093/nar/gkab294>
19. Volkamer A, Griewel A, Grombacher T, Rarey M. Analyzing the topology of active sites: on the prediction of pockets and subpockets. *J Chem Inf Model*. 2010;50(11):2041–52. <https://doi.org/10.1021/ci100241y>
20. Schrödinger L, DeLano W. PyMOL [Internet]. [cited 2020]. Available from: <http://www.pymol.org/pymol>
21. Khmil NV, Kolesnikov VG. Molecular docking of human serum albumin with penicillin G's determinants. *Biophysical bulletin*. 2023;49:7–19. (In Ukrainian). <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-49-01>
22. Ghosh R, Chakraborty A, Biswas A, Chowdhuri S. Potential therapeutic use of corticosteroids as SARS CoV-2 main protease inhibitors: a computational study. *J Biomol Struct Dyn*. 2022;40(5):2053–66. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1835728>
23. RECOVERY Collaborative Group: Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL, Linsell L, et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021;384(8):693–704. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2021436>
24. Mishra A, Qais FA, Pathak Y, Camps I, Tripathi V. Triamcinolone as a Potential Inhibitor of SARS-CoV-2 Main Protease and Cytokine Storm: An *In-silico* Study. *Lett Drug Des Discov*. 2022;19(9). <https://doi.org/10.2174/1570180819666220401142351>
25. Tiwari G, Chauhan MS, Sharma D. Systematic *In Silico* Studies of Corticosteroids and Its Binding Affinities with Glucocorticoid Receptor for Covid-19 Treatment: Ab-Initio, Molecular Docking and MD Simulation Studies. *Polycycl Aromat Comp*. 2023;43(5):4654–69. <https://doi.org/10.1080/10406638.2022.2092878>
26. Fadaka AO, Sibuyi NRS, Madiehe AM, Meyer M. Computational insight of dexamethasone against potential targets of SARS-CoV-2. *J Biomol Struct Dyn*. 2022;40(2):875–85. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1819880>
27. Weng YL, Naik SR, Dingelstad N, Lugo MR, Kalyanamoorthy S, Ganesan A. Molecular dynamics and in silico mutagenesis on the reversible inhibitor-bound SARS-CoV-2 main protease complexes reveal the role of

lateral pocket in enhancing the ligand affinity. Sci Rep. 2021;11:7429. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86471-0>

ВИЗНАЧЕННЯ ПОТЕНЦІЙНИХ МІСЦЬ ЗВ'ЯЗУВАННЯ КОРТИКОСТЕРОЇДІВ НА ОСНОВНІЙ ПРОТЕАЗІ SARS COV-2 MPRO — *IN SILICO* ДОКІНГ ДОСЛІДЖЕННЯ

Н. В. Хміль^{1,2} , А. В. Шестопалова² , В. Г. Колесніков², А. О. Босчко-Немовча¹ 

¹Харківський національний університет радіоелектроніки, пр. Науки, 14, Харків, 61166, Україна;

²Інститут радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України, вул. Ак. Проскури, 12, Харків, 61085, Україна

Надійшла до редакції 14 грудня 2023 р. Переглянута 19 лютого 2024 р.

Прийнята до друку 1 травня 2024 р.

Актуальність. Наразі в Україні та світі фіксується зростання кількості нових випадків Covid-19, спричинених вірусом тяжкого гострого респіраторного синдрому (SARS-CoV-2). SARS-CoV-2 провокує загострення хронічних захворювань та активізує запальні й алергічні реакції. Важкий перебіг Covid-19 збільшує тривалість госпіталізації та смертність серед населення. Патогенетичну терапію проводять системними кортикостероїдами, які пригнічують цитокиновий шторм шляхом пом'якшення системної запальної відповіді, спричиненої SARS-CoV-2, а також пригнічують основну протеазу Mpro SARS-CoV-2, яка є ключовим компонентом реплікації вірусу.

Мета роботи. Метою цього дослідження є визначення потенційних сайтів зв'язування кортикостероїдів на головній протеазі SARS CoV-2 Mpro на основі аналізу енергетичних і топологічних характеристик комплексів, а також дослідження інгібіторної активності вибраних кортикостероїдів проти Mpro.

Матеріали та методи. Кристалічна структура Mpro (ID: 6LU7 з Protein Data Bank) (www.rcsb.org) була обрана в якості док-мішені. Методи молекулярного докінгу (AutoDock Tools 1.5.7, AutoDock Vina 1.1.2) були застосовані для отримання інформації про спорідненість зв'язування Mpro з системними кортикостероїдами, такими як дексаметазон, преднізон, преднізолон, метилпреднізолон, тріамцинолон і гідрокортизон. Візуалізація результатів докінгу була реалізована в PyMol 2.5. Для визначення нековалентних взаємодій між Mpro та лігандами були застосовані веб-засоби PLIP та LigPlot+ (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de>).

Результати. Результати моделювання методом молекулярного докінгу (*in silico*) показали, що вибрані кортикостероїди зв'язувалися з амінокислотними залишками II і III доменів Mpro з енергією зв'язування -7,8...-6,6 ккал/моль. Була виявлена висока афінність зв'язування комплексу дексаметазон-Mpro (-7,8 ккал/моль); для преднізону, преднізолону, метилпреднізолону, тріамцинолону й гідрокортизону енергії зв'язку становили -7,4, -7,0, -7,5, -7,6 і -6,6 ккал/моль, відповідно. Було показано, що водневі зв'язки та гідрофобні взаємодії головним чином беруть участь в утворенні ліганд-білкових комплексів через такі залишки, як Arg131, Lys137, Thr199, Asp289, Leu272, Leu286, Leu287, Tyr239 і Gly275, які утворюють каталітичні та дистальні сайти для зв'язування ліганду. Константа інгібування кортикостероїдів коливалася в межах від $1,90 \times 10^{-6}$ до $14,4 \times 10^{-6}$ М.

Висновки. Результати дослідження показали, що сприятливі сайти зв'язування для дексаметазону, преднізону, метилпреднізолону та тріамцинолону розташовані в каталітичному сайті домену II та дистальному сайті домену III основної протеази SARS-CoV-2 Mpro; вони мають високу спорідненість зв'язування, що підтверджує стабільність комплексів. Низькі значення констант інгібування для дексаметазону, преднізону, метилпреднізолону та тріамцинолону додатково підтверджують ефективність вибраних кортикостероїдів як інгібіторів активності Mpro. На основі енергій зв'язування, а також значень констант інгібування, дексаметазон, преднізон, метилпреднізолон і тріамцинолон були визначені як потенційні інгібітори Mpro.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: Covid-19; головна протеаза SARS CoV-2 Mpro; системні кортикостероїди; молекулярний докінг; здоров'я людини.

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-51-05>

УДК 577.32+57.04

C₆₀ ФУЛЕРЕН ПОКРАЩУЄ ВІДНОВЛЕННЯ БІОМЕХАНІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ СКОРОЧЕННЯ *MUSCLE SOLEUS* ЩУРІВ ПІСЛЯ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛІЗАЦІЇ

Д. М. Ноздренко¹, В. Нан², Т. Ю. Матвієнко¹, К. І. Богуцька¹,
Т. Я. Шевчук², В. П. Берест³, Ю. І. Прилуцький^{1,*}

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13,
м. Київ, 01601, Україна;

²Волинський національний університет імені Лесі Українки, проспект Волі, 13, м. Луцьк, 43025, Україна;

³Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, майдан Свободи 4,
м. Харків, 61022, Україна

*e-mail: prylut@ukr.net

Надійшла до редакції 11 січня 2024 р. Переглянута 14 травня 2024 р.

Прийнята до друку 17 травня 2024 р.

Актуальність. Відновлення біомеханічних параметрів скорочення пошкоджених алкогольною міопатією м'язів є доволі складним і тривалим процесом. Відтак, пошук ефективних терапевтичних засобів для його прискорення є вкрай актуальним завданням у біомедицині.

Мета роботи. Дослідження дії водного розчину C₆₀ фулеренів (C₆₀ФВР) на динаміку скорочення скелетних м'язів щурів після 9-ти місячної хронічної алкоголізації та через 2 місяці після припинення вживання алкоголю.

Матеріали та методи. При аналізі м'язової відповіді з використанням тензометрії оцінювали такі біомеханічні параметри як час зменшення силової відповіді м'яза на 50% від початкового значення, величини сили скорочення та імпульсу сили м'яза.

Результати. Показано, що у тварин, які перорально одержували алкоголь і C₆₀ФВР (щоденна доза 1 мг/кг) разом (схема II) упродовж експерименту, має місце збільшення силової відповіді м'яза на 40–45±2% порівняно з групою алкоголізованих тварин та на 12–15±1% порівняно з групою щурів, які одержували C₆₀ФВР через 1 год після прийому алкоголю (схема I). Позитивний ефект застосування C₆₀ФВР за схемою II і схемою I склав 34±2% та 10±1%, відповідно, порівняно з групою алкоголізованих тварин у випадку реєстрації часу зменшення силової відповіді м'яза на 50% від початкового значення. Після 2-х місячної реабілітації рівень мінімальної сили скорочення м'яза при застосуванні C₆₀ФВР в обох схемах відрізнявся приблизно на 15±1% щодо групи алкоголізованих тварин, а часу зменшення силової відповіді на 50% достовірно не було зафіксовано. Нарешті, застосування C₆₀ФВР виявило суттєве збільшення величини імпульсу сили м'яза: до 86±4% (схема I) і майже до контрольних значень — 94±2% (схема II).

Як цитувати: Ноздренко ДМ, Нан В, Матвієнко ТЮ, Богуцька КІ, Шевчук ТЯ, Берест ВП, Прилуцький ЮІ. C₆₀ фулерен покращує відновлення біомеханічних параметрів скорочення *muscle soleus* щурів після хронічної алкоголізації. Біофізичний вісник. 2024;51:64–74. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-51-05>

In cites: Nozdrenko DM, Nan W, Matvienko TYu, Bogutska KI, Shevchuk TYa, Berest VP, Prylutskyu YuI. C₆₀ fullerene improves the recovery of biomechanical parameters of muscle soleus contraction in rats after chronic alcoholization. Biophysical Bulletin. 2024;51:64–74. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-51-05> (in Ukrainian)

Open Access. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© Ноздренко Д. М., Нан В., Матвієнко Т. Ю., Богуцька К. І., Шевчук Т. Я., Берест В. П., Прилуцький Ю. І., 2024.

Висновки. Одержані результати вказують на перспективність використання C₆₀ФВР для відновлення біомеханічних параметрів скорочення скелетних м'язів за тривалого розвитку алкогольної міопатії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: C₆₀ фулерен; *muscle soleus*; алкогольна міопатія; відновлення; біомеханічні параметри скорочення скелетного м'яза.

Алкогольна міопатія, яка зустрічається у 40–60% хронічних алкоголіків [1], представляє собою сукупність метаболічних та біомеханічних змін у скелетних м'язах [2]. Хронічне зловживання алкоголем є однією з причин загальної дисфункції скелетних м'язів, їх атрофії із супутньою втратою м'язової маси і, як наслідок, порушення рухливості кінцівок загалом [3]. Алкоголь порушує усі ланки обміну речовин м'язової і кісткової тканин. Комплексні дослідження впливу етанолу на м'язову і кісткову тканини виявили достовірні специфічні ознаки атрофії м'язових волокон селективного характеру [3, 4]. Зокрема, атрофуються м'язові волокна ІІВ типу, наприклад, зі зниженням усієї м'язової маси до 30%. Встановлено, що алкогольна проксимальна міопатія веде до зменшення розміру волокон без зміни їх кількості [4]. Середній діаметр м'язових волокон за дії етанолу складає 80% від їх діаметру у контрольних групах [5]. Такі порушення є найбільш поширеним розладом функціонування скелетних м'язів, які спостерігаються приблизно у 50% пацієнтів, що зловживають алкоголем [6]. Вони скорочують час виникнення м'язової втоми та мають довготривалий перебіг. Відновлення біомеханічних параметрів скорочення пошкоджених алкогольною міопатією м'язів може тривати місяці, а іноді й роки. Тому пошук ефективної методики прискорення цього процесу є вкрай актуальним завданням у біомедицині.

Здатність вуглецевих наночастинок C₆₀ фулеренів та їх похідних інактивувати активні форми кисню (АФК) вперше було продемонстровано Krustic зі співавт. [7]. C₆₀ фулерен проявляє сильнішу дію, ніж найефективніший природний антиоксидант — вітамін Е, запобігаючи пошкодженню цілісності клітинних мембран, і, таким чином, сприяє підтримці трансмембранного потенціалу [8]. C₆₀ фулерени проявляють захисний ефект за нейродегенерації різноманітної етіології, зокрема спостерігається значне збільшення толерантності нервової тканини до гіпоксії шляхом впливу на гени, які відповідальні за збільшення експресії глутаматних метаболічних рецепторів та аденозину [9]. Це є важливим фактом, адже одним з головних аспектів ефективного відновлення функціонування скелетного м'яза після алкогольної міопатії є збереження стану іннервуючого м'яз нерва. Наявні експериментальні дані вказують на ефективність застосування C₆₀ фулеренів проти фіброзної дегенерації міжхребцевих дисків, де їх дія проявляється у вираженому протизапальному ефекті [10].

У попередніх експериментах *in vivo* було показано, що застосування водорозчинних C₆₀ фулеренів за низьких доз призводить до значних позитивних ефектів після ініціацій ішемічного пошкодження [11, 12], втоми [13, 14], атрофії [15] та механічної травми [16] скелетних м'язів. Зрозуміло, що ці ефекти істотно залежать від використовуваних схем введення водного розчину C₆₀ фулеренів (C₆₀ФВР) на тлі ініціації тієї чи іншої патології.

Таким чином, метою цієї роботи було з'ясувати вплив C₆₀ФВР на відновлення основних біомеханічних параметрів скорочення скелетних м'язів щурів (час зменшення силової відповіді м'яза на 50% від початкового значення, величини сили скорочення та імпульсу сили м'яза) після 9-ти місячної хронічної алкоголізації та через 2 місяці після припинення вживання алкоголю за різних схем введення цієї нанополуки.

МАТЕРІАЛИ Й МЕТОДИ

Приготування та характеризування C₆₀ФВР

Для отримання C₆₀ФВР був використаний метод, заснований на переведенні C₆₀ фулеренів з толуолу у воду з одночасною обробкою ультразвуком (8 Гц, 8 год) [17]. Отриманий темно-коричневий C₆₀ФВР за максимальної концентрації 0,15 мг/мл є стабільним упродовж 12–18 місяців у діапазоні температур +(4–25) °С.

Важливо зазначити, що C₆₀ фулерен є гідрофобною молекулою, яка здатна вбудовуватися у біологічні мембрани і, таким чином, проникати в клітину шляхом пасивної дифузії або ендоцитозу [18, 19].

За даними [20, 21] водорозчинні C₆₀ фулерени у концентраціях до 14,4 та 24 мкг/мл не проявляли токсичної дії на тимоцити щурів та мезенхімальні стовбурові клітини людини, відповідно. C₆₀ фулерен в діапазоні концентрацій 3,6–144 мкг/мл продемонстрував низьку токсичність проти клітин ембріональної нирки людини (НЕК293) зі значенням IC₅₀ 383,4 мкг/мл [22]. Відсутність токсичної дії C₆₀ фулерену спостерігали у діапазоні доз 75–150 мг/кг, розраховане значення LD₅₀ становило 721 мг/кг [22]. Встановлено, що радіоактивно-мічені C₆₀ фулерени після внутрішньовенного введення мишам накопичуються переважно у печінці, селезінці, шлунку та крові і виводяться з організму упродовж 72 год переважно із сечею [23, 24]. Нещодавні результати [25] свідчать про подовжену кінетику елімінації водорозчинних C₆₀ фулеренів з організму щурів, що сприяє їх тривалій (не менше 48 год) компенсаторній активації ендогенної антиоксидантної системи у відповідь на стимуляцію м'язів.

Методом атомно-силової мікроскопії (АСМ) визначали розмір частинок C₆₀ фулеренів (їх агрегатів) у водному розчині. АСМ дослідження були виконані на зондовому мікроскопі “Solver Pro” (NT-MDT), обладнаному оптичним мікроскопом Integra Spectra (NT-MDT). АСМ візуалізація зразків відбувалася у напівконтактному режимі з використанням АСМ зондів типу NSG10 (NT-MDT). Як підкладку використовували свіжосколоту атомно-гладку поверхню слюди (V1 grade, SPI Supplies), на обмежену ділянку якої наносили краплю C₆₀ФВР. Вимірювання проводили на сухих шарах після повного випаровування води.

In vivo експеримент. Експерименти проводили на щурах-самцях лінії Wistar віком від 1 до 10 місяців (наприкінці досліду). Протокол дослідження був затверджений комісією з питань біоетики ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка згідно з правилами «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» і норм біомедичної етики згідно із Законом України №3447-IV 21.02.2006 р., м. Київ, «Про захист тварин від жорстокого поводження» під час проведення медико-біологічних досліджень.

Контрольна група щурів (n=7) одержувала 100% питну воду.

Кожна тварина у групі «алкоголізація» (n=7) була поміщена в окрему клітку для отримання 40% етанолу у питній воді [26]. Споживання кількості етанолу розраховували щодо 0,5% ваги тіла тварини. Перерахунок дози етанолу проводили кожену добу упродовж експерименту [27]. Тривалість алкоголізації становила 9 місяців. Цільове значення 40% етанолу у питній воді було обрано з тих міркувань, що воно відтворює концентрації алкоголю у крові, зареєстровані у хронічних алкоголіків [28].

Піддослідні тварини групи «C₆₀+алкоголізація» на тлі алкоголізації перорально вживали C₆₀ФВР у щоденній дозі 1 мг/кг ваги тварини упродовж експерименту. Прийом C₆₀ФВР проводили двома способами: через 1 год після алкоголю (схема I; n=7)

та разом з алкоголем (схема II; n=7). Контроль кількості вжитого C₆₀ФВР здійснювали шляхом відмови доступу тварин до 100% питної води до повного використання ними досліджуваної нанополуки.

Важливо зазначити, що використана в наших експериментах доза C₆₀ФВР (1 мг/кг), як найбільш ефективна, була обрана на основі проведених раніше досліджень [29]. Крім того, ця доза не є токсичною: вона значно нижча за значення LD₅₀, яке становило 600 мг/кг ваги щура за перорального введення [30].

Анестезію тварин (для дослідження функціональної активності *muscle soleus*) здійснювали внутрішньочеревним введенням нембуталу (40 мг/кг).

Біомеханічний аналіз

Для реєстрації електрофізіологічних сигналів використовували 12-ти розрядний аналого-цифровий та цифро-аналоговий перетворювач (АЦП-ЦАП). Вихідні імпульси ЦАП запускали ізольовані стимулятори (DS2A, Digitimer), які здійснювали стимуляцію нервів. Вхідні сигнали через підсилювач (Brownlee) подавали на АЦП і реєстрували з частотою 10 кГц. Для підготовки до модульованої стимуляції еферентів у сегментах L7-S1 перерізували вентральні корінці у місцях їхнього виходу зі спинного мозку [31]. Філаменти перерізанних вентральних корінців закріплювали на стимулюючих електродах і здійснювали циклічний розподіл послідовності стимулів. Стимуляцію еферентів здійснювали електричними імпульсами тривалістю 2 мс, сформованими за допомогою генератора імпульсів. Зусилля вимірювали за допомогою напівпровідникових тензодатчиків, наклеєних на жорсткі сталеві балки, встановлені на рухомі частини лінійного двигуна. Контроль зовнішнього навантаження на м'яз здійснювали за допомогою системи механостимуляторів. При аналізі міотичної відповіді аналізували такі основні біомеханічні параметри як час зменшення силової відповіді м'яза на 50% від початкового значення, величини сили скорочення та імпульсу сили м'яза, що слугують маркерами дисфункцій *muscle soleus* [12, 15, 16]. Зазначимо, що імпульс сили м'яза, як розрахована площа під силовою кривою за допомогою програмного забезпечення Origin 9.4, є показником загальної працездатності м'яза за застосованої стимуляції [29].

Слід зауважити, що у цьому дослідженні ми вивчали процес відновлення біомеханічних параметрів м'язового скорочення після тривалої алкогольної інтоксикації через 2 місяці після припинення вживання алкоголю. Вибір саме цього терміну пов'язаний з даними [32, 33], які показують, що за повної відмови від алкоголю м'язова та нервова системи відновлюються понад місяць.

Статистичний аналіз

Статистичний аналіз результатів проводили методами варіаційної статистики у програмі Statistica 8.0. Кожна з одержаних експериментальних кінетичних кривих є результатом усереднення 10-ти аналогічних вимірювань. Для оцінки достовірності виявлених змін застосовували дисперсійний аналіз ANOVA з наступним тестом множинного порівняння Бонферроні. Відмінності при значеннях $p < 0,05$ вважалися значущими.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Моніторинг розміру частинок C₆₀ фулеренів, присутніх у водному розчині, є важливим етапом дослідження, оскільки це пов'язано з їх специфічною біоактивністю і токсичністю [34]. АСМ дослідження виявило високий ступінь дисперсності молекул C₆₀

у розчині (Рис. 1). Отже, одержаний C_{60} ФВР (0,15 мг/мл) є типовим колоїдом, що містить як поодинокі C_{60} фулерени (~0,7 нм), так і їх наноагрегати розміром ~1,4–20 нм, що добре узгоджується з даними [35].

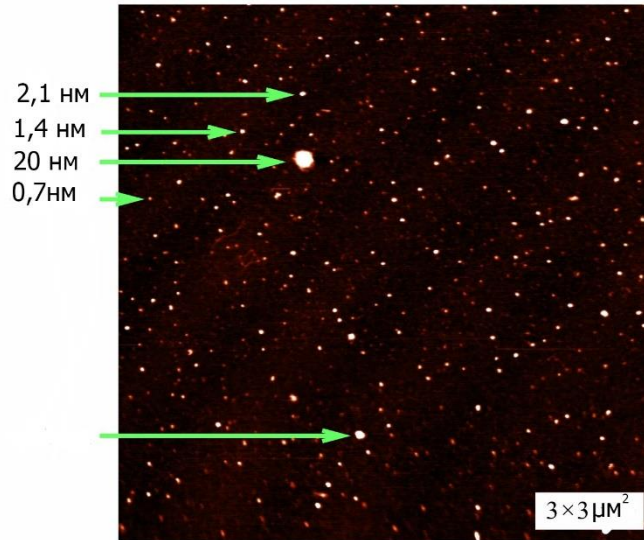


Рис. 1. АСМ зображення наночастинок C_{60} фулеренів, осаджених із C_{60} ФВР (0,15 мг/мл) на свіжосколоту атомно-гладку поверхню шлюди. Цифри біля стрілочок вказують розмір (висоту) наночастинок.

Fig. 1. AFM image of C_{60} fullerene nanoparticles deposited with C_{60} FAS (0.15 mg/ml) on a freshly chipped atomically smooth mica surface. The numbers next to the arrows indicate the size (height) of the nanoparticles.

Сила скорочення *muscle soleus* піддослідних тварин після 9-ти місячної хронічної алкоголізації та 2-х місяців реабілітаційного періоду була проаналізована за 1 Гц безрелаксаційної стимуляції тривалістю 1800 с (Рис. 2). При реєстрації силових відповідей алкоголізованих тварин виявлено зниження силової активності м'яза до 50–70±3% від контрольних значень наприкінці досліду. У щурів, які одержували разом алкоголь і C_{60} ФВР (схема II), простежується збільшення силової відповіді м'яза упродовж експерименту на 40–45±2% порівняно з групою алкоголізованих тварин та на 12–15±1% порівняно з групою щурів, які одержували C_{60} ФВР через 1 год після прийому алкоголю (схема I).

Для більш якісного аналізу одержаних результатів ми дослідили зміни основних біомеханічних маркерів м'язової активності [12, 15, 16] (Рис. 3 та Рис. 4, відповідно).

Час зменшення силової відповіді м'яза на 50% від початкового (контроль) значення (t_{50}) склало 1241±25 с у групі алкоголізованих тварин. При застосуванні C_{60} ФВР цей час склав 1521±13 (схема I) і 1675±15 с (схема II). Таким чином, позитивний ефект застосування C_{60} ФВР за схемою II і схемою I склав 34±2% та 10±1%, відповідно, порівняно з групою алкоголізованих тварин. Зазначимо, що після 2-х місячної реабілітації часу зменшення силової відповіді на 50% від початкового (група алкоголізованих тварин) значення не було зафіксовано у групах тварин « C_{60} +алкоголізація» (Рис. 3).

Зміна рівня мінімальної сили скорочення є одним з найчутливіших маркерів м'язової дисфункції. Його зменшення у групі алкоголізованих тварин склало понад 70% (1,15 Н у контролі). При застосуванні C_{60} ФВР цей показник склав 0,52±0,05 Н (схема I)

і $0,69 \pm 0,07$ Н (схема II). Позитивний ефект застосування C₆₀ВРФ за схемою II склав понад $70 \pm 3\%$ порівняно з групою алкоголізованих тварин та понад $25 \pm 1\%$ порівняно з групою щурів, які одержували C₆₀ФВР за схемою I (Рис. 3).

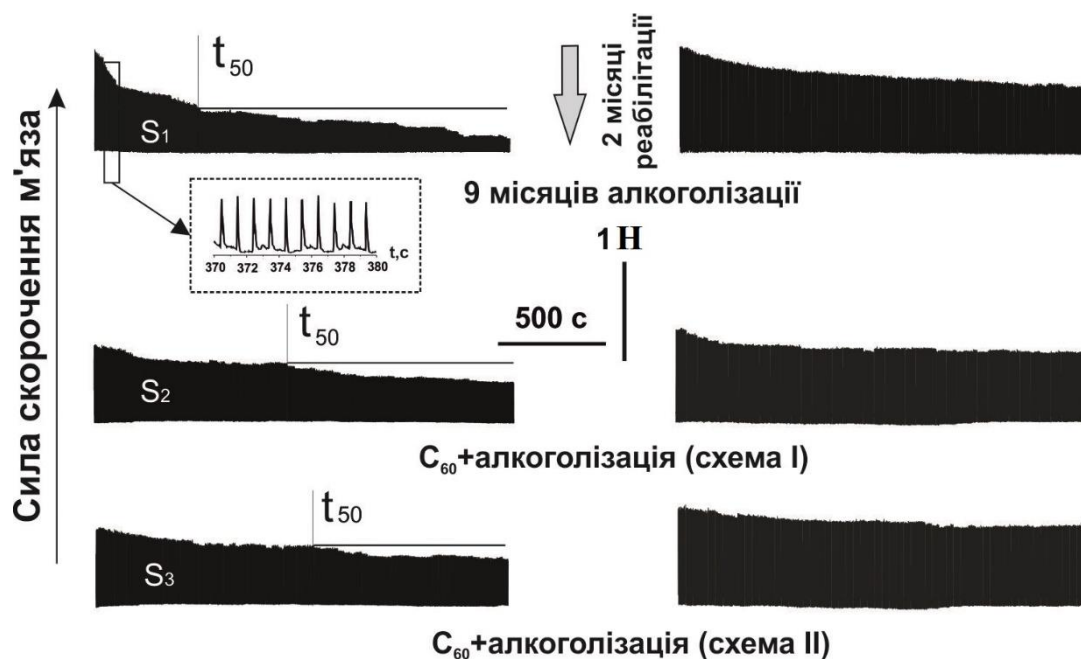


Рис. 2. Сила скорочення *muscle soleus* щурів, викликана 1 Гц безрелаксаційною стимуляцією тривалістю 1800 с, після 9-ти місячної хронічної алкоголізації та через 2 місяці припинення вживання алкоголю: S — імпульс сили м'язу (розрахована площа під силовою кривою); t_{50} — час досягнення силою 50% рівня від початкового значення; алкоголізація — щури, які одержували алкоголь упродовж експерименту; C₆₀+алкоголізація — щури, які одержували алкоголь і C₆₀ФВР (1 мг/кг) упродовж експерименту за різних схем введення нанополуки: через 1 год після прийому алкоголю (схема I) та разом з алкоголем (схема II).

Fig. 2. The force contraction of the *muscle soleus* of rats, induced by 1 Hz by non-relaxation stimulation lasting 1800 s, after 9 months of chronic alcoholism and 2 months after cessation of alcohol consumption: S — impulse of muscle strength (calculated area under the force curve); t_{50} is the time for the force to reach 50% of the initial level; alcoholization — rats that received alcohol during the experiment; C₆₀+alcoholization — rats treated with alcohol and C₆₀FAS (1 mg/kg) during the experiment with different schemes of nanocompound administration: 1 h after alcohol intake (scheme I) and together with alcohol (scheme II).

Після 2-х місячної реабілітації рівень мінімальної сили скорочення у групі алкоголізованих тварин склав $0,73 \pm 0,10$ Н, що майже на $40 \pm 2\%$ менше порівняно з контролем (Рис. 3). Застосування C₆₀ФВР в обох схемах показало рівень мінімальної сили $0,99 \pm 0,10$ Н, який відрізнявся приблизно на 15% щодо групи алкоголізованих тварин. Важливо зазначити також, що у групах тварин «C₆₀+алкоголізація» майже відсутня відмінність між максимальною та мінімальною силами м'язового скорочення, а саме значення їх різниці відповідає за якість та ефективність виконання точних рухів [36].

Аналіз величини імпульсу сили м'язу дозволяє оцінити рівень м'язової активності у системі рівноваги «сила — зовнішнє навантаження», що є фізіологічним аналогом працездатності м'язової системи. Значення цього параметру в групі алкоголізованих тварин склала $23 \pm 1\%$ від контролю, прийнятого за 100%. При застосуванні C₆₀ВРФ цей показник склав $61 \pm 2\%$ (схема I) і $72 \pm 3\%$ (схема II). Навіть після 2-х місячної

реабілітації рівень імпульсу сили м'яза в групі алкоголізованих тварин склав $68\pm 4\%$, що слугує доказом суттєвих патологічних змін у м'язовій тканині, які відбулися за 9-ти місячної алкоголізації тварин. Застосування C_{60} ВРФ виявило суттєве збільшення цього показника: до $86\pm 4\%$ (схема I) і майже до контрольних значень — $94\pm 2\%$ (схема II) (Рис. 4).

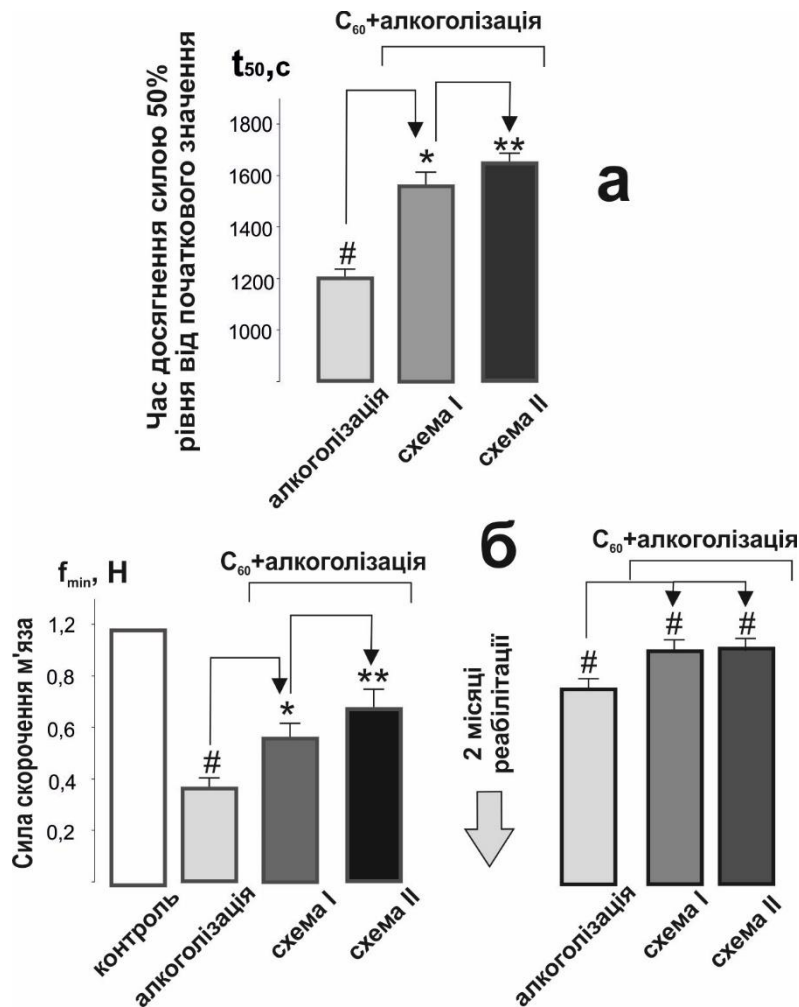


Рис. 3. Біомеханічні маркери скорочення *muscle soleus* щурів при застосуванні 1 Гц стимуляції тривалістю 1800 с після 9-ти місячної хронічної алкоголізації та через 2 місяця після припинення вживання алкоголю: алкоголізація — щури, які одержували алкоголь упродовж експерименту; C_{60} +алкоголізація — щури, які одержували алкоголь і C_{60} ФВР (1 мг/кг) упродовж експерименту за різних схем введення нанополуки: через 1 год після прийому алкоголю (схема I) та разом з алкоголем (схема II); а — час досягнення силою 50% рівня від початкового значення (t_{50}); б — мінімальний рівень силової відповіді м'яза на останньому скороченні стимуляційного тесту (f_{min}); # $p < 0,05$ щодо групи контроль; * $p < 0,05$ щодо групи алкоголізованих тварин; ** $p < 0,05$ щодо групи щурів, які одержували C_{60} ФВР за схемою I.

Fig. 3. Biomechanical markers of *muscle soleus* contraction in rats when applying 1 Hz stimulation lasting 1800 s after 9 months of chronic alcoholization and 2 months after cessation of alcohol consumption: alcoholization — rats that received alcohol during the experiment; C_{60} +alcoholization — rats treated with alcohol and C_{60} FAS (1 mg/kg) during the experiment with different schemes of nanocompound administration: 1 h after ingestion of alcohol (scheme I) and together with alcohol (scheme II); а — the time for the force to reach 50% of the initial level (t_{50}); б — the minimum level of force response of the muscle at the last contraction of the stimulation test (f_{min}); # $p < 0.05$ compared to the control group; * $p < 0.05$ compared to the group of alcoholized animals; ** $p < 0.05$ compared to the group of rats treated with C_{60} FAS according to scheme I.

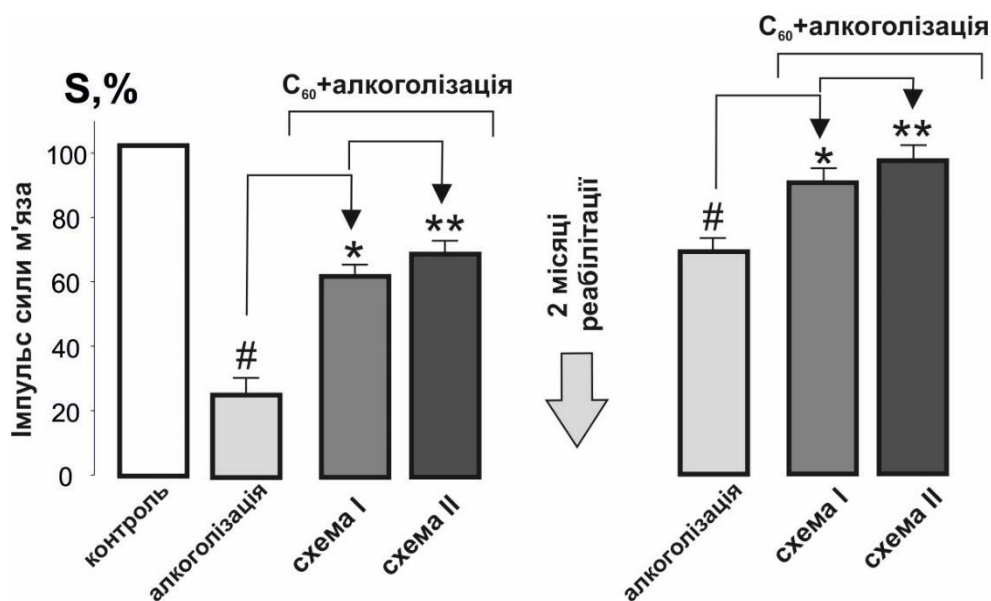


Рис. 4. Імпульс сили м'язів (S) при застосуванні 1 Гц стимуляції тривалістю 1800 с після 9-ти місячної хронічної алкоголізації та через 2 місяці після припинення вживання алкоголю: алкоголізація — щури, які одержували алкоголь упродовж експерименту; C₆₀+алкоголізація — щури, які одержували алкоголь і C₆₀ФВР (1 мг/кг) упродовж експерименту за різних схем введення наносполуки: через 1 год після прийому алкоголю (схема I) та разом з алкоголем (схема II); #p<0,05 щодо групи контроль; *p<0,05 щодо групи алкоголізованих тварин; **p<0,05 щодо групи щурів, які одержували C₆₀ФВР за схемою I.

Fig. 4. Impulse of muscle strength (S) when applying 1 Hz stimulation lasting 1800 s after 9 months of chronic alcoholization and 2 months after cessation of alcohol consumption: alcoholization — rats that received alcohol during the experiment; C₆₀+alcoholization — rats that received alcohol and C₆₀FAS (1 mg/kg) during the experiment with different schemes of nanocompound administration: 1 h after alcohol intake (scheme I) and together with alcohol (scheme II); #p<0.05 compared to the control group; *p<0.05 compared to the group of alcoholized animals; **p<0.05 compared to the group of rats treated with C₆₀FAS according to scheme I.

Відомо, що понад 90% спожитого алкоголю метаболізується окислювальними і неокислювальними шляхами, продукуючи такі хімічно-активні сполуки як ацетальдегід, ацетат, етиловий ефір жирної кислоти тощо [37]. Ці сполуки генерують АФК, які спричинюють підвищення окисного стресу та перекисне окислення ліпідів (ПОЛ), порушуючи таким чином структурну цілісність клітин та функції тканин і органів. На нашу думку, описані вище позитивні ефекти впливу водорозчинних C₆₀ фулеренів пов'язані саме з їх потужними антиоксидантними властивостями [30]: ефективно інактивуючи АФК, вони зменшують кількість пошкоджених міоцитів і, таким чином, знижують ступінь тяжкості алкогольної міопатії. Так, дані [38, 39] вказують на опосередкований вплив деяких потужних антиоксидантів на підвищення показників ПОЛ при пошкодженні м'язів, викликаних алкоголем. У дослідженні [40] показано, що використання процистеїну підвищує рівень глутатіону у мітохондріях і тим самим послаблює викликаний алкоголем окисний стрес. Очевидно, що необхідне подальше *in vivo* тестування функціональної активності наночастинок C₆₀ фулеренів для відновлення м'язів за хронічного алкоголізму.

ВИСНОВКИ

Таким чином, показано, що рівень розвитку патологічних процесів у скелетному м'язі щурів на тлі їх тривалої хронічної алкоголізації зменшується при застосуванні як потенційного терапевтичного агента водорозчинного C₆₀ фулерену в дозі 1 мг/кг. Крім того, покращуються процеси відновлення механокінетичних параметрів скорочення *muscle soleus* після припинення алкоголізації. Можна стверджувати, що запропонована схема введення C₆₀ФВР разом з алкоголем є найбільш ефективною і потребує подальших доклінічних випробувань.

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

Authors' ORCID ID

Д. М. Ноздренко <https://orcid.org/0000-0001-7254-1533>
В. Нан <https://orcid.org/0000-0002-5774-2596>
Т. Ю. Матвієнко <https://orcid.org/0000-0002-1069-809X>
К. І. Богуцька <https://orcid.org/0000-0003-0202-8042>
Т. Я. Шевчук <https://orcid.org/0000-0002-0598-8391>
В. П. Берест <https://orcid.org/0000-0001-7779-154X>
Ю. І. Прилуцький <https://orcid.org/0000-0002-9847-4137>








REFERENCES

1. Estruch R, Nicolas JM, Villegas E, Junque A, Urbano-Marquez A. Relationship between ethanol-related diseases and nutritional status in chronically alcoholic men. *Alcohol Alcohol*. 1993;28(5):543–550.
2. Fernandez-Sola J, Preedy VR, Lang CH, Gonzalez-Reimers E, Arno M, Lin JCI, et al. Molecular and cellular events in alcohol-induced muscle disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007;31(12):1953–62. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00530.x>
3. Hunter RJ, Preedy VR, Neagoe C, Järveläinen HA, Martin CR, Lindros KO, Linke WA. Alcohol affects the skeletal muscle proteins, titin and nebulin in male and female rats. *J Nutr*. 2003;133(4):1154–7. <https://doi.org/10.1093/jn/133.4.1154>
4. Preedy VR, Adachi J, Peters TJ, Worrall S, Parkkila S, Niemela O, et al. Recent advances in the pathology of alcoholic myopathy. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001;25(5):54S–59S. <https://doi.org/10.1097/0000374-200105051-00010>
5. Vary TC, Nairn AC, Lang CH. Restoration of protein synthesis in heart and skeletal muscle after withdrawal of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2004;28(4):517–25. <https://doi.org/10.1097/01.alc.0000121653.80502.54>
6. Preedy VR, Adachi J, Ueno Y, Ahmed S, Mantle D, Mullatti N, et al. Alcoholic skeletal muscle myopathy: definitions, features, contribution of neuropathy, impact and diagnosis. *Eur J Neurol*. 2001;8(6):677–87. <https://doi.org/10.1046/j.1468-1331.2001.00303.x>
7. Krusic PJ, Wasserman E, Keizer PN, Morton JR, Preston KF. Radical reactions of C₆₀. *Science*. 1991;254(5035):1183–5. <https://doi.org/10.1126/science.254.5035.1183>
8. Wang IC, Tai LA, Lee DD, Kanakamma PP, Shen CK, Luh TY, et al. C₆₀ and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation. *J Med Chem*. 1999; 42(22):4614–20. <https://doi.org/10.1021/jm990144s>
9. Giust D, Da Ros T, Martín M, Albasanz JL. [60]Fullerene derivative modulates adenosine and metabotropic glutamate receptors gene expression: a possible protective effect against hypoxia. *J Nanobiotechnol*. 2014;12:27. <https://doi.org/10.1186/s12951-014-0027-7>
10. Liu Q, Cui Q, Li XJ, Jin L. The applications of buckminsterfullerene C₆₀ and derivatives in orthopaedic research. *Connect Tissue Res*. 2014;55(2):71–9. <https://doi.org/10.3109/03008207.2013.877894>
11. Nozdrenko DM, Zavodovskiy DO, Matvienko TYu, Zay SYu, Bogutska KI, Prylutskiy YuI, et al. C₆₀ fullerene as promising therapeutic agent for the prevention and correction of functioning skeletal muscle at ischemic injury. *Nanoscale Res Lett*. 2017;12(1):115. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-1876-4>
12. Nozdrenko D, Matvienko T, Vygovska O, Bogutska K, Motuziuk O, Nurishchenko N, et al. Protective Effect of Water-Soluble C₆₀ Fullerene Nanoparticles on the Ischemia-Reperfusion Injury of the Muscle Soleus in Rats. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):6812. <https://doi.org/10.3390/ijms22136812>

13. Prylutskyi YuI, Vereshchaka IV, Maznychenko AV, Bulgakova NV, Gonchar OO, Kyzyma OA, et al. C₆₀ fullerene as promising therapeutic agent for correcting and preventing skeletal muscle fatigue. *J Nanobiotechnology*. 2017;15(1):8. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0246-1>
14. Vereshchaka IV, Bulgakova NV, Maznychenko AV, Gonchar OO, Prylutskyi YuI, Ritter U, et al. C₆₀ fullerenes diminish the muscle fatigue in rats comparable to N-acetylcysteine or β-alanine. *Front Physiol*. 2018;9:517. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00517>
15. Nozdrenko D, Prylutska S, Bogutska K, Nurishchenko N, Abramchuk O, Motuziuk O, et al. Effect of C₆₀ Fullerene on Recovery of Muscle Soleus in Rats after Atrophy Induced by Achillototomy. *Life (Basel)*. 2022;12(3):332. <https://doi.org/10.3390/life12030332>
16. Nozdrenko D, Matvienko T, Vygovska O, Soroca V, Bogutska K, Zholos A, et al. Post-traumatic recovery of muscle soleus in rats is improved via synergistic effect of C₆₀ fullerene and TRPM8 agonist menthol. *Applied Nanoscience*. 2022;12(3):467–78. <https://doi.org/10.1007/s13204-021-01703-z>
17. Ritter U, Prylutskyi YuI, Evstigneev MP, Davidenko NA, Cherepanov VV, Senenko AI, et al. Structural features of highly stable reproducible C₆₀ fullerene aqueous colloid solution probed by various techniques. *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct*. 2015;23(6):530–34. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2013.870900>
18. Foley S, Crowley C, Smaih M, Bonfils C, Erlanger BF, Seta P, Larroque C. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;294(1):116–9. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00445-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00445-X)
19. Grebinyk A, Prylutska S, Buchelnikov A, Tverdokhle N, Grebinyk S, Evstigneev M, et al. C₆₀ fullerene as effective nanopatform of alkaloid berberine delivery into leukemic cells. *Pharmaceutics*. 2019;11:586. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110586>
20. Prylutska SV, Grynyuk II, Grebinyk SM, Matyshevska OP, Prylutskyi YuI, Ritter U, et al. Comparative study of biological action of fullerenes C₆₀ and carbon nanotubes in thymus cells. *Materialwissenschaft Werkstofftech*. 2009; 40(4): 238–41. <https://doi.org/10.1002/mawe.200900433>
21. Tolkachov M, Sokolova V, Loza K, Korolovych V, Prylutskyi Y, Epple M, et al. Study of biocompatibility effect of nanocarbon particles on various cell types *in vitro*. *Materialwissenschaft Werkstofftech*. 2016;47(2–3):216–21. <https://doi.org/10.1002/mawe.201600486>
22. Prylutska SV, Grebinyk AG, Lynchak OV, Byelinska IV, Cherepanov VV, Tauscher E, et al. *In vitro* and *in vivo* toxicity of pristine C₆₀ fullerene aqueous colloid solution. *Fullerenes, Nanotubes Carbon Nanostruct*. 2019;27:715–28. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2019.1634055>
23. Ji ZQ, Sun H, Wang H, Xie Q, Liu Y, Wang Z. Biodistribution and tumor uptake of C₆₀(OH)_x in mice. *J Nanopart Res*. 2006;8:53–63. <https://doi.org/10.1007/s11051-005-9001-5>
24. Nikolic N, Vranjes-Ethuric S, Jankovic D, Ethokic D, Mirkovic M, Bibic N, Trajkovic V. Preparation and biodistribution of radiolabeled fullerene C₆₀ nanocrystals. *Nanotechnol*. 2009;20:385102. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/38/385102>
25. Prylutskyi Yu, Nozdrenko D, Gonchar O, Prylutska S, Bogutska K, Tauscher E, et al. The residual effect of C₆₀ fullerene on biomechanical and biochemical markers of the *muscle soleus* fatigue development in rats. *J Nanomater*. 2023;2023:2237574. <https://doi.org/10.1155/2023/2237574>
26. Song K, Coleman RA, Zhu X, Alber C, Ballas ZK, Waldschmidt TJ, Cook RT. Chronic ethanol consumption by mice results in activated splenic T cells. *J Leukoc Biol*. 2002;72(6):1109–16.
27. D'Souza El-Guindy NB, Kovacs EJ, De Witte P, Spies C, Littleton JM, de Villiers WJS, et al. Laboratory models available to study alcohol-induced organ damage and immune variations: choosing the appropriate model. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010;34(9):1489–511. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01234.x>
28. Collins MA, Neafsey EJ. Alcohol, Excitotoxicity and Adult Brain Damage: an Experimentally Unproven Chain-of-Events. *Front Mol Neurosci*. 2016;9:8. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00008>
29. Motuziuk O, Nozdrenko D, Prylutska S, Vareniuk I, Bogutska K, Braniuk S, et al. The effect of C₆₀ fullerene on the mechanokinetics of muscle gastrocnemius contraction in chronically alcoholized rats. *Heliyon*. 2023;9(8):e18745. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18745>
30. Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M, Szwarc H, Wilson SR, Moussa F. [60]fullerene is a powerful antioxidant *in vivo* with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett*. 2005;5:2578–85. <https://doi.org/10.1021/nl051866b>
31. Nozdrenko DN, Berehovi SM, Nikitina NS, Stepanova LI, Beregova TV, Ostapchenko LI. The influence of complex drug cocarnit on the nerve conduction velocity in nerve tibialis of rats with diabetic polyneuropathy. *Biomedical Research*. 2018;29(19):3629–34. <https://doi.org/10.4066/BIOMEDICALRESEACH.29-18-1055>
32. Jung MK, Callaci JJ, Lauing KL, Otis JS, Radek KA, Jones MK, Kovacs EJ. Alcohol exposure and mechanisms of tissue injury and repair. *Alcohol Clinical Exp Res*. 2011;35(3):392–9. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01356.x>

33. Monte SM, Kril JJ. Human alcohol-related neuropathology. *Acta Neuropathol.* 2014;127(1):71–90. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1233-3>
34. Melnyk MI, Ivanova IV, Dryn DO, Prylutskyi YuI, Hurmach VV, Platonov M, et al. C₆₀ fullerenes selectively inhibit BK_{Ca} but not K_v channels in pulmonary artery smooth muscle cells. *Nanomedicine NBM.* 2019;19:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.03.018>
35. Prilutski YuI, Durov SS, Yashchuk VN, Ogul'chansky TYu, Pogorelov VE, Astashkin YuA, et al. Theoretical predictions and experimental studies of self-organization C₆₀ nanoparticles in water solution and on the support. *Eur Phys J D.* 1999;9(1–4):341–3. <https://doi.org/10.1007/s100530050452>
36. Kostyukov AI, Tomiak T. The force generation in a two-joint arm model: Analysis of the joint torques in the working space. *Front Neurobot.* 2018;12:77. <https://doi.org/10.3389/fnbot.2018.00077>
37. Schukit MA. Ethanol and methanol. In: Goodman & Gillman's Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th ed. Brunton LL ed. New Delhi: McGraw Hill. 2011:629–47. Available from: https://books.google.com.ua/books?id=e_yAOpYYaowC
38. Preedy VR, Patel VB, Reilly ME, Richardson PJ, Falkous G, Mantle D. Oxidants, antioxidants and alcohol: implications for skeletal and cardiac muscle. *Front Biosci.* 1999;4(5):58–66. <https://doi.org/10.2741/A480>
39. Preedy VR, Adachi J, Asano M, Koll M, Mantle D, Niemela O, et al. Free radicals in alcoholic myopathy: indices of damage and preventive studies. *Free Radical Biol Med.* 2002;32(8):683–7. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00794-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00794-8)
40. Otis JS, Guidot DM. Procysteine increases alcohol-depleted glutathione stores in rat plantaris following a period of abstinence. *Alcohol Alcoholism.* 2010;45(6):495–500. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agg066>

C₆₀ FULLERENE IMPROVES THE RECOVERY OF BIOMECHANICAL PARAMETERS OF MUSCLE SOLEUS CONTRACTION IN RATS AFTER CHRONIC ALCOHOLIZATION

D. M. Nozdrenko¹ , W. Nan² , T. Yu. Matvienko¹ , K. I. Bogutska¹ ,
T. Ya. Shevchuk² , V. P. Berest³ , Yu. I. Prylutskyi^{1*} 

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64/13 Volodymyrska Str., Kyiv, 01601, Ukraine

*e-mail: prylut@ukr.net

²Lesya Ukrainka Volyn National University, 13 Volya Ave., Lutsk, 43025, Ukraine

³V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine

Submitted January 11, 2024; Revised May 14, 2024;

Accepted May 17, 2024

Background: Recovery of biomechanical parameters of contraction of muscles damaged by alcoholic myopathy is a rather complex and long-term process. Therefore, the search for effective therapeutic means for its acceleration is an extremely urgent task in biomedicine.

Aim of work: The effect of C₆₀ fullerene aqueous solution (C₆₀FAS) on the dynamics of skeletal muscle contraction in rats after 9 months of chronic alcoholization and 2 months after cessation of alcohol consumption was investigated.

Materials and Methods: When analyzing the miotic response using tensometry, such biomechanical parameters as the time of reduction of the muscle force response by 50% from the initial value, the values of the contraction force and the impulse of the muscle force were evaluated.

Results: It has been shown that animals orally administered alcohol and C₆₀FAS (daily dose of 1 mg/kg) together (scheme II) during the experiment showed an increase in muscle force response by 40–45±2% compared with the group of alcoholized animals and by 12–15±1% compared with the group of rats administered C₆₀FAS 1 h after alcohol ingestion (scheme I). The positive effect of C₆₀FAS administration according to scheme II and scheme I was 34±2% and 10±1%, respectively, compared with the group of alcoholized animals in the case of recording the time of reduction of the muscle force response by 50% of the initial value. After 2 months of rehabilitation, the level of minimum muscle contraction force when using C₆₀FAS in both schemes differed by about 15±1% compared to the group of alcoholized animals, and the time of reduction of the force response by 50% was not significantly recorded. Finally, the use of C₆₀FAS revealed a significant increase in the magnitude of the muscle force impulse: up to 86±4% (scheme I) and almost to control values — 94±2% (scheme II).

Conclusions: The obtained results indicate the prospects of using C₆₀FAS to restore the biomechanical parameters of skeletal muscle contraction during long-term development of alcoholic myopathy.

KEY WORDS: C₆₀ fullerene; *muscle soleus*; alcoholic myopathy; recovery; biomechanical parameters of skeletal muscle contraction.

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-51-06>

UDC 577.323

THE 2nd SCIENTIFIC WORKSHOP FOR STUDENTS “COMPUTATIONAL PHYSICS OF DNA”

The 2nd Scientific workshop for students “Computational Physics of DNA” took place on May 21-23, 2024 in Kyiv, Ukraine, at the Bogolyubov Institute for Theoretical Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine (BITP). The event was organized in a hybrid offline-online format by joint efforts of the BITP and the Kyiv Academic University (KAU). Over 30 students from various universities of Ukraine participated, including from Taras Shevchenko National University of Kyiv, the National University of Kyiv-Mohyla Academy, the National Technical University of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute”. Students from foreign scientific centers in Italy, Romania, and Slovakia also attended the event. The lecturers and teachers of the school were leading scientists in this field: Dr. Sci. Sergiy Perepelytsya (BITP), Professor Francesca Mocci (University of Cagliari, Italy), Dr. Sci. Sergey N. Volkov (BITP), Dr. Sci. Professor Anna Shestopalova (Institute of Radiophysics and Electronica of the NAS of Ukraine), Dr. Oleksii Zdorevskyi (University of Helsinki, Finland), Dr. Tudor Vasiliu (“Petru Poni” Institute of Macromolecular Chemistry, Romania), Professor Kęstutis Aidias (Vilnius University, Lithuania), and Tatiana Bubon (BITP).

The lectures were focused on the physics of DNA and modern methods for modeling the structure and dynamics of the macromolecule at different levels of its organization. The general overview of the methods of classical molecular dynamics (MD) simulations and their application to DNA-systems has been provided by Sergiy Perepelytsya [1]. Francesca Mocci, in her lecture, did the detailed description of the interaction potentials and modern force fields that are used in classical MD simulations of nucleic acids [2]. Sergey N. Volkov discussed physical models of the conformational mechanics of DNA, describing the experimentally observed effects of the double helix bending, overstretching, and unzipping [3]. Anna Shestopalova delivered two lectures. In the first lecture, she described the methods of structural bioinformatics in studies of the indirect mechanism of protein-nucleic recognition [4], while in the second one, the MD insights of the problem of DNA-ligand interactions [5]. Oleksii Zdorevskyi covered quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) simulation methods and their applications for studying charge transfer processes in redox proteins [6]. Tudor Vasiliu’s lecture was focused on the practical use of ChatGPT for various applications in MD simulations of nucleic acids [7]. Kęstutis Aidias, in his lecture, described the integrated QM/MM approach for modelling NMR spectra of complex molecular materials [8]. Tetiana Bubon presented the results on the structure and dynamics of the DNA ion-hydration shell, discussing the results of modeling the vibrational spectra of DNA in aqueous solutions using classical MD simulations [9]. The practical classes, organized by Tetiana Bubon, were

In cites: Perepelytsya SM, Bubon TL. The 2nd Scientific workshop for students “Computational Physics of DNA”. Biophysical Bulletin. 2024;51:75–6. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-51-06>

Open Access. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

devoted to VMD and GROMACS software packages and how to use them for doing classical MD simulations [10–12]. The computational cluster of the BITP was used during the practical classes. The lectures and practical seminars are available on the BITP YouTube channel [1–12].

The organizers of the Scientific workshop gratefully acknowledge the support of the National Academy of Sciences of Ukraine (project No 0120U100855), the SIMONS Foundation, and COST Action CA21101 — Confined Molecular Systems: From a New Generation of Materials to the Stars (COSY).

REFERENCES

1. Bogolyubov Institute for Theoretical Physics. Sergiy Perepelytsya "Molecular dynamics: from the problem of hard spheres to the DNA macromolecule" [video on the Internet]. 2024 May 26. Available from: <https://youtu.be/F0zRspVZEA?feature=shared>
2. Bogolyubov Institute for Theoretical Physics. Francesca Mocci "Force fields and molecular dynamics simulations: Applications to nucleic acids" [video on the Internet]. 2024 May 26. Available from: <https://youtu.be/L16GBc8Pa48?feature=shared>
3. Bogolyubov Institute for Theoretical Physics. Sergey Volkov "Conformational mechanics of DNA" [video on the Internet]. 2024 May 26. Available from: <https://youtu.be/T70o7JYIE2s?si=YgwABVkJZQxgusaMe>
4. Bogolyubov Institute for Theoretical Physics. Anna Shestopalova "Computational methods of structural bioinformatics in studies of the indirect mechanism of protein-nucleic recognition" [video on the Internet]. 2024 May 26. Available from: <https://youtu.be/Hx0Ju0JlwE?si=7pp35Lx6mYFNw7Rg>
5. Bogolyubov Institute for Theoretical Physics. Anna Shestopalova "Computer simulations of DNA-ligand intercalation complexes: some special features" [video on the Internet]. 2024 May 26. Available from: <https://youtu.be/9XNVgkQjHCw?si=QIEvsv1fFrz6DuYX>
6. Bogolyubov Institute for Theoretical Physics. Oleksii Zdorevskiy "Hybrid quantum-mechanics/molecular mechanics (QM/MM) simulation methods and their applications to studying charge transfer processes in redox proteins" [video on the Internet]. 2024 May 26. Available from: https://youtu.be/8W9uTPJu8U?si=IF_AYx_fw_b_j-ubQ
7. Bogolyubov Institute for Theoretical Physics. Tudor Vasiliu "Using ChatGpt in molecular dynamics simulations: Applications to nucleic acids" [video on the Internet]. 2024 May 26. Available from: https://youtu.be/0szW_eLOyDU?si=B9Isyxj8KGNskybU
8. Bogolyubov Institute for Theoretical Physics. Kęstutis Aidas "Modelling NMR properties of complex molecular materials ..." [video on the Internet]. 2024 May 26. Available from: https://youtu.be/VfYs8zzbRR8?si=wKByN_STNOsSRSZi
9. Bogolyubov Institute for Theoretical Physics. Tetiana Bubon: Specific effects of alkali metal ions on the vibrational dynamics of DNA ion-hydration [video on the Internet]. 2024 May 26. Available from: https://youtu.be/ktS_VNjtXM?si=JX696Tb3jDjM3Hbe
10. Bogolyubov Institute for Theoretical Physics. Tetiana Bubon: "Practical Lesson 1: Getting started with GROMACS and VMD program packages" [video on the Internet]. 2024 May 26. Available from: <https://youtu.be/Kx8LvsipROs?si=bDC6THIy8XAAtNWle>
11. Bogolyubov Institute for Theoretical Physics. Tetiana Bubon "Practical Lesson 2: MD simulations of the DNA double helix with GROMACS" [video on the Internet]. 2024 May 26. Available from: <https://youtu.be/GmqJZqdVA9E?si=5tXP9mcw56aBo4g6>
12. Bogolyubov Institute for Theoretical Physics. Tetiana Bubon "Practical Lesson 3: Analyzing MD trajectories of DNA using GROMACS and VMD" [video on the Internet]. 2024 May 26. Available from: <https://youtu.be/YZb0hmgmCFY?si=USm--arrWuk954h4>

Sergiy Perepelytsya, Tetiana Bubon

*Bogolyubov Institute for Theoretical Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine,
14-b Metrologichna Str., Kyiv, 03143, Ukraine*

S. M. Perepelytsya  <https://orcid.org/0000-0002-9064-4234>
T. L. Bubon  <https://orcid.org/0000-0001-7049-9386>

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 з роздільною здатністю не менше ніж 300 dpi у форматі *.jpg, *.jpeg, *.png вставляються до тексту в межах площі сторінки, вказаної вище. Рисунки слід 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 два реферати (українською та англійською мовами). Реферат мовою статті розміщується першим. Перед другим рефератом з нового рядка пишеться назви статі (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 другою мовою також повинен мати обсяг не менше 1800 та 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 permitted. Use computer printed symbols for axes labeling. Insert prepared images into an MS Word file as files in *.jpg, *.jpeg, *.png format within the area of the page specified above. Images must have a resolution of at least 300 dpi. 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 UDC 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 two abstracts of the paper (written in Ukrainian and English). The first abstract should be written in the language of the manuscript. On the next line provide the second abstract (capital letters, straight font, 10 pt, bold, centered). Above the second abstract place the titles of the paper in the second language (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. The two 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. 51

Збірник наукових праць

Укр. та англ. мовами.

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

Підписано до друку 06.06.2024. Формат 60×84 1/8.
Папір офсетний. Друк ризографічний.
Ум. друк. арк. 6,41. Обл.-вид. арк. 7,45. 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