

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

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

Біофізичний Вісник

Випуск 52

Заснований 1998 р.

Харків 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 № 24 від 25.11.2024).

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

Злепко 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 І. 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.Є. 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

© І. Ф. Коваленко, К. А. Кузнецов, фото клітин букального епітелію людини (флуоресцентний мікроскоп Carl Zeiss LSM 510 META) на першій сторінці обкладинки, 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 52

Founded in 1998

Kharkiv 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 (November 25, 2024, Protocol No. 24).

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., Universität 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. Gorbienko, 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

© I. F. Kovalenko, K. A. Kuznetsov, photo of human buccal epithelial cells (fluorescence microscope Carl Zeiss LSM 510 META) on the first page of the cover, 2024

ЗМІСТ**ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ**

- Л. В. Січевська, Т. М. Овсяннікова, А. О. Коваленко, І. А. Забєліна,
О. М. Левченко, О. В. Гурін, В. П. Берест** 7–20
Вплив низькоінтенсивного лазерного випромінювання на фізико-хімічні
показники біомембран

МАТЕРІАЛИ ДЛЯ БІОМЕДИЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ

- М. О. Кумеда, Л. Б. Суходуб, Л. Ф. Суходуб**
Аналіз кінетики вивільнення лікарських засобів з біорозкладних
модифікованих наночастинками матеріалів на основі хітозану 21–32

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

- К. А. Kuznetsov, G. M. Onyshchenko, О. Т. Nikolov**
Cell stress response to combined ionizing and non-ionizing radiation and magnetic
fields: a review based on human buccal epithelium cells 33–44

CONTENTS**ACTION OF PHYSICAL AGENTS ON BIOLOGICAL OBJECTS**

- L. V. Sichevska, T. M. Ovsyannikova, A. O. Kovalenko, I. A. Zabelina,
O. M. Levchenko, O. V. Gurin, V. P. Berest** 7–20
Influence of low-level laser radiation on the physico-chemical indicators of
biomembranes

MATERIALS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

- M. O. Kumeda, L. B. Sukhodub, L. F. Sukhodub** 21–32
Analysis of drug release models from biodegradable nanomodified chitosan based
materials

CELL BIOPHYSICS

- K. A. Kuznetsov, G. M. Onyshchenko, O. T. Nikolov** 33–44
Cell stress response to combined ionizing and non-ionizing radiation and magnetic
fields: a review based on human buccal epithelium cells

ВПЛИВ НИЗЬКОІНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ БІОМЕМБРАН

Л. В. Січевська^{id}, Т. М. Овсяннікова^{id}, А. О. Коваленко^{id}, І. А. Забеліна^{id},
О. М. Левченко^{id}, О. В. Гурін^{id}, В. П. Берест^{id}

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

e-mail: sichevska@karazin.ua

Надійшла до редакції 12 квітня 2024 р. Переглянута 18 серпня 2024 р.

Прийнята до друку 6 вересня 2024 р.

Актуальність. Дослідження фізичних та молекулярних механізмів впливу низькоінтенсивного лазерного випромінювання (НІЛВ) широкого частотного діапазону на біологічні об'єкти дозволяє з'ясувати проблему лазерної фотомодуляції на рівні природних біологічних мембран та їх модельних аналогів.

Мета роботи. Виявлення молекулярних та фізичних механізмів впливу НІЛВ широкого частотного діапазону на біологічні об'єкти різного рівня складності.

Матеріали та методи. Об'єкти дослідження: одноклітинні організми *S. cerevisiae*, концентрація клітин в зразку 18×10^6 ; модельні ліпідні мембрани з суміші фосфатидилхоліну та кардіоліпіну з різним вмістом компонент (10%, 20% та 40% кардіоліпіну), що моделює поверхневі електричні властивості ліпідних моделей. Спектрофотометричне дослідження перерозподілу зарядів на клітинній поверхні здійснювали з використанням барвника бромтимолового синього. Комплексоутворення цитохрому *c* з модельними мембранами досліджували спектрофотометрично на довжині хвилі смуги Core (405–410 нм). Вплив низькоінтенсивного лазерного випромінювання з довжиною хвилі та щільністю потужності, відповідно: 337 нм, 2,8 мВт/см²; 532 нм, 9,5 мВт/см²; 70,5 мкм, 10,0 мВт/см² на клітинну поверхню дріжджів; 632,8 нм, 5,1 мВт/см² на ліпосоми з різним білок-ліпідним складом.

Результати. НІЛВ широкого частотного діапазону спричиняє зміну поверхневих електричних властивостей клітин *S. cerevisiae*, а саме, перерозподіл поверхневих зарядів клітинної мембрани, як наслідок реєструється зміна поверхневого мембранного потенціалу. Опромінення зразків модельних ліпідних мембран гелій-неоновим лазером призводить до зміни поверхневих характеристик ліпосом, що впливає на кінетичні параметри утворення білок-ліпідних комплексів за участю цитохрома *c*.

Висновки. Мішенню процесів лазерної фотомодуляції є поверхня біологічної мембрани як природних клітин, на прикладі клітин дріжджів, так і модельних ліпідних мембран з суміші фосфоліпідів з різним вмістом компонент. Створення ліпідних моделей, за білковим та ліпідним складом наближених до природних мембран, дозволяє в моделі передбачити реакцію клітинних мембран на дію НІЛВ, зрозуміти молекулярні механізми процесів лазерної фотомодуляції.

Як цитувати: Січевська ЛВ, Овсяннікова ТМ, Коваленко АО, Забеліна ІА, Левченко ОМ, Гурін ОВ, Берест ВП. Вплив низькоінтенсивного лазерного випромінювання на фізико-хімічні показники біомембран. Біофізичний вісник. 2024;52:7–20. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-52-01>

In cites: Sichevska LV, Ovsyannikova TM, Kovalenko AO, Zabelina IA, Levchenko OM, Gurin OV, Berest VP. Influence of low-level laser radiation on the physico-chemical indicators of biomembranes. Biophysical Bulletin. 2024;52:7–20. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-52-01> (in Ukrainian)

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

© Січевська Л. В., Овсяннікова Т. М., Коваленко А. О., Забеліна І. А., Левченко О. М., Гурін О. В., Берест В. П., 2024.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: низькоінтенсивне лазерне випромінювання; клітини *S. cerevisiae*; ліпосоми; мембранний потенціал; білок-ліпідні взаємодії; цитохром *c*; кардіоліпін; фосфатидилхолін.

Фотобіомодулююча ефективність низькоінтенсивного лазерного випромінювання (НІЛВ) в широкому діапазоні довжин хвиль на сьогодні досліджується на різних рівнях організації живого: на прикладі одноклітинних організмів [1, 2], культур клітин [3], клітин крові [4, 5] та на клітинних органелах [6–8]. Лазерне випромінювання низької потужності має великі потенційні можливості в якості регулятора фізіологічних та метаболічних процесів в біологічних об'єктах і на даний час широко застосовується в галузях біології та медицини [9–11]. Дослідження молекулярних механізмів впливу лазерного випромінювання на біологічні об'єкти дозволили отримати перспективне рішення проблеми сьогодення — доставки ліків з подоланням природних біологічних бар'єрів [12]. Новітні технології використання лазерного випромінювання дозволяють досягти ад'ювантного ефекту, який називають «лазерним ад'ювантом» [13, 14]. З огляду на результати наукових досліджень біологічна ефективність НІЛВ ґрунтується на фототермічній дії випромінювання за рахунок перетворення енергії фотонів в тепло [15] та прояву фотохімічного ефекту [3, 16] лазерного випромінювання. Сучасні наукові гіпотези [17, 18] пов'язують біологічну ефективність НІЛВ із запуском молекулярних реакцій в клітинах за участю ендегенних фотосенсибілізаторів. Реакція біологічних об'єктів на дію НІЛВ різних частотних діапазонів забезпечується наявністю в структурі клітинних мембран специфічних фотоакцепторів таких як порфірини, опсини, флавіни і флавопротеїни [12]. Однак, молекулярні механізми лазерного ефекту на рівні біологічних мембран на сьогоднішній день не мають вичерпного пояснення. Зрозуміти, яким чином клітинні структури виступають мішенями при застосуванні лазерного випромінювання, можливо з вивченням дії НІЛВ *in vitro* на різні мембранні структури, у тому числі, із застосуванням модельних систем ліпідних мембран, які за хімічним складом максимально наближені до природних біомембран, наприклад, еритроцитів і мітохондрій, що моделюються ліпідними мембранами з вмістом фосфатидилхоліну та кардіоліпіну.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

З метою дослідження клітинних ефектів за умов впливу лазерного випромінювання використовували культуру одноклітинних організмів *S. cerevisiae*. Робочий розчин клітин отримували з 1% суспензії дріжджів, тричі відмитих фізіологічним розчином шляхом центрифугування при 1500 об/хв протягом 10 хв та ресуспендованих у 8 мл розчину 5мМ трис- HCl буфера (pH 7,4). Кінцева концентрація клітин в досліджуваному зразку становила 18×10^6 клітин.

Дослідження структурних змін клітинної поверхні опромінених дріжджів здійснювали за допомогою барвника — бромтимолового синього (БТС). Робоча концентрація БТС в 5 мМ розчині трис HCl буфера (pH 7,4) становила 0,1 мМ. Інкубацію клітин з аліквотою барвника в інтервалі концентрацій 1,6–16 мкМ здійснювали протягом 15 хвилин з дотриманням температурних умов 25 °С. Вміст вільного барвника визначали у надосаді після центрифугування зразків протягом 10 хв при 1500 об/хв. Спектрофотометричне дослідження надосаду здійснювали на довжині хвилі 615 нм. Розрахунок концентрації вільного барвника здійснювали за формулою (1) та за даними концентраційної градуовальної залежності БТС ($2,5 \div 20$ мкМ):

$$C_B = \frac{C_0 \cdot D_f}{D_0} \quad (1)$$

де: D_0 — оптична щільність розчину барвника концентрації C_0 ; D_f — оптична щільність надосаду досліджуваного зразка; C_0 — початкова концентрація барвника в зразку; C_B — концентрація вільного барвника в зразку. Значення концентрації $C_{зв}$ зв'язаного барвника

отримували за розрахунковою формулою $C_{зв} = C_0 - C_v$. Рівноважне зв'язування БТС із центром взаємодії на поверхні клітин дріжджів аналізували в рамках адсорбційної теорії Ленгмюра [19].

Моделювання поверхневих властивостей ліпідних мембран здійснювали додаванням в суміш ліпідів аніонного фосфоліпиду кардіоліпіну. Модельні ліпідні мембрани формували із суміші ліпідів: фосфатидилхоліну (ФХ) та кардіоліпіну (КЛ) з різним вмістом компонент. В якості вихідних розчинів використовували 10% етанольний розчин фосфатидилхоліну (Sigma) (100 мг/мл), 0,5% етанольний розчин кардіоліпіну (Sigma) (5 мг/мл). Суміші ліпідів для формування ліпосом мали наступний склад: розчин фосфатидилхоліну (ФХ), розчин фосфатидилхоліну з вмістом кардіоліпіну 10%, 20% та 40% (ФХ+КЛ10%, ФХ+КЛ20%, ФХ+КЛ40%). Модельні ліпідні мембрани отримували методом інжекції за постійних температурних умов ($T=25^{\circ}\text{C}$) [20, 21]. Діаметр ліпідних везикул контролювали методом світлорозсіювання [22]. Середній діаметр ліпідних везикул становив 100 нм. Кінцева концентрація ліпідів в досліджуваних зразках ліпосом становила 0,5 мМ.

Комплексоутворення цитохрому *c* (Цит *C*) з модельними ліпідними мембранами досліджували спектрофотометрично на спектрофотометрі HitachiU-3210, в термостатованих кюветах 10×10 мм на довжині хвилі смуги Сорє 405–410 нм. Робоча концентрація розчину білка становила 1 мкМ. Кінетичні залежності зміни оптичної щільності Цит *C* в розчині та при його взаємодії з модельними ліпідними мембранами описували рівнянням [23]:

$$D/D_0 = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t}, \quad (2)$$

де D_0, D — поглинання світла цитохромом *c* в буферному розчині та в суспензії ліпосом, відповідно; A_1, A_2 — амплітуди кінетичних 1 та 2 фаз, відповідно; k_1, k_2 — кінетичні константи. Кінетичні параметри визначали з застосуванням методу найменших квадратів.

Лазерне опромінення зразків клітин дріжджів в ультрафіолетовому діапазоні здійснювали імпульсним азотним лазером ($\lambda = 337$ нм), середня потужність випромінювання 5 мВт, щільність потужності випромінювання $2,8 \text{ мВт/см}^2$. Опромінення з довжиною хвилі $\lambda=532$ нм (зелена область спектру) здійснювали твердотільним лазером типу DPSS (виробник Китай), середня потужність випромінювання 20 мВт, щільність потужності випромінювання $9,5 \text{ мВт/см}^2$. Опромінення зразків клітин в субміліметровому діапазоні здійснювали безперервним CO_2 -лазером ($\lambda = 70,5$ мкм), середня потужність випромінювання 20 мВт, щільність потужності випромінювання $9,2 \text{ мВт/см}^2$. Товщина шару опромінюваної суспензії клітин становила 1 мм, час опромінення зразків 10 хвилин.

Лазерне опромінення зразків модельних ліпосомальних мембран та розчинів цитохрому *c* здійснювали He-Ne лазером $\lambda=632,8$ нм, середня потужність випромінювання 1 мВт, щільність потужності випромінювання $5,1 \text{ мВт/см}^2$. Товщина шару опромінюваної суспензії ліпосом становила 1 мм.

Статистична обробка даних здійснювалася із застосуванням програмного пакету Аналіз даних MS Excel. Результати в таблиці 1 представлені як середнє $\pm$ довірчий інтервал. Достовірність апроксимації (*R*) експериментальних даних (Рис. 2, 3) відповідною функцією (2) складала не менше 0,9 ($n=3$).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Вплив НІЛВ на біоб'єкти, зокрема, на клітини чи клітинні органели, передусім, спричиняє зміну властивостей їх мембранної поверхні, внаслідок чого ініціюється низка перебудов міжмолекулярних взаємодій, що призводить до зміни поверхневого

мембранного потенціалу. Відомо, що поверхневий мембранний потенціал клітини є важливим фізико-хімічним чинником для забезпечення таких параметрів біологічної активності, як стійкість клітини до дії фізичних факторів, активація клітини, міжклітинні взаємодії та інше [24, 25].

З метою виявлення механізмів впливу лазерного випромінювання на поверхню клітинної мембрани експериментально досліджували особливості взаємодії аніонного барвника БТС з клітинами дріжджів, опроміненими в досліджуваному діапазоні довжин хвиль. Перерозподіл аніонного барвника на біологічній мембрані є чутливим показником структурних перебудов поверхні клітини за умов дії фізичних чинників і лазерного випромінювання, зокрема. Особливості хімічної будови молекули БТС пов'язані з наявністю від'ємного заряду та великої гідрофобної поверхні. Ефективність взаємодії барвника з біомембраною визначається розподілом полярних груп на її поверхні, та встановленням первинних електростатичних контактів. Наявність гідрофобної частини молекули БТС забезпечує його здатність до взаємодії з неполярною поверхнею мембрани. Завдяки своїм структурним особливостям барвник не здатний глибоко проникати в ліпідний бішар, а аніонна група молекули БТС залишається на мембранній поверхні [26, 27]. За особливостями молекулярної будови клітинна стінка *S. cerevisiae* розглядається як модульно-решітчаста структура з доволі великими отворами, через які можуть дифундувати молекули різного типу [28]. Проникність клітинної стінки обмежується молекулами з гідродинамічним радіусом до 5,8 нм [29, 30]. Клітинна стінка гнучко взаємодіє з плазматичною мембраною. Саме такі особливості будови клітинної поверхні забезпечують важливі транспортні функції дріжджів, які пов'язані з перенесенням іонів сидерофорами. З огляду на фізико-хімічні властивості БТС та просторову структуру клітинної стінки слід передбачити, що кінцева точка сорбції барвника є плазматична мембрана *S. cerevisiae*.

Характер перерозподілу аніонного барвника на клітинній мембрані визначається щільністю зарядів протилежного знаку на її поверхні, це дозволяє описати концентраційний розподіл аніону на мембрані статистичним рівнянням Больцмана:

$$C_x = C_0 \exp \frac{-Ze\phi}{kT} \quad (3)$$

де C_0, C_x — загальна концентрація та концентрація зв'язаного ліганда, відповідно, Z — заряд молекули ліганда, e — елементарний заряд, ϕ — потенціал на межі розподілу фаз, k — стала Больцмана.

Зміни локальної концентрації барвника в примембранному шарі визначаються величиною поверхневого мембранного потенціалу. Електричні характеристики мембранної поверхні впливають на ефективність формування ліганд-рецепторних комплексів за участю БТС та на константу асоціації цих комплексів. З огляду на особливості електростатичних взаємодій за участю барвника можна припустити:

$$K_a = K_a^0 \exp \frac{-Ze\phi}{kT} \quad (4)$$

де K_a^0 — константа зв'язування для незарядженої мембрани, K_a — константа утворення ліганд-рецепторних комплексів на зарядженій мембрані. Для двох станів клітинної мембрани, неопромінені клітини та клітини опромінені електромагнітним випромінюванням, будуть характерні відповідні константи асоціації K_{a1} та K_{a2} . Для двох різних значень поверхневих потенціалів ϕ_1 (неопромінений контроль) і ϕ_2 (опромінений зразок) буде виконуватися співвідношення:

$$\frac{K_{a1}}{K_{a2}} = \exp \frac{Ze\Delta\phi}{kT} \quad (5)$$

$$\Delta\phi = \phi_1 - \phi_2 = \frac{kT}{Ze} \ln \frac{K_{a1}}{K_{a2}} \quad (6)$$

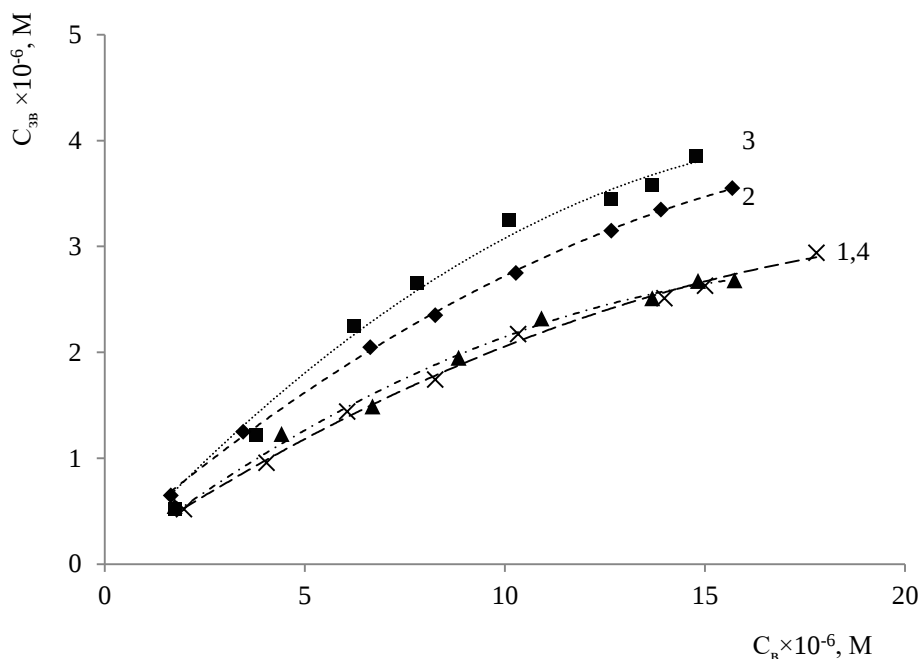


Рис. 1. Зв'язування бромтимолового синього плазматичними мембранами дріжджів за умов дії лазерного випромінювання: 1 — неопромінений контроль; 2 — 337 нм; 3 — 532 нм; 4 — 70,5 мкм.

Fig. 1. Binding of bromothymol blue by plasma membranes of yeast under the conditions of laser radiation: 1 — non-irradiated control; 2 — 337 nm; 3 — 532 nm; 4 — 70.5 μm.

Параметри ліганд-рецепторної взаємодії БТС визначали за методом Скетчарда із експериментальних залежностей титрування барвником суспензії клітин (Рис. 1). Було виявлено зміну параметрів комплексоутворення БТС з опроміненими клітинами в досліджуваному діапазоні довжин хвиль (Рис. 1).

Виявлена загальна тенденція впливу лазерного випромінювання на поверхню клітинної мембрани в широкому діапазоні довжин хвиль: опромінення спричиняє зменшення константи зв'язування та зростання числа центрів сорбції барвника з поверхнею клітин відносно неопроміненого контролю (Табл. 1). З огляду на більшу потужність випромінювання значущі зміни параметрів комплексоутворення виявлені при опроміненні клітин НІЛВ з довжиною хвилі 532 нм: встановлено зростання кількості центрів зв'язування барвника з клітиною (N , мкМ) у 2,5 рази та зменшення константи зв'язування (K_s , моль $^{-1}$) у 2 рази, у порівнянні з неопроміненим контролем.

Розрахована за встановленими параметрами комплексоутворення барвника зміна мембранного потенціалу вказує на зростання абсолютної величини поверхневого потенціалу під впливом лазерного опромінення досліджуваного діапазону довжин хвиль відносно неопроміненого контролю. Найбільш значущі зміни даного показника встановлені для лазерного опромінення з довжиною хвилі $\lambda=532$ нм ($\Delta\phi = -0,77$).

Утримання аніонного барвника БТС на поверхні мембрани здійснюється, в першу чергу, за рахунок електростатичних взаємодій. Вплив лазерного випромінювання модифікує мембранну поверхню клітини та впливає на енергетичні параметри комплексоутворення на її поверхні. За результатами експериментальних даних розрахована величина зміни вільної енергії (ΔG) взаємодії, яка знаходиться в інтервалі значень $-21,97$ кДж/моль ÷ $-20,08$ кДж/моль та вказує на високу спорідненість аніонного барвника до біологічних мембран.

Таблиця 1. Параметри комплексоутворення BTS з поверхнею клітинних мембран дріжджів та розраховані величини зміни вільної енергії зв'язування і зміни мембранного потенціалу за умов дії лазерного випромінювання.

Table 1. Parameters of complex formation of BTS with the surface of cell membranes of yeasts and calculated values of changes in free energy of binding and changes in membrane potential under the conditions of laser radiation.

	$K_c \times 10^4 \text{ моль}^{-1}$	N, мкМ	ΔG , кДж/моль	$\Delta \phi$, мВ
Контроль	$6,7 \pm 0,3$	$5,21 \pm 0,26$	---	---
$\lambda = 337 \text{ нм}$	$5,93 \pm 0,29$	$7,4 \pm 0,4^*$	-21,66	-0,13
$\lambda = 532 \text{ нм}$	$3,16 \pm 0,16^*$	$13,0 \pm 0,7^{**}$	-20,08	-0,77
$\lambda = 70,5 \text{ мкм}$	$3,81 \pm 0,19^*$	$7,4 \pm 0,4^*$	-20,11	-0,56

* — $p < 0,05$ відносно неопроміненого контролю;

** — $p < 0,01$ відносно неопроміненого контролю

За результатами представлених експериментальних досліджень показано, що мембранна поверхня клітин *S. cerevisiae* реагує на дію лазерного випромінювання широкого частотного діапазону зміною поверхневих електричних властивостей. З огляду на більшу потужність випромінювання максимальний ефект спостерігається під впливом НЛВ з довжиною хвилі 532 нм. Отримані нами експериментальні дані не суперечать сучасним науковим дослідженням, щодо стресового впливу видимого світла на клітини [31]. Пригнічення дихальної активності оптичним випромінюванням синього та зеленого спектрального діапазонів виявлене в клітинах *S. cerevisiae* [32]. Також авторами [33] встановлено дозозалежне пригнічення поділу культур клітин дріжджів в логарифмічній фазі росту в результаті їх опромінення видимим світлом в широкому інтервалі доз 0-140 Дж/см². Попередні дослідження [2] свідчать про перебудову клітинної мембрани *S. cerevisiae* під впливом лазерного випромінювання двофотонного збудження оптичного діапазону, виявлені ефекти пов'язуються з активацією процесів фотоокислення в клітинних мембранах. Реакції клітин на видиме випромінювання регулюються, переважно, природними фотосенсибілізаторами. Проте, у клітин *S. cerevisiae* на відміну від багатьох інших одноклітинних організмів, відсутні фоторецептори випромінювання оптичного діапазону такі як криптохроми, схитохроми, родопсини [34], окрім цитохромів. Зареєстроване пригнічення дихальної активності клітин дріжджів видимим випромінюванням низької інтенсивності відбувається за рахунок фотопошкодження мітохондріальних мембран за участі ендогенних фотосенсибілізаторів цитохромів [32]. Також клітини *S. cerevisiae* здатні сприймати видиме світло через пероксисомальну флавіновмісну ацил-КоА-оксидазу, фотоактивація якої супроводжується генерацією перекису водню, що й запускає в клітинах сигнальний каскад реакцій [35]. З молекул перекису водню в присутності іонів металів змінної валентності (заліза, міді, марганцю та ін.) утворюються реакційні гідроксильні радикали, які здатні посилювати окислювальні процеси в мембранних ліпідах. Це дає підстави припустити, що фотопошкодження клітинної мембрани дріжджів ініціюється підвищенням концентрації перексиду водню та спричиняє активацію процесів перекисного окислення ліпідів. З огляду на це автори припускають, що виявлена лазерна фотомодуляція клітинної поверхні досліджуваним випромінюванням з довжиною хвилі 532 нм є багатостадійним процесом, з одного боку, ініційованим ендогенними фотосенсибілізаторами, які присутні в клітинах *S. cerevisiae* і зокрема, молекулами

Цит С, з іншого боку, фотоактивацією пероксисомальної флавіновмісної ацил-КоА-оксидази з наслідками розгортання фотоокислення в ліпідній фазі клітинних мембран.

Наші результати та попередні припущення щодо ролі біологічної мембрани—не суперечать загальній моделі фотомодуляції клітин НІЛВ. Клітинні і субклітинні мембрани є головними мішенями ініціації фотомодуляції на рівні клітинного організму [36, 37]. Біологічна ефективність НІЛВ даного діапазону, досліджувана на клітинах крові людини, пов'язується з активацією ендогенних фотосенсибілізаторів в еритроцитах [36] та, як наслідок, пошкодженням реологічних властивостей еритроцитів. Біостимулююча дія НІЛВ з довжиною хвилі 589 нм на клітини лімфоцитів [37] проявляється в зростанні швидкості поділу клітин зі зростанням концентрації внутрішньоклітинної АТФ, в результаті фотомодуляції мітохондріальних мембран в клітинах лімфоцитів.

Використання ліпосомальних мембран, як спрощених моделей природної мембрани, дозволяє дослідити і проаналізувати біологічну ефективність НІЛВ в системі з заданими молекулярним компонентами та визначитися з їх значущістю в процесах лазерної фотомодуляції. Досліджувалися модельні ліпідні мембрани з фосфатидилхоліну (100%) та фосфатидилхоліну з вмістом крадіоліпіну (10%, 20%, 40%). Моделювання ліпідного складу біомембран дозволяє наблизити за своїми хімічними характеристиками суто фосфатидилхолінові (ФХ) ліпосоми до еритроцитарної мембрани, тоді як ФХ ліпосоми з вмістом крадіоліпіну за хімічним складом наближаються до внутрішньої мембрани мітохондрій. В якості білкового компоненту був обраний Цит С — один із білків дихального ланцюга мітохондрій. Він безпосередньо бере участь не лише у функціонуванні електрон-транспортного ланцюга, але й у процесах апоптозу клітини під дією екзо- або ендогенних чинників [38, 39]. Також відомо, що в природних умовах функціональна активність Цит С на внутрішній мембрані мітохондрій визначається концентрацією крадіоліпіну [40]. За умов впливу He-Ne НІЛВ на модельні білок-ліпідні

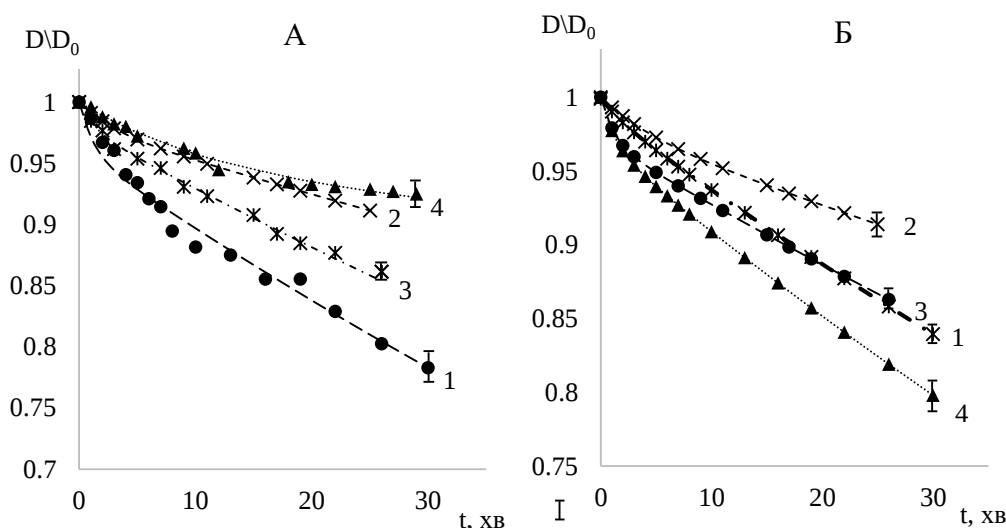


Рис. 2. Кінетичні залежності зменшення оптичної щільності Цит С в присутності модельних ліпідних мембран різного складу в контролі (А) та опромінених He-Ne лазером (Б): 1 — ФХ; 2 — ФХ+КЛ10%; 3 — ФХ+КЛ20%; 4 — ФХ+КЛ40%. Концентрація білка — 1 мкМ, концентрація ліпіда — 0,5 мМ.

Fig. 2. Kinetic dependences of the decrease in the optical density of Cyt C in the presence of model lipid membranes of different composition in the control (A) and those irradiated with a He-Ne laser (B): 1 — PH; 2 — PH+CL10%; 3 — PH+CL20%; 4 — PH+CL40%. Protein concentration — 1 μ M, lipid concentration — 0.5 mM.

системи були досліджені особливості взаємодії Цит С з ліпосомальними мембранами різного фосфоліпідного складу, проаналізовані кінетичні параметри комплексоутворення.

Взаємодія Цит С з модельними мембранами супроводжується зменшенням поглинання світла гемовмісного білка в смузі Соре, на довжині хвилі $\lambda=407$ нм, що обумовлено змінами структурного стану гемової групи. Отримані в даній роботі експериментальні кінетичні залежності комплексоутворення Цит С з ліпосомами різного фосфоліпідного складу характеризуються наявністю двох фаз [41] перебудови в молекулі: швидкої кінетичної фази, яка характеризує зміни конформації білка внаслідок його взаємодії з фосфоліпідами ліпосомальних мембран, та повільної кінетичної фази, яка зумовлена порушенням зв'язку між глобіном та гемовою групою.

Низькоінтенсивне випромінювання He-Ne лазера впливає на ефективність взаємодії Цит С з модельними мембранами (Рис. 2, Рис. 3). Зменшення поглинання гемовмісного білка в максимумі смуги Соре встановлено в процесах комплексоутворення за участі обох типів мембран: ФХ та ФХ+КЛ після їх опромінення.

Формування білок-ліпідних комплексів Цит С з опроміненими ФХ ліпосомами супроводжуються зміною кінетичних параметрів. Значення амплітуди (A_2) та константи швидкості (k_2) повільної кінетичної фази зменшилися в 4 та 1,5 рази, відповідно, у порівнянні з неопроміненим контролем. Проте, більш чутливими до дії He-Ne лазера виявилися ліпосоми з вмістом 40% кардіоліпіну. Для опромінених ліпосом із вмістом 40% кардіоліпіна кінетичні параметри комплексоутворення (k_1 , k_2) Цит С зазнають більш суттєвих змін (Табл. 2). Константи швидкості як швидкої, так і повільної кінетичних фаз, перевищують значення констант для неопромінених ліпосом, а саме, k_1 в 8 разів, k_2 в 9 разів. Зміни кінетичних параметрів для інших досліджуваних зразків були менш значущі.

Таблиця 2. Кінетичні параметри комплексоутворення Цит С з модельними ліпідними мембранами в контрольних зразках та після опромінення ліпосом He-Ne лазером.

Table 2. The kinetic parameters of complex formation of Cyt C with model lipid membranes in control samples and after irradiation of liposomes with a He-Ne laser.

	A_1	$k_1 \times 10^{-3}, \text{хв}^{-1}$	A_2	$k_2, \text{хв}^{-1}$
Контрольні ліпосоми				
ФХ	0,960±0,009	6,80±0,15	0,040±0,012	0,780±0,025
ФХ+КЛ10%	0,98±0,01	2,90±0,15	0,020±0,004	0,4±0,05
ФХ+КЛ20%	0,98±0,014	5,3±0,3	0,020±0,005	0,75±0,025
ФХ+КЛ40%	0,940±0,006	0,85±0,05*	0,060±0,003	0,090±0,005*
Опромінені ліпосоми				
ФХ	0,99±0,02	5,5±0,3	0,010±0,005	0,45±0,07
ФХ+КЛ10%	0,980±0,015	2,80±0,15	0,020±0,003	0,23±0,05
ФХ+КЛ20%	0,97±0,01	4,5±0,4	0,030±0,005	0,80±0,02
ФХ+КЛ40%	0,970±0,007	6,5±0,4*	0,030±0,005	0,79±0,05*

* — $p < 0,01$ відносно неопроміненого контролю

Досліджувані білок-ліпідні взаємодії супроводжуються конформаційними змінами макромолекул. Можливі структурні перебудови при цьому стосуються як білкової частини гемовмісного білка, так і його гемової групи. Утворення білок-ліпідних комплексів Цит С з модельними мембранами різного фосфоліпідного складу, опроміненими He-Ne лазером, супроводжується конформаційними змінами білкової

частини молекули цитохрому при його взаємодії з ФХ ліпосомами, тоді як комплекси з ліпосомами ФХ+КЛ40% відзначаються перебудовами як білкової частини, так і зв'язку гем-глобін.

Взаємодія Цит С з ліпідним бішаром модельних мембран є багатостадійним процесом. Молекула Цит С — це полікатион, який при нейтральних рН має сумарний загальний заряд +9,5 [42, 43], отже, переважають електростатичні взаємодії білка з полярними голівками ліпідного бішару. На першому етапі утворюються один-два зв'язки, а потім кількість електростатичних контактів збільшується в результаті латеральної дифузії заряджених фосfolіпідів та зміни конформації білка [41, 44]. Подальші взаємодії і занурення білка в ліпідний бішар збільшують кількість гідрофобних контактів.

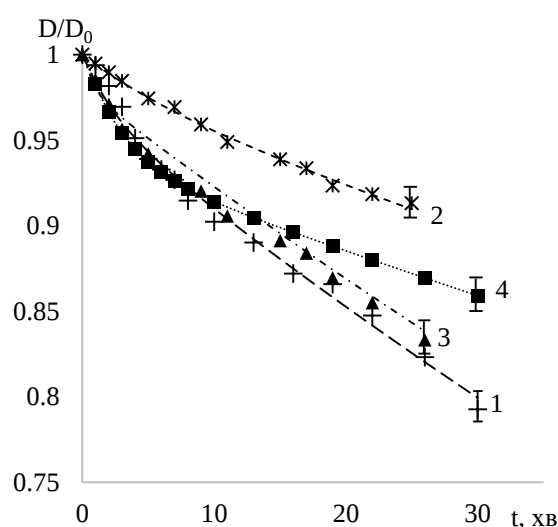


Рис. 3. Кінетичні залежності зменшення оптичної щільності опроміненого He-Ne лазером Цит С в присутності модельних ліпідних мембран різного складу: 1 — ФХ; 2 — ФХ+КЛ10%; 3 — ФХ+КЛ20%; 4 — ФХ+КЛ40%. Концентрація білка — 1 мкМ, концентрація ліпіда — 0,5 мМ.

Fig. 3. Kinetic dependences of the decrease in the optical density of Cyt C irradiated by a He-Ne laser in the presence of model lipid membranes of different composition: 1 — PH; 2 — PH+CL10%; 3 — PH+CL20%; 4 — PH+CL40%. Protein concentration — 1 μ M, lipid concentration — 0.5 mM.

Ефективність формування білок-ліпідних комплексів залежить як від фізичного стану ліпідного бішару, так і від структурного стану молекул білка. У зв'язку з цим, були досліджені кінетичні параметри комплексоутворення модельних ліпідних мембран з Цит С, опроміненим He-Ne лазером, за тих же умов опромінення, що і для попередніх серій дослідів (Рис. 3). Не виявлено достовірних змін кінетичних параметрів швидкої фази (A_1 , k_1) при взаємодії опроміненого Цит С з ФХ ліпосомами та з вмістом кардіоліпіну 10% і 20% у порівнянні з кінетичними параметрами взаємодії неопроміненого Цит С з ФХ ліпосомами. Для повільної фази встановлені достовірні зміни константи швидкості при взаємодії опроміненого Цит С з ФХ ліпосомами та з вмістом кардіоліпіну 10% у порівнянні з відповідними кінетичними параметрами взаємодії неопроміненого Цит С. Більш значущі зміни кінетичних параметрів виявлені при взаємодії опроміненого Цит С з ліпосомами ФХ+КЛ40% (Табл. 3). Константи швидкості k_1 та k_2 перевищують в 4 та 3 рази значення відповідних констант для неопроміненого Цит С. Для інших досліджуваних зразків значущих змін кінетичних параметрів не виявлено.

Таблиця 3. Кінетичні параметри комплексотворення опроміненого He-Ne лазером Цит С з ліпосомами.

Table 3. The kinetic parameters of complex formation of Cyt C irradiated by He-Ne laser with liposomes.

	A_1	$k_1 \times 10^{-3}, \text{хв}^{-1}$	A_2	$k_2, \text{хв}^{-1}$
ФХ	0,970±0,008	6,45±0,21	0,030±0,002	0,40±0,04
ФХ+КЛ10%	0,980±0,014	3,00±0,33	0,020±0,003	0,15±0,01
ФХ+КЛ20%	0,980±0,015	6,0±0,7	0,020±0,005	1,10±0,06
ФХ+КЛ40%	0,940±0,015	3,40±0,27*	0,060±0,003	0,30±0,03*

* — $p < 0,01$ відносно неопроміненого контролю

Опромінення молекулярного розчину цитохрому He-Ne лазером впливає на структурно-функціональні властивості молекул, як наслідок, встановлено зміну параметрів комплексоутворення Цит С з модельними ліпідними мембранами. Спостерігається тенденція зростання кінетичних параметрів білок-ліпідних взаємодій за участі опроміненого Цит С у порівнянні з неопроміненим контролем. Формування білок-ліпідних комплексів за участі опроміненого Цит С і модельних мембран фосфоліпідного складу ФХ+КЛ40% супроводжується конформаційними змінами як білкової частини, так і зв'язку гем-глобін.

Відомо, що в процесі асоціації Цит С з модельними ліпідними мембранами переважають електростатичні білок-ліпідні взаємодії, на користь цього свідчить наявність сумарного електричного заряду молекули Цит С [44]. З огляду на експериментально встановлені зміни кінетичних параметрів взаємодії Цит С з опроміненими He-Ne лазером модельними мембранами можна припустити, що лазерна модифікація ліпідної компоненти, а саме модифікація поверхневих електричних властивостей ліпосом, спричинює зміни процесу комплексоутворення. Експериментальні дані отримані в модельних дослідженнях взаємодії опроміненого He-Ne лазером Цит С з нативними модельними мембранами свідчать про чутливість молекул білка до дії лазерного випромінювання. За таких умов експерименту зберігається загальна тенденція щодо зростання параметрів комплексоутворення за участі опромінених зразків, але кількісна оцінка цих параметрів свідчить на користь більшої чутливості до дії лазерного випромінювання саме ліпідної компоненти.

Дослідження впливу НІЛВ широкого частотного діапазону на біологічні об'єкти різного рівня складності вказує на розгортання процесів фотомодуляції фізико-хімічних властивостей як на рівні природних клітинних мембран, так і на рівні модельних ліпідних мембран з різними фізичними характеристиками поверхні. Мембранна поверхня є чутливою мішенню до дії лазерного випромінювання досліджуваного частотного діапазону. Для клітин дріжджів *S. cerevisiae* наслідки лазерної фотомодуляції пов'язані зі зміною щільності перерозподілу зарядів на клітинній поверхні. З огляду на особливості реакції клітин дріжджів на низькоінтенсивне випромінювання видимого діапазону [32, 35] лазерне пошкодження мембранної поверхні є багатостадійним процесом, ініційованим ендегенними фотосенсибілізаторами, зокрема, молекулами Цит С, та фотоактивацією пероксисомальної ацил-КоА-оксидази з наслідками розгортання фотоокислення в ліпідній фазі клітинних мембран.

Створення ліпосомальних моделей, за білковим та ліпідним складом наближених до природних клітинних чи субклітинних мембран, дозволяє в моделі передбачити реакцію природних мембран на дію НІЛВ, зрозуміти молекулярні механізми процесів лазерної фотомодуляції. Модельні ліпідні мембрани з вмістом 40% кардіоліпіну за своїм хімічним складом наближаються до внутрішньої мембрани мітохондрій (вміст кардіоліпіну

більше 25% загальної кількості фосфоліпідів). Формування білок-ліпідних комплексів Цит С з кардіоліпінумісними ліпосомами робить модельні мембрани ще більше наближеними до природної мітохондріальної мембрани. З огляду на таку модель та результати експериментальних досліджень можна припустити, що НІЛВ впливає на функції мітохондрій через зміну ефективної взаємодії Цит С з кардіоліпіном, а також через зміну просторової конфігурації Цит С, взаємної орієнтації його гемового та білкового компонентів. З урахуванням літературних даних про роль природного комплексу Цит С–кардіоліпін у мітохондріях в процесах апоптозу [45,46], можна з упевненістю припустити, що НІЛВ досліджуваного діапазону (632,8 нм) здатне впливати на цей процес.

ВИСНОВКИ

1. Мембранна поверхня клітин *S. cerevisiae* реагує на дію лазерного випромінювання широкого частотного діапазону зміною поверхневих електричних властивостей. НІЛВ з довжиною хвилі (337 нм; 532 нм; 70,5 мкм) викликає перерозподіл поверхневих зарядів клітин *S. cerevisiae*, що спричиняє зміну поверхневого мембранного потенціалу.

2. НІЛВ (632,8 нм) впливає на кінетичні параметри комплексоутворення Цит С з модельними мембранами з різним ліпідним складом. Найбільший ефект досягається при опроміненні фосфатидилхолінових ліпосом з вмістом 40% кардіоліпіну. Досліджувані білок-ліпідні взаємодії супроводжуються конформаційними змінами як білкової частини Цит С, так і зв'язку гем-глобін.

3. Взаємодія опроміненого цитохрому *c* з ліпідним бішаром модельних мембран характеризується зміною параметрів комплексоутворення. Спостерігається тенденція зростання кінетичних параметрів комплексоутворення (k_1 , k_2) опроміненого Цит С з ліпосомальними мембранами з вмістом кардіоліпіну 40% у порівнянні з неопроміненим контролем. Формування білок-ліпідних комплексів в умовах досліджуваної моделі супроводжується змінами конформації білкової частини цитохрому *c*, а також порушенням її взаємодії з гемовою групою.

4. Встановлені закономірності зміни фізико-молекулярних характеристик модельних ліпідних бішарів під дією низькоінтенсивного випромінювання He-Ne лазера розширюють уявлення про механізми мембранозалежних біоефектів НІЛВ.

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

Authors' ORCID ID

Л. В. Січевська  <https://orcid.org/0000-0001-6613-2645>
 Т. М. Овсяннікова  <https://orcid.org/0000-0002-5386-6559>
 А. О. Коваленко  <https://orcid.org/0000-0002-6332-8922>
 І. А. Забеліна  <https://orcid.org/0009-0005-3071-9635>
 О. М. Левченко  <https://orcid.org/0000-0002-4460-8419>
 О. В. Гурін  <https://orcid.org/0000-0003-1382-5338>
 В. П. Берест  <https://orcid.org/0000-0001-7779-154X>

REFERENCES

1. Santos FP, Carvalhos CA and Figueiredo-Dias M. Review New insights into photobiomodulation of the vaginal microbiome-A. Critical Review Int. J. Mol. Sci. 2023;24:13507. <https://doi.org/10.3390/ijms241713507>
2. Grangeteau C, Lepinois F, Winckler P, Perrier-Cornet JM, Dupont S, Beney L. Cell death mechanisms induced by photo-oxidation studied at the cell scale in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Front Microbiol. 2018;5(9):2640 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02640>

3. Lubart R, Lavi R, Friedmann H, Rochkind S, Photochemistry and Photobiology of Light Absorption by Living Cells Photomedicine and Laser Surgery. 2006;24(2):179–85 <https://doi.org/10.1089/pho.2006.24.179>
4. Zhu R, Avsievich T, Su X, Bykov A, Popov A, Meglinski I. Hemorheological alterations of red blood cells induced by 450-nm and 520-nm laser radiation. J Photochem Photobiol B. 2022;230:112438. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2022.112438>
5. Elblbesy MA. Comparative In Vitro Study: Examining 635 nm laser and 265 nm ultraviolet interaction with blood. Photobiomodul Photomed Laser Surg. 2019;37(6):342–8. <https://doi.org/10.1089/photob.2018.4611>
6. Cui Y, Guo Z, Zhao Y, Zheng Y, Qiao Y, Cai J et al. Reactive effect of low intensity He-Ne laser upon damaged ultrastructure of human erythrocyte membrane in Fenton system by atomic force microscopy. Acta Biochimica et Biophysica Sin. (Shanghai) 2007;39(7):484–9 <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00309.x>
7. Hamblin MR. Mechanisms and mitochondrial redox signaling in photobiomodulation. Photochemistry and Photobiology. 2018;94(2):199–212. <https://doi.org/10.1111/php.12864>
8. Baldassarro VA, Alastra G, Lorenzini L, Giardino L, Calzà L. Photobiomodulation at defined wavelengths regulates mitochondrial membrane potential and redox balance in skin fibroblasts. Oxid Med Cell Longev. 2023;24:7638223 <https://doi.org/10.1155/2023/7638223>
9. Bensadoun RJ, Epstein JB, Nair RG, Barasch A, Raber-Durlacher JE, Migliorati C et al. Safety and efficacy of photobiomodulation therapy in oncology: A systematic review. Cancer Med. 2020;9(22):8279–300. <https://doi.org/10.1002/cam4.3582>
10. Berni M, Brancato AM, Torriani C, Bina V, Annunziata S, Cornella E et al. The Role of Low-Level Laser Therapy in Bone Healing: Systematic Review. Int J Mol Sci. 2023;24(8):7094. <https://doi.org/10.3390/ijms24087094>
11. Nejatifard M, Asefi S, Jamali R, Hamblin MR, Fekrazad R. Probable positive effects of the photobiomodulation as an adjunctive treatment in COVID-19: A systematic review. Cytokine. 2021; 137:155312. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155312>
12. da Silva TG, Ribeiro RS, Mencalha AL, de Souza Fonseca A. Photobiomodulation at molecular, cellular, and systemic levels. Lasers Med. Sci. 2023;38(136):77. <https://doi.org/10.1007/s10103-023-03801-6>
13. Maki Y, Kushibiki T, Sano T, Ogawa T, Komai E, Takahashi S et al. 1270 nm near-infrared light as a novel vaccine adjuvant acts on mitochondrial photoreception in intradermal vaccines. Front. Immunol. 2022;13:1028733. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1028733>
14. Yokomizo S, Katagiri W, Maki Y, Sano T, Inoue K, Fukushi M, et al. Brief exposure of skin to near-infrared laser augments early vaccine responses. Nanophotonics. 2021;10:3187–97. <https://doi.org/10.1515/nanoph-2021-0133>
15. Cronshaw M, Parker S, Grootveld M, Lynch E. Photothermal effects of high-energy photobiomodulation therapies: an in vitro investigation Biomedicines 2023;11(6):1634. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11061634>
16. Itoh S, Okada H, Kuboi T, Kusaka T. Phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia. 2017;59:959–66. <https://doi.org/10.1111/ped.13332>
17. Liebert AD, Bicknell BT, Adams RD. Protein conformational modulation by photons: A mechanism for laser treatment effects Medical Hypotheses 82.2014;275–81 <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2013.12.009>
18. Freitas De Freitas L, Hamblin MR. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics. 2016;22(3):348–64. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2016.2561201>
19. Huanmei Suna, Jiajun Liua, Yifei Lib, Jing Wang, Yajun Zhanga Characterization of the heterogeneous adsorption of three drugs on immobilized bovine serum albumin by adsorption energy distribution. Journal of Chromatography B. 2019;1125(1):121727. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121727>
20. Kremer JMH, Esker MWJ, Pathmamanoharan C, Wiersema PH. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. Biochemistry. 1977;16(17):3932–5 <https://doi.org/10.1021/bi00636a033>
21. Stano P, Bufali S, Pisano C, Bucci F, Barbarino M, Santaniello M, Carminati P, Luisi PL. Novel camptothecin analogue (gimatecan)-containing liposomes prepared by the ethanol injection method. J. Liposome Res, 2004;14(1–2):87–109 <https://doi.org/10.1081/LPR-120039794>
22. Matsuzaki K, Murase O, Sugishita K, Yoneyama S, Akada K, Ueha M, Nakamura A, Kobayashi S. Optical characterization of liposomes by right angle light scattering and turbidity measurement Biochimica et Biophysica Acta 1467 (2000) 219–26 [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00223-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00223-6)
23. Gorbenko GP. Kinetics of conformational changes of methemoglobin complexed with liposomes. The Ukrainian Biochemical Journal. 1998;70(3):68–72. (In Ukrainian)
24. Szeremeta M, Petelska AD, Kotyn'ska J, Pepin'ski W, Naumowicz M, Figaszewski ZA, et al. Changes in surface charge density of blood cells in fatal accidental hypothermia. J Membrane Biol. 2015;248:1175–80. <https://doi.org/10.1007%2Fs00232-015-9838-1>

25. Aharon D, Weitman H, Ehrenberg B. The effect of liposomes' surface electric potential on the uptake of hematoporphyrin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011;1808:2031–5 <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2011.03.015>
26. Dreval VI, Finashin AV, Barannik EA. Study of bromthymol blue binding with plasma membranes. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 1989;61(2):94–8. (In Ukrainian)
27. Luvisetto S, Cola C, Conover TE, Azzone GF. Tracking of proton flow during transition from anaerobiosis to steady state in rat liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1990;1018:77–90 [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(90\)90113-I](https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90113-I)
28. Eddy AA, Barnett JA. A history of research on yeasts 11. The study of solute transport: the first 90 years, simple and facilitated diffusion. *Yeast*. 2007;24(12):1023–59 <https://doi.org/10.1002/yea.1572>
29. De Nobel JG, Barnett JA. Passage of molecules through yeast cell walls: a brief essay-review. *Yeast*. 1991;7(4):313–23 <https://doi.org/10.1002/yea.320070402>
30. De Nobel JG, Klis FM, Munnik T, Priem J, Ende H. An assay of relative cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*. 199;6(6):483–90 <https://doi.org/10.1002/yea.320060605>
31. Camponeschi I, Montanari A, Mazzoni C, Bianchi MM. Light Stress in Yeasts: Signaling and Responses in Creatures of the Night. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24:6929. <https://doi.org/10.3390/ijms24086929>
32. Robertson JB, Davis CR, Johnson CH. Visible light alters yeast metabolic rhythms by inhibiting respiration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(52):21130–5 <https://doi.org/10.1073/pnas.1313369110>
33. Gierke AM, Hessling M. Photoinactivation by UVA radiation and visible light of *Candida auris* compared to other fungi. *Photochem Photobiol Sci.* 2024;23(4):681–92 <https://doi.org/10.1007/s43630-024-00543-4>
34. Salichos L, Rokas A. The diversity and evolution of circadian clock proteins in fungi. *Mycologia*. 2010;102(2):269–78 <https://doi.org/10.3852/09-073>
35. Bodvard K, Peeters K, Roger F, Romanov N, et al. Light-sensing via hydrogen peroxide and a peroxiredoxin. *Nat. Commun.* 2017;24(8):14791 <https://doi.org/10.1038/ncomms14791>
36. Mi XQ, Chen JY, Cen Y, Liang ZJ, Zhou LW. A comparative study of 632.8 and 532 nm laser irradiation on some rheological factors in human blood in vitro *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 74 (2004) 7–12 <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.01.003>
37. Al Musawi MS, Jaafar MS, Al-Gailani, Ahmed NM, Suhaimi FM, Suardi N. Effects of low-level laser irradiation on human blood lymphocytes in vitro *Lasers Med Sci.* 2017;32(2):405–11 <https://doi.org/10.1007/s10103-016-2134-1>
38. Vakifahmetoglu-Norberg H, Ouchida AT, Norberg E. The role of mitochondria in metabolism and cell death, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017;482(3):426–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.088>
39. Hüttemann M, Pecina P, Rainbolt M, Sanderson TH, Kagan VE, Samavati L, et al. The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: from respiration to apoptosis, *Mitochondrion*. 2011;11:369–81. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.01.010>
40. Ikon N, Ryan RO. Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2017;1859(6):1156–63. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2017.03.013>
41. Gorbenko GP. Resonance energy transfer study of hemoglobin and cytochrome complexes with lipids. *Biochim. Biophys. Acta*.1998;12(24):13–4. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00140-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00140-6)
42. Zaidi S, Hassan MI, Islam A, Ahmad F. The role of key residues in structure, function, and stability of cytochrome-c, *Cell. Mol. Life Sci.*2014;71:229–55. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1341-1>.
43. Bertini I, Cavallaro G, Rosato A. Cytochrome c: occurrence and functions. *Chem. Rev.* 2006;106:90–115. <https://doi.org/10.1021/cr050241v>.
44. Schweitzer-Stenner R. Relating the multi-functionality of cytochrome c to membrane binding and structural conversion, *Biophys. Rev.* 2018;10:1151–85. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0409-4>.
45. Fox CA, Ryan RO. Studies of the cardiolipin interactome. *Prog Lipid Res.* 2022;88:101195. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101195>
46. Gasanoff ES, Yaguzhinsky LS, Garab G. Cardiolipin, Non-Bilayer Structures and Mitochondrial Bioenergetics: Relevance to Cardiovascular Disease. *Cells*. 2021;10(7):1721. <https://doi.org/10.3390/cells10071721>

INFLUENCE OF LOW-LEVEL LASER RADIATION ON THE PHYSICO-CHEMICAL
INDICATORS OF BIOMEMBRANES

L. V. Sichevska^{id}, T. M. Ovsyannikova^{id}, A. O. Kovalenko^{id}, I. A. Zabelina^{id}, O. M. Levchenko^{id},
O. V. Gurin^{id}, V. P. Berest^{id}

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

e-mail: sichevska@karazin.ua

Submitted April 12, 2024; Revised August 18, 2024;

Accepted September 6, 2024

Background: The study of physical and molecular mechanisms of the influence of low-level laser radiation (LLLR) of a wide frequency range on biological objects allows to clarify the problem of laser photomodulation at the level of natural biological membranes and their model analogues.

Objectives: Identification of molecular and physical mechanisms of the influence of LLLR of a wide frequency range on biological objects of various levels of complexity.

Materials and methods: Research objects: unicellular organisms *S. cerevisiae*, concentration of cells in the sample 18×10^6 ; model lipid membranes from a mixture of phosphatidylcholine and cardiolipin with different content of components (10%, 20% and 40% cardiolipin), which simulates the surface electrical properties of lipid models. A spectrophotometric study of charge redistribution on the cell surface was carried out using bromothymol blue dye. Complex formation of cytochrome c with model membranes was studied spectrophotometrically at the wavelength of the Soret band (405–410 nm). The influence of low-intensity laser radiation with wavelength and power density, respectively: 337 nm, 2.8 mW/cm²; 532 nm, 9.5 mW/cm²; 70.5 μm, 10.0 mW/cm² on the yeast cell surface; 632.8 nm, 5.1 mW/cm² on liposomes with different protein-lipid composition.

Results: LLLR of a wide frequency range causes a change in the surface electrical properties of *S. cerevisiae* cells, namely, a redistribution of the surface charges of the cell membrane, as a result of which a change in the surface membrane potential is recorded. Irradiation of samples of model lipid membranes with a helium-neon laser leads to a change in the surface characteristics of liposomes, which affects the kinetic parameters of the formation of protein-lipid complexes with the participation of cytochrome c.

Conclusions: The target of laser photomodulation processes is the surface of the biological membrane of both natural cells, for example yeast cells, and model lipid membranes made of a mixture of phospholipids with different content of components. The creation of lipid models based on the protein and lipid composition of natural membranes makes it possible to predict the reaction of cell membranes to the action of LLLR in the model, and to understand the molecular mechanisms of laser photomodulation processes.

KEY WORDS: low-level laser radiation; cells of *S. cerevisiae*; liposomes; membrane potential; protein-lipid interactions; cytochrome c; cardiolipin; phosphatidylcholine.

АНАЛІЗ КІНЕТИКИ ВИВІЛЬНЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ З БІОРОЗКЛАДНИХ МОДИФІКОВАНИХ НАНОЧАСТИНКАМИ МАТЕРІАЛІВ НА ОСНОВІ ХІТОЗАНУ

М. О. Кумеда*^{ORCID}, Л. Б. Суходуб^{ORCID}, Л. Ф. Суходуб^{ORCID}

Навчально-виробнича лабораторія Біонанокомпозит, Сумський державний університет, вул. Харківська,
126, Суми, 40006, Україна

e-mail: mariyakumeda@gmail.com

Надійшла до редакції 12 червня 2024 р. Переглянута 30 жовтня 2024 р.

Прийнята до друку 12 листопада 2024 р.

Актуальність. Проблема доставлення лікарських засобів у зону уражень тканин людського організму залишається наразі актуальною. Гідроксиапатит (НА), як одна з найбільш відомих кальцій фосфатних (СаР) сполук, використовується як неорганічна складова композитних матеріалів для завантаження ліків. Органічною частиною у композитних матеріалах виступають біополімери, такі як альгінат, агароза, хітозан (CS), колаген і желатин. Наночастинки C₆₀ широко застосовуються як антибактеріальні агенти й здатні зміцнювати структуру композитів. Мікрохвильове опромінення (MW) є методом впливу, який скорочує час синтезу, значно збільшуючи кількість центрів зародкоутворення та зменшуючи розмір утворених кристалітів, що впливає на адсорбційну здатність продукту.

Мета роботи. Більшість сучасних форм доставлення лікарських засобів демонструють швидке вивільнення Цефтріаксону (ЦФТ) та Анестезину (АНА) упродовж 2 днів, яке характеризується «вибуховим вивільненням», що може викликати передозування у перші години використання. Метою даної роботи було дослідити та порівняти кінетику вивільнення лікарських засобів з класично (конвекційно) та MW-синтезованих CS матриць модифікованих НА, мультифазними СаР та наночастинками фулерену C₆₀ для відновлення пошкоджень кісткової тканини впродовж тривалого часу.

Матеріали і методи. Дослідження проводили методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) з використанням приладу Agilent 1200 з DAD-детектором ($\lambda = 210\text{--}270$ нм) і хроматографічної колонки C18 (Zorbax SB-C18 4,6×150 мм, 5 мкм) за температури навколишнього середовища.

Результати. НА є хорошим адсорбентом, але важкорозчинною речовиною, тому фармакокінетика вивільнення АНА в основному визначалася ступенем адсорбції препарату поверхнею матеріалу і його дифузійним потенціалом. CS і C₆₀ у складі композитів забезпечують пролонговане вивільнення АНА до 18 днів. Вивільнення ЦФТ з СаР/CS матриць залежить від методу його внесення до композиту: під час синтезу або насиченням після синтезу. Метод насичення характеризується ділянкою швидкого вивільнення впродовж 24–48 годин, а внесення під час

Як цитувати: Кумеда МО, Суходуб ЛБ, Суходуб ЛФ. Аналіз кінетики вивільнення лікарських засобів з біорозкладних модифікованих наночастинками матеріалів на основі хітозану. Біофізичний вісник. 2024;52:21–32. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-52-02>

In cites: Kumeda M, Sukhodub L, Sukhodub L. Analysis of drug release models from biodegradable nanomodified chitosan based materials. Biophysical Bulletin. 2024;52:21–32. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-52-02> (in Ukrainian)

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

синтезу відтерміновує активне вивільнення до 48–72 годин (початку деградації матриці). Індекс вивільнення приймає значення від $n = 0,56$ до $n = 0,92$, що відповідає кінетиці вивільнення, яка не підпорядковується закону Фіка, тобто наближується до моделі першого порядку.

Висновки. Синтезовані композити на основі CS матриці, модифікованої наноструктурованими частинками CaP та фулерену C_{60} , є потенційними носіями ЦФТ та АНА з функцією їх довготривалого вивільнення у зони уражень кісткової тканини.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: хітозан; гідроксиапатит; фулерен C_{60} ; вивільнення лікарських засобів; наночастинки.

Упродовж останніх кількох років дослідження можливості використання CaP для доставлення ліків активізувалися. Матеріали на основі CaP використовуються в якості носіїв для доставлення у таргетні зони антибіотиків, протизапальних та протиракових препаратів, білків, вітамінів і гормонів [1]. До факторів, які впливають на вивільнення ліків із композитних матриць, відносяться склад і властивості матеріалу-носія, його пористість і питома поверхня, а також тип і концентрація лікарського препарату, його взаємодія з матрицею та механізм завантаження до композиту [2].

Фізико-хімічні властивості композиту, присутність домішок у формі неорганічних наночастинок або біоактивних речовин, фізіологічні умови оточуючого середовища (величина pH, температура) є основними факторами, які визначають кінетичний профіль вивільнення препарату [2].

Додавання до складу карбонових наночастинок суттєво покращує механічні властивості та стабільність матриць, що надалі може впливати на механіку вивільнення лікарських засобів зі складу композитних біоматеріалів [3, 4]. Фулерен C_{60} , як один з найбільш застосовуваних представників карбонових наночастинок, відомий своєю стабільністю та унікальними фізико-хімічними властивостями, часто застосовується як антибактеріальний агент в медичних матеріалах [5–7].

Гідроксиапатит (НА) один з найбільш відомих CaP, використовується як неорганічна складова композитних матеріалів, в тому числі як адсорбент та носій ліків для подальшого контрольованого їх вивільнення. Органічною частиною у таких матеріалах виступають біополімери, такі як альгінат, агароза, хітозан, колаген і желатин. Завдяки своїм унікальним властивостям біополімери відіграють важливу роль у тканинній інженерії [8]. Полімери можуть бути модифікованими різними способами та іммобілізованими в мікроструктури для досягнення бажаних характеристик. Одним із поширених в біомедицині полімерів є CS, лінійний полісахарид, який може інкапсулювати та пролонговано вивільняти лікарські засоби [9].

Дослідження *in vitro* показали, що біокомпозити з вмістом НА та біополімерів, добре підходять для тривалого контрольованого вивільнення ліків і працюють краще, ніж чистий пресований порошок НА [10]. Особлива увага приділяється розробці кісткових трансплантатів на основі CaP, які розумно поєднують взаємні терапевтичні функції тривалого вивільнення ліків і регенерацію великих дефектів кісткової тканини [11].

MW є багатообіцяльним методом впливу на матеріали, що наразі широко використовується у різних сферах досліджень. Синтез CaP відбувається при чітко визначених умовах, і збереження певної температури є фактором, що суттєво впливає на морфологію, розмір та фазу кальцій фосфату. Так, для синтезу НА потрібно досягти у реакційній суміші температури 80 °C. Метод конвекційного нагрівання нерівномірно передає тепло суміші, що впливає як на час синтезу, так і на параметри кристалітів. Використання MW дозволяє рівномірно нагріти суміш впродовж 5 хвилин, при цьому кількість центрів зародкоутворення значно збільшується, а розмір синтезованих кристалітів є меншим. В результаті збільшується енергетично активна питома поверхня

наночастинок CaP, що зі свого боку впливає на ступінь адсорбції та наступного вивільнення лікарських засобів.

Проблема доставлення лікарських засобів в зону уражень тканин людського організму є актуальною вже великий проміжок часу. Важливими параметрами, на які варто звертати увагу при розробці таких систем, є тип лікарського засобу, період напіврозпаду в організмі, швидкість та тривалість впливу на тканини, його функціональна кількість. ЦФТ — цефалоспорин третього покоління, з високим рівнем антибактеріальної активності проти Грам-позитивних і Грам-негативних бактерій [12]. Однак постійне використання може призводити до зниження його ефективності. Також він може викликати стійкі побічні ефекти, такі як діарея, еозинофілія, тромбоцитоз та інше [13]. Тому, його застосування є обмеженим і потребує розробки систем контрольованого доставлення ЦФТ в цільову ділянку організму. У роботі [14] показано, що ЦФТ завантажений у полімер-ліпідні наночастинок та його вивільнення відбувалося активно протягом перших годин і досягало 80% вже через 2 доби. Вивільнення ЦФТ з системи волокон камеді акації-трагакантової камеді-поліакриламід відповідає моделі першого порядку (відповідно моделі Корсмейєра-Пепаса — дифузія, що не відповідає закону Фіка) [15].

Ще одним часто вживаним знеболювальним лікарським засобом є АНА — лікарський засіб ефірного типу, отриманий з п-амінобензойної кислоти, який також має застереження щодо застосування. Так, відомі випадки метгемоглобінемії після застосування високих доз АНА дітям, а також можливі алергічні реакції. Аналіз вивільнення препарату *in vitro* з гідрогелів на основі CS та полі(вінілпіролідону) (3-меркаптопропіл)-триметоксисилану (MPTMS) у фосфатному буферному фізіологічному розчині (pH 7,4) і симульованій кишковій рідині (pH 6,8) показав >90% вивільнення протягом 2 годин [16].

Згідно з літературними даними, більшість розроблених форм доставлення ЦФТ та АНА демонструють швидке вивільнення впродовж декількох діб, що не задовольняє довготривалий процес лікування ортопедичних травм.

Метою даної роботи було дослідити та порівняти кінетику вивільнення лікарських засобів, внесених різними методами до структури класично та MW-синтезованих композитів на основі CS матриць, модифікованих наночастинами НА та фулерену C₆₀.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріали: CS (М.В. 100–300 кДа, ступінь деацетилювання 85%, Acros organics, США); кальцій нітрат тетрагідрат, діамоній дигідрофосфат, амоній гідроксид (виробництво Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd.), кальцій хлорид, 85% ортофосфорна кислота, гідроксид натрію (чда, Merck); кальцій ацетат, натрій дигідроортофосфат, оцтова кислота, натрій триполіфосфат (виробництво Китай); C₆₀ (водний колоїдний розчин із середнім розміром частинок 50 нм), приготований згідно [17] та наданий Технічним університетом Ільменау, Інститутом хімії та біотехнології (Німеччина) в рамках співробітництва; комерційно доступні АНА (М.м 165,189 г/моль) та ЦФТ (М.м 554,58 г/моль).

Синтез

НА/CS гідрогель готували за технологією, описаною в [18]. Коротко, до 100 мл 0,1 М CaCl₂ (pH = 12) додавали 100 мл 0,06 М H₃PO₄ з вмістом 0,4 г CS. Отриману суспензію піддавали конвекційному нагріванню (60 °C, 1 година). Після охолодження осад відокремлювали центрифугуванням та промивали деіонізованою водою. Вологість осаду становила 85%. Зразки були названі гідрогелем НА/CS і використані для

подальшого приготування C_{60} -вмісних композитів. Три інші зразки були підготовані за цією ж технологією, але замість класичного конвекційного нагрівання було застосовано мікрохвильове опромінення (MW) різної потужності (300, 600 і 800 W) протягом 5 хв, а зразки були названі відповідно HA/CS300W, HA/CS600W, HA/CS800W. Навантаження зразків лікарським препаратом проводили шляхом їх насичення водним розчином АНА (11,8 мг/мл).

C_{60} HA/CS/АНА гранули. Колоїдний водний розчин C_{60} (2,6 мг/мл) додавали до 3%-го розчину CS (М.В.300 кДа) в 1% оцтовій кислоті, в кількості, яка відповідала 0,0006 та 0,0012 % вмісту C_{60} в готовому композиті. Суміш перемішували під дією ультразвуку. Отримані C_{60} CS суспензії додавали до гідрогелю HA/CS у ваговому співвідношенні 1:1, суміші обробляли ультразвуком упродовж 5 хв, після чого диспергували в 1% розчин триполіфосфату натрію (TPP) та витримували протягом 24 год. Після відокремлення від рідкої фракції фільтруванням, гранули ретельно промивали деіонізованою водою і висушували при температурі 60 °C. Надалі зразки отримали назви 0.0006 C_{60} HA/CS60°C та 0.0012 C_{60} HA/CS60°C. Для визначення впливу фулерену C_{60} на кінетику вивільнення лікарського засобу був отриманий зразок гранул HA/CS (без фулерену). Цей зразок використовувався як контрольний. Навантаження зразків лікарським препаратом проводили шляхом їх насичення водним розчином АНА (11,8 мг/мл).

CaP/CS/ЦФТ композити. Для отримання суспензії готували 6% CS в 1% оцтовій кислоті, 0,5 М розчин ацетату кальцію, 0,3 М розчин дигідроортофосфату натрію та 1% розчин TPP. 6% CS в 1% оцтовій кислоті додавали до 0,5 М ацетату кальцію (рН 6,86), при цьому співвідношення Ca/CS складало 0,45. Суміші струшували у шейкері протягом 3 год (37 °C, 110 об./хв), після чого покvapельно диспергували у розчині 0,3 М натрію дигідроортофосфату (рН 8,0), кількість якого була достатньою для утворення та вільного розташування гранул аморфного кальцію фосфату. Через 2 години частина зразків була піддана впливу MW (600W) протягом 75 с (імпульсним впливом — 5 разів по 15 секунд, для запобігання перегрівання реакційної суміші), при цьому кінцева температури суміші досягла 60 °C. Зразки були названі CaP/CS600W. Конвекційне нагрівання при 60 °C було застосовано до іншої частини зразків, які були названі CaP/CS. Після охолодження розчин NaH_2PO_4 замінювали на 1% TPP та витримували 12 годин, що забезпечувало композитам стабільну форму гранул [19].

Навантаження зразків лікарським засобом ЦФТ проводили 2 методами, а саме: додаванням до материнської суміші під час синтезу, або шляхом насичення у водному розчині ЦФТ готових гранул. Концентрація ЦФТ в обох випадках становила 12,5 мг/мл.

Методи

HPLC determination. Дослідження вивільнення лікарських засобів проводили методом вискоєфективної рідинної хроматографії (HPLC) з використанням Agilent 1200 з DAD-детектором ($\lambda = 210\text{--}270$ нм) і хроматографічної колонки C18 (Zorbax SB-C18 4,6×150 мм, 5 мкм) за температури навколишнього середовища. Експериментальні зразки, насичені лікарськими засобами, поміщали в 6 мл PBS (фосфатний буферний розчин) при рН 7,2 та інкубували за температури 37 °C при безперервному струшуванні 80 об./хв [18]. PBS — це водний сольовий розчин, що містить дигідрофосфат натрію (10 ммоль/л), хлорид натрію (137 ммоль/л), хлорид калію (2,7 ммоль/л) і дигідрофосфат калію (1,8 ммоль/л) [20].

Вивільнення препаратів контролювали погодинно протягом першої доби, а потім щоденно. Для цього з кожної пробірки відбирали аліквоти 600 мкл PBS, а потім

додавали рівний об'єм свіжого середовища для підтримки постійного початкового об'єму в пробірках [3].

Визначення вивільнення АНА: елюент метанол та 10% крижана оцтова кислота при співвідношенні 10:90, відповідно; швидкість потоку 2 мл/хв.; ізостатичний режим; температура аналітичної колонки 40 °С; об'єм ін'єкції 20 мкл; детектування відбувалося при довжині хвилі 210 нм. Час дослідження проби — 5 хвилин [18].

Визначення вивільнення ЦФТ: елюент 0,05 М ортофосфорна кислота (рН 2,0) та ацетонітрил у співвідношенні 35:65, відповідно; при швидкості потоку 2,0 мл/хв. Використовували ізостатичну обробку, температура аналітичної колонки 40 °С. Об'єм ін'єкції становив 20 мкл, а виявлення відбувалося при довжині хвилі 254 нм. Час дослідження проби — 3 хвилини.

Усі експерименти проводили в трьох повторах, і вивільнення лікарського засобу з композитів визначали за калібрувальними кривими. Механізм дифузії ліків із інкапсульованих полімерів визначали за допомогою рівняння Корсмейєра-Пеппаса [21]:

$$M_t/M_\infty = kt^n,$$

де k і n є постійними і відповідно називаються характеристикою композиту та показником дифузії. M_t — кількість препарату, що вивільняється за час t , а M_∞ — кількість препарату в стані рівноваги.

Кумулятивне вивільнення АНА визначали з урахуванням концентрації розчину та кількості відібраної речовини, яка містилась у аліквоті 600 мкл при кожному відборі.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В даній роботі було проведено порівняльне дослідження кінетики вивільнення гідрофобного АНА та гідрофільного ЦФТ з матриць на основі природного полімеру CS з вмістом НА. Полімер-апатитні матриці, як потенційні носії лікарських засобів, були синтезовані за різних технологічних умов (конвекційне або MW нагрівання різної потужності), з вмістом фулерену C_{60} , а лікарські засоби були внесені або при синтезі, або шляхом насичення готового продукту.

Часто базові лікарські засоби демонструють профіль вивільнення першого порядку, який називають «вибуховим» вивільненням, тобто вивільнення великої частки препарату на ранній стадії, після чого слідує зниження фізіологічної концентрації препарату [22]. При цьому фармакокінетика виявляє численні екстремальні низькі та високі показники концентрації лікарських засобів, які характеризують нерівномірне вивільнення ліків. Дані процеси можуть призводити до передозування, а отже, мають бути обмежені. Для забезпечення безпечного вивільнення лікарських засобів швидкість надходження препарату до організму має бути постійною протягом певного періоду часу. Такий фармакологічний процес може бути представлений у вигляді кінетичного профілю нульового порядку — лінійної залежності кількості вивільненої речовини від часу [23].

Відомо, що тип лікарського засобу, а також його взаємодія з CS та іншими компонентами матриці, компонентний склад матриці, її пористість та здатність до набрякання відіграють важливу роль у контролі вивільнення ліків.

Так, на Рис. 1 зображені HPLC графіки вивільнення АНА зі складу НА/CS експериментальних зразків, навантажених АНА шляхом насичення при 37 °С протягом 24 годин. Ці зразки представлені в якості систем для пролонгованого вивільнення лікарського засобу. Очевидно, що хімічні реакції під час синтезу та формування гранул зменшили кількість вільних функціональних груп у CS, здатних взаємодіяти з полярними молекулами води та розчинами ліків. Імобілізація препарату на поверхні

композитного матеріалу могла відбуватися під впливом електростатичних сил. Тому поверхня зразка була областю з найвищою концентрацією АНА. Це сприяло вивільненню препарату в перший день.

На Рис. 1 можна виокремити дві основні стадії вивільнення препарату з експериментальних зразків: 1) упродовж першого дня та 2) після першого дня і до кінця вивільнення. Перша фаза характеризується відносно високою швидкістю вивільнення адсорбованого на поверхні АНА. В подальшому вивільнення препарату з усіх експериментальних зразків відбувається практично рівномірно впродовж усього періоду дослідження [18]. Слід зазначити, що матриці на основі CS та HA є важкорозчинними і гранули під час дослідження зберігали механічну стабільність. Фармакокінетика вивільнення з таких зразків в основному визначалася ступенем адсорбції препарату матеріалом і його дифузійним потенціалом.

Особливу увагу було приділено зразкам, синтезованим під дією MW опромінення (Рис. 1 В). Зразок HA/CS300W синтезований під дією найменшої потужності MW демонструє найменш тривале вивільнення, в той час, як час вивільнення лікарського засобу зі зразка HA/CS800W є більшим майже у два рази. Найнижча швидкість вивільнення АНА спостерігається для HA/CS800W, а найвища для контрольного HA/CS. У перші дві години найменша кількість (близько 32%) АНА вивільняється зі зразка HA/CS800W, що є позитивним моментом. В інших зразках вивільнення препарату в перші кілька годин становить близько 45%. На додаток, HA/CS800W показує найтриваліший час вивільнення (912 годин) порівняно з іншими експериментальними зразками (384–336 годин). Цей факт є результатом гідрофобних взаємодій між АНА та компонентами матеріалу, причому вплив MW опромінення сприяє специфічному розташуванню сайтів зв'язування та доступу молекул АНА до цих сайтів [18]. Таким чином, композити можуть бути застосовані для лікування великих дефектів кісткової тканини, що потребують значного часу для відновлення нативної кістки.

Внесення наночастинок фулерену C_{60} до композитної матриці пролонгує час вивільнення та підвищує загальну кількість вивільненого препарату пропорційно його вмісту (порівняно з контрольним HA/CS). Ми припускаємо, що затримка вивільнення препарату зі зразків з вмістом C_{60} є результатом гідрофобних взаємодій між C_{60} і АНА. Таким чином, час вивільнення препарату можна регулювати, змінюючи вміст C_{60} .

Кінетичні розрахунки кінетики вивільнення АНА проводили для етапу рівномірного вивільнення препарату, який відбувається після першої доби, оскільки на першому етапі АНА активно вивільнявся з поверхневого шару. У результаті індекс вивільнення n приймав значення від $n = 0,75$ до $n = 0,82$ (Таблиця 1), демонструючи кінетику дифузії, що не підпорядковується закону Фіка [21].

Аналізуючи отримані дані (Таблиця 1), та виходячи зі значення параметру r , можна зробити висновок про достатньо рівномірний профіль вивільнення АНА. Це також підтверджується параметром n , який близький до 0,8, що для зразків круглої форми свідчить про дифузію, як таку, що не підпорядковується закону Фіка (дифузія PFO). Даний тип вивільнення АНА наближається до моделі нульового порядку, що є золотим стандартом вивільнення лікарських засобів. Якщо порівнювати кінетику вивільнення АНА зі зразків з вмістом фулерену C_{60} з результатами, отриманими для зразків без домішок, то для останніх спостерігається підвищення значення параметру n , що свідчить про більш складний характер дифузії. Вивільнення препарату зі зразків з вмістом фулерену C_{60} контролюється виключно силами дифузії, в той час як з контрольного зразку вивільнення препарату визначається як дифузією препарату, так і деградацією гранул (незначний вплив).

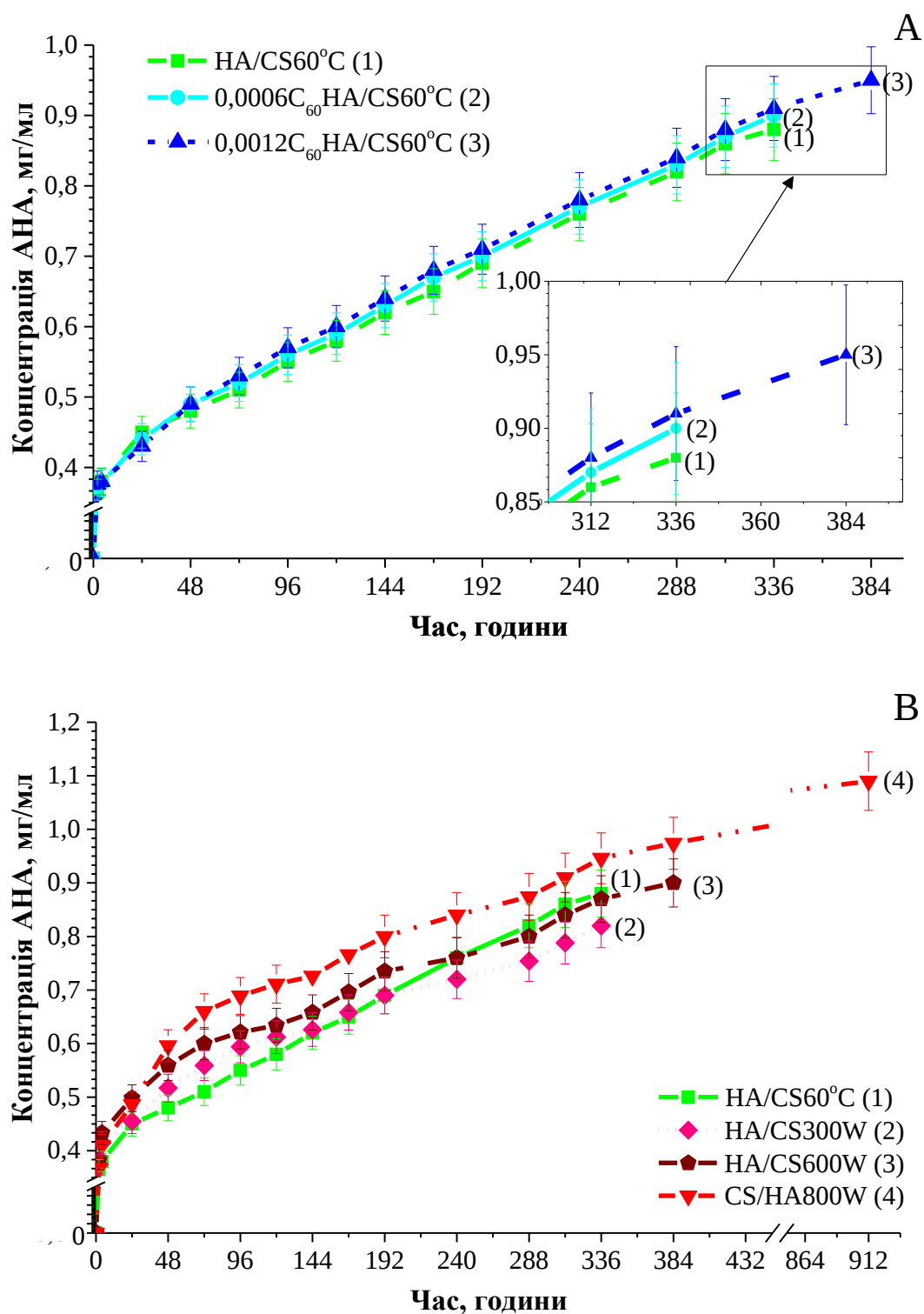


Рис. 1. HPLC графіки вивільнення АНА зі складу HA/CS зразків: А) контрольний зразок без фулерену (HA/CS) та зразки з додаванням фулерену C₆₀: (зразки 0,0012C₆₀HA/CS та 0,0006C₆₀HA/CS), синтезовані конвекційним методом (позначка 60°C); В) синтезовані мікрохвильовим методом (потужність 300, 600 та 800W). *p<0.05

Fig. 1. HPLC graphs of ANA release from the HA/CS samples: A) control sample without fullerene (HA/CS) and with the addition of fullerene C₆₀: (samples 0.0012C₆₀HA/CS and 0.0006C₆₀HA/CS), synthesized by the convection method (60°C); B) samples synthesized by the microwave method (power 300, 600 and 800W). *p<0.05

Для порівняння, у роботі [16] вивільнення АНА з CS-PVP (полівінілпіролідон) матриць, зшитих МРТМС ((3-меркаптопропіл)триметроксисілан), відбувалося впродовж всього 100 хвилин, та теж підпорядковувалося моделі Корсмейера-Пеппаса (Таблиця 1, зразок СР-II).

На Рис. 2 наведено графіки вивільнення ЦФТ зі складу CaP/CS композитів. Як було вище сказано, було застосовано дві методики навантаження зразків ЦФТ, а саме 1) під час синтезу, шляхом додавання порошку ЦФТ до суміші компонентів та 2) після остаточного висихання сформованих гранул шляхом насичення у розчині ЦФТ. Як бачимо, графіки демонструють два кардинально різні профілі вивільнення.

Таблиця 1. Параметри розрахунку модулі Корсмейера-Пеппаса для розроблених гібридних композитів

Table 1. Korsmeyer-Peppas modulus calculation parameters for developed hybrid composites

Зразок	Параметри кінетичної моделі		
	k	n	r^*
1	2	3	4
АНА			
HA/CS	0,080	0,680	0,996
HA/CS300W	0,087	0,655	0,996
HA/CS600W	0,111	0,591	0,998
HA/CS800W	0,115	0,636	0,998
0,0006C ₆₀ HA/CS	0,067	0,757	0,999
0,0012C ₆₀ HA/CS	0,059	0,818	0,999
CP-II [16]	-	0,932	0,993
ЦФТ			
CaP/CS_ Saturation**	10,345	1,042	0,997
CaP/CS600W_ Saturation	10,038	0,928	0,979
CaP/CS_ Synthesis**	33,212	0,540	0,887
CaP/CS600W_ Synthesis	21,557	0,700	0,875
GA-TG-cl-poly(AAm) [15]	1,387	0,65	0,997

* r — коефіцієнт кореляції ($-1 \leq r \leq 1$).

** — навантаження лікарським засобом при синтезі або шляхом насичення

Так, ЦФТ, введений шляхом насичення, вивільняється активно протягом перших годин ($> 30\%$), що є «вибуховим» вивільненням. На противагу цьому, протягом перших двох діб вивільняється близько 10% від загальної кількості ЦФТ, введеного до складу композиту під час синтезу. Зразки, синтезовані під дією MW опромінення, є більш пористими, ніж синтезовані конвекційним методом. Тому під час насичення більш розвинена поверхня здатна адсорбувати та надалі вивільняти більшу кількість лікарського засобу. Логічним є швидше вивільнення зі зразків CaP/CS600W. У разі додавання ЦФТ під час синтезу спостерігається протилежна динаміка вивільнення ЦФТ. Очевидно, це пов'язано з утворенням більш міцних зв'язків між молекулами композиту та ЦФТ, спричинене саме дією MW. Таким чином, вивільнення ЦФТ з CaP/CS600W є більш повільним.

На ділянці 48–72 години відбувається стрімкий ріст вивільненого ЦФТ внаслідок руйнування матриці. Ефекти руйнування поверхневих шарів матриці в розчині PBS присутні в обох випадках, але мають різний вплив на динаміку вивільнення за рахунок різного розподілу молекул лікарського засобу всередині та на поверхні композиту. Процеси адсорбції ЦФТ композитом під час насичення сприяють формуванню високої

концентрації лікарського засобу на поверхні гранул, і нижчої — в об'ємі. Таким чином, процес руйнування матриці ЦФТ насичених композитів демонструє відсутність стрибкоподібних ділянок після початку деградації.

Коефіцієнт кореляції r має вищі значення для методу насичення, але при цьому значення параметрів кінетичної моделі є значно вищими й відповідають дифузії, що не підпорядковується закону Фіка.

Для порівняння у роботі [15] показано, що кількісне вивільнення антибіотика ЦФТ з інкапсульованого гідрогелю GA-TG-cl-poly(AAm), яке відбувалось у буферному розчині при pH 7,4, було більшим, ніж при pH 2,2. Дифузія препарату не відповідала закону Фіка, що витікало зі значень показника дифузії 0,53 у буфері з pH 2,2 та 0,65 у буфері з pH 7,4. Час вивільнення складав 1440 хвилин (1 доба).

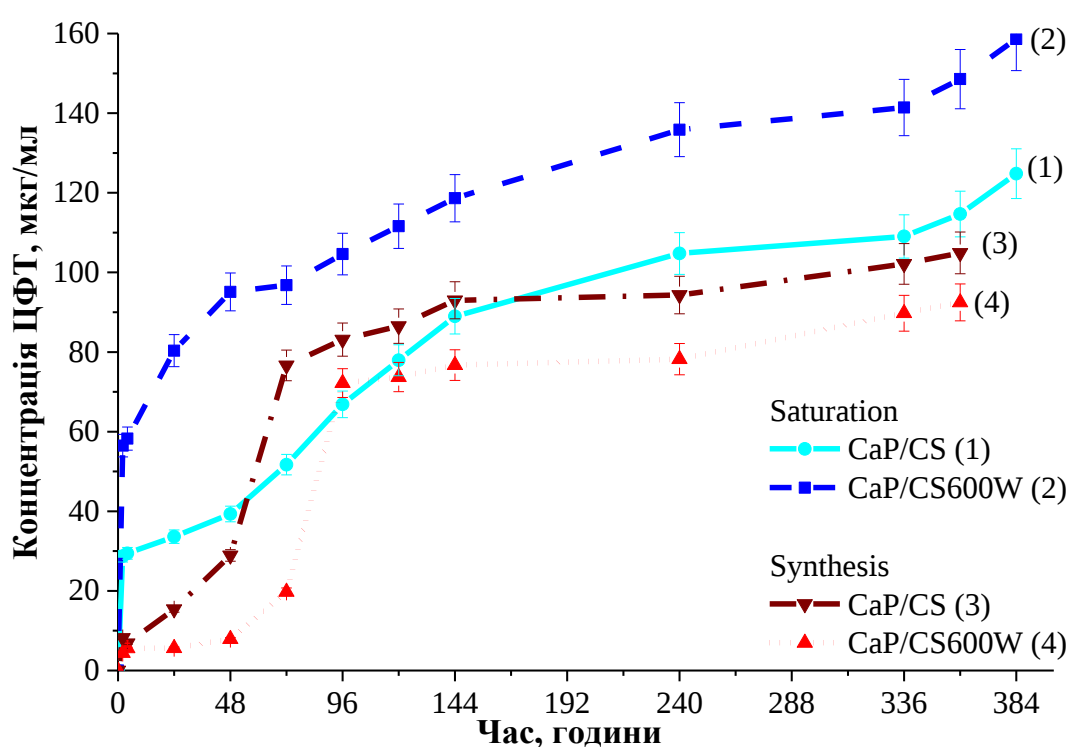


Рис. 2. HPLC графіки вивільнення ЦФТ зі складу CaP/CS зразків, синтезованих конвекційним та мікрохвильовим методом. * $p < 0.05$

Fig. 2. HPLC graphs of CFT release from CaP/CS samples synthesized by convection and microwave methods. * $p < 0.05$

Таким чином, отримані CaP/CS композити виконують функцію носія лікарського засобу з пролонгованим його вивільненням, але проблема вдосконалення кінетики вивільнення все ще залишається. Очевидно, що цього можна досягти шляхом модифікації структури, наприклад, внесенням певної концентрації домішок наночастинок, а також підвищенням пористості композитів.

ВИСНОВКИ

У роботі досліджено вплив факторів, що здатні впливати на кінетику вивільнення лікарських засобів, а саме: метод синтезу композитів (класичний чи MW), методика

внесення лікарського засобу (насичення чи під час синтезу), наявність та кількісний вміст неорганічних наночастинок.

На відміну від методу внесення лікарських засобів під час синтезу (вивільнення відбувається поступово), метод насичення композитів лікарськими препаратами демонструє нерівномірне вивільнення з ділянкою швидкого зростання на початку дослідження, що відповідає поверхнево-адсорбованому ЦФТ.

Дослідження HPLC довело прямо пропорційну залежність між вмістом C_{60} та тривалістю вивільнення АНА: зміна вмісту C_{60} дозволяє регулювати час вивільнення препарату. Синергічна дія CS і C_{60} забезпечує профіль вивільнення АНА, який відповідає розрахованому коефіцієнту кореляції ($r = 0,99$), та параметрам моделі Корсмейєра-Пеппаса ($n = 0,75\text{--}0,82$), що близькі до профілю кінетичного вивільнення нульового порядку.

Внесення ЦФТ на етапі синтезу гібридних СаР-вмісних матеріалів суттєво покращує кінетику вивільнення препарату впродовж перших 5 діб. Після 72 годин кількість вивільненого лікарського засобу суттєво збільшується, що означає початок деградації поверхневих шарів матриці-носія лікарського засобу. Найкращі параметри моделі Корсмейєра-Пеппаса ($n = 0,93\text{--}1$) були отримані для композитів синтезованих під дією MW випромінювання, з ЦФТ внесеним шляхом насичення.

Таким чином, параметри кінетичної моделі та динаміка вивільнення лікарських засобів з композитів на основі хітозанової матриці суттєво залежать від наступних чинників: співвідношення полімеру та вмісту наночастинок (кальцій фосфатів/фулерену), структури композиту та методу внесення лікарського засобу.

ПОДЯКА

Дослідження виконано за фінансової підтримки Міністерства освіти і науки України [грант № 0122U000775, 2022-2024].

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Authors' ORCID ID

Mariia Kumeda  <https://orcid.org/0000-0002-8480-9223>

Liudmyla Sukhodub  <https://orcid.org/0000-0002-9350-5766>

Leonid Sukhodub  <https://orcid.org/0000-0002-1559-0475>

REFERENCES

1. Liu Z-L, Jia Q-Y, Li X-D, Li S-P, Shen J, Lin J, et al. Synthesis of hollow mesoporous HAp-Au/MTX and its application in drug delivery. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2020;586:124231. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.124231>
2. Fosca M, Rau J V., Uskoković V. Factors influencing the drug release from calcium phosphate cements. *Bioact Mater.* 2022;7:341–63. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.05.032>
3. Sukhodub LB, Kumeda MA, Sukhodub LF, Prylutskyi YI. Fullerene C_{60} -containing hydroxyapatite/polymer polyelectrolyte composite for dental applications. In: Pogrebnjak, A., Pogorielov, M., Viter, R. (eds) *Nanomaterials in Biomedical Application and Biosensors (NAP-2019)*. Springer Proceedings in Physics. Vol. 244. Springer, Singapore; 2020. p. 129–37. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3996-1_13
4. Lahiri D, Ghosh S, Agarwal A. Carbon nanotube reinforced hydroxyapatite composite for orthopedic application: A review. *Materials Science and Engineering: C.* 2012;32:1727–58. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.05.010>
5. Fortner JD, Lyon DY, Sayes CM, Boyd AM, Falkner JC, Hotze EM, et al. C_{60} in water: Nanocrystal formation and microbial response. *Environ Sci Technol.* 2005;39:307–16. <https://doi.org/10.1021/es048099n>
6. Grebinyk A, Grebinyk S, Prylutska S, Ritter U, Matyshevska O, Dandekar T, et al. C_{60} fullerene accumulation in human leukemic cells and perspectives of LED-mediated photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med.* 2018;124:319–27. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.022>

7. Lyon DY, Adams LK, Falkner JC, Alvarez PJJ. Antibacterial Activity of Fullerene Water Suspensions: Effects of Preparation Method and Particle Size. *Environ Sci Technol.* 2006;40:4360–6. <https://doi.org/10.1021/es0603655>
8. Zarrintaj P, Seidi F, Youssefi Azarfam M, Khodadadi Yazdi M, Erfani A, Barani M, et al. Biopolymer-based composites for tissue engineering applications: A basis for future opportunities. *Compos B Eng.* 2023;258:110701. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2023.110701>
9. Krishnaswami V, Rajan E, Dutta G, Muruganantham S, Sugumaran A, SA JR. Chitosan mediated smart photodynamic therapy based novel drug delivery systems- a futuristic view. *Carbohydr Polym Technol Appl.* 2024;7:100510. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2024.100510>
10. Hwang S-J, Lee J-S, Ryu T-K, Kang R-H, Jeong K-Y, Jun D-R, et al. Alendronate-modified hydroxyapatite nanoparticles for bone-specific dual delivery of drug and bone mineral. *Macromol Res.* 2016;24:623–8. <https://doi.org/10.1007/s13233-016-4094-5>
11. Soares F, Ribeiro N, Baião A, Torres PMC, Sarmento B, Olhero SM. Sustained drug release from sintering-free calcium phosphate-based scaffolds. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2023;88:04906. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104906>
12. Duceac LD, Luca AC, Mitrea G, Banu EA, Ciuhodaru MI, Ciomaga I, et al. Ceftriaxone intercalated nanostructures used to improve medical treatment. *Materiale Plastice.* 2018;55(4):613–5. <https://doi.org/10.37358/mp.18.4.5086>
13. Shrimali JD, Patel H V., Gumber MR, Kute VB, Shah PR, Vanikar A V., et al. Ceftriaxone induced immune hemolytic anemia with disseminated intravascular coagulation. *Indian Journal of Critical Care Medicine* 2013;17. <https://doi.org/10.4103/0972-5229.123465>
14. Hossein abadi AR, Farhadian N, Karimi M, Porozan S. Ceftriaxone sodium loaded onto polymer-lipid hybrid nanoparticles enhances antibacterial effect on gram-negative and gram-positive bacteria: Effects of lipid - polymer ratio on particles size, characteristics, in vitro drug release and antibacterial drug efficacy. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2021;63:102457. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102457>
15. Singh B, Dhiman A, Kumar S. Polysaccharide gum based network hydrogels for controlled drug delivery of ceftriaxone: Synthesis, characterization and biomedical evaluations. *Results Chem.* 2023;5:100695. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100695>
16. Raza MA, Gull N, Lee SW, Seralathan KK, Park SH. Development of stimuli-responsive chitosan based hydrogels with anticancer efficacy, enhanced antibacterial characteristics, and applications for controlled release of benzocaine. *J Ind Eng Chem.* 2022;109:210–20. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2022.02.004>
17. Ritter U, Prylutsky YI, 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;23:530–34. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2013.870900>
18. Sukhodub LB, Sukhodub LF, Kumeda MO, Prylutska SV, Deineka V, Prylutsky YI, et al. C₆₀ fullerene loaded hydroxyapatite-chitosan beads as a promising system for prolonged drug release. *Carbohydr Polym.* 2019;223:115067. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115067>
19. Sukhodub L, Kumeda M, Sukhodub L, Strelchuk V, Nasieka I, Vovchenko L, et al. Hybrid composite based on chitosan matrix mineralized by polyphasic calcium orthophosphates with enhanced bioactivity and protein adsorption capacity. *Mater Today Commun.* 2022;31:103696. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103696>
20. Sukhodub LB, Sukhodub LF, Kumeda MO, Prylutsky YI, Pogorielov M V., Evstigneev MP, et al. Single-walled carbon nanotubes loaded hydroxyapatite–alginate beads with enhanced mechanical properties and sustained drug release ability. *Prog Biomater.* 2020;9:1–14. <https://doi.org/10.1007/s40204-020-00127-2>
21. Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int J Pharm.* 1983;15:25–35. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9)
22. Huang X, Brazel CS. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *J Controlled Release.* 2001;73:121–36. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00248-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00248-6)
23. Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm.* 2010;67(3):217–23.

KINETIC ANALYSIS OF DRUG RELEASE FROM BIODEGRADABLE NANOPARTICLE-MODIFIED MATERIALS BASED ON CHITOSAN

M. O. Kumeda* , L. B. Sukhodub , L. F. Sukhodub *Laboratory Bionanocomposite, Sumy State University, 126 Kharkivska St., Sumy, 40006, Ukraine***Corresponding author: mariyakumeda@gmail.com**Submitted June 12, 2024; Revised October 30, 2024;**Accepted November 12, 2024*

Background: The problem of drug delivery to the tissue-damaged area of the human body remains relevant. Hydroxyapatite (HA), as one of the best known calcium phosphate (CaP) compounds, is used as an inorganic component of composite materials for drug loading. The organic components in composite materials are biopolymers such as alginate, agarose, chitosan (CS), collagen, and gelatin. Selected C₆₀ nanoparticles are widely used as antibacterial agents and can strengthen the structure of composites. Microwave (MW) irradiation is an exposure method that shortens the synthesis time by significantly increasing the number of nucleation centers, which results in the reducing the size of the crystallites formed, which affects the adsorption capacity of the product.

Objectives: Most forms of drug delivery systems demonstrate rapid release of ceftriaxone (CFT) and anesthesin (ANA) within 2 days, characterized by a "burst release" that may cause overdose in the first hours of use. The aim of this work was to investigate and compare the drug release kinetics from convectionally and MW-synthesized CS matrices modified with HA, multiphasic CaP, and fullerene C₆₀ nanoparticles for long-term bone tissue regeneration.

Materials and methods: The study was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using an Agilent 1200 device with a DAD detector ($\lambda = 210\text{--}270$ nm) and a C18 chromatographic column (Zorbax SB-C18 4.6×150 mm, 5 μm) at ambient temperature.

Results: HA is a good adsorbent, but a poorly soluble substance, so the pharmacokinetics of ANA release was mainly determined by the degree of adsorption of the drug on the surface of the material and its diffusion potential. CS and C₆₀ in the composition provide a prolonged release of ANA for up to 18 days. The release of CFT from CaP/CS matrices depends on the method of its introduction into the composite - during synthesis or saturation after synthesis. The saturation method is characterized by a fast release range of 24–48 hours, and adding during synthesis delays active release to 48–72 hours (start of degradation). The release index took values from $n = 0.56$ to $n = 0.92$, which corresponds to the release kinetics that does not follow Fick's law, and close to the first-order release kinetics model.

Conclusions: Synthesized composites based on a CS matrix modified with nanostructured CaP particles and fullerene C₆₀ are potential carriers of CFT and ANA with the function of their long-term release in areas of bone tissue injury.

KEYWORDS: chitosan; hydroxyapatite; fullerene C₆₀; drug release; nanoparticles.

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-52-03>

UDC 576.32/.36:577.346

CELL STRESS RESPONSE TO COMBINED IONIZING AND NON-IONIZING RADIATION AND MAGNETIC FIELDS: A REVIEW BASED ON HUMAN BUCCAL EPITHELIUM CELLS

K. A. Kuznetsov^{1,*} , G. M. Onyshchenko² , O. T. Nikolov² 

¹Kharkiv National Medical University, 4 Nauky Av., Kharkiv, 61022, Ukraine

²V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine

*Corresponding author: ka.kuznetsov@knmu.edu.ua

Submitted August 13, 2024; Revised October 17, 2024;

Accepted November 12, 2024

Background: The impact of low-dosed ionizing radiation (IR) itself and in combination with the other damaging physical factors such as extremely high frequency (EHF) microwaves and magnetic fields (MF) is currently the object of numerous researches. Results of those investigations, however, still didn't lead to certain unequivocal conclusions.

Objectives: This paper presents the review and analysis of previously conducted experimental series in comparison with adjacent-aimed works to make a step forward in understanding the role of low doses of ionizing, non-ionizing radiation and magnetic field in the development of cellular effects.

Results: Ultra-low doses of both IR itself and with EHF and MF have triggering effects which included variability of IR effect modification; the significance of even non-ionizing radiation effects was shown on the example of ultra-wideband microwaves irradiation. Combined effects from gamma-IR with EHF microwaves and MF on chromatin led to decrease of heterochromatin granules quantity (HGQ) but affected the cell membrane permeability (CMP) rate greater than IR itself. Mitochondrial activity inhibition and cytoplasm Ca^{2+} decrease was detected under exposure to both IR and EHF-microwaves and their combination; MF slightly increased mitochondrial membrane potential and showed no significant changes in Ca^{2+} migration to the nucleus when applied together with IR. Exposure to neutron radiation revealed the maximum of chromatin condensation rate and cell membrane permeability up to the dose 36.5 mSv. Further dose increase returned the state of chromatin and cell membrane to control levels.

Conclusions: Vague effect of ultra-low doses of IR with modifying abilities of EHF-microwaves and MF was shown on the example of HGQ. Effects of high doses of gamma-radiation were also modified by both EHF-microwaves and MF at indexes of HGQ (decrease), CMP (increase), mitochondrial activity (decrease) and Ca^{2+} nucleus/cytoplasm redistribution. Irradiation with fast neutrons in low-to-medium dose range led to the development of cell stress signs (HGQ/CMP increase) which were smoothed under the dose increase.

KEY WORDS: X-rays, gamma-radiation, neutron radiation, EHF-microwaves, static magnetic field, chromatin, membrane permeability, mitochondria activity

The problem the impact of physical factors on the human organism is one of the main tasks in both medicine and ecology because of continuous exposure to variable physical factors [1]. The uncertainty of the data on the biological effects of small doses of ionizing, non-ionizing radiation, and low-intensity magnetic fields requires detailed study. The reasons

In cites: Kuznetsov KA, Onyshchenko GM, Nikolov OT. Cell stress response to combined ionizing and non-ionizing radiation and magnetic fields: a review based on human buccal epithelium cells. Biophysical Bulletin. 2024;52:33–44. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-52-03>

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

for conducting the further investigations are the presence of electromagnetic and radioactive environmental pollution; the application of electromagnetic, corpuscular radiation and magnetic fields in medicine according to existing and under-development methods and procedures; additionally, it is actual for investigations of possible responses of human body in possibly stressing conditions (spaceflight, submarine etc.).

Together with mentioned objectives the modifying effect of non-ionizing radiation (microwaves and low-frequency electromagnetic fields) in combination with ionizing radiation has been the object of research for quite a long time [2], as these factors are used in practical and experimental medicine, but the mechanisms of this effect and its consequences at the cell level are still not completely clarified. Some experimental data [3, 4] says that prolonged exposure to microwave radiation is able to cause changes in living tissues, however the other researches [5, 6] disproves that.

The other significant influence on human organism comes from magnetic fields (MF). The applications of MF in medicine and industry (alone and together with radiation of different spectrum range) [7] requires further investigations.

As the results of scientific data analysis shows the uncertainty of conclusions about the effects of low-dose ionizing radiation especially combined with the other environmental factors such as magnetic fields or non-ionizing radiation. Those mentioned factors have increasing impact on human so that is why the studies in this filed do not lose their importance.

CELL RESPONSE TO X-RAYS, GAMMA RADIATION AND COMBINED EXPOSURE WITH MICROWAVES AND MAGNETIC FIELD

The effects of different ranges of electromagnetic radiation spectrum have been of a great interest especially in case of ionizing radiation impact on living cell. One of the branches in these studies is dedicated to possibility of modification the effects caused by ionizing radiation with non-ionizing one (such as microwaves and low-frequency electromagnetic fields). This problem is also relevant in connection with application in medicine; however, it remains incompletely described. The data of early studies in this field are well-described and summarized in [8]. Separately special attention is paid to the study of modification possibilities for biological effects caused by doses of ionizing radiation (IR), which belong to the ranges of very low (<100 mGy) [9], low (<0.5 Gy) and medium (0.5–5 Gy) [10]. UNSCEAR ranging tells that doses <100 mGy are low, 0.1–1 Gy are moderate, and doses >1 Gy are high ones [11]. It is also important to note that ranges of doses in certain studies may vary due to the way of radiation application, for instance the monthly lethal dose for human which formally belongs to medium range is described in [12] as ultra-low. There is the data that summarizes the presence of the ionizing radiation biological effects on prokaryotic organisms [13] which includes also the signs of radiostimulation with relatively low doses (around 0.5 Gy) which may refer to hormesis concepts [14].

The problem of the cellular response to electromagnetic radiation (both ionizing and non-ionizing) is key in understanding its potentially harmful effects on human health [15] and at the same time understanding the possibilities of using these effects in medicine [16, 17]. The question of the response of both a whole organism and individual cells to the action of ionizing and non-ionizing radiation was considered by A.S. Pressman, in his experimental works the positive changes in the viability of animals under conditions of microwave irradiation before receiving a dose of ionizing radiation were described [1]. Recently, it has been established that non-ionizing radiation (for example, microwaves) and magnetic fields can cause certain biological effects. In particular, there are data on the presence of such effects in the cell nucleus [18]. There is also the evidence of the positive effect of the

magnetic field on plants [19, 20]. The possibility of biological interaction of the magnetic field and ionizing radiation has also been shown [21, 22].

Known cytological impact caused by ionizing radiation include changes in the permeability of the cell membrane, swelling of both the majority of cell organelles and its entire volume of cytoplasm, chromosomal aberrations and cell cycle interruption. There are data confirming the relationship between the number of heterochromatin granules and the degree of the cell's stress response to electromagnetic radiation, RNA synthesis inhibitors, etc. [23]. The permeability of the cytoplasmic membrane is also an indicator of cell damage. An increase in the permeability of the cell membrane can be a sign of either apoptosis or necrosis. It has been shown that microwave radiation and a magnetic field can damage the membranes of plant cells [24]. In addition, an increase in membrane permeability was observed in human cells under the influence of electromagnetic radiation of the mobile frequency range [25]. The influence of the magnetic field used in medicine (for MRI and stimulation of regenerative processes) and industry also requires a more detailed study, especially in cases of combined exposure together with microwave and other types of radiation [26]. There are data on the ability of a low-frequency magnetic field to reduce the harmful effects of microwave radiation [27, 28]. In the development of the stress response of the cell to the action of ionizing radiation, a significant role is played by the signal response of the cell to the stress associated with irradiation [29].

It has been established that non-ionizing radiation is also able to cause a stress response, leading to the activation of signaling pathways [30], which, in turn, affect the activity of certain genes [31]. It has been shown that there is an increase in the ability of laboratory animals to survive after exposure to ionizing radiation, simultaneously with irradiation and during pretreatment with electromagnetic or by magnetic fields [1]. Together with that different results exist with the use of the combination of 900 MHz microwaves and gamma-radiation based on experimental object. A negative effect of microwaves on the proliferation of cells that were previously treated with gamma radiation has been revealed on SHG44 cells while in mice the microwaves as pre-treatment of gamma-radiation exposure showed protective features [32, 33]. Plant organisms instead such as guar has shown an increase of productivity high doses of gamma radiation and 900 MHz-microwaves [34]. Also there the possibility of metabolic product modification by different combinations of gamma-radiation and microwaves was shown [35].

For magnetic field it has been shown the absence of a reliable effect of a magnetic field with an induction of 1.42 mT and electromagnetic radiation with a frequency of 60 Hz (magnetic induction of 0.13 μ T) on the mortality of mice that simultaneously received high doses of gamma radiation (3.0, 4.0 and 5.1 Gy) [36]. In some works, the role of ELF electromagnetic fields in the development of cancer, their influence on immunity and the functioning of nerve cells were studied, there is evidence of the positive effect of ELF and magnetic fields on bone structures, nerve tissue, wound healing and reperfusion processes [37].

The uncertainties and controversy mentioned above the further research of electromagnetic field impact on human organism is still actual, especially in the branch related to combined exposure of different physical factor such as ionizing and non-ionizing radiation ranges.

The series of experiments which are discussed in present analysis were conducted with use of X-rays [38] and gamma-radiation impact modified with microwave radiation and static magnetic field [39]. Buccal epithelium cells were used as the experimental object for their convenience in examining of cytological indexes such as heterochromatin granules quantity (HGG) and cell membrane permeability (CMP). The methods of cell samples prepare and the

procedure of irradiation are described in [40, 38]. Another series included the assessment of mitochondrial activity and Ca^{2+} ions migration between cell nucleus and cytoplasm [41].

Effects of X-rays with microwaves and magnetic field on chromatin condensation

The main conclusion of the experimental series with use of X-rays is about trigger effect of X-ray towards chromatin state. Even dose 1.4 μSv led to significant increase of HGQ index. However, this effect appeared without certain dependences in the range of very low doses. The absence of the trend also was observed up to 40 μSv in cells of 2 donors. And in general cell of both donors did not show similarities in response to mentioned dose range [38]. Still the presence of the trigger effect may mean the radiosensitivity in dose ranges that are even lower than low [42] or very low [9].

According to the data that the cytological effects of even short ultrawideband impulses has been shown as significant in ability to change the rate of chromatin condensation [18, 43, 44], the combinations of microwave radiation and X-rays were implemented as the variant of exposure for cell samples. Microwave radiation and static magnetic field ability to change HGQ index were also illustrated in [45]

The combined effect of microwave and X-ray radiation in most cases reduced the value of the HGQ index under the condition of cells post-treatment with microwave radiation after exposure to X-ray. Thus microwave radiation had a modifying effect, which appeared more clearly with the increase of the X-rays.

The biological effect caused by the permanent magnetic field, also had its own personalized features such as decrease or increase of HGQ in the cells of different donors. A protective effect of the magnetic field was observed in case of cells pre-treatment before X-ray irradiation. This effect was most clearly observed on cells of a 25-year-old donor. Post-treatment with magnetic field caused changes variable by donors' individual features (from absence of the effects to its increase in addition to X-rays). These results illustrate the uncertainty in the statements about possibility of direct impact of the magnetic field on any kind of cellular effect including oncogenesis [46]. Detected so-called protective properties of static magnetic field against ionizing radiation can be explained from the creation of smaller cell stress from MF which may prepare the cell to upcoming damage from radiation.

Gamma-radiation with microwaves or magnetic field impact on chromatin condensation, cell membranes permeability

The problem of biological effects from the combined effects of ionizing and non-ionizing radiation is not fully resolved; basing on data of our experiments with X-rays and microwaves the mentioned stochasticity may be present not only in the range of extremely low doses both for ionizing and non-ionizing radiation, the same may be predicted also for simultaneous impact of magnetic field with ionizing radiation. In our opinion, the cellular response to the combination of these factors is determined by the genotype of the cell and the intensity of the effect, which is the reason for the difference in the experimental data obtained by different authors.

Cells of the human buccal epithelium obtained from different donors have individual characteristics of the reaction to the action of gamma radiation. These features are similar to those that occur under the action of small doses of X-ray and microwave radiation. Results of samples gamma-irradiation revealed predictable increase of HGQ; however the highest doses have led to non-linear plateau-like dependency [47]. Statistically significant increase in the level of chromatin condensation (HGQ index) in cells of all donors was detected at a dose of gamma radiation of 2 Sv and higher. With use of this threshold dose of 2 Sv the further modification of the cell effects on chromatin condensation, plasmatic membranes

permeability, mitochondrial activity and Ca^{2+} redistribution between nucleus and cytoplasm was carried out.

The application of a constant magnetic field and microwaves in most cases after treatment with γ -radiation led to a decrease in the stress response of cells according to the HGQ index. General modifying effect of EHF-microwaves was also related either to the decrease of HGQ or no significance in the impact toward γ -radiation. Results obtained in our experiments correspond to general uncertainty about possibility of non-ionizing radiation to induce the adverse changes in living matter (including carcinogenesis) [48]. Also there was no difference between intensities of microwave radiation (0,1 or 1 W/m^2) in their effect before/after ionizing irradiation [40, 49]. There is the data about development of the oxidative stress however without significant outcome [49], so in our cases changes in cells nuclei membrane may appear as indirect illustration of EHF microwaves low impact on general cell stress development induced by ionizing radiation.

When the cells were exposed to microwave radiation in combination with ionizing radiation and static magnetic field, a tendency to decrease the permeability of the cell membrane was observed, but this effect was not pronounced among the cells of all donors. For instance, cell of one of the donors demonstrated greater amount of damage in plasmatic membranes under combined exposure of γ -radiation with magnetic field as well as the in combination with microwaves regardless of the sequence or intensity of EHF-irradiation. Due to expressivity of plasmatic membrane permeability changes under various damaging factors it can be concluded that both questionable microwaves influence on human [49] (but stated as possible on bacteria [9]) and magnetoreception [46] can be revealed under condition enhanced with such clearly damaging factor as gamma-radiation.

Ca^{2+} redistribution and mitochondria activity under gamma-radiation exposure combined with microwaves

The magnetic field has a weak positive effect on the membrane potential of mitochondria and is able to facilitate the transfer of Ca^{2+} ions from the cytoplasm to the nucleus; in combination with gamma radiation, this effect is neutralized.

EHF-microwaves and gamma radiation lead to a decrease in the activity of mitochondria in terms of their membrane potential and mutually reinforce each other, also leading to the accumulation of Ca^{2+} in the cell nucleus. Thus, this combination turned out to be the most significant among the studied physical factors with proapoptotic potential. Our results correspond with conclusion of works [50, 51] about radiation-induced oxidative stress; microwave radiation appeared to be a potent enhancer of ionizing radiation effects related to suppression of oxidative phosphorylation. Despite the clear difference in destructive impact of gamma rays on cell structures the non-ionizing showed even more expressive signs of oxidative stress comparing to pure IR exposure but at the same time the sustainability of such modifying effect should be researched furthermore.

With experimental data obtained, it is possible to make an assumption about the mutual reinforcement of the effects of gamma radiation and microwaves in relation to the redistribution of Ca^{2+} ions from the cytoplasm to the nucleus. In combination with the previously shown ability of EHF-waves and gamma-rays to a decrease in the membrane potential of mitochondria, this may indicate the beginning of the process of induced apoptosis in the cells of the buccal epithelium. However, taking into account the processes of restoration of cell membranes and reduction of the degree of chromatin condensation demonstrated above, at this stage of our research, the reversibility of the pro-apoptotic state of the cell should be noted [41]. Also the data about sensitization of the tissues to ionizing radiation by

microwaves is present in recent studies [52] but in our case the changes in the mitochondria activity and Ca^{2+} ions location may doubtfully depend on thermal effects.

CELL RESPONSE TO NEUTRON RADIATION EXPOSURE

The study of the influence of neutron radiation on biological objects is necessary for the general characterization of the processes occurring during the interaction of tissues with corpuscular radiation, including for determining the relationship between indicators of the cell's response to stress and its functional (proliferative) activity, with the aim of practical application in medicine. It is known that the development of cellular stress depends on both the intensity and the type of radiation.

The medical value of neutron radiation is considered in [52], where the high efficiency of neutron exposure in the treatment of brain tumors was demonstrated. Biological effects of neutron radiation, occurring at all levels of the organization of living matter, have various manifestations. The problem of using neutrons in medicine is related to the absorption of accompanying low-intensity radiation by the tissues surrounding the tumor. Studying the state of cells under the influence of neutron radiation is of practical importance for clarifying the characteristics of possible side effects of radiotherapy. The work [54] shows the high efficiency of neutron radiation in anticancer therapy with neutron capture by boron ^{10}B . Slow neutrons are inferior to gamma radiation in terms of biological effectiveness [55], but it has long been established that their effect outweighs the effects of X-ray radiation [56]. At the same time, it should be noted that despite the established distribution of RBE (relative biological efficiency) of neutrons corresponding to their energy range, some reviews provide a set of data indicating no change in the RBE indicator, for example, for fast neutrons in relation to their effect on inducing apoptosis [57].

There are also quite contradictory data that indicate an increased risk of carcinogenesis under the influence of, including, neutrons [58], on the one hand, and the insignificance of the influence of neutron radiation on the occurrence of cancer [59] on the other. Neutron radiation at small absorbed doses has significant destructive properties for cells, which can be manifested in the weakening of gene activity, while X-ray radiation can have both suppressing and enhancing effects [60], the nature of which is not completely understood.

Separately, we should take into account the evidence about the weak influence of neutron radiation on the survival of patients [61], that is, the effects of neutrons at the cellular level were more pronounced than at the organismic level. The effect of large doses of neutron radiation on living objects is well studied. Studies show a clear dependence of the effect on the dose, albeit nonlinear, using the example of rat [62] and human [63] cells. There are different views on the biological effect of neutron radiation, which indicate both hormetic [56] and damaging effects [64, 65]. But since there are still no final conclusions determining the biological effects of small doses of neutron radiation, the question of a scientific solution to this problem arises separately. But at the same time, according to some data, it is claimed that there is an increased risk of carcinogenesis [66] and an increase in the frequency of chromosomal aberrations [57] in the range of small doses of ionizing radiation (including neutrons), according to others, that this risk is not significant [59]. There are also scientific data on the positive effect of neutron radiation on animal organisms [67]. All of the above requires further research to clarify the biological impact of neutron radiation depending on the dose range.

Low doses of neutron radiation appeared to be able to increase the degree of chromatin condensation (from 4.6 mSv) and the permeability of the cell membrane (from 9.2 mSv) with the maximum values of indicators at a dose of 36.5 mSv, but these processes have individual characteristics and character and depend from the characteristics of a specific donor. A further

increase in the dose (73.1–146 mSv) caused the opposite changes such as chromatin decondensation and a decrease in the permeability of cell membranes. At the same time, the content of heterochromatin granules and the permeability of the cell membrane for vital dyes decreases to the control level and in some samples show even lower values [68, 69, 70, 71]. Such non-linear response may be explained by numerous cell protective mechanisms that are described in [72] or from the point of view of radiation hormesis as the stimulating effect of lower doses of neutron radiation (up to 36.5 mSv) with the subsequent development of the adaptive response of the cell to the stress factor of higher doses (73.1–146 mSv). There is a point of view about pro-inflammatory response of immune system to very low IR doses which changes to anti-inflammatory with the increase of dose to low-to-moderate range [73], so similar variations exactly on the border of dose ranges may take place in other cells (e.g. buccal epithelium). Also the case of protective effects of IR against chemical damaging factor were observed [74], and in our case due to elongated procedure of irradiation the dose received in the beginning of the exposure could appear as protection-activating against the upcoming doses.

At the same time the donors' sensitivity to neutron radiation had also individual features of response. Considering the noted similarity of reactions to different types and dose ranges of ionizing radiation, which were described both in experiments with gamma radiation and with neutrons, we can make an assumption about the similarity of individual adaptation reactions of donors to different types and doses of ionizing radiation.

There can be two points of view on the recorded wave-like changes in the state of chromatin: the development of a stress reaction with the loss of the cell's ability to further chromatin condensation with an increase in the dose of ionizing radiation due to irreversible DNA damage or cell repair and, accordingly, the stimulating effect of small doses of neutron radiation with the activation of biosynthetic processes. The second way may resemble the gradual acquired radioresistance to upcoming irradiation observed exactly at low-to-moderate doses (as it was recently shown in experiments with *Drosophila melanogaster* [9]) by analogy with higher ones [75]. In general, non-monotonic dependences of the effect on ultra-low doses of ionizing radiation have been known in radiobiology for many years.

CONCLUSIONS

According to the results of our research, it was primarily postulated that very low doses range cannot give the certain "dose-effect" dependency, the low doses of neutron radiation revealed non-linear features of cell response and the high doses may lead to plateau threshold in the effects toward chromatin condensation including the doses that are closes to lethal.

The effect of 2 Sv gamma-radiation dose is partially reduced by applying a constant magnetic field and microwaves before or after gamma radiation treatment. Individual differences in the reaction of the HGQ indicator in donor cells to different treatment regimes were revealed. Changes in the permeability of cell membranes of different donors under the exposure of gamma radiation have individual characteristics and in general statistically are less significant than the HGQ index. The microwave radiation and magnetic field in combination with gamma radiation has a weak but reliable additive effect, which is expressed in further increase of cell membranes permeability.

The transmembrane potential of mitochondria is significantly decreased under the influence of both microwave and gamma radiation, while increasing the dose of gamma radiation led to wave-like fluctuations in mitochondrial activity. The magnetic field had no significant effect on this index. Gamma radiation, unlike microwave radiation, did not cause a significant increase in the content of Ca^{2+} ions in cell nuclei, however the combined effect of

microwave and gamma radiation led to an effect that was more expressive than the one after exposure of microwaves.

Neutron radiation caused wave-like changes in cell membrane permeability and chromatin condensation in the nucleus of target cells in the dose range of 2.3–146.0 mSv with the maximum effect at a dose of 36.5 mSv. A further increase in the dose of neutron radiation reduces the HGQ index and the permeability of the cell membrane to control levels and even below.

Since the cells of the buccal epithelium are sensitive even to extremely small doses of ionizing radiation, and also demonstrate modification of the effects of irradiation during the action together with a magnetic field and microwaves, it is proposed to continue using the cells of the human buccal epithelium as a test system for studying the effects of both ionizing and non-ionizing radiation.

ACKNOWLEDGMENTS

The Authors are grateful to untimely gone Doctor of Biological Science, Professor Yuriy Georgievich Shkhorbatov (Molecular Biology and Biotechnology Department, V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine), who inspired and supervised the research, which results are presented in this article.

This investigation was supported by the research grants of Ukrainian Ministry of Education and Science, Grants Nos 0112U008334, 0112U008335, 0115U000487.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

Authors' ORCID ID

Kostiantyn Kuznetsov  <http://orcid.org/0000-0003-0498-2489>

Gennadiy Onyschenko  <http://orcid.org/0000-0001-6945-8413>

Oleg Nikolov  <http://orcid.org/0000-0002-3020-5539>

REFERENCES

1. Rodrigues FM, Tavella RA, Lopes C, Mortola AS, Peraza GG, Garcia EM. Genotoxic risk in health-care professionals occupationally exposed to low doses of ionizing radiation. *Toxicol Ind Health*. 2020;36(5):356–70. <https://doi.org/10.1177/0748233720932081>
2. Presman A. *Electromagnetic Fields and Life*. New York: Springer Science & Business Media; 2013. 336 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0635-2>
3. Shaukat F, Qamar K, Butt SA. Effects of Mobile Phone Induced Electromagnetic Field on Height of Follicular Cells in Thyroid Gland of Mice. *J Rawalpindi Med Coll*. 2011;15(1):27–9.
4. Hintzsche H, Stopper H. Micronucleus frequency in buccal mucosa cells of mobile phone users. *Toxicol Lett*. 2010 Mar;193(1):124–30. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.12.016>
5. Cao Y, Zhang W, Lu MX, Xu Q, Meng QQ, Nie JH, Tong J. 900-MHz Microwave Radiation Enhances γ -Ray Adverse Effects on SHG44 Cells. *J Toxicol Environ Health A*. 2009;72(11–12):727–32. <https://doi.org/10.1080/15287390902841466>
6. Eltiti S, Wallace D, Ridgewell A, Zougkou K, Russo R, Sepulveda F, et al. Does Short-Term Exposure to Mobile Phone Base Station Signals Increase Symptoms in Individuals Who Report Sensitivity to Electromagnetic Fields? A Double-Blind Randomized Provocation Study. *Environ Health Perspect*. 2007;115(11):1603–8. <https://doi.org/10.1289/ehp.10286>
7. Dasdag S, Akdag MZ, Meric F, Uzunlar AK, Celik MS, Gun R. Effect of Extremely Low Frequency Magnetic Field and Mobile Phone Exposure on Nasal Mucosa and Nose Skin. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2011;25(1):2273–8. <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2011.0017>
8. Presman AS. The action of microwaves on living organisms and biological structures. *Sov Phys Usp*. 1965;8(3):463–88. <https://doi.org/10.1070/PU1965v008n03ABEH003056>
9. Tanaka Y, Furuta M. Biological effects of low-dose γ -ray irradiation on chromosomes and DNA of *Drosophila melanogaster*. *J Radiat Res*. 2020;62(1):1–11. <https://doi.org/10.1093/jrr/rraa108>

10. Wakeford R, Tawn EJ. The meaning of low dose and low dose-rate. *J Radiol Prot.* 2010;30(1):1–3. <https://doi.org/10.1088/0952-4746/30/1/e02>
11. United Nations. Biological Mechanisms of Radiation Actions at Low Doses. New York: UNSCEAR; 2012. 45 p.
12. Lee MJ, Lee MY, Choe JY, Choi SH, Kim HJ. Ultra-low-dose radiation treatment for early-stage ocular adnexal MALT lymphoma. *Eur J Ophthalmol.* 2021;32(5):3092–6. <https://doi.org/10.1177/11206721211035622>
13. Ardelean I, Toedosiu G, Ștefanescu M, Moisescu C, Ardelean A-V, Constantin M, et al. The stimulating effects of non-lethal γ -radiation doses on prokaryotes. *Rom Biotechnol Lett.* 2020;25(6):2027–32. <https://doi.org/10.25083/rbl/25.6/2027.2032>
14. Kudryasheva NS, Rozhko TV. Effect of low-dose ionizing radiation on luminous marine bacteria: radiation hormesis and toxicity. *J. Environ Radioact.* 2015;142:68–77. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2015.01.012>
15. Redlarski G, Lewczuk B, Żak A, Koncicki A, Krawczuk M, Piechocki J, et al. The Influence of Electromagnetic Pollution on Living Organisms: Historical Trends and Forecasting Changes. *Biomed Res Int.* 2015(1):1–18. <https://doi.org/10.1155/2015/234098>
16. Meyn RE, Milas L, Ang KK. The role of apoptosis in radiation oncology. *Int J Radiat Biol.* 2009;85(2):107–15. <https://doi.org/10.1080/09553000802662595>
17. Vergallo C, Ahmadi M, Mobasheri H, Dini L. Impact of Inhomogeneous Static Magnetic Field (31.7–232.0 mT) Exposure on Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells during Cisplatin Administration. *PLoS ONE.* 2014;9(11):e113530. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113530>
18. Shckorbatov Y, Kolchigin N, Grabina V, Pasiuga V. Cellular effects of ultrawideband ultrashort pulsed radiation and microwave radiation exposure. In: 5th International Conference on Ultrawideband and Ultrashort Impulse Signals. 2010 September 6–10, Sevastopol, Ukraine, IEEE; 2010. p. 34–9. <https://doi.org/10.1109/UWBUSIS.2010.5609084>
19. Sharafi S, Gholami A, Abbasdokht H. Effect of Magnetic Field on Seed Germination of Two Wheat Cultivars. *World Academy of Science (Engineering and Technology).* 2010;68:1079–84. Available from: <https://sid.ir/paper/673132/en>
20. Majd A, Shabrangi A. Effect of Seed Pretreatment by Magnetic Fields on Seed Germination and Ontogeny Growth of Agricultural Plants. In: Progress in Electromagnetics Research Symposium. 2009 March 23–27; Beijing, China, Cambridge, MA.: The Electromagnetics Academy; 2009. p. 1137–41.
21. Xing G, Zheng D, Zhou Q, Su R, Chen Q. Effect of pre-flight treatment with constant magnetic field on development of *Artemia* eggs retrieved from Chinese Satellite “8885”. *Sci China B.* 1991;34(6):699–705. PMID: 1888436
22. Miyakoshi J, Koji Y, Wakasa T, Takebe H. Long-term Exposure to a Magnetic Field (5 mT at 60 Hz) Increases X-ray-induced Mutations. *J Radiat Res.* 1999;40(1):13–21. <https://doi.org/10.1269/jrr.40.13>
23. Shckorbatov Y. New Developments in Chromatin Research. In: Simpson NM, Stewart VJ, editors. New Developments in Chromatin Research. Nova Science Publishers; 2012. p. 123–44.
24. Pasiuga OS, Pasiuga VN, Ryabuha SS, Shckorbatov YG. The Effects of Microwave Radiation and Weak Magnetic Field on State of Pea (*Pisum Sativum* L.) Cell Membrane and Nuclei. *Bulletin of Kharkiv National Agrarian University, Biology series.* 2014;32(2):38–45.
25. Skamrova GB, Evstigneev MP, Lantushenko AO, Lukianchuk GA, Salamatin VV, Shckorbatov YG. Influence of Microwave Radiation of Mobile WIMAX Network Frequencies on Human Buccal Epithelium Cells Membrane Permeability. *Proceedings of VI Vernadsky Taurida National University, Biology and Chemistry Series.* 2011;24(63)(4):282–91.
26. Banik S, Bandyopadhyay S, Ganguly S. Bioeffects of microwave—a brief review. *Bioresour Technol.* 2003;87(2):155–9. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00169-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00169-4)
27. Lai H, Singh NP. Interaction of Microwaves and a Temporally Incoherent Magnetic Field on Single and Double DNA Strand Breaks in Rat Brain Cells. *Electromagn Biol Med.* 2005;24(1):23–9. <https://doi.org/10.1081/JBC-200055046>
28. Yao K, Wu W, Wang K, Ni S, Ye P, Yu Y, et al. Electromagnetic noise inhibits radiofrequency radiation-induced DNA damage and reactive oxygen species increase in human lens epithelial cells. *Mol Vis.* 2008;14:964–9.
29. Valerie K, Yacoub A, Hagan MP, Curiel DT, Fisher PB, Grant S, et al. Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(3):789–801. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0596>
30. Lee KS, Choi JS, Hong SY, Son TH, Yu K. Mobile phone electromagnetic radiation activates MAPK signaling and regulates viability in *Drosophila*. *Bioelectromagnetics.* 2008;29(5):371–9. <https://doi.org/10.1002/bem.20395>

31. Blank M, Goodman R. Initial interactions in electromagnetic field-induced biosynthesis. *J Cell Physiol.* 2004;199(3):359–63. <https://doi.org/10.1002/jcp.20004>
32. Cao Y, Xu Q, Jin ZD, Zhang J, Lu MX, Nie JH, et al. Effects of 900-MHz Microwave Radiation on γ -Ray-Induced Damage to Mouse Hematopoietic System. *J Toxicol Environ Health.* 2010;73(7):507–13. <https://doi.org/10.1080/15287390903523451>
33. Cao Y, Xu Q, Jin ZD, Zhou Z, Nie JH, Tong J. Induction of adaptive response: Pre-exposure of mice to 900 MHz radiofrequency fields reduces hematopoietic damage caused by subsequent exposure to ionising radiation. *Int J Radiat Biol.* 2011;87(7):720–8. <https://doi.org/10.3109/09553002.2010.550981>
34. Khaled KAM, Sultan FM, Azzam CR. Gamma-rays and microwave irradiation influence on GUAR (*Cyamopsis tetragonoloba*): I - markers assisted selection for responding to mutagenic agents. *SABRAO J Breed Genet.* 2022;54(2):331–49. <http://doi.org/10.54910/sabrao2022.54.2.10>
35. Chandak A, Dhull SB, Chawla P, Fogarasi M, Fogarasi S. Effect of Single and Dual Modifications on Properties of Lotus Rhizome Starch Modified by Microwave and γ -Irradiation: A Comparative Study. *Foods.* 2022;11(19):2969. <https://doi.org/10.3390/foods11192969>
36. Babbitt JT, Kharazi AI, Taylor J, Bonds CB, Mirell SG, Frumkin E, et al. Hematopoietic neoplasia in C57BL/6 mice exposed to split-dose ionizing radiation and circularly polarized 60 Hz magnetic fields. *carcinogenesis.* 2000;21(7):1379–89. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.7.1379>
37. Santini MT, Rainaldi G, Indovina PL. Cellular effects of extremely low frequency (ELF) electromagnetic fields. *Int J Radiat Biol.* 2009;85(4):294–313. <https://doi.org/10.1080/09553000902781097>
38. Kuznetsov K, Shckorbatov Y, Badiyan E, Bykov V, Pasiuga V, Mavrodi S. The method of detection of cellular effects of ionizing and non-ionizing radiation in human cells. In: *Proceedings of the VI International Conference “Electronics and Applied Physics”.* 2010 October 20–23, Kyiv, Ukraine, T. Shevchenko National University of Kyiv; 2010. p. 96.
39. Kuznetsov KA, Shckorbatov YG, Kolchigin NN, Nikolov OT. Changes of chromatin and cell membranes in exfoliated human buccal epithelium cells exposed to non-ionizing and ionizing electromagnetic fields. In: *8th International Conference on Ultrawideband and Ultrashort Impulse Signals.* 2016 September 5 – 8, Odesa, Ukraine, Sevastopol National Technical University, IEEE; 2016. p. 167–70. <https://doi.org/10.1109/UWBUSIS.2016.7724179>
40. Kuznetsov KA, Miroshnik DB, Shckorbatov YG, Nikolov OT, Kolchigin NN. Modification of cellular effects of exposure to gamma-radiation by microwaves and magnetic field. In: *9th International Kharkiv Symposium on Physics and Engineering of Microwaves, Millimeter and Submillimeter Waves.* 2016 June 20–24, Kharkiv, Ukraine, V. N. Karazin Kharkiv National University, IEEE; 2016. p. 1–3. <https://doi.org/10.1109/MSMW.2016.7538012>
41. Kuznetsov K, Kovalenko I, Shckorbatov Y. Exfoliated Human Cells Response to Microwaves and Magnetic Field Exposure. In: *Proceedings of Asia Electro-magnetic Symposium.* 2017 July 23 – 27, Bengaluru, India.
42. Khan MGM, Wang Y. Advances in the Current Understanding of How Low-Dose Radiation Affects the Cell Cycle. *Cells.* 2022;11(3):356. <https://doi.org/10.3390/cells11030356>
43. Kuznetsov K, Magda I, Kazansky O, Kolchigin N, Shckorbatov Y. The Influence of Ultrawideband Irradiation of Different Energy and Exposure Time on the State of Chromatin in Human Cells. In: *7th International Conference on Ultrawideband and Ultrashort Impulse Signals.* 2014 September 15–19, Kharkiv, Ukraine, V.N. Karazin Kharkiv national University, IEEE; 2014. p. 49–51.
44. Kuznetsov KA, Pasiuha VN, Mahda IYu, Kazanskyi OV, Yvanchenko DD, Kolchyhyn NN, et al. Effect of different regimes of ultrawideband pulse irradiation on the state of chromatin in human cells. *Photobiology and Photomedicine.* 2014;12(3,4):64–70 (In Ukrainian). Available from: <https://periodicals.karazin.ua/photomedicine/article/view/4615>
45. Kuznetsov KA, Myroshnyk DB, Pasiuha VN, Yvanchenko DD, Kliuchyvska OI, Stoika RS, et al. The effect of microwave radiation and magnetic field on the state of nuclear chromatin and the content of the regulatory protein cyclin A in cells. *Photobiology and Photomedicine.* 2014;11(2):64–9 (In Russian). Available from: <https://periodicals.karazin.ua/photomedicine/article/view/4079>
46. Maffei ME. Magnetic Fields and Cancer: Epidemiology, Cellular Biology, and Theranostics. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1339. <https://doi.org/10.3390/ijms23031339>
47. Kuznetsov K, Miroshnik D, Nikolov O, Shckorbatov Y. The Effect of Ionizing Radiation in Combination with Static Magnetic Field and Microwave Radiation on Chromatin State in Isolated Human Buccal Epithelium Cells. *Visnyk of Lviv University. Biological series.* 2014;(68):197–205.
48. Gupta S, Sharma RS, Singh R. Non-ionizing radiation as possible carcinogen. *Int J Environ Health Res.* 2020;32(4):1–25. <https://doi.org/10.1080/09603123.2020.1806212>
49. Kuznetsov K, Nikolov O, Shckorbatov Y. Response of exfoliated human buccal epithelium cells to combined gamma radiation, microwaves, and magnetic field exposure estimated by changes in chromatin condensation

- and cell membrane permeability. *Biophys Bull.* 2016;2(36):19–26. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2016-36-03>
50. Sisakht M, Darabian M, Mahmoodzadeh A, Bazi A, Shafiee SM, Mokarram P, et al. The role of radiation induced oxidative stress as a regulator of radio-adaptive responses. *Int J Radiat Biol.* 2020;96(5):561–76. <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1721597>
 51. Akbari A, Jelodar G, Nazifi S, Afsar T, Nasiri K. Oxidative Stress As The Underlying Biomechanism Of Detrimental Outcomes Of Ionizing and Non-Ionizing Radiation on Human Health: Antioxidant Protective Strategies. *Zahedan J Res Med Sci.* 2019;21(4):e85655. <https://doi.org/10.5812/zjrms.85655>
 52. Wang Z, Liu B, Tu J, Xiang J, Xiong H, Wu Y, et al. PLGA Nanoparticles Loaded with Sorafenib Combined with Thermosensitive Hydrogel System and Microwave Hyperthermia for Multiple Sensitized Radiotherapy. *Pharmaceutics.* 2023;15(2):487. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020487>
 53. Miyatake SI, Kawabata S, Hiramatsu R, Kuroiwa T, Suzuki M, Kondo N, et al. Boron Neutron Capture Therapy for Malignant Brain Tumors. *Neurol Med Chir.* 2016;56(7):361–71. <https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2015-0297>
 54. Heber EM, Hawthorne MF, Kueffer PJ, Garabalino MA, Thorp SI, Pozzi ECC, et al. Therapeutic efficacy of boron neutron capture therapy mediated by boron-rich liposomes for oral cancer in the hamster cheek pouch model. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(45):16077–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410865111>
 55. Lowy RJ, Vavrina GA, LaBarre DD. Comparison of gamma and neutron radiation inactivation of influenza A virus. *Antiviral Res.* 2001;52(3):261–73. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(01\)00169-3](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(01)00169-3)
 56. Barendsen GW, Broerse JJ. Experimental radiotherapy of a rat rhabdomyosarcoma with 15 MeV neutrons and 300 kV X-rays. *Eur J Cancer.* 1969;5(4):373–91. [https://doi.org/10.1016/0014-2964\(69\)90051-6](https://doi.org/10.1016/0014-2964(69)90051-6)
 57. Paterson L. Low Dose Effects of Gamma and Neutron Radiation on Peripheral Blood Lymphocytes [thesis]. Hamilton, ON: McMaster University; 2017. 189 p.
 58. Peak MJ, Wang L, Hill CK, Peak JG. Comparison of repair of DNA double-strand breaks caused by neutron or gamma radiation in cultured human cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 1991;60(6):891–8.
 59. Cohen BL. Cancer Risk from Low-Level Radiation. *Am J Roentgenol.* 2002;179(5):1137–43. <https://doi.org/10.2214/ajr.179.5.1791137>
 60. Broustas CG, Xu Y, Harken AD, Garty G, Amundson SA. Comparison of gene expression response to neutron and x-ray irradiation using mouse blood. *BMC Genomics.* 2017;18(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3436-1>
 61. Tačev T, Ptáčeková B, Strnad V. Californium-252 (²⁵²Cf) versus Conventional Gamma Radiation in the Brachytherapy of Advanced Cervical Carcinoma. Long-Term Treatment Results of a Randomized Study. *Strahlenther Onkol.* 2003; 6:377–84
 62. Zhang J, He Y, Shen X, Jiang D, Wang Q, Liu Q, et al. γ -H2AX responds to DNA damage induced by long-term exposure to combined low-dose-rate neutron and γ -ray radiation. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2016;795:36–40. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.11.004>
 63. Michnik A, Polaczek-Grelík K, Staś M, Sadowska-Krępa E, Gibińska J, Drzazga Z. Delayed Effects of Neutron Radiation on Human Serum. *J Therm Anal Calorim.* 2016;126(1):37–45. <https://doi.org/10.1007/s10973-016-5255-7>
 64. Ng CYP, Kong EY, Konishi T, Kobayashi A, Suya N, Cheng SH, et al. Low-dose neutron dose response of zebrafish embryos obtained from the Neutron exposure Accelerator System for Biological Effect Experiments (NASBEE) facility. *Radiat Phys Chem.* 2015;114:12–7. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2015.05.020>
 65. Saeed A, Raouf GA, Nafee SS, Shaheen SA, Al-Hadeethi Y. Effects of Very Low Dose Fast Neutrons on Cell Membrane and Secondary Protein Structure in Rat Erythrocytes. *PLoS ONE.* 2015;10(10):e0139854. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139854>
 66. Harbron RW. Cancer Risks from Low Dose Exposure to Ionising Radiation – Is the Linear no-threshold Model still relevant? *Radiography.* 2012;18(1):28–33. <https://doi.org/10.1016/j.radi.2011.07.003>
 67. Luo Ke-yong. Stimulation Growth Effect of *Eriochloa sinensis* Treated with low-dose Neutron. *J Nucl Agric Sci.* 2006;20(1):74–8.
 68. Kuznetsov K, Kizim P, Berezhnoy A, Shchus O, Onyshchenko G. Cell stress response to low-dose neutron radiation. *MSABP.* 2020;1(1):036–42. <https://doi.org/10.30574/msabp.2020.1.1.0022>
 69. Kuznetsov K, Kyzym P, Berezhnoy A, Shchus A, Onishchenko G, Shckorbatov Y. Human buccal epithelium cell response to low intensive neutron radiation. *Biophys Bull.* 2018;(40):17–25. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2018-40-02>
 70. Kuznetsov K, Kyzym P, Onishchenko G, Berezhnoy A, Shckorbatov Y. Chromatin Changes under Exposure to Neutron Radiation. In: *Advances in Cell Biology and Biotechnology.* 2015 October 11–13, Lviv, Ukraine, Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine; 2015. p. 83.

71. Kuznetsov K, Kyzym P, Berezhnoy A, Shchus A, Onishchenko G, Shckorbatov Y. Cell Membrane Permeability Changes under Exposure to Neutron Radiation. In: Proceedings of 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with International Representation. 2019 June 18–21, Yaremche, Ukraine, Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine; 2019. p. 27.
72. Guéguen Y, Bontemps A, Ebrahimian TG. Adaptive Responses to Low Doses of Radiation or chemicals: Their Cellular and Molecular Mechanisms. *Cell Mol Life Sci.* 2018;76(7):1255–7. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2987-5>
73. Lumniczky K, Impens N, Armengol G, Candéias S, Georgakilas AG, Hornhardt S, et al. Low Dose Ionizing Radiation Effects on the Immune System. *Environ Int.* 2021;149:106212. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106212>
74. Karam H, Mohamed M. Beneficial Effect of Low Dose Gamma Irradiation or Quercetin on *Cerastes cerastes* Snake Venom Induced Toxicity in Male Rats. *Toxin Rev.* 2019;40(1):35–47. <https://doi.org/10.1080/15569543.2019.1580746>
75. Huang CY, Lai ZY, Hsu TJ, Chou F, Li H, Chuang YJ. Boron Neutron Capture Therapy Eliminates Radioresistant Liver Cancer Cells by Targeting DNA Damage and Repair Responses. *J Hepatocell Carcinoma.* 2022;9:1385–401. <https://doi.org/10.2147/JHC.S383959>

**СТРЕСОВА ВІДПОВІДЬ КЛІТИН НА КОМБІНОВАНУ ДІЮ ІОНІЗУЮЧОГО,
НЕІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ ТА МАГНІТНОГО ПОЛЯ:
ОГЛЯД НА ПРИКЛАДІ КЛІТИН БУКАЛЬНОГО ЕПІТЕЛІЮ ЛЮДИНИ**

К. А. Кузнецов^{1,*}, Г. М. Онищенко², О. Т. Ніколов²

¹Харківський національний медичний університет, пр-т Науки, 4, Харків, 61022, Україна

²Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, Харків, 61022, Україна

e-mail: ka.kuznetsov@knmu.edu.ua

Надійшла до редакції 13 серпня 2024 р. Переглянута 17 жовтня 2024 р.

Прийнята до друку 12 листопада 2024 р.

Актуальність. Вплив малих доз іонізуючого випромінювання (ІВ) як такого та в поєднанні з іншими шкідливими фізичними факторами, такими як надвисокочастотні (НВЧ) мікрохвилі та магнітні поля (МП), в даний час є об'єктом численних досліджень. Проте результати цих досліджень все ще не мають однозначних висновків.

Мета роботи. Представлено огляд та аналіз раніше проведених серій експериментів у порівнянні з суміжними цільовими роботами для покращення розуміння ролі малих доз іонізуючого, неіонізуючого випромінювання та магнітного поля у розвитку ефектів клітинного стресу.

Результати. Наднизькі дози як самого ІВ, так і НВЧ і МП проявляли тригерні ефекти, які включають варіабельність модифікації ефекту ІВ. На прикладі ультраширокодіапазонного мікрохвильового опромінення показано значущість впливу навіть надмалих доз неіонізуючого випромінювання. Комбінований вплив гамма-випромінювання з НВЧ-мікрохвилями та МП на стан хроматину призвів до зменшення вмісту гранул гетерохроматину (ВГГ), але вплинув на зростання проникності клітинної мембрани (ПКМ) більше, ніж саме ІВ. Виявлено пригнічення активності мітохондрій та зниження Ca^{2+} в цитоплазмі при дії як ІВ, так і НВЧ-мікрохвиль та їх комбінацій. МП дещо підвищувало мембранний потенціал мітохондрій та не показало значних змін у перерозподілі Ca^{2+} до ядра при застосуванні разом з ІВ. При дії нейтронного випромінювання виявлено максимум показника ВГГ та проникності клітинної мембрани при дозі 36,5 мЗв. Подальше збільшення дози повертало стан хроматину та клітинної мембрани до контрольного рівня.

Висновки. На прикладі ВГГ показано невиразний ефект надмалих доз ІВ із модифікуючою здатністю НВЧ-мікрохвиль та МП. Ефекти високих доз гамма-випромінювання також були модифіковані як НВЧ-мікрохвилями, так і МП за показниками ВГГ (зменшення), ПКМ (збільшення), мітохондріальної активності (зменшення) і Ca^{2+} -перерозподілу між ядром та цитоплазмою. Опромінення швидкими нейтронами в діапазоні низьких і середніх доз призводило до розвитку ознак клітинного стресу (підвищення ВГГ та ПКМ), які згладжувалися при збільшенні дози.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: рентгенівське випромінювання; гамма-випромінювання; нейтронне випромінювання; НВЧ-мікрохвилі; постійне магнітне поле; хроматин; проникність мембрани; активність мітохондрій.

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 "Peфeпар" 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. 52

Збірник наукових праць

Укр. та англ. мовами.

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

Підписано до друку 30.12.2024. Формат 60×84 1/8.
Папір офсетний. Друк цифровий.
Ум. друк. арк. 3,71. Обл.-вид. арк. 4,31. 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