

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

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

Біофізичний Вісник

Випуск 53

Заснований 1998 р.

Харків 2025

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

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

Biophysical Bulletin

Issue 53

Founded in 1998

Kharkiv 2025

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 Біомедицина 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 № 14 від 26.05.2025).

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., професор, 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 скінтиляційних 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, п.н.с., 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 скінтиляційних матеріалів Національної академії наук України, Харків, Україна

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

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

Лисецький Л. М., д.ф.-м.н., професор, п.н.с., Інститут скінтиляційних 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, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Київ, Україна

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

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

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

Степаньян С. Г., д.ф.-м.н., с.н.с., зав. відділу, 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, член-кор. НАН України, 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, зав. відділу, 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, 2025

© В. В. Гурмач, В. Р. Караушу, З. С. Клецова, В. П. Берест, Ю. І. Прилуцький, фото результатів молекулярного докінгу C₆₀ фулерену з білком ACE2 на першій сторінці обкладинки, 2025

Biophysical Bulletin publishes original scientific articles, short communications and reviews dealing with physical, mathematical, and engineering problems pertaining to biological systems and solved by methods of experimental and theoretical physics, mathematical modeling and computer simulation. UDC 577. The founder of the Journal is V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine. Year of foundation 1998. The journal is published twice a year.

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

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

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

Approved for publication by the Academic Council of V. N. Karazin Kharkiv National University (May 26, 2025, Protocol No. 14).

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.), Prof., 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, PhD, Dr. hab., 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., 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., Principal Investigator, Investigator Principal, Departamento de Química, Universidade de Coimbra, Portugal

D. 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.), Head of Department, 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", 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 Soft Condensed Matter Physics Laboratory, The Hebrew University of Jerusalem, Israel

A. V. Shestopalova, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Prof., Head of Department, 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, 2025

© V. V. Hurmach, V. R. Karaushu, Z. S. Klestova, V. P. Berest, Yu. I. Prylutsky, photo of results of molecular docking of C₆₀ fullerene with ACE2 protein on the first page of the cover, 2025

ЗМІСТ

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

- N. S. Kavok, G. V. Dudetskaya, V. V. Seminko, P. O. Maksimchuk,
V. K. Klochkov, Y. H. Kot, Yu. V. Nikitchenko, O. O. Sedyh**
Influence of redox cyclers on thiol oxidation in the presence of nanoparticles 7–17

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

- O. V. Pakhomov, Y. O. Posokhov, N. Ye. Volkova, N. A. Chernobai,
G. A. Bozhok**
Effects of cryoprotective agents on osmotic tolerance limit of testicular interstitial cells 18–33

- Л. В. Січевська, Т. М. Овсяннікова, І. А. Забєліна, А. О. Коваленко,
О. М. Левченко, О. В. Гурін**
Дозові ефекти ультрафіолетового та терагерцового лазерного випромінювання на плазматичну мембрану еритроцитів 34–45

МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

- M. Olenchuk, G. Monastyrskyi, O. Gnatyuk, A. Boisen, Z. Zhang, G. Solyanik,
D. Kolesnyk, S. Karakhim, G. Dovbeshko**
Optical and electron microscopy imaging of model circulating tumour cells 46–59

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

- В. В. Гурмач, В. Р. Караушу, З. С. Клестова, В. П. Берест,
Ю. І. Прилуцький**
Протикоронавірусна активність C_{60} фулерену: *in silico* та *in vitro* скринінг 60–71

- Д. М. Ноздренко, М. С. Ангелов, І. М. Варенюк, М. Е. Держинський,
К. І. Богуцька, В. С. Теплюк, І. М. Неділько, В. П. Берест,
Ю. І. Прилуцький**
 C_{60} фулерен сприяє відновленню скоротливої активності *musculus gastrocnemius* щурів після нейрогенної атрофії 72–81

ОГОЛОШЕННЯ

- 9-та Міжнародна конференція «Нанобіофізика: фундаментальні та прикладні аспекти» 82

CONTENTS

MOLECULAR BIOPHYSICS

- N. S. Kavok, G. V. Dudetskaya, V. V. Seminko, P. O. Maksimchuk,
V. K. Klochkov, Y. H. Kot, Yu. V. Nikitchenko, O. O. Sedyh** 7–17
Influence of redox cyclers on thiol oxidation in the presence of nanoparticles

ACTION OF PHYSICAL AGENTS ON BIOLOGICAL OBJECTS

- O. V. Pakhomov, Y. O. Posokhov, N. Ye. Volkova, N. A. Chernobai,
G. A. Bozhok** 18–33
Effects of cryoprotective agents on osmotic tolerance limit of testicular interstitial cells
- L.V. Sichevska, T.M. Ovsyannikova, I.A. Zabelina, A.O. Kovalenko,
O.M. Levchenko, O.V. Gurin** 34–45
Dose effects of ultraviolet and terahertz laser radiation on the plasma membrane of erythrocytes

BIOPHYSICAL METHODS

- M. Olenchuk, G. Monastyrskyi, O. Gnatyuk, A. Boisen, Z. Zhang, G. Solyanik,
D. Kolesnyk, S. Karakhim, G. Dovbeshko** 46–59
Optical and electron microscopy imaging of model circulating tumour cells

CELL BIOPHYSICS

- V. V. Hurmach, V. R. Karaushu, Z. S. Klestova, V. P. Berest, Yu. I. Prylutsky** 60–71
Anticoronavirus activity of C₆₀ fullerene: *in silico* and *in vitro* screening
- D. M. Nozdrenko, M. S. Anhelov, I. M. Vareniuk, M. E. Dzerzhynsky,
K. I. Bogutska, V. S. Tepliuk, I. M. Nedilko, V. P. Berest, Yu. I. Prylutsky** 72–81
C₆₀ fullerene promotes recovering rat *musculus gastrocnemius* contracting activity after neurogenic atrophy

ANNOUNCEMENT

- 9th International conference “Nanobiophysics: fundamental and applied aspects” 82

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-01>

UDC 577.3:577.1.088:022.532

INFLUENCE OF REDOX CYCLERS ON THIOL OXIDATION IN THE PRESENCE OF NANOPARTICLES

N. S. Kavok¹ , G. V. Dudetskaya^{1*} , V. V. Seminko¹ , P. O. Maksimchuk¹ ,
V. K. Klochkov¹ , Y. H. Kot² , Yu. V. Nikitchenko¹ , O. O. Sedyh¹ ¹Institute for Scintillation Materials SSI "Institute for Single Crystals", NAS of Ukraine, 60 Nauky Ave.,
Kharkiv, 61072, Ukraine²V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine*Corresponding author: gdudetska@gmail.com

Submitted September 25, 2024; Revised April 2, 2025;

Accepted April 6, 2025

Background: An increase in metabolic rate interconnected with oxidative imbalance are major features of tumor process. Higher ROS (reactive oxygen species) levels make tumor cells more sensitive to oxidative stress compared to normal cells. Therefore, generating additional ROS can lead to cancer cell death. Redox cycling is a crucial process responsible for the production of ROS by various clinical and experimental anticancer agents. Among these compounds are quinones and ascorbic acid, which exhibits a synergistic antitumor effect. Elevated glutathione levels and glutathione-dependent antioxidant enzymes play a key role in protecting cancer cells from intracellular oxidative stress. Nanoparticles with glutathione depletion properties can act as smart chemodynamic agents, disrupting the cellular antioxidant defense system. In this work, inorganic nanoparticles based on rare earth elements are used as catalytic amplifiers of one-electron transfer with the formation of organic and oxygen radicals in the redox cycles of ascorbic acid and vitamin K3.

Objectives: The thiol oxidation was studied in the presence of nanoparticles in combination with redox cyclers.

Materials and methods: As an indicator of the pro-oxidant efficiency of nanoparticles (CeO₂ (2 nm, 20 µg/ml) or GdYVO₄:Eu³⁺ (2 nm, 20 µg/ml)) combined with organic compounds (ascorbic acid (100 or 200 µM) and vitamin K3 (4 µM)) changes in the level of thiols (glutathione (200 µM), L-cysteine (200 µM) or dithiothreitol (500 µM)) in the model system were used.

Results: It was shown that GdYVO₄:Eu³⁺ and CeO₂ nanoparticles enhances oxidation of thiols under an influence of the redox active molecule as well as their combination. The efficiency of bare nanocereria as well as in redox cyclers combinations was higher compared to respective orthovanadate nanoparticles combinations (including time dynamics) that was especially pronounced in the dithiothreitol oxidation system.

Conclusions: The data obtained indicate the ability of nanocereria to significantly enhance the oxidation of thiols induced by redox cyclers revealing the perspective of this approach in solving the problem of increased thiol level in tumor cells.

KEY WORDS: CeO₂ nanoparticles; GdYVO₄:Eu³⁺ nanoparticles; thiols; ascorbic acid; tumor cells.

In tumor cells increase in metabolic rate, cellular signaling processes, and activity of antioxidant enzymes caused by ROS (reactive oxygen species) have been reported. Higher ROS

Citation: Kavok NS, Dudetskaya GV, Seminko VV, Maksimchuk PO, Klochkov VK, Kot YH, Nikitchenko YuV, Sedyh OO. Influence of redox cyclers on thiol oxidation in the presence of nanoparticles. Biophysical Bulletin. 2025;53:7–17. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-01>

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

© Kavok N. S., Dudetskaya G. V., Seminko V. V., Maksimchuk P. O., Klochkov V. K., Kot Y. H., Nikitchenko Yu. V., Sedyh O. O., 2025.

level in tumor cells makes them more ROS-sensitive than normal cells. So, additional ROS generation can cause cancer cell death with negligible effect on non-tumor cells [1]. Although ROS-generating agents have been found to be effective in many cases, low clinical response and resistance to those agents were also reported. Elevation of certain transcription factors, antioxidants and survival signals as a result of redox adaptation probably explains the drug resistant phenotype [2, 3].

Elevated levels of glutathione (GSH), a major intracellular redox buffer, and GSH-dependent antioxidant enzymes play a central role in protection of cancer cells against intracellular oxidative stress [4]. This fact can be one of the most sufficient obstacles for cancer treatment. High levels of GSH have been found in various tumor types being up to several-fold more than in surrounding tissues. The overexpression of GSH in tumors indicates enhanced cell proliferation, decreased levels of apoptosis, increased resistance to chemotherapeutic drugs and radiation therapy.

Development of effective therapeutic agents, which are selective and able to overcome drug resistance, requires reconsideration of the concepts of intrinsic oxidative stress in cancer cells and their redox adaptation [2].

Redox cycling is an important chemical mechanism underlying formation of ROS by numerous clinical and experimental anticancer agents containing quinone pharmacophores (including anthracyclines, geldanamycin, and menadione) [5]. The redox cycling induced toxicity of quinones (Q) was largely investigated. The molecular mechanism is believed to be that the semiquinone radical is generated by spontaneous or enzyme-catalyzed reduction of Q in the cell. The semiquinone radical is oxidized by oxygen with formation of parent Q and superoxide radical. NAD(P)H and GSH systems are implicated in the process. So, enzymatic or non-enzymatic reduction of menadione converts it from pro-drug to drug compound with antitumor activity [1]. However, the systemic toxicity of menadione, a short half-life and low concentration (only 7.4 μM in plasma) make it difficult to use as a monotherapy. Its use in various combinations (with vitamin C (AA), orthovanadates (OV, $\text{GdYVO}_4\text{:Eu}^{3+}$ NPs)) is considered more promising [6]. A recent study has shown the potent anticancer activity of menadione and ascorbate combination due to induced redox cycling [7].

Nanoparticles (NPs), with GSH depletion properties can serve as a smart chemodynamic agent disrupting the cellular antioxidant defense system. Drug development based on multifunctional redox catalysts that selectively enhance oxidative stress in cancer cells through GSH depletion, ROS formation, and thiol oxidation in crucial redox target proteins including transcription factors has been initiated. Prooxidant and antioxidant redox effects as a function of cellular redox status and GSH availability, provide a therapeutic window based on cancer cell redox dysregulation with elevated peroxide and decreased GSH cellular levels.

It has been shown that artificial enzymes mimic the activity of peroxidases, oxidases, superoxide dismutase, and hydrolases, while limited data are available regarding reductase mimetics [8]. It has been suggested that NPs with oxidoreductase activity can function as redox cycling activators or mediators and catalysts facilitating interactions and electron transfer between organic compounds. Since these processes can involve thiol compounds or reducing equivalents, this fact leads to their consumption and a decrease in the overall reductive activity in the system and an increase in prooxidant potential.

Prooxidant effect of GSH depletion by orthovanadate NPs has been demonstrated previously [9]. It was also found that cerium dioxide NPs exhibit GSH and cysteine oxidation activities [10, 11]. The antitumor activity of nanoceria and orthovanadate NPs is also known [12, 13]. However, the mechanism of these effects remains poorly understood.

In the present study, thiol oxidation system was used to evaluate the combined prooxidant efficacy of vitamin K3 and AA in the presence of extra-small (2 nm) orthovanadate and cerium dioxide NPs.

MATERIALS AND METHODS

Reagents: vitamin C (Thermo Fisher Scientific, USA), glutathione (AppliChem GmbH, Germany), L-cysteine (Sigma-Aldrich, USA), dithiothreitol (Merck KGaA, Germany); Tris-buffer (AppliChem GmbH, Germany), vitamin K3 (MSB, Darnytsia, Ukraine), 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic) acid (Sigma-Aldrich, USA).

Colloidal solutions of CeO_2 and $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ NPs were obtained and characterized as described previously [14, 15]. Transmission electron microscope (TEM) images of each sample were collected using a TEM 125K (Selmi) transmission electron microscope (100 kV). According to the TEM, solid phase of colloidal solution consists of $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ spherical NPs with average sizes of 2 nm and CeO_2 NPs with average sizes of 2 nm.

Dynamic light scattering was used to reveal the hydrodynamic diameter of the NPs (CeO_2 (9 nm) and $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (26.8 nm)) using a ZetaPALS analyzer (Brookhaven, NY) equipped with He-Ne laser (658 nm). Measurements of zeta potential were conducted using a ZetaPALS/bi-masanalyzer (Brookhaven Instruments Corp., USA), operating in phase analysis light scattering mode. The experiments were performed at a scattering angle of 90° and $\lambda = 659$ nm, at a temperature of 25°C . The zeta potential was obtained through measurement of the electrophoretic mobility of the particles which was converted to apparent zeta-potentials using the Helmholtz-Smoluchowski relationship. For each test, at least ten records were obtained and averaged. Notably, the zeta potential was found to be negative.

Oxidative potential (OP) is most common measure of the ability to oxidize target molecules. These molecules include low molecular weight natural antioxidants such as AA, monothiols (GSH, L-cysteine), dithiols (dithiothreitol (DTT)) [16, 17]. Our studies assessed the oxidation of mono- and dithiols both under the influence of NPs (cerium dioxide and orthovanadates) and their combinations with redox cyclers [5, 18]. The oxidation of GSH, L-cysteine and DTT was monitored by spectroscopic techniques using Specord 200 spectrophotometer (Analytik Jena, Germany). Suspensions of NPs (CeO_2 (2 nm, $20\ \mu\text{g/ml}$) or $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (2 nm, $20\ \mu\text{g/ml}$) in 10 mM Tris HCl buffer combined with organic compounds (AA (100 or $200\ \mu\text{M}$), vitamin K3 (Q) ($4\ \mu\text{M}$)) changes in the level of thiols (GSH ($200\ \mu\text{M}$), L-cysteine ($200\ \mu\text{M}$) or DTT ($500\ \mu\text{M}$)) in the model system were used. The pH dependence (pH 6.7, 7.4, 7.8) and time dynamics of the process within 24 hours were studied. The rate of thiol oxidation was evaluated by measuring the disappearance of -SH groups. Free -SH groups were determined according to [19]. Incubation at 37°C was initiated by the addition of the thiol compounds. Aliquots of the reaction mixture ($100\ \mu\text{L}$) were checked for the amount of -SH groups using absorbance at 412 nm at different times after addition of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) color reagent. Adding DTNB to the mixtures yielded a yellow product (forms 2-nitro-5-thiobenzoic acid (TNB)), which is stable in the final solution for at least 2 hours at room temperature. TNB content was determined by spectroscopic techniques using Specord 200 spectrophotometer from absorbance at 412 nm with solution of thiols without NPs used as a control. The level of thiols was expressed as relative change (as a reference the absorbance value at 0 hours was taken). For statistical analysis Origin software was used. Deviations were analyzed by Shapiro-Wilk test. Subsequent analysis included one-way ANOVA with Dunn-Sidak post-hoc test or Kruskal-Wallis ANOVA with Mann-Whitney post-hoc test. The values were expressed as mean $\pm$ SEM from 3 to 5 independent experiments performed in duplicate, and the results were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Low molecular weight thiols are present in high concentrations in most cells. Modification of cysteinyl residues can impart or regulate molecular functions important to cellular processes including signal transduction. In addition, in connection with the mentioned above thiol-dependent mechanism of tumor resistance, prooxidant effect of NPs in relation to thiols should be studied. There are evidences that redox action of nanoceria induces the formation of disulfide bridges in thiol-containing biomolecules [11].

We have shown that reduced GSH is the most resistant to oxidation by NPs of all the thiols studied in this work. With CeO₂ NPs as well as combining CeO₂ NPs with recyclers, significant decrease in the level of reduced GSH was noted. However, the drop in its level occurs only at sufficiently long incubation (24 hours) and only in a neutral and slightly alkaline environment (Fig. 1). Unlike nanoceria, orthovanadate NPs revealed such properties only at pH 7.8 when combining with AA.

During the oxidation of L-cysteine, much more pronounced and early effect of nanoceria was observed (Fig. 2).

In contrast to GSH oxidation, the opposite pH dependence along with different dynamics was observed during L-cysteine oxidation in the presence of CeO₂ NPs. Thus, already within 6 hours of incubation, the process was accelerated with the most pronounced effect at slightly acidic pH values with 0.238 ± 0.046 r.u., 0.317 ± 0.044 r.u., and 0.363 ± 0.076 r.u. (relative to the value at $t = 0$ hours) for pH 6.7, 7.4, and 7.8, respectively.

Under neutral conditions, at pH 7.4, a significant drop in the –SH groups of L-cysteine occurred after only 6 hours of incubation with nanoceria. However, in contrast to the process of GSH oxidation, the addition of AA inhibited the pro-oxidant effect of nanoceria at the initial stage of the experiment, which was especially noticeable with increasing concentration of AA. By 24 hours of incubation, the effect of all combinations of redox compounds with nanoceria was observed leading to almost complete oxidation of the thiol groups of L-cysteine. The effect of orthovanadate NPs on this indicator did not differ from the appropriate time control and did not change the effects of redox compounds. The most striking prooxidant effect of nanoceria on thiols when interacting with redox cyclers was found in a system containing DTT (Fig. 3).

As can be seen from the Fig. 3, the dynamics of DTT oxidation by nanoceria and orthovanadates differ. Delay of prooxidant effect by 24 hours for combinations of orthovanadate NPs with Q compared to the same effect for combination of nanoceria with Q was observed.

So, for all studied thiols the oxidation activity of nanoceria predominates, while orthovanadate NPs and their combinations were rather neutral. It also should be noted that in the absence of NPs additive effect of redox molecules was most clearly manifested for DTT oxidation, in Cys-based system it was weaker and absent in GSH-based system.

Extra-small CeO₂ (2 nm) NPs are not only capable of exhibiting a prooxidant effect to GSH even at neutral pH, which is consistent with previously obtained results [10], but also enhance the oxidation of other thiols. In contrast to nanoceria, extra-small GdYVO₄:Eu³⁺ (2nm) NPs did not exhibit a similar effect, neither to GSH (in accordance to our previous results [10]), nor to other studied thiols. However, in some cases, orthovanadate NPs exhibited prooxidant effect when combined with redox cyclers. At the same time, the effect of nanoceria and its combinations with redox compounds was more pronounced. This is especially true for combinations with the both — AA and vitamin K3 (a combination that has attracted the increased attention of oncology specialists for quite a long time and have shown high antitumor efficacy both in vitro and in vivo [20–22]).

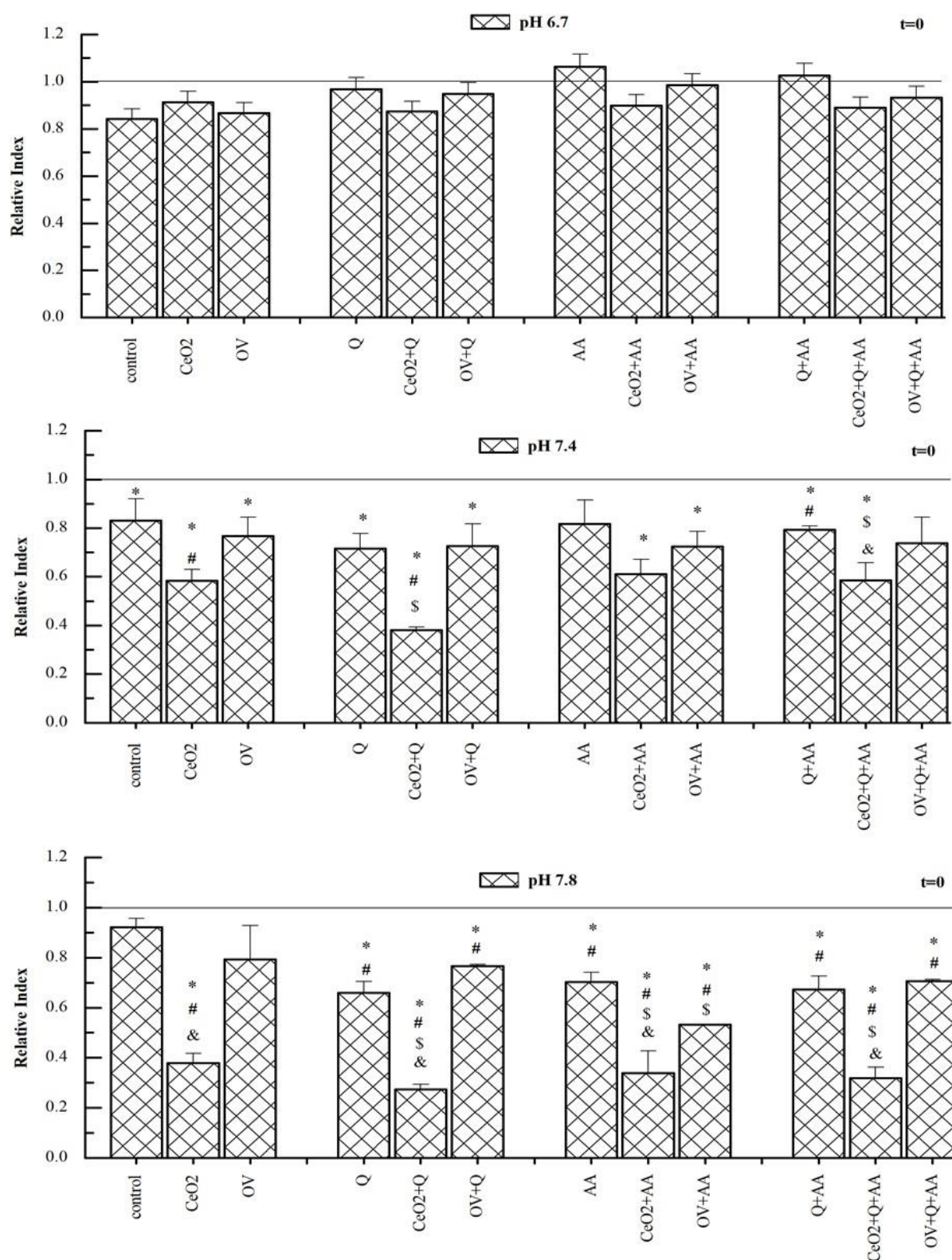


Fig. 1. Oxidation of GSH under an influence of CeO₂ and GdYVO₄:Eu³⁺ (OV) NPs within 24 hours at 37 °C and pH 6.7, 7.4, and 7.8 in the presence of 100 μM AA and vitamin K3 (Q) in different combinations.

Note:

* – significant differences compared to initial control t = 0, p < 0.05;

– significant differences compared to appropriate 24 hours control, p < 0.05;

\$ – significant differences compared to appropriate compound control, p < 0.05;

& – significant differences between CeO₂ NPs-based and GdYVO₄:Eu³⁺ (OV) NPs-based combination, p < 0.05.

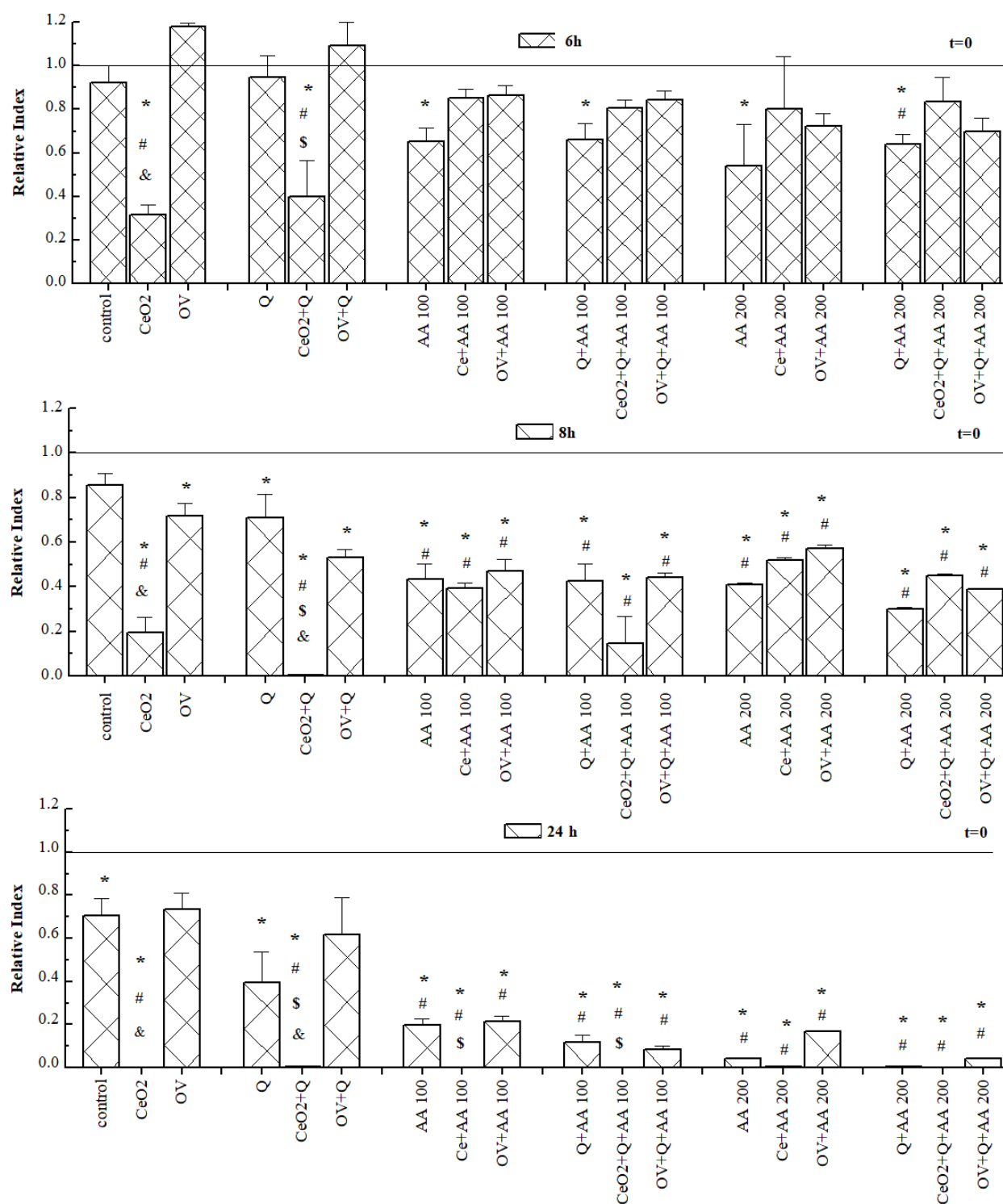


Fig. 2. Dynamics of oxidation of L-cysteine at 37 °C at pH 7.4 under the influence of CeO₂ and GdYVO₄:Eu³⁺ (OV) NPs at pH 7.4 in the presence of 100 or 200 μM AA and vitamin K3 (Q) in different combinations.

Note:

* – significant differences compared to initial control t = 0, p < 0.05;

– significant differences compared to appropriate time control, p < 0.05;

\$ – significant differences compared to appropriate compound control, p < 0.05;

& – significant differences between CeO₂ NPs-based and GdYVO₄:Eu³⁺ (OV) NPs-based combinations, p < 0.05.

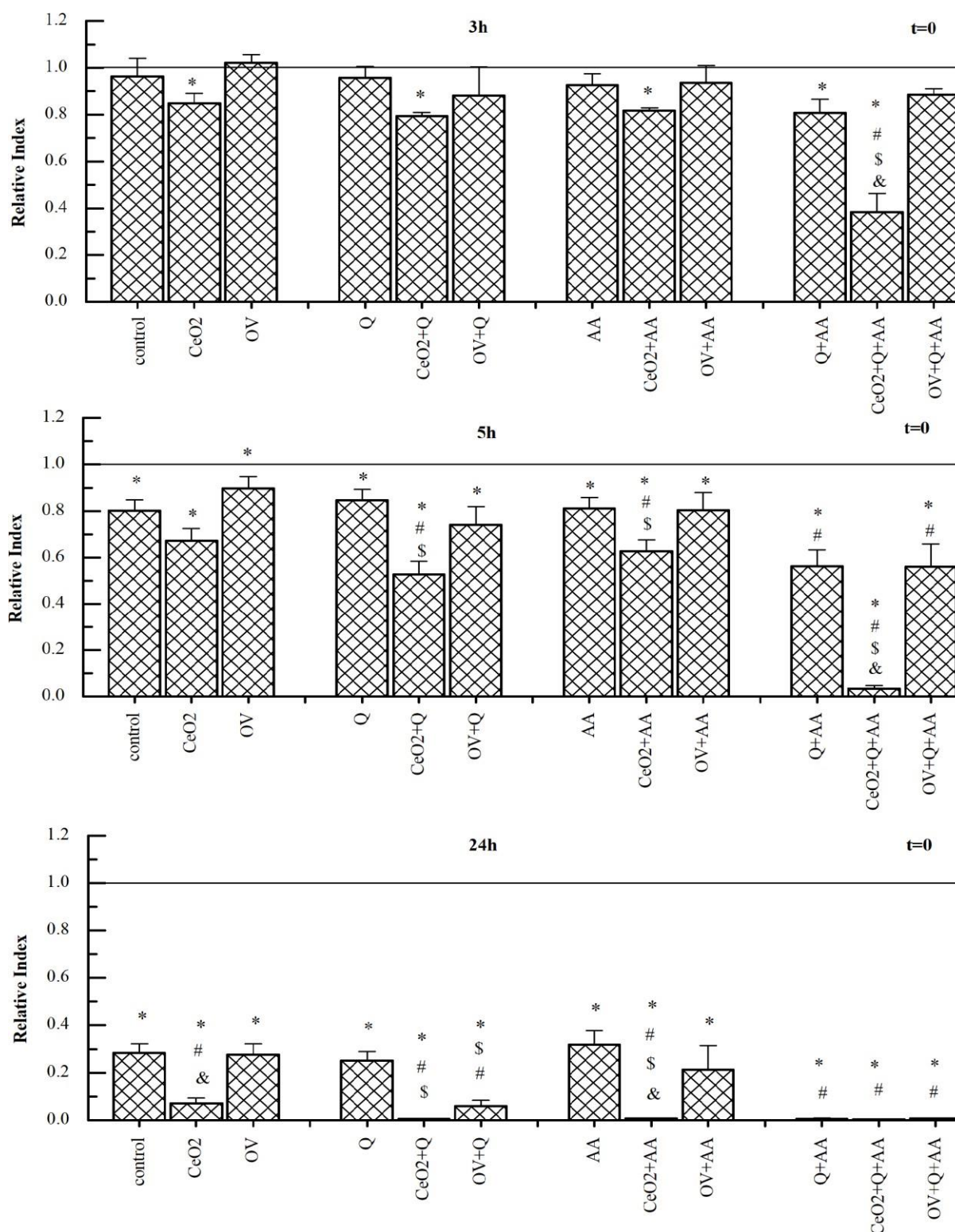


Fig. 3. Dynamics of oxidation of DTT under the influence of CeO₂ and GdYVO₄:Eu³⁺ (OV) NPs at pH 7.4 in the presence of 100 μM AA and vitamin K3 (Q) in different combinations.

Note:

* – significant differences compared to initial control t = 0, p < 0.05;

– significant differences compared to appropriate time control, p < 0.05;

\$ – significant differences compared to appropriate compound control, p < 0.05;

& – significant differences between CeO₂ NPs-based and GdYVO₄:Eu³⁺ (OV) NPs-based combinations, p < 0.05.

It can be assumed that the oxidation of thiols (as well as other low-molecular antioxidants) due to the oxidase activity of nanoceria can represent one of the specific and leading mechanisms in the disruption of the functioning of antioxidant systems of tumor cells. The increase in the oxidase-like activity of nanoceria with pH decrease, should enhance the prooxidant effect of nanoceria, on tumor cells (also evidenced by a number of studies [23, 24]), which being combined with redox cyclers, can contribute to decrease in the effectiveness of protective systems (based on low-molecular antioxidants) and thiol-dependent signaling systems of tumors stimulating the destruction of tumor cells.

At the same time, the results obtained in the work did not allow us to draw an unambiguous conclusion about an involvement of pH-dependent oxidase-like activity of nanoceria in the direct oxidation of natural monothiols. Indeed, an increase in the prooxidant properties of NPs (first of all, of nanoceria) with pH decrease enhanced by the presence of redox cyclers is well known. However, in the thiol-containing model system, the pH dependence is not so straightforward. On the one hand, the literature data on higher stability of GSH in more acidic environment are verified. We have shown an increase in GSH oxidation with pH increase only during prolonged incubation (24 hours), which indicates high thiol stability. However, in the cysteine-containing system, faster thiol oxidation (within 6 hours) and opposite pH dependence of CeO₂ NPs prooxidant effect (with slight increase for weakly-acidic pH) was detected. Differences in the results obtained for different thiols can be explained both by steric effects and possible difference in the values of the dissociation constants of sulfhydryl groups: pK_a = 8.36 for L-cysteine, and 9.2 for GSH. In addition, although there are data on the oxidase activity of vanadium NPs in relation to GSH [25], as well as on the binding and oxidation of sulfhydryl groups on the surface of nanoceria [11], these thiols are not convenient substrates for the oxidase-like reaction of the NPs. At the same time, easily autooxidizable substances such as AA or polyphenols capable of forming mono- and bidentate bonds on the surface of NPs [26] can be oxidized via the oxidase-like mechanism not only at acidic ~ pH 5, but also at slightly acidic and neutral pH [27, 28] that can indirectly trigger the response of the thiol disulfide system in cells.

CONCLUSIONS

Thus, the results obtained are consistent with our earlier data on the ability of nanoceria to oxidize low molecular weight antioxidants, including AA, NADPH, and GSH [10]. In this work, a more detailed analysis of the prooxidant effect of cerium dioxide NPs in comparison with orthovanadate NPs in relation to mono- and dithiols was carried out. The pro-oxidant effect of nanoceria was detected for all the studied thiols; GSH demonstrated the highest stability, and for DTT the combined pro-oxidant effect of nanoceria with redox cyclers was most pronounced.

A study of L-cysteine oxidation confirmed higher prooxidant activity of nanoceria and nanoceria-based combinations with redox cyclers in comparison with orthovanadate-based ones. In addition, a slight increase of CeO₂ NPs prooxidant effect in weakly-acidic pH was detected. In this system the combination of nanoceria with Q demonstrated the highest effectiveness. Though the presence of AA in the system reduced the cysteine oxidation efficiency of nanoceria on the early stages of the process, but an increase of pro-oxidant effect was found for all CeO₂-based combinations for 24 hours of incubation. Prooxidant effects of orthovanadate NPs in combination with redox cyclers are delayed and observed only at the late stages of the experiment.

Although in the current model we were not able to show a pronounced pH-dependent enhancement of the oxidative effect of nanoceria, with respect to thiols, it is not excluded that NPs and their combinations with redox cyclers can influence GSH pathways in cancer cells involving other cytotoxicity mechanisms, which require further investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by National Research Foundation of Ukraine, Grant № 2023.03/0050.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

Authors' ORCID ID

N. S. Kavok  <https://orcid.org/0000-0002-2429-2832>
 G. V. Dudetskaya  <https://orcid.org/0000-0003-2863-4788>
 V. V. Seminko  <https://orcid.org/0000-0002-3958-9161>
 P. O. Maksimchuk  <https://orcid.org/0000-0001-5448-1274>
 V. K. Klochkov  <https://orcid.org/0000-0002-8080-1195>
 Y. H. Kot  <https://orcid.org/0000-0003-2591-4098>
 Yu. V. Nikitchenko  <https://orcid.org/0009-0001-9075-1179>
 O. O. Sedyh  <https://orcid.org/0009-0004-2136-5209>

REFERENCES

1. Li J, Zuo X, Cheng P, Ren X, Sun S, Xu J, et al. The production of reactive oxygen species enhanced with the reduction of menadione by active thioredoxin reductase. *Metallomics*. 2019;11(9):1490–97. <https://doi.org/10.1039/c9mt00133f>
2. Chaiswing L, St Clair WH, St Clair DK. Redox paradox: a novel approach to therapeutics-resistant cancer. *Antioxid Redox Signal*. 2018;29(13):1237–72. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7485>
3. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(7):579–91. <https://doi.org/10.1038/nrd2803>
4. Khramtsov VV, Gillies RJ. Janus-faced tumor microenvironment and redox. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(5):723–9. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5864>
5. Wondrak GT. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(12):3013–69. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2541>
6. Delwar ZM, Avramidis D, Follin E, Hua Y, Siden A, Cruz M, et al. Cytotoxic effect of menadione and sodium orthovanadate in combination on human glioma cells. *Invest New Drugs*. 2012;30(4):1302–10. <https://doi.org/10.1007/s10637-011-9680-y>
7. Jamison JM, Gilloteaux J, Nassiri MR, Venugopal M, Neal DR, Summers JL. Cell cycle arrest and autophagy in a human bladder carcinoma cell line following vitamin C and vitamin K3 treatment. *Biochem Pharmacol*. 2004;67(2):337–51. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.08.040>
8. Jeyachandran S, Srinivasan R, Ramesh T, Parivallal A, Lee J, Sathiyamoorthi E. Recent development and application of "Nanozyme" Artificial Enzymes-A Review. *Biomimetics (Basel)*. 2023;8(5):446. <https://doi.org/10.3390/biomimetics8050446>
9. Nikitchenko YV, Klochkov VK, Kavok NS, Averchenko KA, Karpenko NA, Nikitchenko IV, et al. Anti-aging effects of antioxidant rare-earth orthovanadate nanoparticles in Wistar rats. *Biol Trace Elem Res*. 2021;199:4183–92. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02531-y>
10. Kavok N, Klochkov V, Nikitchenko Yu, Sedyh O, Dudetskaya G, Kot Yu, et al. Exposure of prooxidant potential of CeO₂ and GdYVO₄/Eu³⁺ nanoparticles in model systems containing low-molecular antioxidants. In 2023 IEEE 13th International Conference "Nanomaterials: Applications & Properties (NAP)"; 2023 September 10–15; Bratislava, Slovakia: IEEE; 2023. p. NRA11-1-NRA11-4. <https://doi.org/10.1109/NAP59739.2023.10310986>
11. Rollin-Genetet F, Seidel C, Artells E, Auffan M, Thiéry A, Vidaud C. Redox reactivity of cerium oxide nanoparticles induces the formation of disulfide bridges in thiol-containing biomolecules. *Chem Res Toxicol*. 2015;28(12):2304–12. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00319>
12. Pešić M, Podolski-Renić A, Stojković S, Matović B, Zmejkoski D, Kojić V, et al. Anti-cancer effects of cerium oxide nanoparticles and its intracellular redox activity. *Chem Biol Interact*. 2015;232:85–93. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.03.013>
13. Goltsev AN, Babenko NN, Gaevskaya YA, Bondarovich NA, Dubrava TG, Ostankov MV, et al. Nanotechniques inactivate cancer stem cells. *Nanoscale Res Lett*. 2017;12(1):415. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2175-9>

14. Klochkov VK, Malysenko AI, Sedykh OO, Malyukin YV. Wet chemical synthesis and characterization of luminescent colloidal nanoparticles: $\text{ReVO}_4\cdot\text{Eu}^{3+}$ (Re = La, Gd, Y) with rod-like and spindle-like shape. *Funct Mater.* 2011;18(1):111–5. <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/135437>
15. Klochkov VK, Grigorova AV, Sedyh OO, Malyukin YV. The influence of agglomeration of nanoparticles on their superoxide dismutase-mimetic activity. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 2012;409:176–82. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.06.019>
16. Bates JT, Fang T, Verma V, Zeng L, Weber RJ, Tolbert PE, et al. Review of acellular assays of ambient particulate matter oxidative potential: methods and relationships with composition, sources, and health effects. *Environ Sci Technol.* 2019;53(8):4003–19. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03430>
17. Charrier JG, Anastasio C. On dithiothreitol (DTT) as a measure of oxidative potential for ambient particles: evidence for the importance of soluble transition metals, *atmos. Chem. Phys.* 2012;12:9321–33. <https://doi.org/10.5194/acp-12-9321-2012>
18. Juchau MR, Fantel AG, Harris C, Beyer BK. The potential role of redox cycling as a mechanism for chemical teratogenesis. *Environ. Health Perspect.* 1986;70:131–36. <http://doi.org/10.2307/3430349>
19. Elman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82(1):70–7. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
20. Bakalova R, Semkova S, Ivanova D, Zhelev Z, Miller T, Takeshima T, et al. Selective targeting of cancerous mitochondria and suppression of tumor growth using redox-active treatment adjuvant. *Oxid Med Cell Longev.* 2020; Article ID 6212935, 30 pages. <https://doi.org/10.1155/2020/6212935>
21. Semkova S, Zhelev Z, Miller T, Sugaya K, Aoki I, Higashi T, et al. Menadione/ascorbate induces overproduction of mitochondrial superoxide and impairs mitochondrial function in cancer: comparative study on cancer and normal cells of the same origin. *Anticancer Research.* 2020;40(4):1963–72. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14151>
22. Sumiyoshi A, Shibata S, Lazarova D, Zhelev Z, Aoki I, Bakalova R. Tolerable treatment of glioblastoma with redox-cycling ‘mitocans’: a comparative study in vivo. *Redox Report.* 2023;28(1), 2220531. <https://doi.org/10.1080/13510002.2023.2220531>
23. Amaldoss MJN, Mehmood R, Yang J L, Koshy P, Kumar N, Unnikrishnan A. Anticancer therapeutic effect of cerium-based nanoparticles: known and unknown molecular mechanisms. *Biomater. Sci.* 2022;10(14):3671–94. <https://doi.org/10.1039/D2BM00334A>
24. Datta A, Mishra S, Manna K, Saha KD, Mukherjee S, Roy S. Pro-oxidant therapeutic activities of cerium oxide nanoparticles in colorectal carcinoma cells. *ACS Omega.* 2020;5(17):9714–23. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b04006>
25. Lu H, Xiang Z, Ren Q. Sensitive and highly selective biosensor based on innovative V_2O_5 nanoparticles for detection of glutathione. *Asia-Pac J Chem Eng.* 2024;19(4):e3081. <https://doi.org/10.1002/apj.3081>
26. Luna-Velasco A, Field JA, Cobo-Curiel A, Sierra-Alvarez R. Inorganic nanoparticles enhance the production of reactive oxygen species (ROS) during the autooxidation of l-3,4-dihydroxyphenylalanine (l-dopa). *Chemosphere.* 2011;85(1):19–25. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.053>
27. Hayat A, Andreescu D, Bulbul G, Andreescu S. Redox reactivity of cerium oxide nanoparticles against dopamine. *J Colloid Interface Sci.* 2014;418:240–45. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.12.007>
28. Othman A, Norton L, Finny AS, Andreescu S. Easy-to-use and inexpensive sensors for assessing the quality and traceability of cosmetic antioxidants. *Talanta.* 2020;208:120473. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120473>

ВПЛИВ РЕДОКС-АКТИВНИХ МОЛЕКУЛ НА ОКИСНЕННЯ ТІОЛІВ У ПРИСУТНОСТІ НАНОЧАСТИНОК

Н. С. Кавок¹ , Г. В. Дудецька^{1*} , В. В. Семінко¹ , П. О. Максимчук¹ ,
В. К. Клочков¹ , Ю. Г. Кот² , Ю. В. Нікітченко¹ , О. О. Сєдих¹ 

¹Інститут сцинтиляційних матеріалів НТК «Інститут монокристалів» НАН України, пр. Науки, 60, Харків, 61072, Україна;

²Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, м. Харків, 61022, Україна
e-mail: gdudetska@gmail.com

Надійшла до редакції 25 вересня 2024 р. Переглянута 2 квітня 2025 р.

Прийнята до друку 6 квітня 2025 р.

Актуальність. Високі рівні АФК (активних форм кисню) пухлинних клітин роблять їх більш чутливими до окислювального стресу порівняно з нормальними клітинами. Таким чином, утворення додаткових АФК може призвести до загибелі ракових клітин. Окислювально-відновний цикл є ключовим процесом, відповідальним за виробництво АФК різними медичними та експериментальними протипухлинними агентами. Серед цих сполук — хінони та аскорбінова кислота, яка виявляє синергічний протипухлинний ефект. Підвищені рівні глутатіону та

глутатіонзалежні антиоксидантні ферменти відіграють ключову роль у захисті ракових клітин від внутрішньоклітинного окисного стресу. Наночастинки зі властивостями виснаження глутатіону можуть діяти як інтелектуальні хіміодинамічні агенти, які порушують систему антиоксидантного захисту клітин. У даній роботі неорганічні наночастинки на основі рідкоземельних елементів використовуються як каталітичні підсилювачі одноелектронного переносу з утворенням органічних і кисневих радикалів в окисно-відновних циклах аскорбінової кислоти та вітаміну К3.

Мета роботи. Вивчити динаміку окиснення тіолів у присутності наночастинок у поєднанні з редокс-активними молекулами.

Матеріали та методи. Як індикатор прооксидантної ефективності наночастинок (CeO_2 (2 нм, 20 мкг/мл) або $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (2 нм, 20 мкг/мл)) у поєднанні з органічними сполуками (аскорбінова кислота (100 або 200 мкМ) та вітамін К3 (4 мкМ)) використовували зміни рівня тіолів (глутатіону (200 мкМ), L-цистеїну (200 мкМ) або дитіотреїтолу (500 мкМ)) у модельній системі.

Результати. Показано, що наночастинки $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ та CeO_2 підсилюють окиснення тіолів під впливом кожної редокс-активної молекули, а також їх комбінації. Ефективність наноцерію, а також комбінацій редокс-активних молекул, була вищою порівняно з відповідними комбінаціями наночастинок ортованадату (включаючи часову динаміку), що було особливо виражено в системі окиснення дитіотреїтолу.

Висновки. Отримані дані свідчать про здатність наноцерію суттєво посилювати окиснення тіолів, індуковане редокс-активними молекулами, що розкриває перспективність цього підходу у вирішенні проблеми підвищеного рівня тіолів у пухлинних клітинах.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: наночастинки CeO_2 ; наночастинки $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$; тіоли; аскорбінова кислота; пухлинні клітини.

Original article<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-02>

UDC 57.086.1:612.61:577.3

EFFECTS OF CRYOPROTECTIVE AGENTS ON OSMOTIC TOLERANCE LIMIT OF TESTICULAR INTERSTITIAL CELLS**O. V. Pakhomov¹, Y. O. Posokhov^{2,3}, N. Ye. Volkova⁴, N. A. Chernobai¹,
G. A. Bozhok¹**¹*Institute for problems of cryobiology and cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Pereyaslavskaya St., 61016, Kharkiv, Ukraine;*²*Department of Organic Chemistry, Biochemistry, Paints and Coatings, The National Technical University "Kharkiv Polytechnic Institute", 2 Kyrpychova St, 61000, Kharkiv, Ukraine;*³*Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Kharkiv National Medical University, 6 Trinklera St., 61022, Kharkiv, Ukraine;*⁴*Genetics and Cytology Department, V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., 61022, Kharkiv, Ukraine**e-mail: aleksandr.pakhomov2017@gmail.com*

Submitted February 13, 2025; Revised April 15, 2025;

Accepted April 24, 2025

Background: Cryopreservation is a multistep process, which includes stages affecting biological material mechanically, osmotically and toxically. The use of cryopreservation of biological materials is cost-effective and affording long-term storage at cryogenic temperatures. It also guarantees the stability of the genetic component of cells and reduced contamination of the biological material.

Objectives: The objective of the research is to evaluate the effects of cryoprotective agents (CPAs) (dimethyl sulfoxide (DMSO), dextran (D40), hydroxyethyl starch, polyethylene glycols (PEG1500 and PEG400), and fetal bovine serum) and their combinations on the interconnection between the osmotic tolerance of testicular interstitial cells (ICs) and cryoprotection.

Materials and Methods: The osmotic tolerance limit (OTL) of ICs and the toxic effect of the CPA were investigated in the phosphate buffer saline based media of different osmolarities: isosmotic (300 mOsm), hypo-osmotic (225 mOsm), hyperosmotic (600 mOsm). Similar osmotic conditions can develop during cryopreservation of cells in the temperature interval from +4 to -30 °C.

Results: The indicators of cell survival after incubation in the media differed depending on osmolarities of incubation media. They were compared with the indicators obtained after cooling ICs to -30 °C followed by warming and CPA removal. We have shown that the non-toxic additive D40 increased the OTL of ICs in hypo-osmotic medium and decreased negative effects of DMSO on the cells. These effects were accompanied by high indicators of ICs survival obtained after cooling ICs to -30 °C with 100 mg/ml D40 and 0.7 M DMSO.

Conclusions: These results unveil the mechanisms of cryoprotection of 0.7DMSO+D40 and partially explain the superiority of 0.7DMSO+D40 media shown in our previous works compared with other investigated media. Understanding the mechanisms of cryodamage and cryoprotection of 0.7DMSO+D40 paves a way toward the development of new serum-/xeno-free cryoprotective compositions and improvement of cryopreservation protocols for cell suspensions that include many types of cells. Further studies are required to reveal the effects of DMSO on membranes and intracellular metabolic processes.

KEY WORDS: osmotic tolerance; toxicity; dimethyl sulfoxide; dextran; hydroxyethyl starch; polyethylene glycol; mechanisms of cryoprotection.

Citation: Pakhomov OV, Posokhov YO, Volkova NYe, Chernobai NA, Bozhok GA. Effects of cryoprotective agents on osmotic tolerance limit of testicular interstitial cells Biophysical Bulletin. 2025;53:18–33. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-02>

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

Preservation of living cells is a central technology that brings cell-based products to market on-demand. The use of cryopreservation of biological materials is cost-effective and affording long-term storage at cryogenic temperatures. It also guarantees the stability of genetic content of cells and reduced contamination of the biological material [1]. Our previous works were devoted to the development of serum-/xeno-free cryoprotective compositions for testicular interstitial cells (ICs) and to investigation of the mechanisms of their cryoprotective effects [2]. The biological material of ICs is an example of a cellular suspension, which includes different types of cells: Leydig cells and cells of the immune system. Such cellular suspensions can be used for the creation of germplasm banks, for preservation of endangered species, breeds and lines, as well as in reproductive technologies [3–7]. The use of cryoprotective media that include combinations of cryoprotective agents (CPAs) was shown to be relevant for cellular suspensions consisting of different types of cells [8]. Moreover, the development of serum-/xeno-free cryoprotective compositions may help to avoid problems connected with the use of serum such as transmission of infections to the biological material and instability of composition of cryoprotective media from batch-to-batch [9–11]. We have shown that a serum-free medium that included 0.7 M DMSO and 100 mg/ml dextran (M.m. 40 kDa) (0.7DMSO+D40) had an exceptional property for preservation of ICs. Some indicators of ICs survival were even higher than in the best serum-containing media that was supplemented with 1.4 M DMSO and 10% fetal bovine serum (FBS). If D40 was replaced by other polymeric compounds, such as hydroxyethyl starch (HES), polyethylene glycol (PEG), polyvinylpyrrolidone, the cryopreservation of IC was less effective (with HES) or non-effective (with PEG). 0.7DMSO+D40 was able to suppress intracellular crystallization, salt eutectic crystallization/melting and recrystallization [12]. The medium promoted amorphous phase formation and changed the shape and size of water crystals in a way that increased IC survival [2, 13]. However, the osmotic effects of the cryoprotective additives and their cytotoxicity were less explored.

Cryopreservation is a multistage process, which includes isolation of cells, addition of cryoprotective media, cooling, storage, warming, removal of cryoprotective media, and recovery of biological material. Any of the mentioned stages can contribute to a loss of cells. Addition of CPAs before cooling and their removal after warming can cause damaging cell volume excursions [14]. CPA addition as well as extracellular crystallization result in the formation of a hyperosmotic environment that causes cell shrinkage. The shrinkage itself can be damaging as it leads to membrane deformations, stresses, loss of integrity, increased permeability to extracellular ions, distorted interaction of the membrane and cytoskeleton [15, 16], and cell surface loss [14, 17–19]. On warming and CPA removal cells can swell. The swelling can cause membrane rupture, especially, if cooling was accompanied by the influx of normally extracellular ions into the cells and/or the membrane surface reduction [18, 20, 21]. Of note, the processes generally occur in the temperature interval from positive temperature to about -30 °C and this is the temperature interval where main bulk water crystallization/melting takes place [13]. The safety range of cell volume excursions is known as the OTL [14]. The plasma membrane damage is a stochastic phenomenon affecting a variable number of cells but allowing others to survive the expansion [22]. The osmotic injury is difficult to separate from the cytotoxic influence of CPA, which includes physical and chemical interaction of CPA with membranes, cytoskeleton and other cellular components. DMSO, for example, can interact with the membrane phospholipids and reduce membrane thickness [23], or promote the formation of pores [24]. Obviously, such DMSO effects will affect the OTL of the cells.

We supposed that, if the above-mentioned cryoprotective compositions differed by the type of additives, which resulted in different cryopreservation outcomes, they would also influence the osmotic tolerance of cells in hypo- and hyperosmotic conditions and their ability to

withstand different concentration of DMSO. If so, the cells' ability to survive during cryopreservation with the cryoprotective media could be partially explained by the stabilizing effect of the additives on the membrane integrity and their effect on DMSO cytotoxicity. Thus, we have investigated indicators of cell survival in hypo- and hyperosmotic conditions, showed the effect of additive on the indicators, and matched the data with the survival of cells after cooling to -30 °C. The chosen indicators of cells survival are the general cell survival, which reflected the number of cells whose membranes did not rupture, and the preservation of metabolic activity that, in addition, helped indicate the integrity of internal cellular processes and cellular structures after interaction with components (DMSO and polymers) of investigated solution. The objective of the research is to evaluate the effects of DMSO, polymers and serum on the interconnection between the OTL of ICs and cryoprotection.

MATERIALS AND METHODS

Testicular interstitial cell isolation

Interstitial cells were isolated from male Wistar rats. These animals were kept in the animal house of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv). The experimental protocols followed the Guide for Care and Use of Laboratory Animals. They were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine. The isolation was generally done as described [25]. Briefly, mature male rats were killed by cervical dislocation. Then, their bodies were sterilized by immersion in 75% ethanol for 5 min. Their testes were isolated and decapsulated. Blood vessels were trimmed. The content of the testes was placed in 15-mL centrifuge tubes with 4 ml of 0.2 mg/mL collagenase (type I) (Sigma-Aldrich, USA) and 0.1 mg/mL DNase I (Sigma-Aldrich, USA) in DMEM F12 (Biowest, France) for 15 min. The tubes were transferred to a thermostatic shaking water bath for 10 min (90 cycles/min, 34 °C). After that, 10 ml of pure precooled (+4 °C) PBS (300 mOsm) were added to each tube. Thus, the seminiferous tubule mass was obtained. It was filtered through a doubled 100-µm nylon mesh. The seminiferous tubules were discarded whereas the filtrates were centrifuged at 325 g for 3 min. The supernatants were discarded when the pellets were collected and resuspended in 10 mL PBS. The sedimentation operation was repeated. The concentration of ICs was adjusted to 4×10^7 cells/mL by PBS. If ICs were supposed to be cooled, DMEM F12 was added to the pellet instead of PBS after the last centrifugation and cell concentration adjustment was done with DMEM F12.

Osmotic tolerance limit measurements

The effects of DMSO, D40, HES, PEG1500, PEG400, FBS on the OTL of ICs were measured in the phosphate buffer saline (PBS) of different osmolarities: 225 (hypo-osmotic PBS), 300 (isosmotic PBS), 600 mOsm (hyperosmotic PBS). The PBSs were additionally supplemented with 0.7 M DMSO and/or one of the above-mentioned polymers (D40, HES, PEG1500, PEG400). Alternatively, the PBSs were added with 1.4 M DMSO and/or 10% (v/v) FBS. The stock solutions of DMSO, polymers and FBS in PBS were prepared in a way that, on mixing with IC suspension (1:1), gave their mentioned final concentrations and osmolarities. Therefore, the final concentration of cells supposed to be incubated also dropped to 2×10^7 cells/mL. The cells were then incubated for 40 min at 4 °C. The incubation media were replaced with isosmotic PBS by gradual dilution: five aliquots of PBS (200 µL) were added every 30 seconds to 1 ml of ICs, followed by addition of two 500 µL- and three 1 mL-aliquots. The cells were centrifuged at 325 g for 3 min and the supernatant was discarded. 5 mL of PBS was added and the procedure of sedimentation and supernatant removal was repeated again. After the last

centrifugation, the pellet was diluted with DMEM F12 to 1 ml. Finally, the indicators of cell survival: general cell survival and preservation of metabolic activity of cells were assessed.

Cooling/warming

The cryopreservation media were prepared similarly to the incubation media for the OTL measurements, however, DMEM F12 medium was used instead of PBSs as a basic solution. ICs were added to the cryopreservation media (1:1) in 1.8-mL cryocontainers (Nunk, Denmark) to reach the final concentration just before cooling. The final volume of cell suspension, thus, came to 1 mL and the concentration of ICs was 2×10^7 cells/mL. The cryocontainers were placed into the programmable freezer and cooled to $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ at a rate of $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. A copper-constantan thermocouple was used to detect the temperature in the control sample. Once the final temperature was reached, the samples were kept at the set temperature of $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the freezer chamber for 7 minutes to reach the required final temperature. When the final temperature was reached, the cryocontainers were transferred to a water bath at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ and warmed. The samples were kept in a water bath until the crystalline phase disappeared. The cryopreservation media were replaced with isosmotic PBS by gradual dilution as described above for the OTL measurements. The indicators of cell survival were measured.

General cell survival and preservation of metabolic activity measurements

A hemocytometer chamber was used for counting of ICs. The general cell survival was determined as a ratio of the number of all cells in a sample after incubation (or cryopreservation) to the number of cells before incubation (or cryopreservation) multiplied by 100%.

IC metabolic activity was determined after incubation or cryopreservation as described [2]. Briefly, 50 μL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, USA) solution in PBS (5 mg/mL) was added to 500 μL of the IC suspension after incubation or cryopreservation. After that, the cells were incubated for 2 h at $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Then, ICs were sedimented at 325 g for 3 min. The supernatant was discarded. 450 μL of DMSO was added to the stained pellet and the samples were stirred. The samples were centrifuged after 5 minutes. The optical density of the supernatants was measured at 530 nm. The samples containing no cells were used as a reference. Metabolic activity preservation was expressed as the ratio of the optical density of a sample after incubation or cryopreservation to the optical density of a sample before incubation or cryopreservation multiplied by 100%.

Fluorescence measurements

For the spectrofluorometric analysis, ICs after incubation or cryopreservation with DMSO, followed by its removal, were placed in DMEM F12. The number of cells was adjusted to 2×10^6 cell/ml by diluting the cells with DMEM F12. A 50 μL -aliquot of probe O1O (synthesized in the Institute for Single Crystals, National Academy of Science, Kharkiv, Ukraine – [26]) stock solution in acetonitrile was added to 1 mL of ICs. The final probe concentration was 5×10^{-6} M. Then, the samples were incubated with the probe at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (room temperature) for 40 minutes before fluorescence measurements with spectrometer “PerkinElmer FL8500”. Probe O1O emission was measured in the range of 340–550 nm, with an increment of 0.1 nm, the emission scan speed of 240 nm/min, the excitation wavelength of 330 nm, the excitation and emission slits of 5 nm.

The membrane location of fluorescent probe O1O: the area of glycerol backbones of phospholipids closer to the center of the lipid bilayer, the area of carbonyl groups of phospholipids and the area of hydrocarbon chains of phospholipids near the area of the carbonyl groups of phospholipids of the lipid membrane [27]. In the excited electronic state, the initial form of the probe (or so-called “normal” form: N^* -form) converts into photoproduct - tautomer

form (T^{*}-form) [28, 29]. The phototautomer has a long-wavelength fluorescence band, while the initial form of the probe emits in significantly shorter wavelengths [30]. The amount of the formed phototautomeric form depends on the physico-chemical properties of the probe microenvironment [28, 29]. Probe O1O has two-band fluorescence, hence, the ratiometric measurements are possible: T^{*}-form fluorescence intensity-to-N^{*}-form fluorescence intensity ratio can be used as a parameter. For instance, the I_{T^{*}}/I_{N^{*}} ratio increases when the polarity and/or hydrogen-bonding ability of the probe microenvironment decreases.

The fluorescence intensity in arbitrary units versus emission wavelength, were processed with Origin 2018 (OriginLab Corporation, Northampton, MA 01060, USA) and normalized with respect to native cells in pure DMEM F12. The fluorescence intensities of T^{*}- and N^{*}-form were detected at 480 and 390 nm, respectively, and used for the calculation of the actual values of the I_{T^{*}}/I_{N^{*}} ratio. The changes in the actual values of I_{T^{*}}/I_{N^{*}} were normalized to the samples without DMSO containing native cells.

Statistical analysis

Data were represented as a median, 25th percentile, 75th percentile, maximum and minimum. The minimal number of repetitions for each measurement was six. The data were ranked before the Newman–Keuls was used to reveal the differences between several groups and $p \leq 0.05$ was considered significant. The Dunnett's test was used to compare the samples having additives with samples incubated in pure PBS.

RESULTS AND DISCUSSION

Incubation in isotonic conditions

Incubation of ICs with D40, HES or FBS did not result in the significant cell loss (Fig. 1A) comparatively to PBS samples. Incubation with D40 or FBS also did not change the percentage of metabolically active cells in the samples (Fig. 1B), while in samples incubated with HES we observed significantly lower metabolic activity contrary to PBS variant. However, 0.7 and 1.4 M DMSO as well as their combinations with other additives lowered the indicators significantly. Interestingly, the presence of PEG400 in the media containing 0.7 M DMSO further decreased indicators of cell survival. Apart from PEG400, PEG1500 was less damaging to IC but its use with DMSO in 0.7DMSO+PEG1500 essentially decreased the metabolic activity of the samples (Fig. 1B) when the general cell survival was elevated compared with the sample containing DMSO only (Fig. 1A). 0.7DMSO+D40 and 0.7DMSO+HES had the same indicators of metabolic activity as the sample with 0.7 M DMSO but their indicators of general cell survival tended to be even higher (Fig. 1A and B).

Incubation in hypotonic conditions

Incubation in hypotonic PBS (225 mOsm) negatively affected both indicators of cell survival compared with correspondent solutions based on 300 mOsm PBS (Fig. 2A, Fig. 2B). The indicators of cell survival did not decrease in pure 300 mOsm PBS but 225 mOsm PBS lowered general cell survival and metabolic activity by about 65 and 50 % respectively. One exception is the PBS solution supplemented with PEG1500 where a slight increase was observed. However, D40 as well as PEG1500 significantly increased the metabolic activity in the samples compared with pure PBS (225 mOsm) (Fig. 2B). Typically, DMSO lowered the general cell survival (Fig. 2A) but addition of any polymer or FBS positively changed the indicators (Fig. 2A, Fig. 2B). Interestingly, the general cell survival in 0.7DMSO+D40 was even higher than in pure PBS (225 mOsm) (Fig. 2A). The metabolic activity of all 0.7 M DMSO containing media with/without polymers was comparable to pure PBS (except the significant

reduction in 0.7DMSO+PEG400), while the use of 1.4 M DMSO led to considerable inhibition of metabolic activity.

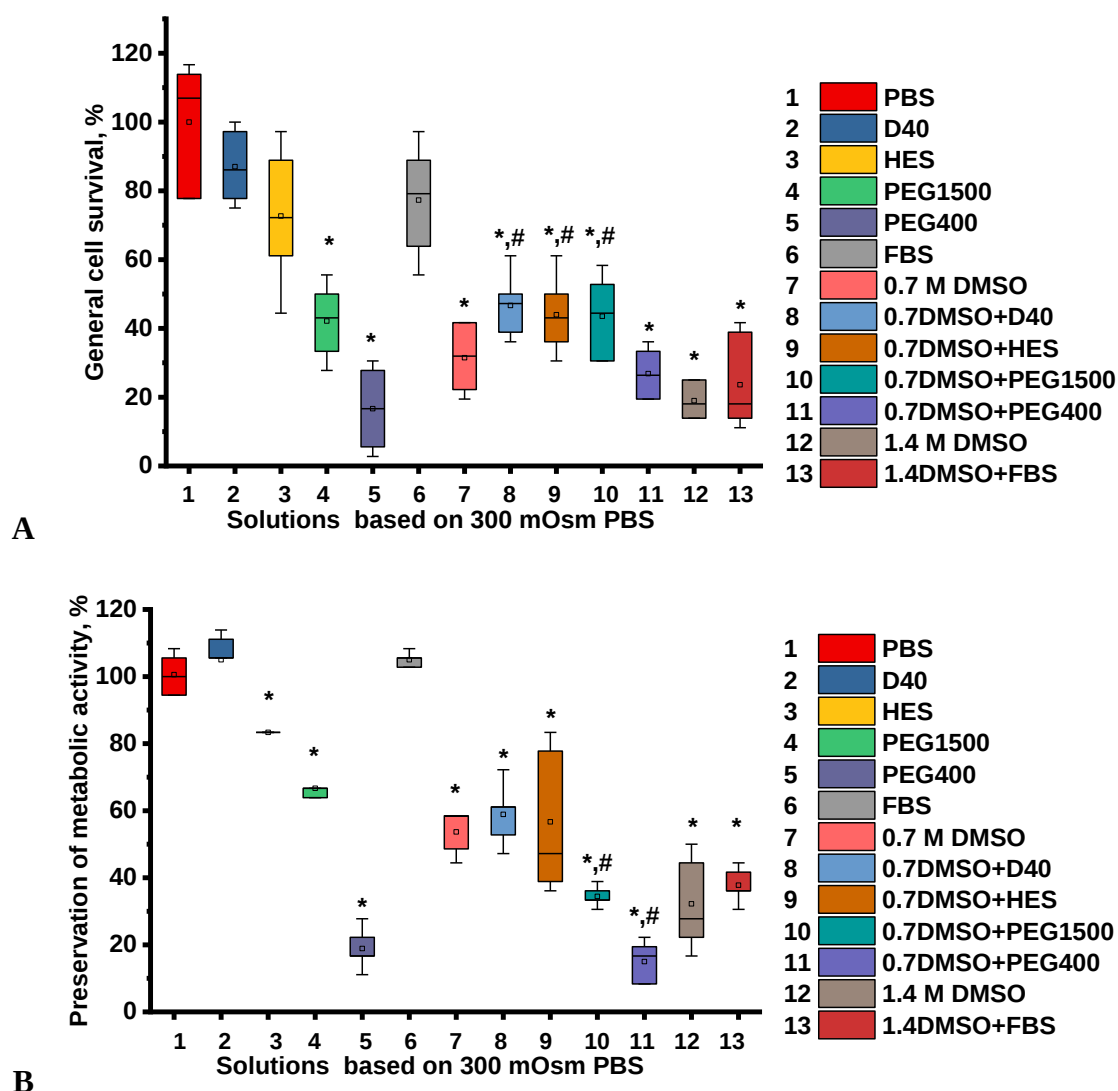


Figure 1. Indicators of IC survival after incubation in 300 mOsm PBS supplemented with DMSO and/or polymers or FBS: (A) general cell survival; (B) preservation of metabolic activity.

* – the indicators of cell survival were statistically different from pure PBS (300 mOsm) ($p \leq 0.05$);

– the indicators of cell survival were statistically different from polymer- and serum-free PBS having the same DMSO concentration ($p \leq 0.05$).

Hypertonic conditions

The media based on 600 mOsm PBS also lowered indicators of general cell survival and their metabolic activity in most samples compared to the media based on isosmotic PBS (300 mOsm) by 40 and 20 % respectively (Fig. 3A, Fig. 3B). Polymers in the medium lowered either one or another indicator of cell survival (or both), except D40. 0.7DMSO alone had no effect neither on cell survival nor on metabolic activity (Fig.3A, Fig.3B) as well as its combination with D40, but 1.4 DMSO reduced both indicators significantly (Fig.3A, Fig.3B) compared to pure PBS (600 mOsm). PEG400 and FBS did not improve the outcome of incubation with DMSO, although FBS alone did not decrease the indicators of IC survival. It should be mentioned that PEG400 had the most prominent negative effect if both indexes are analyzed in hypertonic conditions.

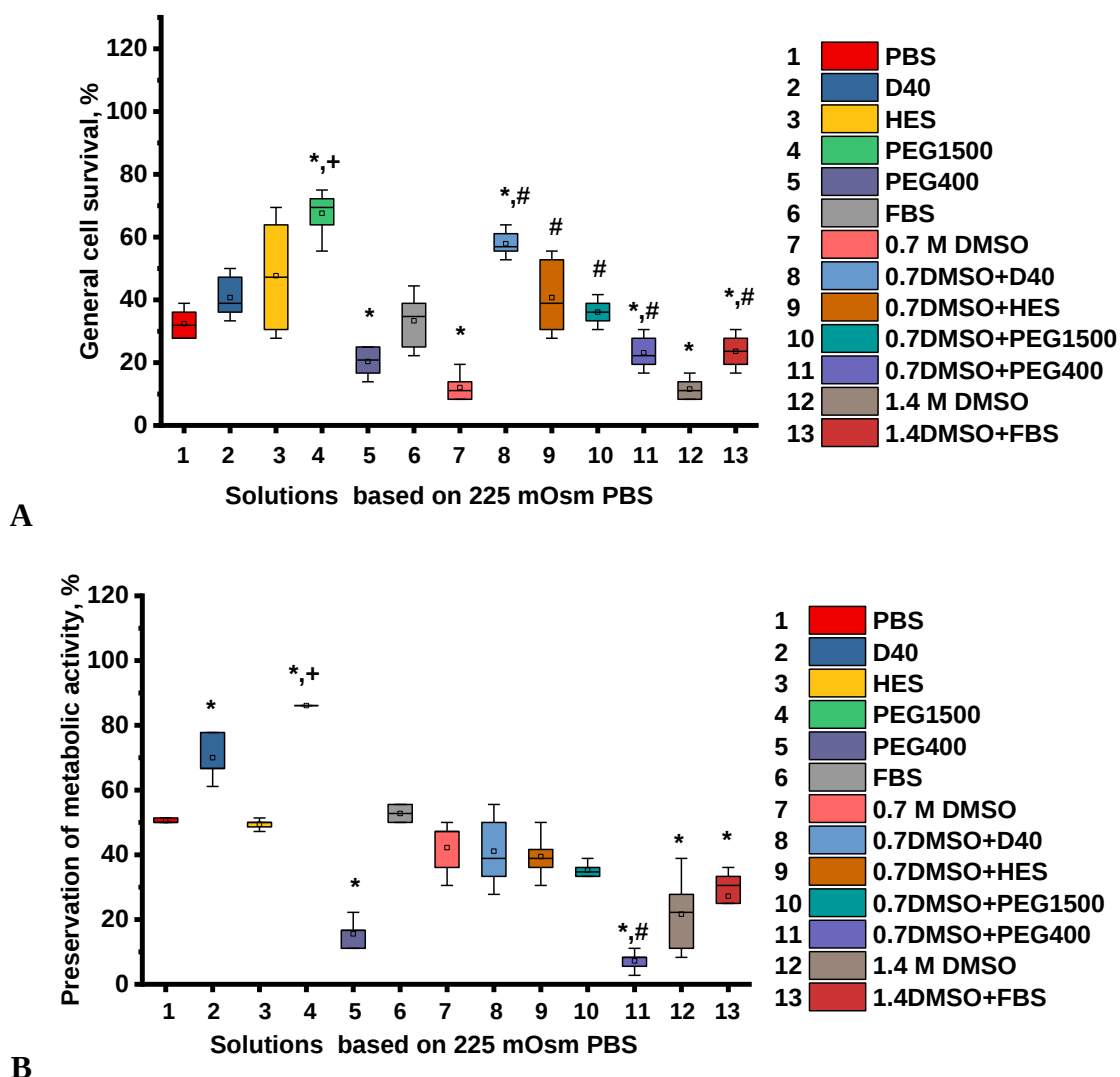


Figure 2. Indicators of IC survival after incubation in 225 mOsm PBS supplemented with DMSO and/or polymers or FBS: (A) general cell survival; (B) preservation of metabolic activity.

* – the indicators of cell survival were statistically different from pure PBS (225 mOsm) ($p \leq 0.05$);

– the indicators of cell survival were statistically different from polymer- and serum-free PBS having the same DMSO concentration ($p \leq 0.05$);

+ – the indicators of cell survival were statistically higher than the same indicators of 300 mOsm PBS having identical concentrations and compositions of additives ($p \leq 0.05$).

Cooling/warming

The combinations of D40 or HES with 0.7 M DMSO significantly increased the general survival of ICs after cooling/warming (Fig. 4A). The increase also correlated with high metabolic activity in the samples (Fig. 4B). 0.7DMSO+D40 had best cryoprotective properties towards ICs. The use of FBS had a moderate impact on the survival of ICs: it did not increase the number of the surviving cell when combined with 1.4 M DMSO but significantly elevated the metabolic activity of the samples compared with the sample having 1.4 M DMSO alone (Fig. 4B). The use of 0.7DMSO+PEG1500 and 0.7DMSO+PEG1500 did not bring any advantage compared to the media supplemented by 0.7 M DMSO only.

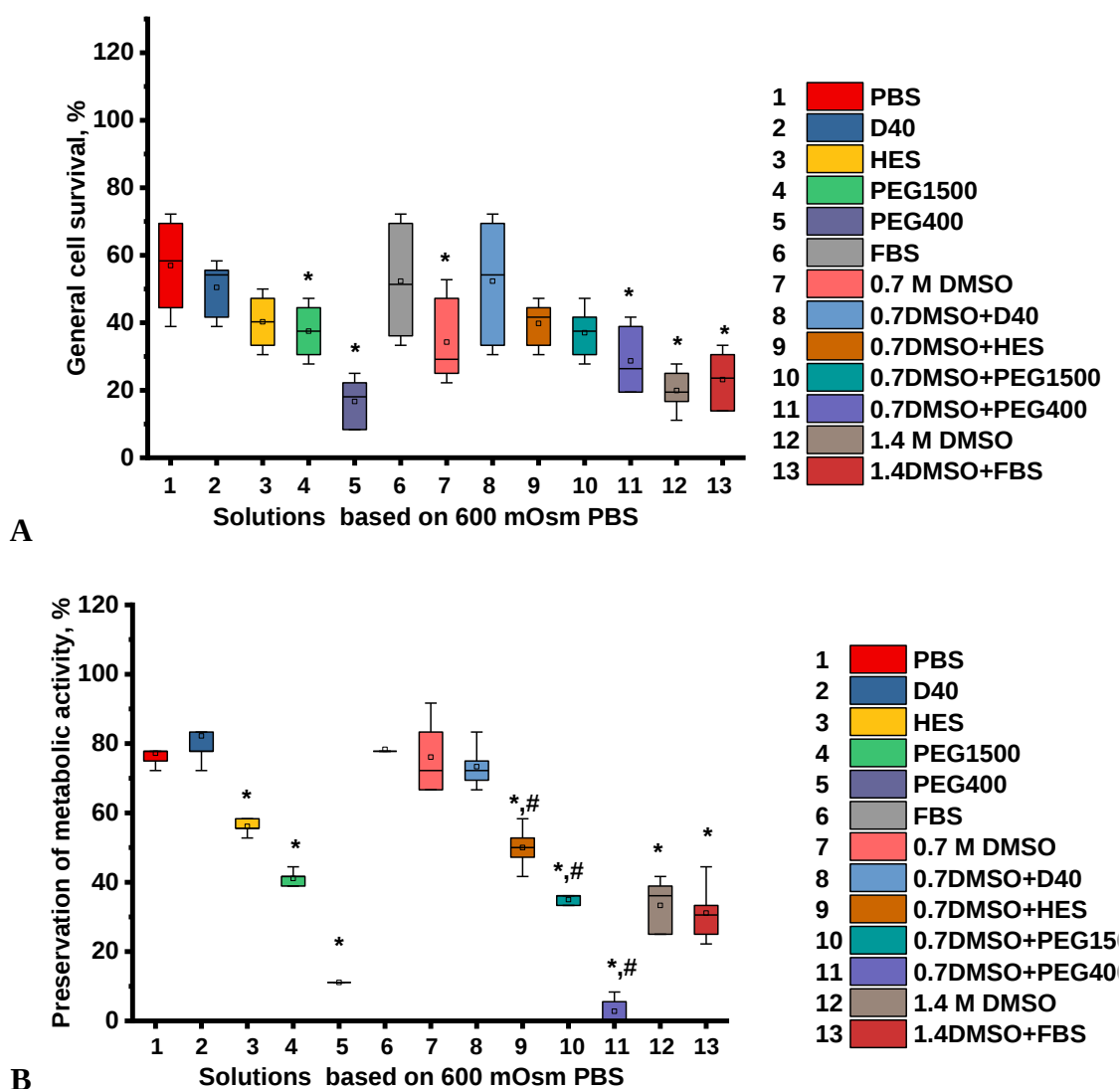


Figure 3. Indicators of IC survival after incubation in 600 mOsm PBS supplemented with DMSO and/or polymers or FBS: (A) general cell survival; (B) preservation of metabolic activity.

* – the indicators of cell survival were statistically different from pure PBS (600 mOsm) ($p \leq 0.05$);

– the indicators of cell survival were statistically different from polymer- and serum-free PBS having the same DMSO concentration ($p \leq 0.05$).

Taking into account that DMSO is membrane permeable and able to change membrane physical-chemical properties [31], on the next stage of the study we estimated the influence of 0.7 M and 1.4 M DMSO on the state of phospholipid bilayer of ICs, using a fluorescent probe O1O (Fig. 5. A and B). Low-intensive short-wavelength band belongs to the N^* -form of the probe, while high-intensive long-wavelength band is attributed to emission of its T^* -form. It was found that, on comparison to the sample without additives, no considerable changes in the T^* -form fluorescence intensity-to- N^* -form fluorescence intensity ratio (i.e., I_{T^*}/I_{N^*} ratio) were observed at lower concentration of DMSO in both cases - after incubation and after cryopreservation: the I_{T^*}/I_{N^*} ratio was 0.98 (0.81; 0.99) and 1.01 (0.95; 1.07), respectively. On the contrary, at higher concentration of DMSO (1.4 M) a noticeable increase in I_{T^*}/I_{N^*} ratio ($p < 0.05$) was observed: 1.12 (1.12; 1.12) after incubation and 1.08 (1.06; 1.10) after cryopreservation.

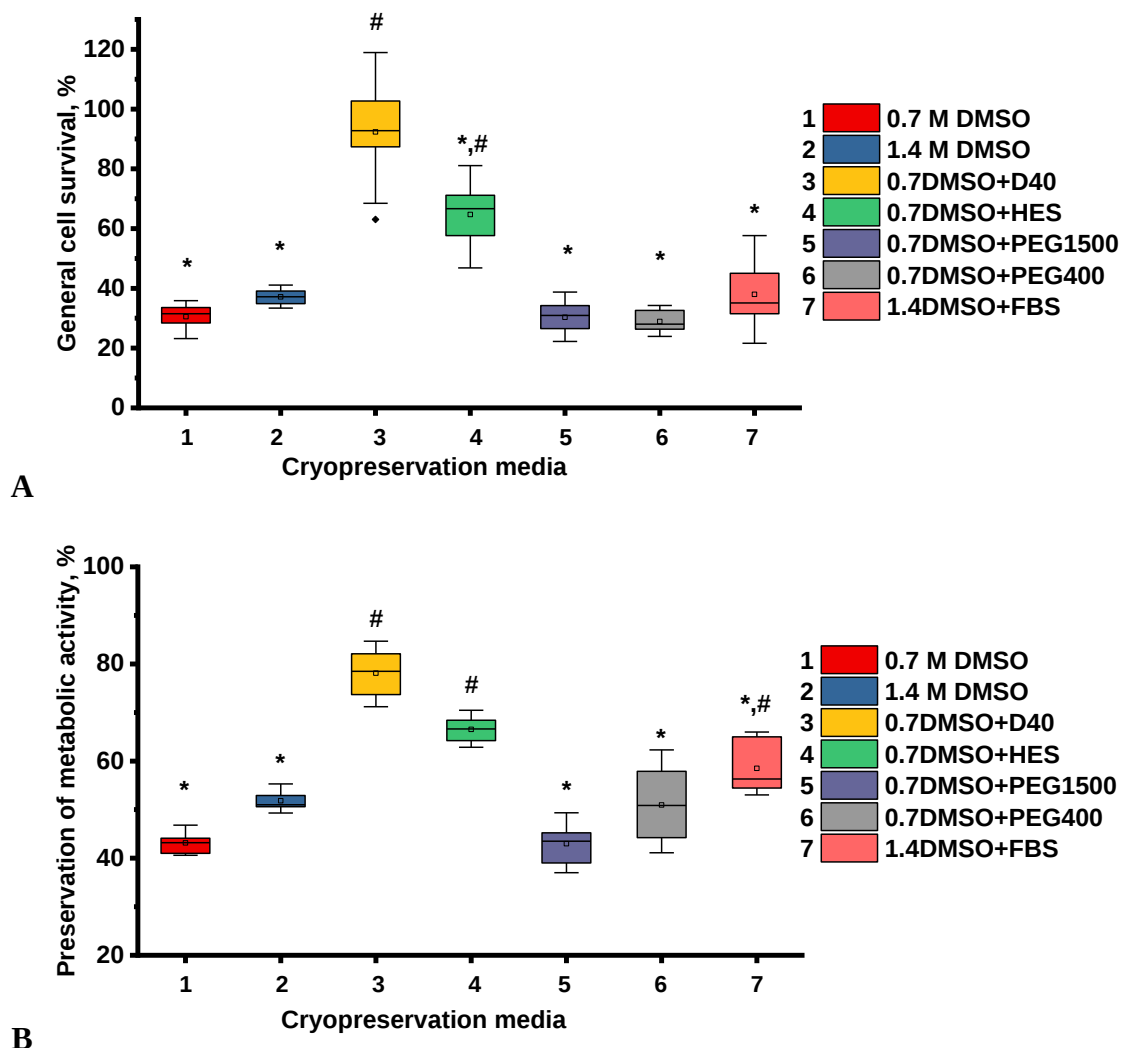


Figure 4. Indicators of IC survival after cooling/warming cycle to -30°C with DMSO and/or polymers, or FBS: (A) general cell survival; (B) preservation of metabolic activity.

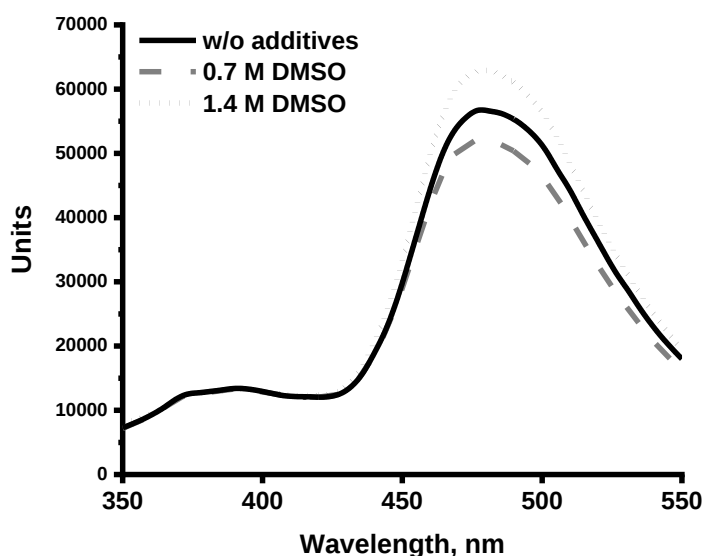
* – the indicators of cell survival were statistically different from 0.7DMSO+D40 ($p \leq 0.05$);

– the indicators of cell survival were statistically different from the polymer- or serum-free media having the same concentration of DMSO.

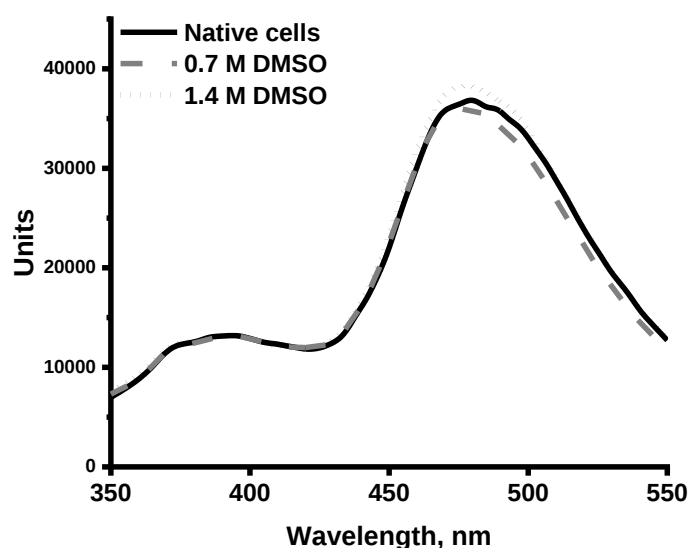
Cryopreservation of cell suspensions involves multiple steps, including cell isolation, the addition of cryopreservation media, equilibration with the media, cooling, storage, warming, removal of CPAs, and transferring the cells into new media for subsequent use. Certain stages expose cells to osmotic stress. For instance, during cooling, water crystallization creates hyperosmotic conditions around the cells, leading to water loss and cell shrinkage, which reduces cell volume. This shrinkage, combined with the toxic effects of highly concentrated solutes, can significantly lower the survival rate of the cells. Conversely, during warming, cells may experience the opposite effect, with changes in volume in the other direction.

The components of cryopreservation media can be conditionally subdivided into membrane permeable and impermeable. Permeable solutes such as DMSO when added can cause temporal cell shrinkage followed by restoration of cell volume to the initial one and, in some cases, by swelling [20, 21]. CPA removal can cause opposite changes: cell swelling followed by volume restoration. Elevated concentrations of conditionally impermeable solutes,

for example, Na^+ , K^+ , Cl^- , may lead to a persistent cell volume loss provided the membrane remains impermeable in such hypertonic media or the hypertonicity does not result in opening ion channels which can lead to the equilibration of ion concentration across the membrane. However, if the latter happens, the excessive concentration of the solutes in the cells may cause cell swelling and/or membrane damage when the cells are transferred back into isosmotic conditions, for example, during cryopreservation on warming and/or CPA removal. This effect is known as the post-hypertonic lysis and may contribute to cell loss.



A



B

Figure 5. Representative fluorescence spectra of probe O1O in cell-containing DMEM F12: (A) after incubation, followed by DMSO removal; (B) after cryopreservation, followed by DMSO removal. For better comparison, the spectra of the probe in the cells in the additive-free medium are presented on the graphs. To show the differences in the fluorescence intensities of the phototautomer forms, the spectra are normalized to the fluorescence intensity of the normal form of the sample with no additives.

Excessive shrinkage or swelling can cause damage to the cellular membrane and cell loss. Under the same deviation of osmolarity from the isosmolar condition, cell membranes are more sensitive to swelling which typically occurs in hypotonic media [32, 33]. This finding can be explained based on the theory of elasticity: stretching an oblong extended object (in our case the membrane in a hypotonic solution) is more difficult than bending it (or deforming the membrane on cell squeezing in a hypertonic solution) [17]. The stress provoked by hypotonicity can be accommodated by membrane rupture and cell death. In our experimentations, lowering osmolarity by 25 % (from 300 to 225 mOsm) resulted in a more dramatic decrease in the indicators of cell survival than increasing osmolarity by 100 % (from 300 to 600 mOsm). Similar observations were obtained [34]. Membrane stretching and bending may cause lateral separation of membrane lipids, which is carefully reviewed [17, 35, 36]. This effect is responsible for the increased permeability of the membrane and sensitivity to cooling/warming.

DMSO is common penetrating CPA able to form multiple interaction with water molecules, thus decreasing the amount of ice that can be formed on cooling at any given temperature, mitigating “solution effect”, preventing excessive cell dehydration during formation of extracellular ice, increasing the amount of amorphous phase and making lipid phase transitions in cell membranes less cooperative [2, 12, 13, 31, 37]. These effects of DMSO promote the survival of many types of cells. However, it is known to be toxic for cells. Taking into account that polarity of DMSO is lower than that of water (dielectric permittivity of DMSO is 46.68 and DP of water is 81) and hydrogen-bonding ability of DMSO molecule is lower than that of water molecule (DMSO molecule has no proton-donating ability), one can suggest that the observed changes in the microenvironment of probe O1O at higher concentration of DMSO (1.4 M) may be caused by the solvation of the membrane with DMSO in the regions, where the probe locate: in the area of glycerol backbones of phospholipids closer to the center of the lipid bilayer, the area of carbonyl groups of phospholipids and the area of hydrocarbon chains of phospholipids near the area of the carbonyl groups of phospholipids of the lipid membrane [27]. The mentioned solvation of the membrane at 1.4 M DMSO correlated with decreased IC survival. This membrane effect of DMSO persisted even after DMSO removal.

DMSO can affect metabolic processes occurring in cells. It can cause membrane thinning and transmembrane pore formation [38–41]. In addition, it is osmotically active and may also cause unwanted cell excursions. The CPA decreased the indicators of IC survival. Apart from DMSO, D40, FBS and, to a lesser extent, HES did not lower the survival of ICs. In isosmotic conditions, PEG1500 and, especially, PEG400 showed damaging effects to ICs, supposedly, because of their additional osmotic activity and toxicity [42].

In our previous work [2], we have tested a number of common polymeric substances (common extracellular CPAs) for their ability to replace serum (or its components) in DMSO based cryoprotective solutions and found that the medium containing 0.7 M DMSO and 100 mg/ml D40 had an exceptional capability to preserve ICs. Other polymeric additives to the DMSO based media were less effective (HES) or non-effective (PEG1500 and PEG400). The indicators of IC survival in the medium supplemented with D40 were not inferior to the best serum-containing media with 1.4 M DMSO and 10% FBS. What’s more, the D40 based media (also designated as 0.7DMSO+D40) did not contain components of serum. This is one more advantage of this medium because serum or its components can cause transmitting infection to biological material and lead to instability of composition of cryoprotective media from batch-to-batch [9-11]. The medium supplemented with D40 also had lower concentration of DMSO compared to its serum-containing counterpart, which, considering DMSO toxicity, is another advantage of the medium. Herein we have shown that D40, HES and PEG1500 mitigated the negative effect of DMSO on the general cell survival, probably due to their ability to prevent excessive cell volume fluctuations on cooling/warming. Although the metabolic activity of the

samples with 0.7 M DMSO, 0.7DMSO+D40 and 0.7DMSO+HES was the same, the indicator in 0.7DMSO+PEG1500 and 0.7DMSO+P400 was considerably lower. These indicate additional toxic effects of DMSO on cell components in the PEG-containing media.

0.7DMSO+D40 could suppress eutectic crystallization, promote the amorphous phase formation, inhibit intracellular crystallization, and change ice morphology in a way that promoted ICs survival. All the studied effects occur at a very wide temperature interval [2, 12, 13]. However, the contribution of osmotic effects of the tested cryoprotective solution developing on crystallization of water as well as their toxic effects were generally unexplored. Herein, we hypothesized that the additives could attenuate osmotic effects of the solution and DMSO toxicity. To verify this assumption, we investigated how the osmotic tolerance of ICs changed depending on the presence of DMSO, polymers and/or FBS. Additionally, we compared the data with cell survival obtained after cooling of the samples to -30 °C (the temperature interval from positive temperature to about -30 °C where osmotic and toxic effects of solutes are especially damaging [12, 37]) followed by warming and CPA removal.

DMSO presence exacerbated membrane damage caused by hypo- and hyperosmolarity. Absolute values of indicators of IC survival were generally lower in 1.4 M DMSO than in 0.7 M DMSO. However, in hypotonic media D40 was able to increase the OTL of ICs. Of note, PEG1500 was able to do this either. The extracellular CPAs can interact with the surface of cells preventing the membrane from excessive stretching [43]. Dextran in particular blocks membrane pores, thus, preventing cell death [44].

The polymers and FBS in the combined media 0.7DMSO+D40, 0.7DMSO+HES, 0.7DMSO+PEG1500, 1.4DMSO+FBS did not decrease the survival of ICs in hypotonic media compared to the media with the same DMSO concentrations without polymers and FBS. Moreover, the general survival of ICs in 0.7DMSO+D40 and 1.4DMSO+FBS tended to be higher than in 0.7 and 1.4 M DMSO, respectively. This means that D40 and FBS can attenuate the negative influence of DMSO on cell survival in hypo-osmotic conditions.

In hypertonic media, D40 and FBS, neither increase, nor decrease the OTL of ICs. All other additives caused lower indicators of cell survival (either general cell survival or metabolic activity preservation, or both). In hypertonic conditions, the use of 0.7 M DMSO did not lower metabolic activity. Furthermore, 0.7 M DMSO did not reduce any indicators of cell survival when used in combination with D40

The incubation of cells in hypo- or hyperosmotic conditions with DMSO or polymers, or FBS, is, to some extent, simulation of the events taking place during cryopreservation described at the beginning of Discussion. It is obvious, even if a substance can promote the survival of cells in hypo- or hyperosmotic solutions, it does not directly mean that it possesses adequate cryoprotective properties towards the cell. In our experimentation, for example, ICs can withstand hypo-osmotic conditions when PEG1500 was added to the solution. However, the additive was not able to promote amorphous phase formation or inhibit intracellular crystallization and recrystallization as effectively as 0.7DMSO+D40 [13]. PEG1500 was shown to be toxic towards ICs [42]. In the current research, in order to display the correlation between the survival of ICs in anisotonic conditions and after cryopreservation clearer, ICs were cooled in cryoprotective media based on DMEM F12 only to -30 °C. The temperature interval (from positive temperature to -30 °C), where crystallization/melting of bulk water occurs, is responsible for most osmotic and toxic effects of cryoprotective media [14, 45, 46]. The cooling/warming to -30 °C has shown that 0.7DMSO+D40 was the most effective in terms of IC survival. Other combined media were less effective (0.7DMSO+HES, 1.4DMSO+FBS) or non-effective (0.7DMSO+PEG1500, 0.7DMSO+PEG400). Thus, D40 increases the survival of ICs, at least partially, at the expense of lowering osmotic effects of concentrated media and toxic DMSO effects. In our previous work serum-containing medium 1.4DMSO+FBS also

showed high cryoprotective properties, however, cooling to -30°C resulted in moderate indicators of cell survival compared to other studied compositions. Apparently, this result related to high DMSO concentration in this composition, which could suppress salt eutectic, promote the amorphous phase formation, but could alter the membrane of ICs. This emphasizes the importance of finding approaches that lower DMSO concentration to the minimum required for effective cryopreservation. Cooling to -30°C is not suitable for long-term preservation of cell samples as it does not prevent other physical transformations in the samples and in the present work was used to reveal the described effects associated with osmolarity changes. Lower temperatures are typically needed for cryopreservation of ICs and other cell suspension [2].

CONCLUSION

In the present research, we have shown that at 1.4M DMSO, the decrease in ICs survival correlated with the detected increase in the lipid membrane solvation with this solvent. The non-toxic additive D40 increased the osmotic tolerance limit of ICs in the hypo-osmotic medium and decreased the negative effects of DMSO on the cells. These effects were accompanied by high indicators of ICs survival obtained after cooling ICs to -30°C with 0.7DMSO+D40. These results unveil the mechanisms of cryoprotection of 0.7DMSO+D40 and partially explain the superiority of 0.7DMSO+D40 media shown in our previous works compared with other investigated media. Understanding the mechanisms of cryodamage and cryoprotection of 0.7DMSO+D40 paves a way toward the development of new serum-/xeno-free cryoprotective compositions and improvement of cryopreservation protocols for cell suspensions that include many types of cells. Further studies are required to reveal the effects of DMSO on membranes and intracellular metabolic processes. The effects of other procedures of cryopreservation such as cooling/warming rates or controlled nucleation on the survival of ICs in 0.7DMSO+D40 has yet to be investigated.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors want to express their sincere gratitude to Prof. A.O. Doroshenko for giving us the ortho-hydroxy derivative of 2,5-diphenyl-1,3-oxazole.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

Authors' ORCID ID

O. V. Pakhomov  <https://orcid.org/0000-0002-7494-654X>

Y. O. Posokhov  <https://orcid.org/0000-0001-8395-9089>

N. O. Volkova  <https://orcid.org/0000-0002-3948-4896>

N. A. Chernobai  <https://orcid.org/0000-0002-5736-9277>

G. A. Bozhok  <https://orcid.org/0000-0002-4188-9286>

REFERENCES

1. Karlsson JOM, Toner M. Chapter 24 — Cryopreservation. In: Lanza RP, Langer R, Vacanti J, editors. Principles of Tissue Engineering. 2nd ed. Academic Press; 2000. p. 293–307. <https://doi.org/10.1016/b978-012436630-5/50028-3>
2. Pakhomov O, Gurina T, Mazaeva V, Polyakova A, Deng B, Legach E, Bozhok G. Phase transitions and mechanisms of cryoprotection of serum-/xeno-free media based on dextran and dimethyl sulfoxide. Cryobiology. 2022;107:13–22. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.06.004>
3. Hutka M, Smith LB, Mitchell RT. Xenotransplantation as a model for human testicular development. Differentiation. 2017;97:44–53. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2017.09.001>

4. Morrell JM, Mayer I. Reproduction biotechnologies in germplasm banking of livestock species: a review. *Zygote*. 2017;25(5):545–57. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000442>
5. Schlatt S, Honaramooz A, Boiani M, Schöler HR, Dobrinski I. Progeny from sperm obtained after ectopic grafting of neonatal mouse testes. *Biol Reprod*. 2003;68(6):2331–5. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.014894>
6. Holoch P, Wald M. Current options for preservation of fertility in the male. *Fertil Steril*. 2011;96(2):286–90. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.06.028>
7. Kirpatovskii VI, Efremov GD, Frolova EV. Ectopic Organogenesis after Allotransplantation of Freshly Removed or Cryopreserved Neonatal Testicle under the Renal Capsule in Rats. *Bull Exp Biol Med*. 2018;166(2):268–73. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4330-4>
8. Pribor DB. PVP contrasted with dextran and a multifactor theory of cryoprotection, *Cryobiology*. 1974;11(1):60–72. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(74\)90039-x](https://doi.org/10.1016/0011-2240(74)90039-x)
9. Dinkins MB, Brackett BG. Chlortetracycline staining patterns of frozen-thawed bull spermatozoa treated with beta-cyclodextrins, dibutyl cAMP and progesterone. *Zygote*. 2000;8(3):245–56. <https://doi.org/10.1017/s0967199400001040>
10. González Hernández Y, Fischer RW. Serum-free culturing of mammalian cells--adaptation to and cryopreservation in fully defined media. *ALTEX*. 2007;24(2):110–6. <https://doi.org/10.14573/altex.2007.2.110>
11. Hinckley GT, Johnson CJ, Jacobson KH, Bartholomay C, McMahon KD, McKenzie D, Aiken JM, Pedersen JA. Persistence of pathogenic prion protein during simulated wastewater treatment processes. *Environ Sci Technol*. 2008;15;42(14):5254–9. <https://doi.org/10.1021/es703186e>
12. Pakhomov O, Shevchenko N, Chernobai N, Prokopiuk V, Yershov S, Bozhok G. Open-source hardware- and software-based cryomicroscopy system for investigation of phase transitions in cryobiological research. *J Microsc*. 2024;293(2):71–85. <https://doi.org/10.1111/jmi.13253>
13. Pakhomov OV, Gurina TM, Polyakova AL, Mazaeva VS, Deng B, Bozhok GA. Study of physical processes occurring in serum-containing and polymer-based serum-free cryoprotective media. *Biopolym Cell*. 2024;40(1):37–46. <http://doi.org/10.7124/bc.000AAC>
14. Traversari G, Delogu F, Aparicio S, Cincotti A. hMSCs in contact with DMSO for cryopreservation: Experiments and modeling of osmotic injury and cytotoxic effect. *Biotechnol Bioeng*. 2022;119(10):2890–907. <https://doi.org/10.1002/bit.28174>
15. Vincent C, Pickering SJ, Johnson MH, Quick SJ. Dimethylsulphoxide affects the organisation of microfilaments in the mouse oocyte. *Mol Reprod Dev*. 1990;26(3):227–35. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080260306>
16. Fukui Y. Formation of multinuclear cells induced by dimethyl sulfoxide: inhibition of cytokinesis and occurrence of novel nuclear division in Dictyostelium cells. *J Cell Biol*. 1980;86(1):181–9. <https://doi.org/10.1083/jcb.86.1.181>
17. Gordienko EA, Pushkar NS. Physical grounds for low temperature preservation of cell suspensions. Kyiv: Naukova dumka; 1994. 143 p. (in Russian)
18. Klbi I. Is post-hypertonic lysis of human red blood cells caused by excessive cell volume regulation? *Cryobiology*. 2024;114:104795. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2023.104795>
19. Meryman HT. The Exceeding of a Minimum Tolerable Cell Volume in Hypertonic Suspension as a Cause of Freezing Injury. In: Wolstenholme GEW, O'Connor M, editors. *The Frozen Cell*. CIBA Foundation Symposium. Churchill; 1970. p. 51–67. <https://doi.org/10.1002/9780470719732.ch4>
20. Traversari G, Cincotti A. Insights into the model of non-perfect osmometer cells for cryopreservation: A parametric sweep analysis. *Cryobiology*. 2021;100:193–211. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.11.013>
21. Casula E, Traversari G, Fadda S, Klymenko OV, Kontoravdi C, Cincotti A. Modelling the osmotic behaviour of human mesenchymal stem cells. *Biochem Eng J*. 2019;151:107296. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107296>
22. Lemetais G, Dupont S, Beney L, Gervais P. Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;96(2):471–80. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4014-3>
23. Hughes ZE, Mark AE, Mancera RL. Molecular dynamics simulations of the interactions of DMSO with DPPC and DOPC phospholipid membranes. *J Phys Chem B*. 2012;116(39):11911–23. <https://doi.org/10.1021/jp3035538>
24. Fernández ML, Reigada R. Effects of dimethyl sulfoxide on lipid membrane electroporation. *J Phys Chem B*. 2014;118(31):9306–12. <https://doi.org/10.1021/jp503502s>
25. Deng B, Bondarenko T, Pakhomov O. Changes in Sexual Behavior of Orchidectomized Rats Under Influence of Allotransplantation of Testicular Interstitial Cell Suspension. *Cell Transplant*. 2017;26(5):795–803. <https://doi.org/10.3727/096368916X693301>

26. Doroshenko A, Posokhov E, Shershukov V, Mitina V, Ponomarev O. ChemInform Abstract: Spectral-Luminescent Properties of 2-Aryl (9, 10) phenanthroazole Derivatives. Chem Inform. 1996;27(5). <https://doi.org/10.1002/chin.199605028>
27. Posokhov Y, Kyrychenko A. Location of fluorescent probes (2'-hydroxy derivatives of 2,5-diaryl-1,3-oxazole) in lipid membrane studied by fluorescence spectroscopy and molecular dynamics simulation. Biophys Chem. 2018;235:9–18. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2018.01.005>
28. Doroshenko AO, Posokhov E A. Proton phototransfer in a series of ortho-hydroxy derivatives of 2,5-diaryl-1,3-oxazole and 2,5-diaryl-1,3,4-oxadiazole in polystyrene films. Theoretical and Experimental Chemistry. 1999;35(6):334–337. <https://doi.org/10.1007/bf02522792>
29. Doroshenko AO, Posokhov EA, Verezubova AA, Ptyagina LM, Skripkina VT, Shershukov VM. Radiationless deactivation of the excited phototautomer form and molecular structure of ESIPT-compounds. Photochem Photobiol Sci. 2002;1(2):92–9. <https://doi.org/10.1039/b107255m>
30. Posokhov YO, Kyrychenko A, Korniyenko Y. Derivatives of 2,5-Diaryl-1,3-Oxazole and 2,5-Diaryl-1,3,4-Oxadiazole as Environment-Sensitive Fluorescent Probes for Studies of Biological Membranes. In: Geddes C, editor. Reviews in Fluorescence 2017. Reviews in Fluorescence. Springer, Cham; 2018. p. 199–230. https://doi.org/10.1007/978-3-030-01569-5_9
31. Awan M, Buriak I, Fleck R, Fuller B, Goltsev A, Kerby J, Lowdell M, Mericka P, Petrenko A, Petrenko Y, Rogulska O, Stolzing A, Stacey GN. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? Regen Med. 2020;15(3):1463–91. <https://doi.org/10.2217/rmc-2019-0145>
32. Kashuba CM, Benson JD, Critser JK. Rationally optimized cryopreservation of multiple mouse embryonic stem cell lines: I--Comparative fundamental cryobiology of multiple mouse embryonic stem cell lines and the implications for embryonic stem cell cryopreservation protocols. Cryobiology. 2014;68(2):166–75. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.12.007>
33. Lovelock JE. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. Biochim biophys acta. 1953;10(3):414–26. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(53\)90273-x](https://doi.org/10.1016/0006-3002(53)90273-x)
34. Ertmer F, Oldenhof H, Schütze S, Rohn K, Wolters WF, Sieme H. Induced sub-lethal oxidative damage affects osmotic tolerance and cryosurvival of spermatozoa. Reprod Fertil Dev. 2017;29(9):1739–50. <https://doi.org/10.1071/RD16183>
35. Collard L, Sinjab F, Nottingher I. Raman Spectroscopy Study of Curvature-Mediated Lipid Packing and Sorting in Single Lipid Vesicles. Biophys J. 2019;117(9):1589–98. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.09.020>
36. Dasgupta S, Auth T, Gompper G. Nano- and microparticles at fluid and biological interfaces. J Phys Condens Matter. 2017;29(37):373003. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa7933>
37. Meneghel J, Kilbride P, Morris JG, Fonseca F. Physical events occurring during the cryopreservation of immortalized human T cells. PLoS One. 2019;14(5):e0217304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217304>
38. Cheng CY, Song J, Pas J, Meijer LH, Han S. DMSO induces dehydration near lipid membrane surfaces. Biophys J. 2015;109(2):330–9. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.06.011>
39. Schrader AM, Cheng CY, Israelachvili JN, Han S. Communication: Contrasting effects of glycerol and DMSO on lipid membrane surface hydration dynamics and forces. J Chem Phys. 2016;145(4):041101. <https://doi.org/10.1063/1.4959904>
40. Sydykov B, Oldenhof H, de Oliveira Barros L, Sieme H, Wolters WF. Membrane permeabilization of phosphatidylcholine liposomes induced by cryopreservation and vitrification solutions. Biochim Biophys Acta Biomembr. 2018;1860(2):467–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.10.031>
41. Gurtovenko AA, Anwar J. Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. J Phys Chem B. 2007;111(35):10453–60. <https://doi.org/10.1021/jp073113e>
42. Pakhomov O, Posokhov Y. Detecting changes of testicular interstitial cell membranes with a fluorescent probe after incubation and cryopreservation with cryoprotective agents. Cryobiology. 2025;118:105194. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2024.105194>
43. Vitkova V, Yordanova V, Staneva G, Petkov O, Stoyanova-Ivanova A, Antonova K, Popkirov G. Dielectric Properties of Phosphatidylcholine Membranes and the Effect of Sugars. Membranes (Basel). 2021;11(11):847. <https://doi.org/10.3390/membranes11110847>
44. Cudd A, Arvinte T, Schulz B, Nicolau C. Dextran protection of erythrocytes from low-pH-induced hemolysis. FEBS Lett. 1989;250(2):293–6. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80741-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80741-0)
45. Gurina TM, Pakhomov AV, Kyryliuk AL, Bozhok GA. Development of a cryopreservation protocol for testicular interstitial cells with the account of temperature intervals for controlled cooling below -60°C. Cryobiology. 2011;62(2):107–14. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.01.011>
46. Gurina TM, Pakhomov AV, Polyakova AL, Legach EI, Bozhok GA. The development of the cell cryopreservation protocol with controlled rate thawing. Cell Tissue Bank. 2016;17(2):303–16. <https://doi.org/10.1007/s10561-015-9533-6>

ВПЛИВ КРІОПРОТЕКТОРІВ НА ОСМОТИЧНУ ТОЛЕРАНТНІСТЬ ІНТЕРСТИЦІАЛЬНИХ КЛІТИН ЯЄЧКА

О. В. Пахомов¹ , Є. О. Посохов^{2,3} , Н. С. Волкова⁴ , Н. А. Чернобай¹ , Г. А. Божок¹ 

¹Інститут проблем кріобіології та кріомедицини Національної академії наук України, вул. Переяславська, 23, 61016, Харків, Україна;

²Кафедра органічної хімії, біохімії, лакофарбових матеріалів, Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», вул. Кирпичова, 2, 61000, Харків, Україна;

³Науково-дослідний інститут експериментальної та клінічної медицини, Харківський національний медичний університет, вул. Трінклера, 6, 61022, Харків, Україна;

⁴Кафедра генетики та цитології, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, 61022, Харків, Україна
e-mail: aleksandr.pakhomov2017@gmail.com

Надійшла до редакції 13 лютого 2025 р. Переглянута 15 квітня 2025 р.

Прийнята до друку 24 квітня 2025 р.

Актуальність. Кріозбереження — це багатокроковий процес, який включає етапи, що механічно, осмотично та токсично впливають на біологічний матеріал. Використання кріозбереження біологічних матеріалів є економічно вигідним та забезпечує довготривале зберігання за кріогенних температур. Воно також гарантує стабільність генетичного компоненту клітин та знижує ризик контамінації біологічного матеріалу.

Мета роботи. Метою дослідження є вивчення впливу кріопротекторів (диметилсульфоксид (DMSO), декстран (D40), гідроксіетилкрахмаль, поліетиленгліколі (PEG1500 та PEG400) та фетальна бича сироватка) і їх комбінацій на взаємозв'язок між осмотичною толерантністю інтерстиціальних клітин яєчка (ІК) та кріозахистом.

Матеріали і методи. Поріг осмотичної толерантності (OTL) ІК та токсичний вплив кріопротекторів досліджували в середовищах на основі фосфатного буферного розчину з різною осмолярністю: ізоосмотичний (300 мОсм), гіпоосмотичний (225 мОсм) та гіперосмотичний (600 мОсм). Подібні осмотичні умови можуть розвиватися під час кріозбереження клітин у температурному діапазоні від +4 до -30 °С.

Результати. Показники виживання клітин після інкубації в середовищах залежали від осмолярності середовищ інкубації. Вони порівнювалися з показниками, отриманими після охолодження ІК до -30 °С з наступним нагріванням та видаленням кріопротекторів. Ми показали, що нетоксична добавка D40 підвищувала OTL ІК у гіпоосмотичному середовищі та зменшувала негативний вплив DMSO на клітини. Ці ефекти супроводжувалися високими показниками виживання ІК, отриманими після охолодження ІК до -30 °С у середовищі з 100 мг/мл D40 і 0,7 М DMSO.

Висновки. Ці результати розкривають механізми кріозахисту середовища 0.7DMSO+D40 і частково пояснюють перевагу цього середовища, яка була продемонстрована в наших попередніх роботах порівняно з іншими дослідженими середовищами. Розуміння механізмів кріопошкодження та кріозахисту 0.7DMSO+D40 відкриває шлях до розробки нових кріопротекторних композицій, вільних від сироватки та ксеногенних компонентів, а також покращення протоколів кріозбереження для клітинних суспензій, що включають багато типів клітин. Подальші дослідження необхідні для вивчення ефектів DMSO на мембрани та внутрішньоклітинні метаболічні процеси.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: осмотична толерантність; токсичність; диметилсульфоксид; декстран; гідроксіетилкрахмаль; поліетиленгліколь; механізми кріозахисту.

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-03>

УДК 577.38:577.353:577.345:535.372

ДОЗОВІ ЕФЕКТИ УЛЬТРАФІОЛЕТОВОГО ТА ТЕРАГЕРЦОВОГО ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ПЛАЗМАТИЧНУ МЕМБРАНУ ЕРИТРОЦИТІВ

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

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

e-mail: sichevska@karazin.ua

Надійшла до редакції 17 березня 2025 р. Переглянута 18 квітня 2025 р.

Прийнята до друку 22 квітня 2025 р.

Актуальність. У сучасній медицині активно застосовуються різні технічні засоби та розробки у вигляді інвазивної внутрішньосудинної (ВЛОК) та неінвазивної транскутанної методик опромінення крові, у тому числі, з застосуванням низькоінтенсивного лазерного випромінювання (НЛВ) різних діапазонів. Незважаючи на позитивні клінічні результати такого впливу, фізико-молекулярні механізми залишаються не до кінця з'ясованими. Ультрафіолетовий (УФ) і терагерцовий (ТГц) діапазони електромагнітного випромінювання відносять до біогенних, тому встановлення їх ефектів на рівні клітин крові дозволить мотивовано рекомендувати їх до використання у медичній та біотехнологічній практиці після розроблення відповідних методик впливу.

Мета роботи — дослідження біогенної активності НЛВ ультрафіолетового та терагерцового діапазонів на структурно-функціональний стан еритроцитів крові щурів *in vitro*.

Матеріали і методи. Методами мікроелектрофорезу, спектрофотометрії та кислотних еритрограм досліджено, відповідно, дзета-потенціал еритроцитів, вміст первинних продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) в еритромасі (кон'югати жирних кислот фосфоліпідів мембран еритроцитів — дієнові (ДК), трієнові (ТК) і тетраєнові (ТЕК), оксодієнові (ОДК)), резистентність еритроцитів до дії кислотного гемолітика після попереднього лазерного опромінення в УФ та ТГц діапазонах. Лазерне опромінення зразків в УФ діапазоні здійснювали імпульсним азотним лазером ($\lambda = 0,337$ мкм), опромінення в ТГц діапазоні — безперервним CO₂-лазером ($\lambda = 118,8$ мкм).

Результати. Вплив НЛВ УФ та ТГц низької потужності дози опромінення спричинює фізико-хімічні зміни в плазматичній мембрані еритроцитів. Встановлено нелінійне дозозалежне зниження електрокінетичного потенціалу клітинної поверхні та підвищення гемолітичної чутливості еритроцитів на тлі активації процесів перекисного окислення ліпідів в еритроцитарних мембранах.

Висновки. За умов впливу НЛВ стимулюються процеси вільно-радикального переокислення ліпідів мембран еритроцитів. Виявлена виражена біогенна активність НЛВ УФ діапазону на рівні мембран еритроцитів. Отримані дані можуть бути використані для розширення спектру застосування НЛВ УФ діапазону в методиках ВЛОК.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: низько-інтенсивне лазерне випромінювання; ультрафіолетовий діапазон; терагерцовий діапазон; дзета-потенціал еритроцитів; перекисне окислення ліпідів; кислотний гемоліз.

Як цитувати: Січевська ЛВ, Овсяннікова ТМ, Забєліна ІА, Коваленко АО, Левченко ОМ, Гурін ОВ. Дозові ефекти ультрафіолетового та терагерцового лазерного випромінювання на плазматичну мембрану еритроцитів. Біофізичний вісник. 2025;53:34–45. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-03>

Citation: Sichevska LV, Ovsyannikova TM, Zabelina IA, Kovalenko AO, Levchenko OM, Gurin OV. Dose effects of ultraviolet and terahertz laser radiation on the plasma membrane of erythrocytes. Biophysical Bulletin. 2025;53:34–45. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-03> (in Ukrainian)

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

Біостимулююча дія низькоінтенсивного лазерного випромінювання (НІЛВ) широкого частотного діапазону з різними показниками потужності дози активно досліджується та представлена в наукових літературних джерелах [1–4], проте ефекти НІЛВ у більшості випадків дискусійні, оскільки остаточні механізми впливу випромінювання й досі залишаються не виявлені. В науковій періодиці представлений та обговорюється широкий спектр властивостей лазерного випромінювання медичного спрямування: протизапальна та стимулююча до регенерації клітин дія НІЛВ [5–6], втілення фізіотерапевтичних методів з застосуванням низькоінтенсивного лазера [7], лазеротерапія з метою посилення кисневого постачання за рахунок перфузії крові [8]. Однак, не дивлячись на чисельні наукові звіти про дослідження *in vitro* на тваринах та випадки практичного застосування, що підтверджують позитивний результат, лазеротерапія все ще залишається недоказовим методом медичного втручання. Незважаючи на невизначеність механізмів впливу когерентного випромінювання на біооб'єкти, у клінічній практиці успішно застосовують внутрішньосудинне лазерне опромінення крові (ВЛОК), в тому числі, у вигляді інвазивної внутрішньосудинної [9, 10] та неінвазивної транскутанної методик опромінення [11, 12]. Вказані методики застосовуються для лікування захворювань різної етіології та мають позитивний клінічний результат [13]. Результативне вирішення медичних проблем здійснюється, переважно, з застосуванням інфрачервоного та ближнього інфрачервоного діапазонів НІЛВ. В сучасних дослідженнях встановлено, що біологічна ефективність низькоінтенсивного лазерного випромінювання суттєво залежить від дози та потужності випромінювання і має нелінійний характер [14]. З метою вивчення молекулярних механізмів біогенного впливу лазерного випромінювання останнім часом суттєво розширився діапазон частот НІЛВ, який використовується в медико-біологічних експериментах. Досліджується біогенна активність ультрафіолетового (УФ) і терагерцового (ТГц) діапазонів НІЛВ. Практичне застосування УФ випромінювання пов'язане з певними проблемами та викликає ряд запитань. Наприклад, необхідно враховувати, що УФ опромінення може викликати як корисні (терапевтичні), так і шкідливі (побічні) ефекти, такі як канцерогенний, прояв якого залежить від частотних характеристик випромінювання [15, 16]. Добре досліджені бактерицидні властивості УФ випромінювання довгий час застосовувалися в медичній практиці з метою дезинфекції поверхні відкритої рани, проте з відкриттям антибіотиків зазнали зменшення попиту. Однак, зі зростанням лікарської стійкості збудників інфекцій до антибіотикотерапії УФ опромінення знову стає альтернативним методом лікування інфекцій, що дозволяє передбачити перспективи розвитку УФ-лазерної антибіотикотерапії. Питання біогенного впливу ТГц лазерного випромінювання набуло актуальності особливо за останні два десятиліття. Результати дослідження біологічної ефективності НІЛВ ТГц діапазону представлені в матеріалах звіту масштабного Європейського Проєкту дослідження взаємодії випромінювання ТГц НІЛВ з біологічними системами (2004) та інших наукових джерелах [17, 18]. Особливо актуальна проблема сьогодення — застосування ТГц випромінювання для діагностики онкологічних захворювань [19, 20]. Терагерцова спектроскопія і візуалізація продемонстрували потенціал розпізнавання типів клітин. Опубліковані дані, які підтверджують успішну терагерцову візуалізацію патологічних тканин і показують виразну диференціацію між пухлинними і здоровими тканинами [20, 21]. Проте залишається відкритим питання про безпеку застосування терагерцового випромінювання, у зв'язку з чим біогенна активність ТГц випромінювання потребує подальшого ретельного дослідження.

Аналіз опублікованих робіт [22, 23] щодо впливу НІЛВ показує, що саме в мембранному апараті клітини розвиваються первинні фізико-хімічні реакції, які в тій чи іншій мірі визначають відгук клітини й організму в цілому на вплив факторів зовнішнього середовища. Плазматичні мембрани еритроцитів є зручною біологічною моделлю для дослідження мембрано-модулюючої дозозалежної дії низькоінтенсивного опромінення різних частотних діапазонів. Метою роботи було дослідження біогенної активності НІЛВ УФ та ТГц діапазонів на рівні структурно-функціональних властивостей мембран еритроцитів крові щурів *in vitro*, виявлення ефектів опромінення за показниками електрофоретичної рухливості, рівня первинних продуктів перекисного окислення ліпідів та резистентності клітин до впливу кислотного гемолітика.

МАТЕРІАЛИ Й МЕТОДИ

В експерименті були використані 6-місячні безпородні білі щурі-самці з початковою масою 200–250 г, які утримувалися на стандартній дієті віварію в умовах вільного доступу до води. В досліджуваних групах було не менше трьох тварин, всього було п'ять таких груп. Дослідження здійснювалися згідно з національними «Загальними етичними принципами проведення експериментів на тваринах», ухваленими Першим Національним конгресом з біоетики [24], що узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» [25].

З метою встановлення особливостей реакції червоних клітин крові щурів на дію лазерного випромінювання УФ та ТГц діапазонів *in vitro* досліджувалися електрокінетичні властивості мембранної поверхні еритроцитів щурів, зміни рівня первинних продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та резистентність еритроцитів до дії кислотного гемолітика.

Препарат суспензії відмитих еритроцитів отримували за загально прийнятою методикою. Первинні продукти ПОЛ — це кон'югати жирних кислот фосфоліпідів мембран еритроцитів: дієнові (ДК), трієнові (ТК) і тетраєнові (ТЕК), оксодієнові (ОДК) визначали в еритромасі після їх екстракції в суміші гептан/ізопропанол спектрофотометричним методом на відповідних довжинах хвиль 233 нм (ДК), 268 нм (ТК), 276 нм (ОДК), 287 нм (ТЕК). Розрахунок концентрацій кон'югатів здійснювали за законом Бугера-Ламберта-Бера з урахуванням відповідних коефіцієнтів молярної екстинкції ϵ_0 (для ДК, ТК та ОДК: $\epsilon_0=2,2 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$, $\epsilon_0=4,34 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$ та $\epsilon_0=2,7 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$, відповідно). Концентрацію кон'югатів представляли в нмоль на 1 мл еритромаси (для ДК, ОДК, ТК); коефіцієнт молярної екстинкції для ТЕК не визначений, тому їх рівень визначали в одиницях оптичної щільності на 1 мл еритромаси [26, 27].

Величину дзета-потенціалу еритроцитів оцінювали за показником електрофоретичної рухливості клітин в розчині 5 мМ трис-НСІ буфера, рН 7,4 з постійним значенням сили струму 4 мА в електрофоретичній камері. Розрахунки величини дзета-потенціалу здійснювали за формулою Гельмгольца-Смолуховського [28]. Щільність поверхневого заряду еритроцитів визначали за методом [29].

Резистентність еритроцитів до дії кислотного гемолітика досліджували за методом [30] визначення гемолітичної активності еритроцитів за допомогою агрегометра-формометра АКК-01. Величину LAG-період визначали як відлік інтервалу часу після додавання гемолітику до моменту розгортання гемолізу. Відсоток прогемолізованих еритроцитів в певний момент часу обчислювали за формулою:

$$\%D_i = \frac{D_1 - D_i}{\Delta D},$$

де D_i — показник оптичної щільності в даний момент часу; ΔD — величина, що дорівнює різниці між початковим значенням оптичної щільності і значенням оптичної щільності

після закінчення гемолізу. Значення tgA обчислювали на лінійній ділянці залежності $\%D_i(t)$, що за фізичним змістом відповідає швидкості гемолізу еритроцитів [31].

Лазерне опромінення зразків в ультрафіолетовому діапазоні здійснювали імпульсним азотним лазером ($\lambda = 0,337$ мкм), середня потужність випромінювання 5 мВт, щільність потужності випромінювання 2,8 мВт/см²; опромінення в субміліметровому діапазоні – безперервним CO₂-лазером ($\lambda = 118,8$ мкм), середня потужність випромінювання 20 мВт, щільність потужності випромінювання 9,5 мВт/см². Експозиційна доза за умов опромінення азотним лазером становила: $D_{1УФ}=0,109$ Дж/см², $D_{2УФ}=0,327$ Дж/см², $D_{3УФ}=0,546$ Дж/см². За умов опромінення CO₂-лазером експозиційна доза була $D_{1ТГц}=0,624$ Дж/см², $D_{2ТГц}=1,871$ Дж/см², $D_{3ТГц}=3,119$ Дж/см². Товщина шару опромінюваної суспензії еритроцитів становила 1 мм, час опромінення зразків 10 хвилин.

Статистичний аналіз отриманих результатів здійснено з використанням стандартних пакетів програм Excel (версія 7), розраховані середні значення і стандартна похибка середнього для досліджуваних зразків клітин, результати опрацьовані з використанням методу Стюдента [32]. Результати експериментальних досліджень на графіках та в таблицях 1, 2 представлені як середнє $\pm$ довірчий інтервал для середнього ($\bar{X} \pm \Delta x$; $P=95\%$).

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження електричних властивостей мембранної поверхні клітин методом мікроелектрофорезу широко застосовується в науковій практиці [29, 33, 34]. Електрокінетичний потенціал плазматичних мембран еритроцитів є важливим фізико-хімічним показником для оцінки таких параметрів біологічної активності клітин, як стійкість до дії зовнішніх чинників [34], клітинний гомеостаз [33], активація (інактивація) клітин [29] та інше. З метою дослідження біогенної активності УФ та ТГц діапазонів визначали дозову залежність поверхневих електричних властивостей мембран еритроцитів за умов впливу НІЛВ. Експериментально методом мікроелектрофорезу [28] визначали електрофоретичну рухливість еритроцитів крові щурів та обчислювали значення дзета-потенціалу і щільність розподілу поверхневого заряду клітин.

На рисунку 1 представлені результати досліджень дозозалежної зміни величини дзета-потенціалу опромінених еритроцитів. Спостерігається тенденція зниження електрокінетичного потенціалу досліджуваних клітин зі зростанням експозиційної дози опромінення для УФ та ТГц діапазонів. При УФ опроміненні суттєво змінюється заряд мембранної поверхні в інтервалі доз до 0,327 Дж/см², встановлено зменшення величини дзета-потенціалу на 33% відносно контрольного зразка. Тоді як за умов максимальної експозиційної дози опромінення (0,546 Дж/см²) зменшення величини дзета-потенціалу відбувається на 39% у порівнянні з неопроміненим контролем. За умов опромінення ТГц лазером встановлено зменшення досліджуваної величини на 47% при максимальній дозі опромінення (3,119 Дж/см²) порівняно з неопроміненим контролем, при цьому на перших етапах опромінення також, як і для УФ-діапазону, зміни більш значні у порівнянні з максимальною дозою. Результати представлені в таблиці 1 узгоджуються з загальним уявленням щодо механізму формування електрокінетичного потенціалу мембран та логічно підтверджують, що першопричина зміни електрокінетичних властивостей – зміна перерозподілу зарядів на мембранній поверхні опромінених клітин.

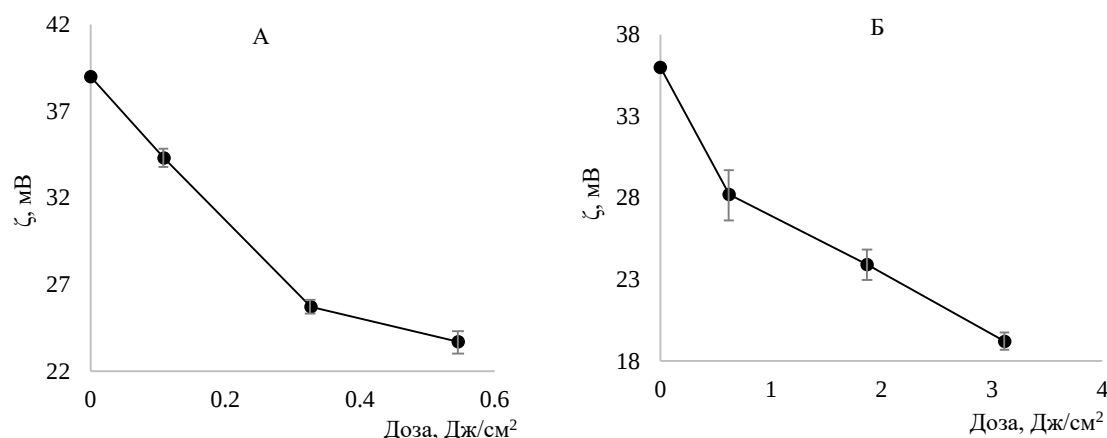


Рис. 1. Дозозалежна зміна величини дзета-потенціалу мембранної поверхні еритроцитів за умов впливу лазерного випромінювання діапазонів УФ (А), $\lambda = 0,337$ мкм та ТГц (Б), $\lambda = 118,8$ мкм.

Fig. 1. Dose-dependent change in the value of the zeta potential of the membrane surface of erythrocytes under the conditions of exposure to UV (A) ($\lambda = 0.337 \mu\text{m}$) and THz (Б) ($\lambda = 118.8 \mu\text{m}$) laser radiation.

Таблиця 1. Щільність поверхневого заряду опромінених лазером еритроцитів в УФ та ТГц діапазонах ($\bar{X} \pm \Delta x$; $n = 5$)

Table 1. Surface charge density of laser-irradiated erythrocytes in the UV and THz ranges ($\bar{X} \pm \Delta x$; $n = 5$)

	УФ	ТГц
	$\delta, 10^{-3} \text{ Кл} \cdot \text{м}^{-2}$	
Контроль	$1,13 \pm 0,04$	$1,04 \pm 0,02$
$D_1 (0,109 \text{ Дж/см}^2)$	$0,99 \pm 0,08$	$0,82 \pm 0,08$
$D_2 (0,327 \text{ Дж/см}^2)$	$0,74 \pm 0,09$	$0,69 \pm 0,10$
$D_3 (0,546 \text{ Дж/см}^2)$	$0,69 \pm 0,07$	$0,56 \pm 0,05$

Відомо, що електрофоретична рухливість клітин та щільність заряду поверхні визначається фосfolіпідним складом клітинної мембрани та фізико-хімічним станом ліпідому [35]. Вплив фізичних чинників на мембрани еритроцитів може спричинювати перебудови ліпідного бішару [36], зміни фосfolіпідного складу та їх жирнокислотних залишків [37]. У зв'язку з цим доцільно було дослідити активність процесів ПОЛ та визначити рівень генерації первинних продуктів переокислення жирнокислотних залишків із різною кількістю подвійних зв'язків у фосfolіпідах мембран еритроцитів після опромінення НІЛВ УФ та ТГц діапазонів. Як видно з рисунку 2, одноразове опромінення суспензії еритроцитів УФ лазером за умов різних експозиційних доз ($D_1=0,109 \text{ Дж/см}^2$; $D_2=0,327 \text{ Дж/см}^2$; $D_3=0,546 \text{ Дж/см}^2$) спричинює зниження рівня ДК після УФ опромінення в дозах $0,109 \text{ Дж/см}^2$ (на 17 %) та $0,327 \text{ Дж/см}^2$ (на 50 %), після опромінення в максимальній дозі $0,546 \text{ Дж/см}^2$ не виявлено достовірних змін концентрації ДК. Рівень ТК, ОДК та ТЕК стає нижчим контрольного значення після УФ опромінення в усіх досліджуваних дозах (Рис. 2, Рис. 3), проте дозова залежність є нелінійною. Максимальне зменшення досліджуваних показників встановлено в зразках опромінених в дозі $D_2=0,327 \text{ Дж/см}^2$: на 56% для ТК, на 57% для ОДК, на 52% для ТЕК порівняно з неопроміненим контролем.

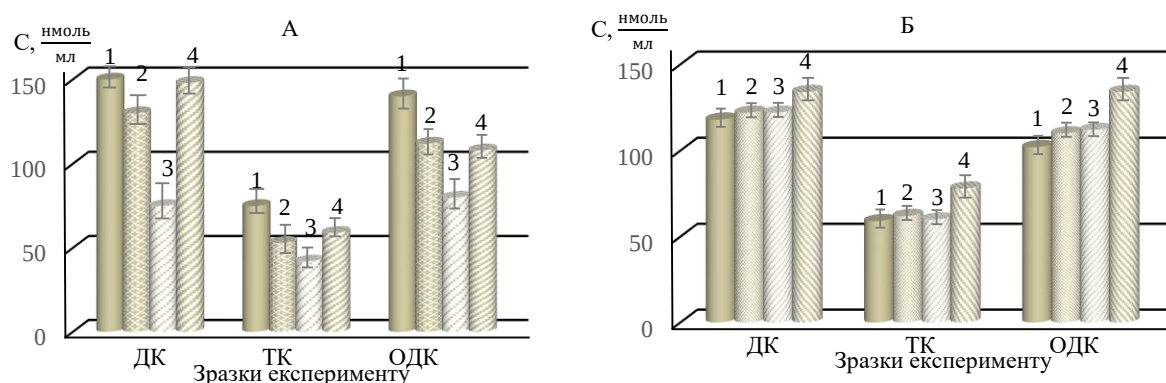


Рис. 2. Вплив НІЛВ УФ ($\lambda=0,337$ мкм) (А) та ТГц ($\lambda = 118,8$ мкм) (Б) діапазонів на рівень первинних продуктів ПОЛ (ДК, ТК, ОДК) в дозах опромінення: 1 — контроль; 2 — D_1 ; 3 — D_2 ; 4 — D_3 .

Fig. 2. Influence of LLL UV ($\lambda=0.337$ μm) (A) and THz ($\lambda = 118.8$ μm) (B) ranges on the level of primary products of POL (DC, TC, ODK) in doses: 1 — control; 2 — D_1 ; 3 — D_2 ; 4 — D_3 .

За умов впливу ТГц НІЛВ виявлено дозозалежне монотонне збільшення генерації продуктів ПОЛ у порівнянні з неопроміненим контролем. Лазерне випромінювання даного діапазону стимулює первинні ланки ПОЛ, спостерігається тенденція зростання концентрації кон'югатів зі збільшенням експозиційної дози, але експериментальні дані мають статистичну значущість лише для максимальної дози $3,119$ Дж/см², з застосуванням якої було зареєстровано підвищення концентрації для усіх продуктів ПОЛ, що вимірювалися, приблизно на 30 %. Аналогічні залежності спостерігались і для ТЕК, як видно з результатів експериментальних досліджень представлених на рисунку 3.

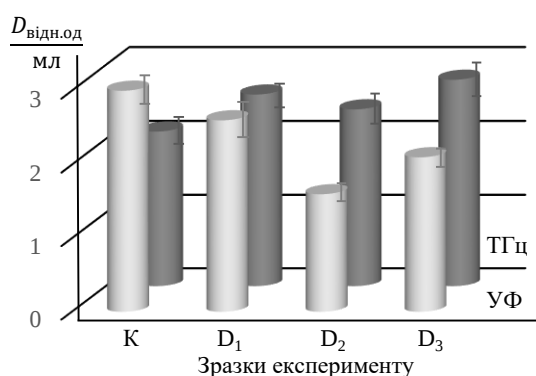


Рис. 3. Вплив НІЛВ УФ ($\lambda = 0,337$ мкм) та ТГц ($\lambda = 118,8$ мкм) діапазонів на рівень первинних продуктів ПОЛ для жирних кислот з чотирма та більше подвійними зв'язками (ТЕК).

Fig. 3. The effect of LLL UV ($\lambda = 0.337$ μm) and THz ($\lambda = 118.8$ μm) ranges on the level of primary LPO products for fatty acids with four or more double bonds (TEC).

Електрична активність еритроцитів визначається фізичним станом ліпідного бішару [38], конформаційним станом мембранних інтегральних білків [39], білків цитоскелету та їх взаємодією, примембранним іонним оточенням [40], що, в свою чергу, в комплексі забезпечує в'язкоеластичні властивості еритроцитарної мембрани. Слід припустити, що виявлені зміни електрокінетичного потенціалу еритроцитів крові щурів за умов впливу лазерного випромінювання спричинені, перш за все, зміною в'язкоеластичних властивостей клітинних мембран. Дослідження стійкості плазматичних мембран

еритроцитів до дії кислотного гемолітика після їх лазерного опромінення дозволяє впевнитися в важливості такого припущення.

На рисунку 4 та в таблиці 2 представлені результати досліджень стійкості мембран еритроцитів до дії кислотного гемолітика після опромінення клітин НІЛВ УФ та ТГц діапазонів. Встановлено зниження стійкості еритроцитарних мембран та достовірне зменшення величини лаг-періоду на 22% при УФ опроміненні в дозах 0,327 Дж/см² та 0,546 Дж/см². Разом з тим, розрахункові дані, які відображено в таблиці 2, свідчать про те, що лазерне випромінювання не впливає на швидкість кислотного гемолізу еритроцитів в досліджуваному інтервалі доз УФ випромінювання, не виявлено достовірних змін цього параметру в опромінених зразках.

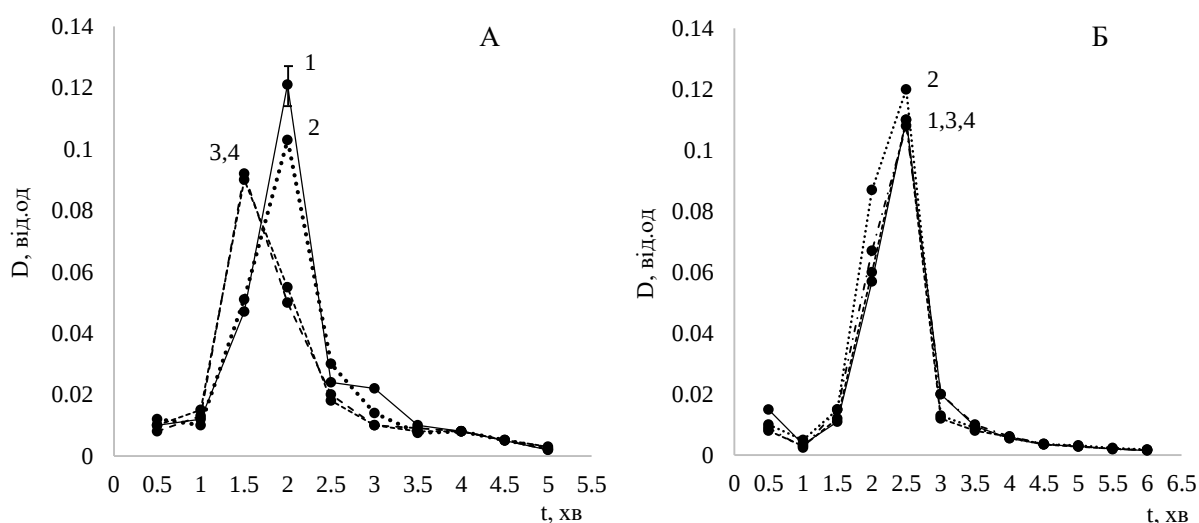


Рис. 4. Дозові ефекти НІЛВ УФ ($\lambda = 0,337$ мкм) (А) та ТГц ($\lambda = 118,8$ мкм) (Б) діапазонів на резистентність мембран еритроцитів до дії кислотного гемолітика в дозах опромінення: 1 — контроль; 2 — D_1 ; 3 — D_2 ; 4 — D_3 .

Fig. 4. Dose effects of LLLV UV ($\lambda = 0.337 \mu\text{m}$) (A) and THz ($\lambda = 118.8 \mu\text{m}$) (B) ranges on the resistance of erythrocyte membranes to acid hemolysis in doses: 1 — control; 2 — D_1 ; 3 — D_2 ; 4 — D_3 .

За результатами експериментальних досліджень не виявлено біогенної активності лазерного випромінювання ТГц діапазону при опроміненні суспензії еритроцитів. Відсутні достовірні зміни стійкості еритроцитарної мембрани до дії кислотного гемолітика, про що свідчать експериментальні дані рисунку 4.

Таблиця 2. Розрахункові параметри кислотного гемолізу еритроцитів щурів за умов впливу лазерного випромінювання УФ – діапазону ($\bar{X} \pm \Delta x$; $n = 5$)

Table 2. Calculated parameters of acid hemolysis of rat erythrocytes under the conditions of exposure to UV laser radiation ($\bar{X} \pm \Delta x$; $n = 5$)

Умови експерименту	Швидкість гемолізу ($\text{tgAx}10^{-3}$)	LAG-період (d,сек)
Контроль	$3,3 \pm 0,1$	$77,9 \pm 1,0$
$D_1 (0,109 \text{ Дж/см}^2)$	$3,6 \pm 0,1$	$76,5 \pm 1,3$
$D_2 (0,327 \text{ Дж/см}^2)$	$2,98 \pm 0,16$	$61,4 \pm 1,7$
$D_3 (0,546 \text{ Дж/см}^2)$	$3,42 \pm 0,17$	$60,4 \pm 1,6$

З огляду на отримані експериментальні результати дослідження, а також аналіз світової літератури, можна припустити, що встановлене зниження дзета-потенціалу еритроцитів при опроміненні в обох режимах свідчить про перерозподіл заряджених груп клітинної поверхні, стимульований лазерним випромінюванням. Без зміни іонного середовища в експерименті заряд поверхні клітин може змінюватися виключно завдяки молекулярним перебудовам у самій клітині. У світовій літературі описані випадки зниження дзета-потенціалу мембрани еритроцитів за абсолютно різних умов, наприклад, при паразитарній інфекції [41], при зберіганні еритроцитів [42], при розвитку патологічних станів організму людини [43] або під впливом статичного магнітного поля різної магнітної інтенсивності на еритроцити здорових людей [44]. Авторами називаються можливі причини зміни дзета-потенціалу, не пов'язані з кількістю залишків сілової кислоти на клітинній поверхні, які роблять основний внесок у величину потенціалу, як вважається [41, 43, 44]. До таких причин відносяться зміна кластеризації або ремоделювання мембранних білків еритроцитів, підвищена здатність мембрани до деформації [45], латеральні білок-білкові взаємодії, структурні та механічні зміни цитоплазматичної мембрани та властивостей клітин за рахунок модифікації ліпідому еритроцитів [46]. Взаємодії між сусідніми молекулами можуть змінювати перерозподіл білків та нейтралізувати деякі поверхневі заряди.

Зміна ліпідому за умов впливу НІЛВ може здійснюватися за механізмом ПОЛ. Справді, результати дослідження, продемонстровані у цій роботі на рисунках 2 і 3, вказують на підвищення рівня первинних продуктів ліпопереокислення після опромінення еритроцитів в максимальній дозі у діапазоні ТГц. Динаміка утворення первинних продуктів ПОЛ під дією НІЛВ УФ діапазону показує їх зниження, що нелінійно залежить від поглиненої дози. Але, враховуючи замкненість системи інкубації клітин, зниження базового рівня первинних продуктів (порівняно з контролем) може бути пов'язане з утворенням цих інтермедіатів більш просунутих продуктів ПОЛ, наприклад, вторинних, типу малонового альдегіду або основ Шиффа, концентрація яких у цьому дослідженні не вимірювалася, на жаль. Деякими авторами було показано, що під дією НІЛВ різних діапазонів знижується сатурація кисню в еритроцитах, дезоксигенація еритроцита відбувається за рахунок фотодисоціації кисню з гемоглобіну [47, 48, 49]. Ці спостереження дозволяють припустити, що у разі лазерно-індукованої дезоксигенації еритроцитів вільний кисень, що утворюється в результаті фотодисоціації, діє як окисник і призводить до окисного пошкодження еритроцитів.

Таким чином, активація вільно-радикальних процесів за умов впливу НІЛВ досліджуваних діапазонів може бути однією з причин перебудови еритроцитарної мембрани та зниження дзета-потенціалу клітин. При цьому опромінення в УФ діапазоні викликає більш суттєві зміни досліджуваних параметрів порівняно з ТГц, але залежність від дози не є лінійною і потребує додаткових досліджень для уточнення механізмів.

Дослідниками було показано, що дія різних факторів на еритроцити тварин і людини *in vivo* або *in vitro* — бактеріальних токсинів [41], зберігання [42] та багатьох інших [50] призводить до зміни асиметрії ліпідного бішару, зокрема, на поверхню зовнішнього моношару експонується фосфатидилсерин із внутрішньоклітинного мембранного шару. Це може викликати наслідки, а саме: агрегацію клітин, зміну їхньої форми, ініціацію еритропозу. З іншого боку, сильна агрегація спостерігалася і через знижений дзета-потенціал клітин крові. На зразках зрілих еритроцитів, агрегати яких мали велику площу поверхні, що охоплює декілька клітин, фракціонованих за щільністю, було виявлено зниження величини дзета-потенціалу у порівнянні з молодими еритроцитами [51]. Еритрограми кислотного гемолізу клітин після дії НІЛВ, представлені в даній роботі,

показали (Рис. 4 і Табл. 2), що стійкість клітин знижується, причому дозозалежно, тільки після опромінення в УФ діапазоні. Зареєстровані різні величини оптичної щільності зразків гемолізатів опромінених еритроцитів УФ НІЛВ у досліджуваних дозах (Рис. 4) можуть вказувати на формування в загальному пулі еритроцитів субпопуляції клітин менш стійкої до гемолізу, яка характеризується відносним зниженням концентрації гемоглобіну всередині клітин після їх опромінення внаслідок часткового виходу молекул в середовище ще до застосування гемолітику. Таким чином, значна частина клітин під дією НІЛВ УФ діапазону набуває більш крихкої мембрани і, швидше за все, клітини зменшуються в об'ємі, що може свідчити про ериптоз частини досліджуваної популяції еритроцитів, опромінених НІЛВ УФ в дозах $0,327 \text{ Дж/см}^2$ і $0,546 \text{ Дж/см}^2$. Можливо, явища, які спостерігаються в даних дослідженнях: зниження дзета-потенціала поряд зі зниженням стійкості клітин та активацією процесів ПОЛ, свідчать на користь зміни асиметрії еритроцитарних мембран за рахунок перерозподілу компонентів ліпідного бішару, у тому числі і за рахунок появи в зовнішньому ліпідному моношарі фосфоліпідів внутрішнього шару. Що призводить до апоптичних змін в еритроцитах під дією НІЛВ УФ діапазону.

ВИСНОВКИ

За умов впливу НІЛВ встановлено дозозалежне зниження електрокінетичного потенціалу плазматичної мембрани еритроцитів при опроміненні в УФ та ТГц діапазонах, залежність не є лінійною для всіх досліджуваних частот випромінювання.

Активация вільно-радикальних процесів під дією НІЛВ УФ та ТГц діапазонів може бути однією з причин перебудови еритроцитарної мембрани та зниження дзета-потенціалу клітин за таких умов опромінення. Встановлена залежність від дози не є лінійною для досліджуваних частот і потребує подальшого вивчення з метою з'ясування механізмів дії.

Еритрограми кислотного гемолізу виявили дозозалежне зниження стійкості еритроцитарних мембран до дії гемолітика після їх опромінення НІЛВ в УФ діапазоні, опромінення в дозах $0,327 \text{ Дж/см}^2$ і $0,546 \text{ Дж/см}^2$ викликає формування в загальному пулі еритроцитів субпопуляції клітин менш стійких до гемолізу за рахунок підвищеної крихкості мембрани.

Отримані дані можуть бути використані для розширення спектру застосування НІЛВ УФ діапазону в методиках ВЛОК.

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>
І. А. Забеліна  <https://orcid.org/0009-0005-3071-9635>
А. О. Коваленко  <https://orcid.org/0000-0002-6332-8922>
О. М. Левченко  <https://orcid.org/0000-0002-4460-8419>
О. В. Гурін  <https://orcid.org/0000-0003-1382-5338>

REFERENCES

1. Khuda LV, Cheban LM, Khudiyi OI. The influence of low-frequency laser emission on phyto- and zooplankton productivity properties. Scientific Herald of Chernivtsy University. Biology (Biological Systems). 2020;12(2):196–201. <https://doi.org/10.31861/biosystems2020.02.196> (In Ukrainian)
2. Luo GY, Sun L, Wei EX, Tan X, Liu TC. The effects of low-intensity He-Ne laser irradiation on erythrocyte metabolism. Lasers Med Sci. 2015;30(9):2313–8. <https://doi.org/10.1007/s10103-015-1806-6>

3. Oliveira MC, Krueger GF, Sganzerla JT, Gassen HT, Hernández PAG, Allgayer MDC, et al. Effect of radiotherapy and low-level laser therapy on circulating blood cells of rats. *J Lasers Med Sci.* 2021;12:e45. <https://doi.org/10.34172/jlms.2021.45>
4. Gorenskaya OV, Shckorbatov YuG, Filiponenko NS. Mutations rate in different lines of drosophila melanogaster after the treatment with caffeine and he-ne laser radiation. *Photobiol Photomed.* 2018;24:41–5. <https://doi.org/10.26565/2076-0612-2018-24-05> (In Ukrainian)
5. Erthal V, da Silva MD, Cidral-Filho FJ, Santos AR, Nohama P. ST36 laser acupuncture reduces pain-related behavior in rats: involvement of the opioidergic and serotonergic systems. *Lasers Med. Sci.* 2013;28(5):1345–51. <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1260-7>
6. Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Salgado MAC, Bjordal JM, Alves LP, Munin E, Costa MS. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. *J Photochem Photobiol B.* 2007;89(1):50–5. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2007.08.005>
7. Vasilyeva-Linetska LYa. Low-level laser therapy in rehabilitation of patients with ischemic heart disease: review of evidence-based studies. *Photobiol Photomed.* 2019;28:39–53. <https://doi.org/10.26565/2076-0612-2019-28-05> (In Ukrainian)
8. Huang YC, Tran N, Shumaker PR, Kelly K, Ross EV, Nelson JS, Choi B. Blood flow dynamics after laser therapy of port wine stain birthmarks. *Lasers Surg Med.* 2009;41(8):563–71. <https://doi.org/10.1002/lsm.20840>
9. Krasnoselsky N, Simonova L, Zavadska T, Pushkar E, Gertman V. Natural and systemic treatment effects of intra-vascular laser therapy in cancer patients. *Exp Clin Med.* 2019;82(1):87-93. <https://doi.org/10.35339/ekm.2019.01.13> (In Ukrainian)
10. Tomé RF, Silva DF, Dos Santos CA, de Vasconcelos Neves G, Rolim AK, de Castro Gomes DQ. ILIB (intravascular laser irradiation of blood) as an adjuvant therapy in the treatment of patients with chronic systemic diseases – An integrative literature review. *Lasers Med Sci.* 2020;35(9):1899–907. <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03100-4>
11. Naeser MA, Saltmarche A, Krengel MH, Hamblin MR, Knight JA. Improved cognitive function after transcranial light-emitting diode treatments in chronic, traumatic brain injury: two case reports. *Photomed Laser Surg.* 2011;29:351–8. <https://doi.org/10.1089/pho.2010.2814>
12. Liebert A, Capon W, Pang V, Vila D, Bicknell B, McLachlan C, Kiat H. Photophysical mechanisms of photobiomodulation therapy as precision medicine. *Biomedicines.* 2023;11(2):237–68. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020237>
13. Kazemikhoo N, Sarafnejad AF, Ansari F, Mehdipour P. Modifying effect of intravenous laser therapy on the protein expression of arginase and epidermal growth factor receptor in type 2 diabetic patients. *Lasers Med. Sci.* 2016;31(8):1537–45. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-2012-x>
14. Pasternak K, Nowacka O, Wrobel D, Pieszyński I, Bryszewska M, Kujawa J. Influence of MLS laser radiation on erythrocyte membrane fluidity and secondary structure of human serum albumin. *Mol Cell Biochem.* 2014;388:261–7. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1917-y>
15. Gupta A, Avci P, Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Ultraviolet radiation in wound care: sterilization and stimulation. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2013;2(8):422–37. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0366>
16. Le Duff F, Fontas E, Giaccherio D, Sillard L, Lacour JP, Ortonne JP, et al. 308-nm excimer lamp vs. 308-nm excimer laser for treating vitiligo: a randomized study. *Br J Dermatol.* 2010;163:188–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.09778.x>
17. Hintzsche H, Stopper H. Effects of terahertz radiation on biological systems. *Crit Rev Environ Sci Technol.* 2012;42: 2408–34. <https://doi.org/10.1080/10643389.2011.574206>
18. Wang Y, Xiong Y, Chen M, Liu F, He H, Ma Q, Gao P, Xiang G, Zhang L. The biological effects of terahertz wave radiation-induced injury on neural stem cells. *iScience.* 2023;26(10):107418. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107418>
19. Gezimati M, Singh G. Advances in terahertz technology for cancer detection applications. *Opt Quantum Electron.* 2023;55(2):151. <https://doi.org/10.1007/s11082-022-04340-0>
20. Wang L. Terahertz imaging for breast cancer detection. *Sensors (Basel).* 2021;21(19):6465. <https://doi.org/10.3390/s21196465>
21. Fitzgerald AJ, Berry E, Zinovev NN, Walker GC, Smith MA, Chamberlain JM. Topical Review: An introduction to medical imaging with coherent terahertz frequency radiation. *Phys Med Biol.* 2002;47(7):R67–84. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/47/7/201>
22. Musawi Al, Jaafar MS, Al-Gailani MS, Ahmed NM, Suhaimi FM, Bakhsh M. Erythrocyte sedimentation rate of human blood exposed to low-level laser. *Lasers Med Sci.* 2016;31(6):1195–201. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-1972-1>

23. Paranich AV, Sichevska LV, Roshal OD. Structural and functional changes in plasma membranes of cells under the influence of laser radiation. *Photobiol Photomed.* 2000;3(3–4):94–7. (In Ukrainian)
24. Reznikov OG. General ethical principles of animal experiments. *Endokrynologia.* 2003;8(1):142–5. Available from: <https://endokrynologia.com.ua/index.php/journal/issue/view/59/65> (In Ukrainian)
25. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe. Strasbourg. 1986. 53 p.
26. Recknagel RO, Ghoshal AK. Quantitative estimation of peroxidative degeneration of rat liver microsomal and mitochondrial lipids after carbon tetrachloride poisoning. *Exp Mol Pathol.* 1966;5:413–26. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(66\)90023-2](https://doi.org/10.1016/0014-4800(66)90023-2)
27. Yamamoto Y, Niki E, Eguchi J, Kamiya Y, Shimasaki H. Oxidation of biological membranes and its inhibition. Free radical chain oxidation of erythrocyte ghost membranes by oxygen. *Biochim Biophys Acta – Biomembr.* 1985;819(1):29–36. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90192-0](https://doi.org/10.1016/0005-2736(85)90192-0)
28. Levine S, Levine M, Sharp KA, Brooks DE. Theory of the electrokinetic behavior of Human erythrocytes. *Biophys J.* 1983;42:127–135. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(83\)84378-1](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(83)84378-1)
29. Szeremeta M, Petelska AD, Kotyńska J, Pepiński 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>
30. Ilani A, Granoth R. The pH dependence of the hemolytic potency of bile salts. *Biochim Biophys Acta – Biomembr.* 1990;1027(2):199–204. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90085-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90085-3)
31. Rudenko SV, Nipot EE. Protection by chlorpromazine, albumin and bivalent cations against haemolysis induced by melittin, [Ala-14]melittin and whole bee venom. *Biochem J.* 1996;317(3):747–54. <https://doi.org/10.1042/bj3170747>
32. Glantz SA. *Primer of biostatistics.* 3rd ed. New York: McGraw Hill; 1992. 440 p.
33. Dobrzyńska I, Szachowicz-Petelska B., Darewicz B., Figaszewski ZA. Characterization of human bladder cell membrane during cancer transformation. *J Membr Biol.* 2015;248(2):301–7. <https://doi.org/10.1007/s00232-015-9770-4>
34. Petelska AD, Janica JR, Kotyńska J, Łebkowska U, Figaszewski ZA. The effect of contrast medium SonoVue on the electric charge density of blood cells. *J Membr Biol.* 2012;245(1):15–22. <https://doi.org/10.1007/s00232-011-9409-z>
35. Szachowicz-Petelska B, Dobrzyńska I, Figaszewski Z, Sulkowski S. Changes in physico-chemical properties of human large intestine tumour cells membrane. *Mol Cell Biochem.* 2002;238(1-2):41–7. <https://doi.org/10.1023/a:1019946718876>
36. Sichevska LV. The role of the lipid and the protein in radiation defeat of the erythrocyte membranes. *Biophys Bull.* 1998;1(1):128–32. Available from: <https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/article/view/2084/1823> (In Russian)
37. Dobretsov GE, Borschevskaya VA, Petrov VA, Vladimirov YuA. The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation. *FEBS Lett.* 1977;84(1):125–8. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(77\)81071-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(77)81071-5)
38. Dobrzyńska I, Szachowicz-Petelska B, Skrzydlewska E, Figaszewski ZA. Changes in electric charge and phospholipids composition in erythrocyte membrane of ethanol-poisoned rats after administration of teas. *Acta Pol Pharm.* 2004;61(6):483–7.
39. Adak S, Chowdhury S, Bhattacharyya M. Dynamic and electrokinetic behavior of erythrocyte membrane in diabetes mellitus and diabetic cardiovascular disease. *Biochim Biophys Acta – Gen Subj.* 2008;1780(2):108–15. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.10.013>
40. Stankowski S. Surface charging by large multivalent molecules Extending the standard Gouy-Chapman treatment. *Biophys J.* 1991;60:341–51. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82059-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82059-8)
41. Tokumasu F, Ostera GR, Amaratunga C, Fairhurst RM. Modifications in erythrocyte membrane zeta potential by *Plasmodium falciparum* infection. *Exp Parasitol.* 2012;131(2):245–51. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.03.005>
42. Bordi F, Cametti C, De Luca F, Gili T, Misasi R, Sorice M, et al. Structural alteration of erythrocyte membrane during storage: a combined electrical conductometric and flow-cytometric study. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2001;56(9–10):857–64. <https://doi.org/10.1515/znc-2001-9-1030>
43. Karemore M, Avari J. Alteration in zeta potential of erythrocytes in preeclampsia patients. In: Nidhi Sharma, editor. *Prediction of Maternal and Fetal Syndrome of Preeclampsia.* 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85952>
44. Doltchinkova V, Lozanova S, Rukova B, Nikolov R, Ivanova E, Roumenin C. Electrokinetic properties of healthy and β -thalassemia erythrocyte membranes under *in vitro* exposure to static magnetic field. *Front Chem.* 2023;11:1197210. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1197210>

45. Huang YX, Wu ZJ, Mehrishi J, Huang BT, Chen XY, Zheng XJ, Liu WJ, Luo M. Human red blood cell aging: correlative changes in surface charge and cell properties. *J Cell Mol Med.* 2011;15(12):2634–42. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01310.x>
46. Himbert S, Rheinstädter MC. Structural and mechanical properties of the red blood cell's cytoplasmic membrane seen through the lens of biophysics. *Front Physiol.* 2022;13:953257. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.953257>
47. Hamada R, Ogawa E, Arai T. Continuous optical monitoring of red blood cells during a photosensitization reaction. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2019;37(2):110–6. <https://doi.org/10.1089/photob.2018.4513>
48. Ahlawat S, Kumar N, Uppal A, Kumar Gupta P. Visible raman excitation laser induced power and exposure dependent effects in red blood cells. *J Biophotonics.* 2017;10(3):415–22. <https://doi.org/10.1002/jbio.201500325>
49. Wasik M, Gorska E, Modzelewska M, Nowicki K, Jakubczak B, Demkow U. The influence of low-power helium-neon laser irradiation on function of selected peripheral blood cells. *J Physiol Pharmacol.* 2007;58(5):729–37. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18204188>
50. Sathi A, Viswanad V, Aneesh TP, Kumar BA. Pros and cons of phospholipid asymmetry in erythrocytes. *J Pharm Bioallied Sci.* 2014;6(2):81–5. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.129171>
51. D'Alessandro A, Blasi B, D'Amici GM, Marrocco C, Zolla L. Red blood cell subpopulations in freshly drawn blood: application of proteomics and metabolomics to a decades-long biological issue. *Blood Transfus.* 2013;11:75–87. <https://doi.org/10.2450/2012.0164-11>

DOSE EFFECTS OF ULTRAVIOLET AND TERAHERTZ LASER RADIATION ON THE PLASMA MEMBRANE OF ERYTHROCYTES

L. V. Sichevska^{id}, T. M. Ovsyannikova^{id}, I. A. Zabelina^{id}, A. O. Kovalenko^{id}, O. M. Levchenko^{id}, O. V. Gurin^{id}
V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., 61022, Kharkiv, Ukraine

e-mail: sichevska@karazin.ua

Submitted March 17, 2025; Revised April 18, 2025;

Accepted April 22, 2025

Background: In modern medicine, various technical means and developments are actively used in invasive intravascular (IVL) and non-invasive transcutaneous blood irradiation methods, including low-intensity laser radiation (LLLR) of various ranges. Despite the positive clinical results of such exposure, the physical and molecular mechanisms remain incompletely understood. Ultraviolet (UV) and terahertz (THz) ranges of electromagnetic radiation are classified as biogenic; therefore, establishing their effects at the level of blood cells will allow them to be recommended for use in medical and biotechnological practice after the development of appropriate exposure methods.

The objective was to study the biogenic activity of ultraviolet (UV) and terahertz (THz) ranges of LLLR on the structural and functional state of red blood cells of rats *in vitro*.

Materials and methods: Using methods of microelectrophoresis, spectrophotometry and chemical erythrograms, the following was studied: zeta potential of *red blood cells*; the content of the primary products of lipid peroxidation in the *red blood cells* (fatty acid conjugates of membrane of *red blood cells* phospholipids — diene (DK), triene (TK), and tetraene (TTK), oxodiene (ODK); resistance of erythrocytes to the action of an acid hemolytic after previous laser irradiation in the UV and THz ranges. Laser irradiation of the samples in the UV range was carried out by a nitrogen pulsed laser ($\lambda = 0.337 \mu\text{m}$), with the average radiation power 5 mW; irradiation in the THz range with a continuous CO₂ laser ($\lambda = 118.8 \mu\text{m}$), the average radiation power is 20 mW. When the samples were irradiated, the density of radiation power W did not exceed 7 W/m^2 . The exposure dose under nitrogen laser irradiation was $D_{1UV}=0.109 \text{ J/cm}^2$, $D_{2UV}=0.327 \text{ J/cm}^2$, $D_{3UV}=0.546 \text{ J/cm}^2$. Under CO₂ laser irradiation, the exposure dose was $D_{1THz}=0.624 \text{ J/cm}^2$, $D_{2THz}=1.871 \text{ J/cm}^2$, $D_{3THz}=3.119 \text{ J/cm}^2$. The thickness of irradiated red blood cell suspension layer was 1 mm.

Results: The effect of low-dose LLLR UV and THz radiation causes physicochemical changes in the plasma membrane of erythrocytes. A nonlinear dose-dependent decrease in the electrokinetic potential of the cell surface and an increase in the hemolytic sensitivity of erythrocytes against the background of activation of lipid peroxidation processes in erythrocyte membranes have been established.

Conclusions: Under the influence of LLLR, the free-radical peroxidation of lipids of erythrocyte membranes is stimulated. Pronounced biogenic activity of UV of LLLR was detected at the level of erythrocyte membranes. The obtained data can be used to expand the spectrum of application of LLLR of the UV range in IVL techniques.

KEY WORDS: low-level laser radiation (LLLR); terahertz (THz) radiation; ultraviolet radiation; red blood cells; zeta-potential of erythrocytes; lipid peroxidation; acid hemolysis.

Original article<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-04>

UDC 577.359

OPTICAL AND ELECTRON MICROSCOPY IMAGING OF MODEL CIRCULATING TUMOUR CELLS

M. Olenchuk^{1,*} , G. Monastyrskyi¹ , O. Gnatyuk¹ , A. Boisen² ,
Z. Zhang² , G. Solyanik³ , D. Kolesnyk³ , S. Karakhim⁴ , G. Dovbeshko¹ 

¹Department of Physics of Biological Systems, Institute of Physics, NAS of Ukraine, 46 Prospect Nauky, 03028 Kyiv, Ukraine;

²Department of Health Technology, Technical University of Denmark, Ørsted's Plads, Building 345C, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark;

³Laboratory of Molecular and Cellular Mechanisms of Metastasis, R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, 45 Vasyl'kivs'ka St., 03022 Kyiv, Ukraine;

⁴Department of Muscle Biochemistry, O. V. Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, 9 Leontovicha Str., 01030 Kyiv, Ukraine

*Corresponding author: m.olenchuk@yahoo.com

Submitted April 28, 2025; Revised May 25, 2025;

Accepted May 25, 2025

Background: Microscopy is a key tool in biophysical research for visualizing living cells' morphology, structure, and dynamic processes. Depending on the specific research goals, various optical and electron microscopy techniques can be applied, each offering unique benefits. Determining the structural features of the cytoskeleton, nucleus, and membrane of circulating tumor cells in the model Lewis lung carcinoma (LLC) is an important biophysical and biological task, as it will allow identifying targets for antitumor and antimetastatic therapy, as well as investigating the mechanisms of action of antitumor drugs. However, comprehensive multimodal imaging of such cells — particularly under non-adherent conditions — remains limited in the literature due to the difficulty of working with such models.

Objectives: This study aimed to visualize Lewis lung carcinoma (LLC) cells cultured under de-adhesive conditions using various microscopy techniques for their characterization and to examine the cancer cells' structure and functionality. The goal was to evaluate each method's individual capabilities and combined strengths in revealing cellular morphology, internal structure, and nanoparticle interactions.

Materials and Methods: LLC cells were obtained from the National Bank of Cell Lines and Tumor Strains of the IEPOR (NAS of Ukraine) and cultured in RPMI-1640 medium under conditions of de-adhesive growth. Imaging was performed using inverted optical microscopy (Euromex Oxion), fluorescence and confocal microscopy (Carl Zeiss LSM 510) with F-actin (Alexa Fluor 488-phalloidin) and nuclear (Hoechst 33342) staining, and label-free Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) microscopy (Leica TCS SP8). Scanning electron microscopy (TESCAN MIRA3 LMU) was used for high-resolution surface imaging. 2D-MoS₂ nanoparticles, as well as 2D-MoS₂ and doxorubicin simultaneously, were applied to investigate nanoparticle-mediated labeling and cellular uptake.

Results: A comparative analysis of multiple imaging modalities — including optical, fluorescence, confocal, CARS, and SEM — was applied to Lewis lung carcinoma (LLC) cells. Fluorescence microscopy with specific fluorophores made it possible to analyze the size and properties of actin fibers and showed that nuclei occupy most of the deadhesive cells. Electron microscopy revealed numerous filopodia on the cell surface. CARS showed the presence of lipid droplets in the cells.

Citation: Olenchuk M, Monastyrskyi G, Gnatyuk O, Boisen A, Zhang Z, Solyanik G, Kolesnyk D, Karakhim S, Dovbeshko G. Optical and electron microscopy imaging of model circulating tumour cells. *Biophysical Bulletin*. 2025;53:46–59. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-04>

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

© Olenchuk M., Monastyrskyi G., Gnatyuk O., Boisen A., Zhang Z., Solyanik G., Kolesnyk D., Karakhim S., Dovbeshko G., 2025.

Conclusions: Each microscopy method provided complementary insights into cell morphology, cytoskeletal organization, lipid content, and surface ultrastructure. Nanoparticles demonstrated high utility as dual imaging and therapeutic agents. This work represents the first detailed SEM study of non-adherent LLC cells and highlights the potential of integrated multimodal imaging for studying circulating tumor cell models.

KEY WORDS: model circulating tumour cells LLC; SEM; CARS; confocal microscopy; nanoparticles.

Microscopy imaging techniques are widely utilized for studying dynamic cellular behavior in biophysics, enabling precise and real-time analysis of a broad range of cellular and tissue parameters. It allows for the observation of intercellular interactions, the behavior of individual cells, cytoskeletal dynamics, the activity of cellular organelles and molecules, and the measurement of cell proliferation over time. Various imaging modalities can be applied, including phase-contrast microscopy [1], fluorescence and confocal microscopy [1], multiphoton microscopy [2, 3], stimulated emission depletion microscopy (STED) [4], scanning electron microscopy (SEM) [5], and transmission electron microscopy (TEM) [6, 7].

Inverted microscopes are frequently employed in research to analyze and study tissues and cells, particularly living cells. Since many cellular processes can be directly visualized under the microscope, different imaging techniques are required depending on the experimental needs. Some experiments, such as chemotaxis assays or tube formation analysis, do not require staining and can be readily visualized using optical microscopy (e.g., phase contrast). However, due to the optical transparency of tissues to visible light and the necessity for sufficient contrast, various staining markers are often employed. Although optical microscopy exhibits low phototoxicity [8], it can still influence cellular behavior and must be minimized. For instance, light exposure should occur only during image acquisition, and the intensity of illumination can be reduced by employing highly sensitive cameras.

Fluorescence microscopy, which utilizes various fluorophores, enables the detection of more structural details and molecular interactions [9]. When applying fluorescence-based techniques, such as confocal microscopy, it is particularly critical to minimize cellular stress caused by excitation light. Phototoxic effects and photobleaching occur rapidly in live cells and can significantly alter experimental outcomes [10]. Stimulated emission depletion microscopy provides a clear view of a cell's cytoskeleton.

Multiphoton microscopy offers several advantages for live-cell imaging. The use of longer excitation wavelengths substantially reduces photobleaching compared to single-photon confocal imaging, thus enhancing cell viability during prolonged observation periods. This technique also enables three-dimensional (3D) fluorescent imaging of live cells at depths of several hundred micrometers in thick, highly scattering samples [11].

Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy has been increasingly utilized by cell biologists to study the dynamics of living cells with chemical specificity in a non-invasive, label-free manner [12–15]. Most CARS-based studies in cell biology have focused on lipid dynamics [12, 16], as CARS signals strongly from the C-H bond stretching vibrations in lipids. In fluorescence microscopy, achieving stable lipid-specific labeling remains challenging due to the interference of labeling processes with lipid function and localization. Consequently, in live-cell studies, performing rapid experiments on lipids and lipid droplets while maintaining quantitative accuracy is extremely difficult [17]. CARS microscopy has thus proven to be an excellent technique for investigating lipid dynamics in living cells with high chemical specificity.

The electron beam within a transmission electron microscope (TEM) poses significant challenges for biological specimens due to its high energy. To penetrate the sample and exit from the opposite side, the beam must possess sufficient energy, which can lead to local temperatures exceeding 100 °C where it strikes the specimen. Although scanning electron

microscopes (SEMs) employ lower-energy electron beams, they can still cause damage to biological samples. Additionally, the vacuum environment inside the microscope promotes water evaporation from biological samples, further complicating imaging. Therefore, careful sample preparation is crucial. SEM is particularly well-suited for analyzing cell morphology, proliferation, metabolism, and expression profiles.

Fluorescence confocal microscopy is widely employed for the investigation of Lewis lung carcinoma (LLC) cells. Depending on the specific objectives of the study, various fluorescent dyes are utilized. Green fluorescent protein (GFP) is commonly used for monitoring cell division, migration, and intercellular interactions [18]. Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) is frequently applied in immunological assays to assess lymphocyte proliferation and migration [19]. The red fluorescent protein *Katushka* [20] has been used in LLC studies; however, its variable expression levels within cell cultures present technical challenges when attempting to image cells with both high and low fluorescence intensities in the same field of view. Hoechst 33342 is routinely used for nuclear staining, cell cycle analysis, and apoptosis evaluation [21]. For cytoskeletal studies, phalloidin conjugates are applied, including far-red Alexa Fluor 633 phalloidin, which specifically stains the actin cytoskeleton [22], as well as Alexa Fluor 488 (green) and Alexa Fluor 546 (orange) phalloidin for precise visualization of filamentous actin (F-actin) structures [23].

The radiobiological response of Lewis lung carcinoma cells treated with gold nanoparticles was examined in [24], where scanning electron microscopy was employed for visualization. Samples were polymerized, and ultrathin sections (approximately 100 nm) were obtained using a diamond knife. These sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and imaged using a FEI Nova NanoSEM 230 in scanning transmission electron microscopy (STEM) mode at 15 kV in bright field vacuum conditions.

In this work, we present integrated data from optical and electron microscopy of circulating tumor cells (CTCs), which serve as a model for circulating metastatic cells. We assess the capabilities of each imaging modality independently and in combination. Using confocal microscopy with Alexa Fluor 488-conjugated phalloidin and Hoechst 33342, we aimed to analyze potential cytoskeletal reorganization and distinctive features in F-actin architecture in non-adherent LLC cells compared to their adhesive counterparts, as previously reported in [14]. The application of two-dimensional molybdenum disulfide (2D-MoS₂) nanoparticles as a substitute for conventional fluorescent dyes in confocal microscopy represents a promising alternative and warrants further investigation. Model deadhesive LLC cells have not been studied previously, and both electron images of deadhesive cells and confocal images characterizing actin fibers in such cells are absent in literature.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Lewis lung carcinoma cells (LLC) were obtained from the National Bank of Cell Lines and Tumor Strains of the IEPOR (R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology, and Radiology) of the National Academy of Sciences of Ukraine [25]. Cells were maintained under standard in vitro conditions at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cultures were grown in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, and 40 µg/mL gentamicin to prevent bacterial contamination. For experimental procedures, LLC cells were seeded at a density of 0.3×10^6 cells per 60 mm Petri dish. To investigate de-adhesive growth conditions, Petri dishes were left pre-coated with poly-2-hydroxyethyl methacrylate (poly-HEMA) solution. Poly-HEMA coating prevents cell attachment by forming a hydrophilic, non-adhesive surface, thus allowing

the study of de-adhesive cell behavior and morphology [14]. After seeding, cells were incubated for three days without changing the medium to maintain stable experimental conditions and to allow for natural progression of growth and morphological adaptation.

Method of preparation-of 2D-MoS₂ is dispersant-free liquid exfoliation of solvent-free mechanochemically delaminated bulk MoS₂ developed at the L. V. Pisarzhevsky Institute of Physical Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine by Dr. Oleg Posudievsky [26]. The initial concentration of the nanoparticle suspension was 0.15 mg/mL.

To investigate the biological effects of 2D-MoS₂ on tumor cells, 225 µL of the nanoparticle suspension was added to 1275 µL of cell culture medium in which Lewis lung carcinoma cells were maintained. Cells were cultured in 35 mm Petri dishes for 24 hours under standard incubation conditions (37 °C, 5% CO₂, humidified atmosphere). This dilution yielded a final concentration of 2D-MoS₂ nanoparticles of 0.021 mg/mL in the culture medium.

In a separate experimental group, doxorubicin (DOX) was added to the medium containing nanoparticles at 0.05 mg/mL concentration. The amount of doxorubicin added was standardized at 100 µL per 10,000 cells, based on initial seeding density. This setup allowed the evaluation of combined MoS₂ and DOX influence on the cells.

For control experiments, LLC cells were incubated under identical conditions, using the same culture medium and time frame, but without the addition of nanoparticles or doxorubicin. These controls were used to assess baseline cellular morphology, viability, and fluorescence without external agents.

Optical Microscopy

Optical imaging of the LLC cells was performed using an inverted microscope, Euromex Oxion Inverso (model OX.2453-PLPHF, Euromex Microscopen, The Netherlands). Imaging was conducted at 400× total magnification using phase contrast mode to enhance visualization of cellular morphology under live, unstained conditions. Optical observations provided preliminary assessments of cell proliferation patterns, morphology, and behavior under different substrate adhesion conditions.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

High-resolution morphological characterization of the LLC cells was carried out using a TESCAN MIRA LMU scanning electron microscope equipped with a Schottky field emission cathode. Secondary electron imaging mode was employed to optimize surface topography visualization. A contrast-optimized acceleration voltage of 10.0 kV was applied, with an imaging field of view set at 50 µm, yielding a final total magnification of approximately 3,790×. Samples were fixed, dehydrated through graded ethanol series, dried, and sputter-coated with a thin gold layer (~20 nm) before SEM analysis to ensure electrical conductivity and prevent charging artifacts.

Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy

Preparation of biological samples for scanning electron microscopy (SEM) requires a series of critical and meticulous steps to preserve cellular morphology and prevent artifacts. In this study, Lewis Lung Carcinoma (LLC) cells were cultured for 48 hours in Petri dishes pre-coated with poly (2-hydroxyethyl methacrylate) (poly-HEMA), a polymer that prevents cell adhesion to the substrate, thereby promoting a suspension-like growth state.

Following incubation, the cell suspension was gently harvested by low-speed centrifugation (1000 rpm for 5 minutes) to minimize mechanical stress and aggregation. The cell pellet was immediately fixed in a solution containing 4% paraformaldehyde and 2.5%

glutaraldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), ensuring stabilization of cellular structures at the ultrastructural level.

Subsequent triple washing with PBS and two additional washes with distilled water were performed to thoroughly remove residual salts, a crucial step to prevent salt crystallization artifacts during the drying process. Fixed cell suspensions were then deposited onto polished silicon wafers, chosen for their smooth, conductive surface and chemical inertness. Samples were air-dried in a laminar flow hood to gently remove moisture while preserving cell morphology. To ensure adequate charge dissipation during SEM imaging, a conductive gold layer approximately 20 nm thick was applied to the sample surface by magnetron sputtering.

Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) and Second Harmonic Generation (SHG) Microscopy

CARS and SHG imaging were performed using a Leica TCS SP8 CARS microscope (Leica Microsystems, Germany). This multimodal system allows simultaneous acquisition of vibrational (CARS) and structural (SHG) signals without the need for exogenous labeling. Imaging was conducted with constant excitation parameters: pump and Stokes beam powers at the sample were maintained at 1 W, with the system output power measured at 870 mW. The spectral acquisition was tuned to optimize sensitivity for lipid structures, exploiting the high C-H vibrational contrast in the cellular environment. This approach enabled non-invasive visualization of lipid-rich compartments such as membranes and lipid droplets, critical for understanding cell morphology and metabolism under various conditions.

Confocal Laser Scanning Microscopy

Confocal fluorescence imaging of the LLC cells was conducted using an LSM 510 confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss, Germany). Fluorescence detection utilized FSet10wf and FW1-2: FSet20wf filter sets optimized for capturing emission from common fluorophores under UV lamp and laser excitation. All images were acquired using an LD Plan-Neofluar 40x/0.6 Korr objective lens, ensuring high-resolution imaging with minimal spherical aberration. Confocal microscopy allowed three-dimensional reconstruction of cellular structures, and provided complementary information on intracellular organization, particularly under de-adhesive conditions where cytoskeletal rearrangements and lipid droplet formation are prominent.

RESULT AND DISCUSSION

SEM Imaging

For detailed morphological analysis of LLC cells, secondary electron imaging was performed using a field-emission scanning electron microscope under optimized conditions. The use of secondary electrons enabled high-resolution visualization of surface features with enhanced topographical contrast. Notably, due to the presence of a robust cytoskeletal network, the LLC cells displayed sufficient mechanical stability to withstand electron beam exposure without notable structural collapse.

The Fig. 1. shows representative SEM images with subsequent magnification of the same spot.

Dense clusters of spherical cells without signs of spreading or flattening are observed in the centre and upper right regions of the image. Cells have maintained their rounded morphology, characteristic of suspension growth, with clearly defined and textured surface features. Groupings of cells into small colonies are apparent, likely due to residual intercellular contacts or aggregation following centrifugation.

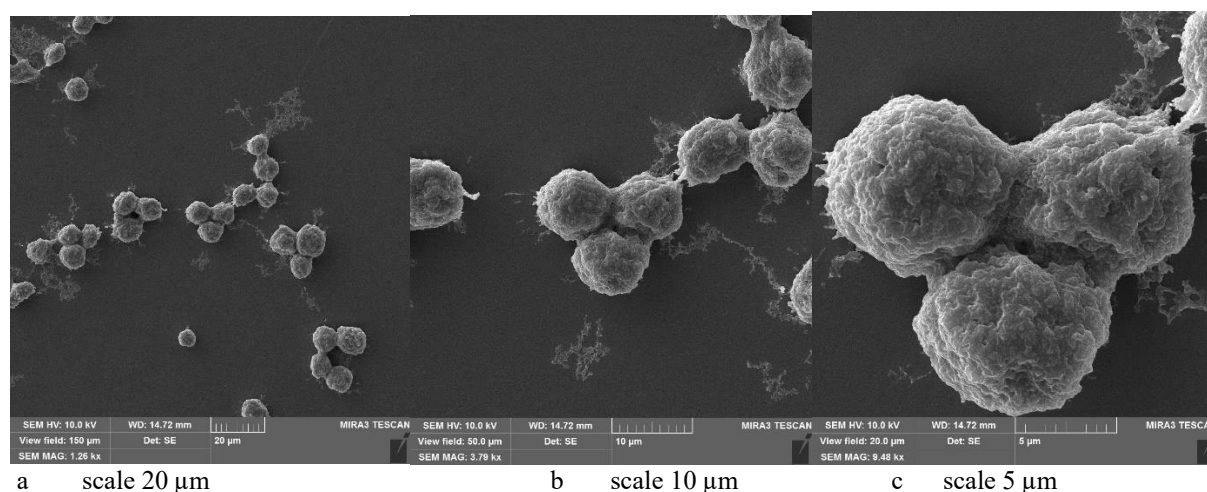


Fig. 1. Representative SEM images of LLC cells cultured under de-adhesive conditions:

- a) Low magnification (1260X, scale bar = 20 μm , field of view 150 μm) showing dispersed spherical cells and small aggregates on the polished silicon wafer substrate;
- b) Intermediate magnification (3790X, scale bar = 10 μm , field of view 50 μm) revealing detailed cell contours and extracellular filamentous material;
- c) High magnification (9480X, scale bar = 5 μm , field of view 20 μm) displaying individual cells with rugged membrane surfaces featuring microprotrusions and vesicular structures, suggestive of active surface remodelling.

The cell surfaces appear heterogeneous, exhibiting numerous microvilli, blebs, and micropseudopodia, indicative of active membrane processes. These features may reflect apoptotic changes or stress responses induced by the non-adhesive culture environment. The SEM analysis of LLC cells, cultured under non-adhesive conditions and fixed in suspension, confirms the preservation of their spherical morphology and the presence of dynamic surface structures. This model system provides valuable insights for simulating the behavior of CTCs and investigating adhesion-independent morphological adaptations.

CARS and SHG Imaging

CARS and SHG images of de-adhesive LLC cell cultures are presented in Figure 2. For CARS imaging of the cell, forward-detected signals (F-CARS) were collected to enhance signal-to-noise ratio and achieve high-resolution vibrational contrast.

During CARS acquisition, the frequency difference between the pump (ω_p) and Stokes (ω_s) beams was tuned to specific Raman-active vibrational modes. The first setting targeted 1650 cm^{-1} , corresponding to the Raman shift associated with the C=C [27], which matches the Raman shift of symmetric stretching vibration CH_2 (by the way, the strongest vibration belongs to asymmetric CH_2 near 2930 cm^{-1} in CARS and 2937 cm^{-1} in Raman spectra [14, 28]), predominantly originating from lipid-rich cellular compartments such as membranes and lipid droplets.

Figure 2 displays representative F-CARS and SHG images acquired at these vibrational frequencies. The 1650 cm^{-1} imaging (Fig. 2a) emphasizes regions rich in unsaturated lipids and proteins [27], providing insight into the biochemical organization of the cells. Imaging at 2850 cm^{-1} (Fig. 2c) highlights the distribution of saturated lipid structures [28], which are critical for membrane integrity and cellular energy storage. Additionally, SHG signals were simultaneously collected to visualize non-centrosymmetric structures, such as collagen fibers or ordered membrane regions, without the need for exogenous labeling as well non-resonance background.

The combination of F-CARS and SHG imaging thus offers a powerful, label-free approach to assess both the molecular composition and structural organization of LLC cells under de-adhesive conditions

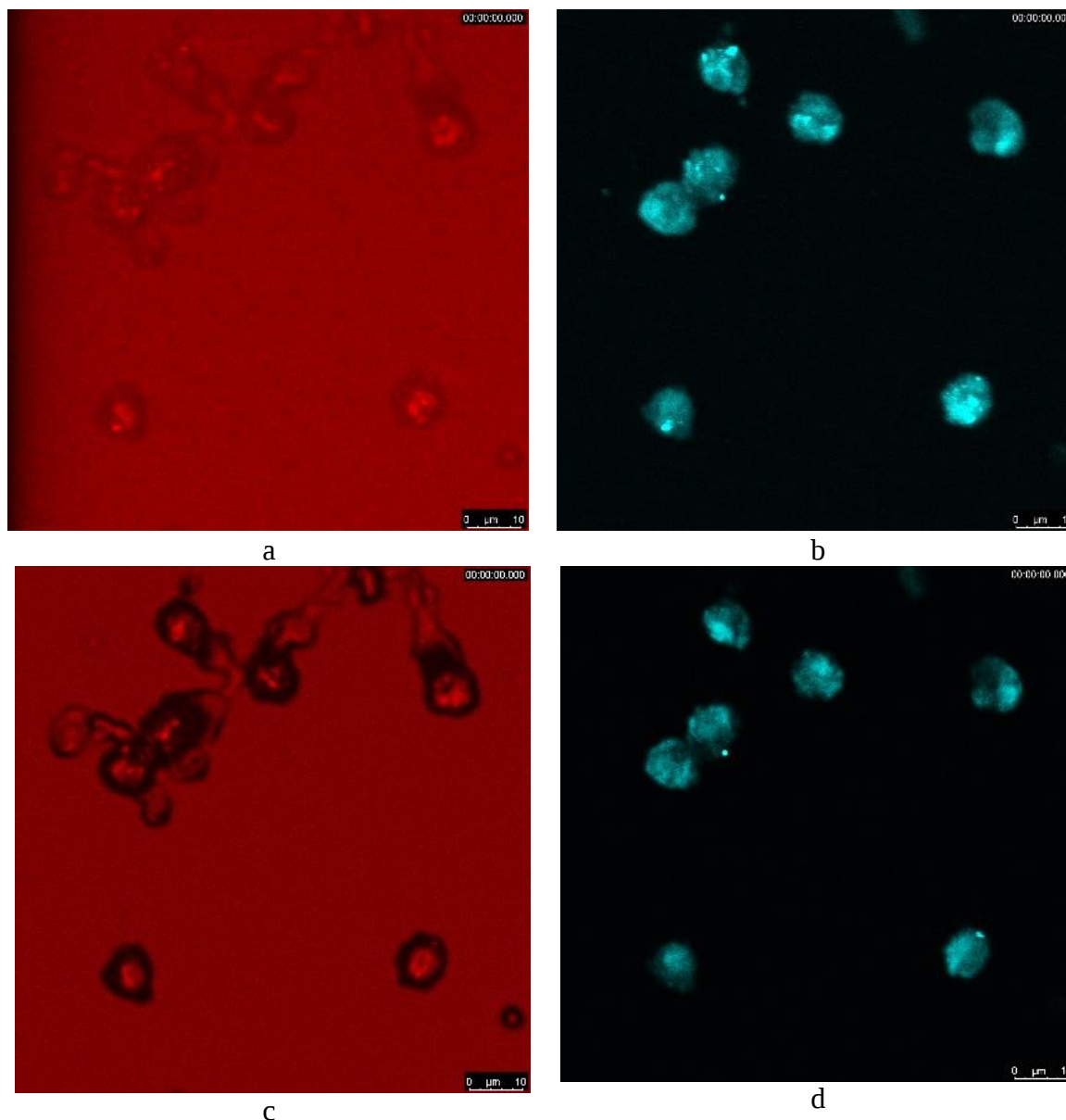


Fig. 2. F-CARS (a) and SHG (b) images at 1650 cm^{-1} ; F-CARS (c) and SHG (d) images at 2850 cm^{-1} of de-adhesive LLC. Scale bar = $10\text{ }\mu\text{m}$.

F-CARS imaging revealed distinct vibrational contrast between content-rich and content-poor regions within de-adhesive LLC cells. Content-rich cellular poles, comprising the cell membrane along with associated lipid droplets, exhibited a strong CARS signal due to the high density of CH_2 groups and unsaturated lipid components. In contrast, content-poor poles, consisting primarily of the cell membrane with minimal internal lipid accumulation, produced a significantly weaker CARS signal. This variation in CARS intensity provides valuable biochemical information about intracellular heterogeneity and lipid distribution under non-adherent growth conditions.

Optical Imaging

Living mammalian cells are nearly as translucent as ice cubes submerged in water. Consequently, to render them visible under standard brightfield or fluorescence microscopy, cells must be either stained or genetically modified to absorb, emit, or scatter light effectively. Staining enables the differentiation of cells and the visualization of specific intracellular structures. Among various staining techniques, immunofluorescence represents the gold standard, wherein specific antibodies conjugated with fluorescent dyes bind to target proteins within the cell. This method provides enhanced contrast and allows simultaneous detection and localization of multiple proteins through the use of differently colored fluorophores.

To study the cytoskeletal structure and the organization of filamentous actin (F-actin) and the nucleus in LLC cells, the dyes Alexa Fluor 488-conjugated phalloidin and Hoechst 33342 were used, respectively. An image of cells stained with Alexa Fluor 488-conjugated phalloidin obtained using an inverted microscope is shown in Figure 3a, while the corresponding confocal image of the same sample is presented in Figure 4a. LLC cells stained with Hoechst 33342 are shown in Figures 3b and 4b.

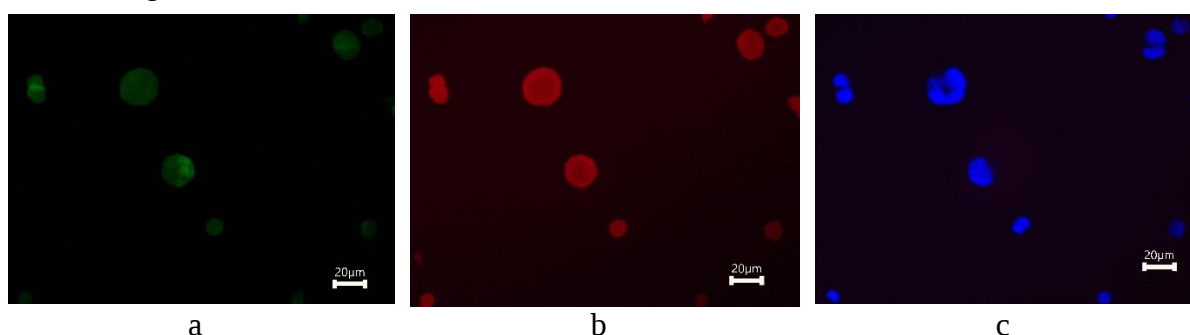


Fig. 3. Inverted microscope images of F-actin staining LLC cells, cell nuclei stained by Hoechst 33342.2. Scale bar = 20 µm.

Fluorescence microscopy was employed to gain more detailed information on intracellular structures and molecular dynamics. A standard set of three fluorescence filter cubes — targeting blue (DAPI channel, ~460 nm emission), green (FITC channel, ~520 nm emission), and red (Texas Red or TRITC channel, ~620 nm emission) — was utilized to visualize different cellular components selectively. The blue filter typically highlights nuclei stained with DAPI or similar dyes, the green filter reveals cytoskeletal structures or membrane components labeled with FITC, and the red filter is commonly used to detect actin filaments or lipid structures stained with TRITC or analogous fluorophores.

In our experiment, it is clearly observed that the cells exhibit a de-adhesive phenotype, as indicated by their rounded morphology. A heterogeneous distribution of F-actin within the cell is also well visualized (Fig. 3a), along with distinct chromatin organization features within the nucleus (Fig. 3c). However, in the case of our specific optical system, image quality was reduced during digital conversion, primarily due to the limited performance of the CCD camera used. Confocal fluorescence microscopy was employed to visualize cytoskeletal organization and nuclear morphology in de-adhesive LLC cells. Representative confocal images are presented in Figure 4. The green fluorescence channel was selectively enhanced to emphasize the staining of filamentous actin (F-actin) using Alexa Fluor 488-conjugated phalloidin (Fig. 4a). Simultaneously, cell nuclei were counterstained with Hoechst 33342, a DNA-specific dye that emits in the blue channel (Fig. 4b).

In de-adhesive LLC cells, F-actin fibers formed prominent perinuclear structures, tightly encircling the nuclei. This arrangement is similar to that observed in cells grown under adhesive conditions [14]; however, in de-adhesive cells, the F-actin fibers exhibited reduced diameter

and shortened length. These observations suggest that cytoskeletal remodeling occurs in response to the absence of adhesion forces, leading to a more compact and mechanically adapted cytoskeletal architecture. The combined use of F-actin and nuclear staining thus provided detailed insights into the structural adaptations of LLC cells under de-adhesive culture conditions (Fig. 4c).

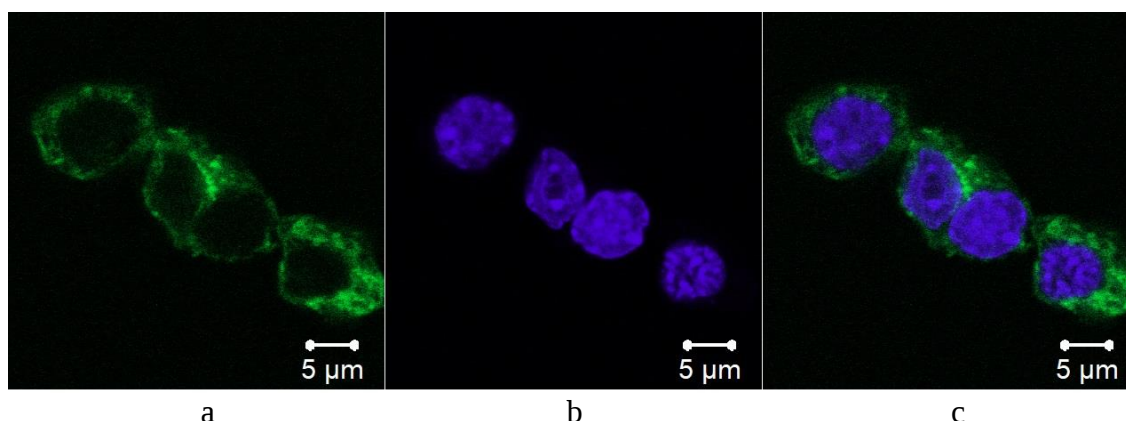


Fig. 4. Confocal images of F-actin staining (a) in LLC cells under de-adhesive growth, cell nuclei stained by Hoechst 33342.2 (b) and (c) image from both channels. Scale bar = 5 μ m.

This multicolor imaging approach provided complementary datasets that enabled precise analysis of both the general morphology and the specific intracellular organization of LLC cells.

However, it is important to acknowledge that such invasive preparative techniques can significantly alter cellular behavior, thereby compromising the *in vivo* relevance of *in vitro* live-cell observations. The chemical or photonic stress introduced during sample staining and preparation can lead to artifacts that obscure native physiological states.

Nanoparticles can be effectively employed as contrast agents for enhancing fluorescence signals during confocal microscopy imaging of cells. In this study, an aqueous suspension of two-dimensional molybdenum disulfide (2D-MoS₂) nanoparticles was used to investigate their interaction with LLC cells and to assess their potential as imaging enhancers.

Figure 5 presents representative confocal images of three experimental groups: control LLC cells (Fig. 5a), LLC cells incubated with MoS₂ nanoparticles (Fig. 5b), and LLC cells treated with a doxorubicin and MoS₂ nanoparticle (Fig. 5c).

For fluorescence excitation, lasers of different wavelengths were employed to selectively stimulate various components: 543 nm laser (T1, 60% intensity) was used for excitation of the red fluorescence channel, 488 nm laser (T2, 50% intensity) was used for excitation of the green fluorescence channel, 405 nm laser (T3, 30% intensity) was used for excitation of the blue fluorescence channel.

Beam splitters FW1-1 (FSet10wf) and FW1-2 (FSet20wf) were applied according to the corresponding fluorescence sets. Additionally, ultraviolet (UV) excitation was performed in transmission mode without emission filters to detect the autofluorescence of cells and nanoparticles.

Visualization of LLC cells (Fig. 6 a, d), LLC cells incubated with 2D-MoS₂ nanoparticles (Fig. 6 b, e) was also performed under widefield illumination conditions. Figure 6 presents images acquired using both halogen lamp excitation in transmission mode and ultraviolet (UV) lamp excitation with selective optical filtering with FSet10 wf and FSet20 wf filters.

The application of 2D-MoS₂ nanoparticles with the anticancer drug doxorubicin resulted in extensive fluorescence labeling of LLC cells, as demonstrated in Figure 5c and Figure 6 c, f. Confocal imaging revealed uniform staining of the entire cell body within the green

fluorescence range, accompanied by pronounced luminescence signals in both the green and red spectral regions.

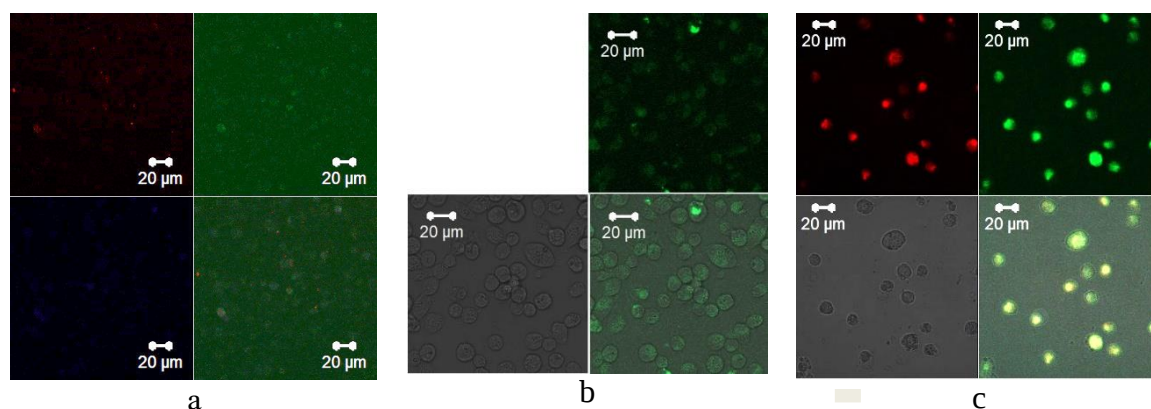


Fig. 5. Confocal images of LLC cells (a), LLC cells with 2D-MoS₂ nanoparticles (b), LLC cells with 2D-MoS₂ nanoparticles with doxorubicine (c). excitation: Laz 543 nm (a, c), 488 nm (a, b, c), 405 nm (a), transmission mode (b, c). Scale bar = 20 µm.

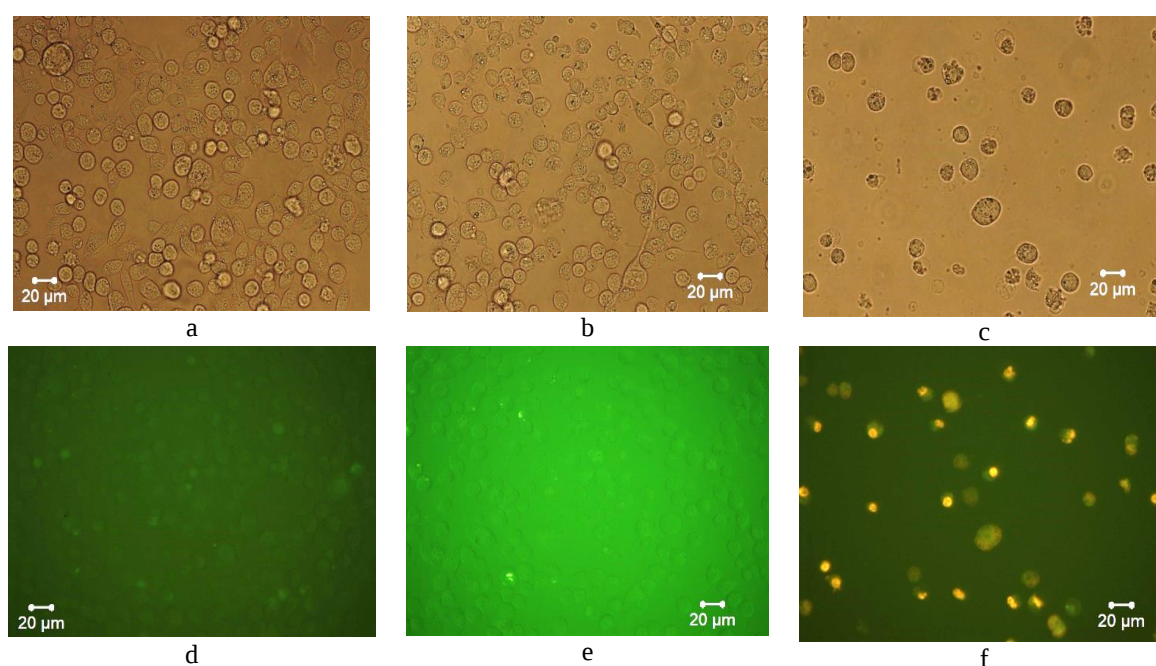


Fig. 6. Confocal images of LLC cells (a), LLC cells with 2D-MoS₂ nanoparticles (b), LLC cells with 2D-MoS₂ nanoparticles with doxorubicine (c) with a halogen lamp excitation, transmittance mode; and LLC cells (d), LLC cells with 2D-MoS₂ nanoparticles (e), LLC cells with 2D-MoS₂ nanoparticles with doxorubicine (f) with UV lamp excitation with FSet10 wf and FSet20 wf filters. Scale bar = 20 µm.

Our results indicate that 2D nanoparticles can be effectively utilized as multifunctional markers for the visualization of cellular structures (Fig. 5 b, 6 b, e). Specifically, they facilitate the detection of critical cellular events such as apoptosis, necrosis, and intracellular redistribution of therapeutic agents like DOX. Importantly, MoS₂ nanoparticles alone did not exhibit cytotoxic effects on LLC cancer cells; instead, a modest increase in proliferative activity was observed, suggesting a degree of cellular tolerance to the nanomaterial.

We supposed that the MoS₂ particles may break down and easy split in aggressive environment of tumor cells during long-term incubation (1 days) and convert to nanometer-sized MoS₂ nanoparticles (referred to as "dots") successfully entered the cells (Fig. 5b), localizing predominantly within the cytoplasm and often accumulating in close proximity to

the nucleus. In cells treated with the 2D-MoS₂ and DOX, the nanoparticles, together with the doxorubicin, appeared to permeate the intracellular space extensively, covering both perinuclear and cytoplasmic regions and effect of staining became better.

Moreover, cells seeded onto nanostructured gold surfaces and treated with DOX and 2D-MoS₂-exhibited enhanced fluorescence intensity under ultraviolet excitation when using a red emission filter. This effect is likely due to the plasmonic properties of the gold substrate, which can amplify local electromagnetic fields and thereby increase the fluorescence signal of nearby molecules.

Overall, our findings suggest that 2D-MoS₂ nanoparticles, particularly when combined with nanostructured gold surfaces, hold promise as potent contrast enhancers in confocal microscopy and as luminescent markers operating effectively in both green and red spectral regions.

CONCLUSION

In this study, we demonstrated that two-dimensional molybdenum disulfide (2D-MoS₂) nanoparticles can serve as effective markers for cell structure visualization and for enhancing image contrast in fluorescence microscopy. The use of 2D-MoS₂ nanoparticles enabled strong and broad fluorescence signals in the green and red spectral ranges without the need for additional staining, offering a less invasive alternative for live-cell imaging.

Scanning electron microscopy (SEM) was shown to be a powerful technique for detailed morphological characterization of Lewis lung carcinoma (LLC) cells. SEM provided high-resolution imaging of cell surfaces and membrane features, revealing abundant filopodia structures on their surfaces. However, it requires a specific and carefully controlled sample preparation protocol, including fixation, dehydration, and conductive coating, to prevent sample damage and charging under the electron beam.

The advantages of Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) microscopy were also highlighted in this work. CARS offers a non-invasive, label-free approach to study live cells with chemical specificity. CARS microscopy confirmed the presence of lipid droplets within the cytoplasm. By tuning the frequency difference between the pump and Stokes beams, it was possible to selectively visualize different cellular components. Imaging at 1650 cm⁻¹ targeted the cis C=C stretch vibrations characteristic of unsaturated lipids and the Amide I band associated with protein structures, while imaging at 2850 cm⁻¹ highlighted symmetric CH₂ stretch vibrations, predominantly from lipid-rich domains. The ability of CARS to distinguish between lipid and protein content without external markers underscores its potential for studying cellular dynamics with minimal perturbation.

Overall, the combination of advanced microscopy techniques, including SEM, CARS, confocal fluorescence microscopy, and nanoparticle-assisted imaging, provides a comprehensive toolkit for investigating the morphology, molecular composition, and dynamic behavior of cancer cells under different culture conditions. Undoubtedly, high-resolution visualization of such cells provides deeper insights into the biophysical and biochemical mechanisms underpinning metastatic dissemination.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is supported by project NRFU № 2021.01/0229 “Biophysical characteristics of circulating metastatic cells as potential targets of antimetastatic therapy” (2022-2025). We express our gratitude to Doctor of Chemical Sciences, Senior Researcher O. Yu. Posudievsky for providing aqueous suspensions of molybdenum disulfide.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

Authors' ORCID ID

Maryna Olenchuk  <https://orcid.org/0000-0002-3710-6349>
 Grygorii Monastyrskyi  <https://orcid.org/0000-0002-4910-552X>
 Olena Gnatyuk  <https://orcid.org/0000-0003-4406-5503>
 Anja Boisen  <https://orcid.org/0000-0002-9918-6567>
 Zhongyang Zhang  <https://orcid.org/0000-0002-9035-2880>
 Galina Solyanik  <https://orcid.org/0000-0002-8657-1263>
 Denis Kolesnik  <https://orcid.org/0000-0002-1223-3544>
 Sergiy Karakhim  <https://orcid.org/0000-0002-8389-0584>
 Galyna Dovbeshko  <https://orcid.org/0000-0002-7701-0106>

REFERENCES

1. Zuluaga AF, Drezek R, Collier T, Lotan R, Follen M, Richards-Kortum R. Contrast agents for confocal microscopy: how simple chemicals affect confocal images of normal and cancer cells in suspension. *J Biomed Opt.* 2002;7(3):398–403. <https://doi.org/10.1117/1.1481047>
2. Torcellan T, Stolp J, Chtanova T. In vivo imaging sheds light on immune cell migration and function in cancer. *Front Immunol.* 2017;8:309. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00309>
3. Perrin L, Bayarmagnai B, Gligorijevic B. Frontiers in intravital multiphoton microscopy of cancer. *Cancer Rep.* 2020;3:e1192. <https://doi.org/10.1002/cmr2.1192>
4. Hein B, Willig KI, Hell SW. Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(38):14271–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807705105>
5. Ali R, El-Boubbou K, Boudjelal M. An easy, fast and inexpensive method of preparing a biological specimen for scanning electron microscopy (SEM). *MethodsX.* 2021;8:101521. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101521>
6. Peckys DB, Mazur P, Gould KL, de Jonge N. Fully hydrated yeast cells imaged with electron microscopy. *Biophys J.* 2011;100(10):2522–9. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.03.045>
7. Hou WL, Chang M, Liu XF, Hu LS, Hua SC. Proteomic and ultrastructural analysis of Clara cell and type II alveolar epithelial cell-type lung cancer cells. *Transl Cancer Res.* 2020;9(2):565–76. <https://doi.org/10.21037/tcr.2019.12.04>
8. Conchello JA, Lichtman JW. Optical sectioning microscopy. *Nat Methods.* 2005;2(12):920–31. <https://doi.org/10.1038/nmeth815>
9. Cook A, Walterspiel F, Deo C. HaloTag-based reporters for fluorescence imaging and biosensing. *Chembiochem.* 2023;24(12):e202300022. <https://doi.org/10.1002/cbic.202300022>
10. Khodjakov A, Rieder CL. Imaging the division process in living tissue culture cells. *Methods.* 2006;38(1):2–16. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.07.007>
11. Rubart M. Two-photon microscopy of cells and tissue. *Circ Res.* 2004;95(12):1154–66. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000150593.30324.42>
12. Nahmad-Rohen A, Regan D, Masia F, McPhee C, Pope I, Langbein W, et al. Quantitative label-free imaging of lipid domains in single bilayers by hyperspectral coherent raman scattering. *Anal. Chem.* 2020;92(21):14657–66. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03179>
13. Shi J, Bera K, Mukherjee P, Alex A, Chaney EJ, Spencer-Dene B, et al. Weakly supervised identification and localization of drug fingerprints based on label-free hyperspectral CARS microscopy. *Anal Chem.* 2023;95(29):10957–65. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c00979>
14. Gnatyuk O, Kolesnyk D, Voitsitskyi T, Karakhim S, Nikolenko A, Dementjev A, et al. Vibrational markers of a model circulating metastatic cells LLC-R9. *Spectroscopy Journal.* 2024;2(4):306–21. <https://doi.org/10.3390/spectroscj2040018>
15. Dovbeshko G, Gnatyuk O, Dementjev A, Rutkauskas D, Kovalska E, Baldycheva A, et al. Coherent anti-stokes Raman scattering spectroscopy (CARS) and imaging of DNA on graphene layers and glass covers. *FlatChem.* 2021;27:100243. <https://doi.org/10.1016/j.flatc.2021.100243>
16. Pezacki JP, Blake JA, Danielson DC, Kennedy DC, Lyn RK, Singaravelu R. Chemical contrast for imaging living systems: molecular vibrations drive CARS microscopy. *Nat Chem Biol.* 2011;7:137–45. <https://doi.org/10.1038/nchembio.525>
17. Liu C, He S, Guo XF, Wang H. A novel near-infrared AIE probe for sensitive imaging of lipid droplet and dual-parameter cancer diagnosis. *Anal Chim Acta.* 2025;1352:343916. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2025.343916>

18. Rashidi B, Moossa AR, Hoffman RM. Specific route mapping visualized with GFP of single-file streaming contralateral and systemic metastasis of Lewis lung carcinoma cells beginning within hours of orthotopic implantation. *J Cell Biochem*. 2013;114:1738–43. <https://doi.org/10.1002/jcb.24516>
19. Lin T, Liao Y, Chang W, Yang C, Cheng L, Cheng M, et al. The establishment of a lung colonization assay for circulating tumor cell visualization in lung tissues. *J Vis Exp*. 2018;136:e56761. <https://doi.org/10.3791/56761>
20. Rask L, Fregil M, Høgdall E, Mitchelmore C, Eriksen J. Development of a metastatic fluorescent Lewis Lung carcinoma mouse model: Identification of mRNAs and microRNAs involved in tumor invasion. *Gene*. 2013;517(1):72–81. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.083>.
21. Lee CB, Choi HG, Gurmessa SK, Jang IT, Kumar N, Jiang Z, et al. Enhancing antitumor immunity in Lewis lung cancer through plasma-treated medium-induced activation of dendritic cells. *Cancer Cell Int*. 2024;24:389. <https://doi.org/10.1186/s12935-024-03569-x>
22. Stankevicius V, Vasauskas G, Bulotiene D., Butkyte S, Jarmalaite S, Rotomskis R, et al. Gene and miRNA expression signature of Lewis lung carcinoma LLC1 cells in extracellular matrix enriched microenvironment. *BMC Cancer*. 2016;16:789. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2825-9>
23. Niu S-W, Wu C-H, Chen H-C, Yang C-J, Chang J-M, Chang EE, et al. Proteins secreted by lung cancer cells induce the onset of proteinuria via focal adhesion kinase signaling in mice. *Lab Invest*. 2023;103(8):100156. <https://doi.org/10.1016/j.labinv.2023.100156>
24. Pandey A, Vighetto V, Di Marzio N, Ferraro F, Hirsch M, Ferrante N, et al. Gold nanoparticles radio sensitize and reduce cell survival in Lewis lung carcinoma. *Nanomaterials*. 2020;10(9):1717. <https://doi.org/10.3390/nano10091717>
25. Pyaskovskaya ON, Dasyukevich OI, Kolesnik DL, Garmanchouk LV, Todor IN, Solyanik GI. Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance. *Exp Oncol*. 2007;29(3):197–202.
26. Posudievsky OYu, Khazieieva OA, Cherepanov VV, Dovbeshko GI, Shkavro AG, Koshechko VG, et al. Improved dispersant-free liquid exfoliation down to the graphene-like state of solvent-free mechanochemically delaminated bulk MoS₂. *J Mater Chem C*. 2013;1(39):6411–5. <http://doi.org/10.1039/C3TC30856A>
27. Yoneyama H, Sudo K, Leproux P, Couderc V, Inoko A, Kano H. Invited Article: CARS molecular fingerprinting using sub-100-ps microchip laser source with fiber amplifier. *APL Photonics*. 2018;3:092408. <https://doi.org/10.1063/1.5027006>
28. Gnatyuk O, Dovbeshko G, Dementjev A, Chernyakova K., Posudievsky O, Kupchak, et al. Spectroscopic and microscopic evidence of 2D boron nitride nanoflake interaction with doxorubicin. *Opt Mater: X*. 2024;22:100323. <https://doi.org/10.1016/j.omx.2024.100323>

ОПТИЧНА ТА ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ ДЛЯ ВІЗУАЛІЗАЦІЇ МОДЕЛЬНИХ ЦИРКУЛЮЮЧИХ ПУХЛИННИХ КЛІТИН

М. Оленчук^{1*}, Г. Монастирський¹, О. Гнатюк¹, А. Бойзен², Ч. Чжан²,
Г. Соляник³, Д. Колесник³, С. Карахим⁴, Г. Довбешко¹

¹Відділ фізики біологічних систем, Інститут фізики НАН України, проспект Науки, 46, 03028 Київ, Україна;

²Відділ технологій охорони здоров'я, Технічний університет Данії, площа Ерстед, 345С, 2800, Кінгс-Лінгбю, Данія;

³Лабораторія молекулярних і клітинних механізмів метастазування, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, вул. Васильківська, 45, 03022 Київ, Україна;

⁴Відділ біохімії м'язів, Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, вул. Леонтовича, 9, 01030 Київ, Україна

* e-mail: m.olenchuk@yahoo.com

Надійшла до редакції 28 квітня 2025 р. Переглянута 25 травня 2025 р.

Прийнята до друку 25 травня 2025 р.

Актуальність. Мікроскопія є ключовим інструментом у біофізичних дослідженнях для візуалізації морфології, структури та динамічних процесів у живих клітинах. Залежно від конкретних задач застосовують різні методи оптичної та електронної мікроскопії, кожен з яких має свої переваги. Визначення особливостей будови цитоскелета, ядра, мембрани циркулюючих пухлинних клітин на моделі карциноми легені Льюїса (LLC) є важливою біофізичною та біологічною задачею, оскільки дозволить встановити мішені для протипухлинної та антиметастатичної терапії, а також дослідити механізми дії протипухлинних препаратів. Однак комплексне мультимодальне зображення таких клітин, особливо в умовах відсутності адгезії, залишається обмеженим у літературі через складність роботи з такими моделями.

Мета. Метою роботи було отримати зображення клітин карциноми легені Льюїса (LLC), вирощених в деадгезивних умовах, за допомогою різних методів мікроскопії. Завданням було оцінити

можливості кожного методу окремо та у поєднанні для візуалізації клітинної морфології, внутрішньоклітинної структури та взаємодії з наночастинками.

Матеріали та методи. Клітини LLC були отримані з Національного банку клітинних ліній та штамів пухлин ІЕПОР НАН України та культивувалися у середовищі RPMI-1640 в умовах деадгезивного росту. Візуалізацію проводили за допомогою інверсного оптичного мікроскопа (Euromex Oxion), флуоресцентної та конфокальної мікроскопії (Carl Zeiss LSM 510) з фарбуванням F-актину (Alexa Fluor 488-фалоїдіном) і клітинних ядер (Hoechst 33342), безміткової мікроскопії когерентного антистоксового розсіювання (Leica TCS SP8), а також скануючої електронної мікроскопії (TESCAN MIRA3 LMU). 2D-MoS₂ наночастинки, а також 2D-MoS₂ і доксорубіцин одночасно, були застосовані для дослідження опосередкованого маркування наночастинками клітин та поглинання клітинами.

Результат. У цій статті представлено порівняльний аналіз різних методів візуалізації культур клітин карциноми легені Льюїса (LLC), включаючи оптичні, флуоресцентні, конфокальні, КАРС і СЕМ мікроскопічні техніки. Флуоресцентна мікроскопія зі специфічними барвниками дала можливість зробити аналіз розмірів і морфології F-актинових волокон і показала, що ядра займають більшу частину деадгезивних клітин. Електронна мікроскопія виявила численні філоподії на поверхні клітин. КАРС виявив наявність ліпідних дроплетів в клітинах.

Висновки. Кожен із методів мікроскопії забезпечив унікальні та доповнюючі одна одну характеристики клітинної морфології, організації цитоскелета, вмісту ліпідів та структури мембрани. Наночастинки показали ефективність як подвійні агенти — маркери та носії препаратів. Вперше представлено докладне SEM-дослідження деадгезивних клітин LLC, що демонструє потенціал мультимодальної візуалізації для аналізу модельних циркулюючих пухлинних клітин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: модельні циркулюючі пухлинні клітини LLC; СЕМ; КАРС; конфокальна мікроскопія; наночастинки.

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-05>

УДК 577.352 + 636.09

ПРОТИКОРОНАВІРУСНА АКТИВНІСТЬ C₆₀ ФУЛЕРЕНУ: IN SILICO ТА IN VITRO СКРИНІНГ

В. В. Гурмач¹, В. Р. Караушу², З. С. Клестова³, В. П. Берест⁴,
Ю. І. Прилуцький²

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, вул. Академіка Заболотного, 150, м. Київ, 03143, Україна;

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, 01601, Україна;

³Інститут медичної вірусології та епідеміології вірусних захворювань, вул. Ельфріди Аульхорн, 6, 72076, Тюбінген, Німеччина;

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

e-mail: prylut@ukr.net

Надійшла до редакції 30 грудня 2024 р. Переглянута 1 квітня 2025 р.

Прийнята до друку 6 квітня 2025 р.

Актуальність. Пошук потенційних терапевтичних засобів проти найбільш поширених коронавірусів, які несуть загрозу життю людини і тварин, є актуальним питанням сучасної біомедицини.

Мета роботи полягала в оцінці *in silico* здатності C₆₀ фулерену взаємодіяти з мембранним білком ACE2, запобігаючи утворенню комплексу «коронавірус-ACE2» і подальшому його проникненню всередину клітини-господаря, а також ефективності протикоронавірусної дії цих вуглецевих наночастинок у системах *in vitro*.

Методи. Для дослідження структурної організації білка ACE2 людини використали дані Protein Data Bank, для побудови мембрани — web-ресурс CHARMM-GUI, а для C₆₀ фулерену — онлайн сервер SwissParam. Потенційні кишені зв'язування для C₆₀ фулерену у структурі ACE2 визначили за допомогою програмного пакету Caver. Для дослідження взаємодії C₆₀ фулерену та ACE2 використали алгоритм системного молекулярного докінгу (sdock+). Розрахунки з молекулярної динаміки (МД) виконали у програмному пакеті Gromacs 2020. В експериментах *in vitro* використали цитотоксикологічні та вірусологічні методи. Статистичну обробку результатів вимірювань проводили за використання програми Statistica 13.3.

Результати. Встановили три потенційних сайти зв'язування між жолобком пептидазного домену білка ACE2 і C₆₀ фулереном. Результати молекулярного докінгу та МД свідчать, що C₆₀ фулерен утворює два стабільних комплекси з ACE2 білком, блокуючи таким чином його потенційну взаємодію з коронавірусами. За результатами *in vitro* досліджень випливає, що C₆₀ фулерени за максимально допустимої концентрації 37,5 мкг/мл діють на коронавіруси свиней (α-коронавірус) і великої рогатої худоби (β-коронавірус) на ранній стадії реплікації (1 год) у чутливих клітинних системах, суттєво знижуючи їх інфекційну активність на величину 2,00 lg ТЦД₅₀/мл і ≥2,28 lg ТЦД₅₀/мл, відповідно.

Як цитувати: Гурмач ВВ, Караушу ВР, Клестова ЗС, Берест ВП, Прилуцький ЮІ. Протикоронавірусна активність C₆₀ фулерену: *in silico* та *in vitro* скринінг. Biophysical Bulletin. 2025;53:60–71. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-05>

Citation: Hurmach VV, Karaushu VR, Klestova ZS, Berest VP, Prylutsky YuI. Anticoronavirus activity of C₆₀ fullerene: *in silico* and *in vitro* screening. Biophysical Bulletin. 2025;53:60–71. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-05> (in Ukrainian)

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

Висновки. Показано, що C₆₀ фулерен утворює два стабільних комплекси з білком ACE2, пригнічуючи його функціональну активність і блокуючи потенційну взаємодію з коронавірусами. Встановлено, що C₆₀ фулерени проявляють противірусну активність щодо коронавірусів двох груп на початковій стадії інфікування при взаємодії з чутливими клітинами-господаря.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: C₆₀ фулерен; коронавіруси тварин; молекулярний докінг; молекулярна динаміка; противірусна активність *in vitro*.

Пандемія COVID-19, спричинена коронавірусом SARS-CoV-2, який відноситься до тієї ж групи вірусів, що і добре відомі патогени SARS і MERS — збудники атипової пневмонії і близькосхідної лихоманки [1, 2]. Завдяки унікальному механізму вірусної реплікації коронавіруси мають високу тенденцію до рекомбінації та частоти мутацій, що потенційно збільшує можливість їх адаптації до нових господарів та екологічних ніш. Спалахи SARS, MERS, а потім і COVID-19 стимулювали дослідження їх збудників, за результатами яких було виявлено велику кількість відповідних антивірусних мішеней, таких як вірусні протеази, полімерази та внутрішні білки коронавірусів. Вважали, що війчасті і келихоподібні епітеліальні клітини, які вкривають носову порожнину, є основними мішенями потрапляння вірусу SARS-CoV-2 в організм людини. Ці клітини, як і низка інших, містять високий рівень білків ACE2 (ангіотензин-перетворюючий фермент 2; рецепторний білок, який кодується геном *ACE2*), які сприяють зв'язуванню коронавірусу SARS-CoV-2 з поверхнею клітин [3, 4]. Білковий шип на поверхні SARS-CoV-2 здатен також прикріплюватися до білка-рецептора як клітин легені людини, так і інших чутливих до вірусу клітин, зокрема ACE2, і, таким чином, проникає всередину органу. Відтак, проблема інактивації коронавірусу потребує детального вивчення його структурної організації — складових частин, особливо тих, які беруть участь у взаємодії з клітинами-мішенями різних органів людей (у зв'язуванні та проникненні) та механізмах розмноження вірусу в клітині-мішені.

Коронавірусна інфекція великої рогатої худоби (BPX) — хвороба, яка етіологічно зумовлена дією коронавірусу BPX (Bovine coronavirus, BCoV), який, як і вірус SARS-CoV-2, належить до групи β-коронавірусів (Betacoronavirus, subgenus *Embecovirus* lineage A). BCoV — це пневмоентеральний вірус, який інфікує верхні і нижні дихальні шляхи та кишківник і виділяється з фекаліями та секретами верхніх дихальних шляхів [5]. Захворюваність у телят становить 40–100%, а летальність — 15–20% при інфікуванні [6].

Коронавіруси свиней є одними з найбільш руйнівних патогенів, що негативно впливають на розвиток свинарства у всьому світі. До них відноситься, зокрема вірус трансмісивного гастроентериту свиней (TГС; TGEV, subgenus *Tegacovirus*), що належить до групи α-коронавірусів (Alphacoronavirus). Смертність поросят до 2-тижневого віку сягає 100% [7].

За винятком філогенезу коронавірусів ТГС і BPX, єдиною відомою характеристикою, що відрізняє їх між собою, є унікальний неструктурний протеїн 1 (nsr1), різний за розміром і послідовністю. Гомологія геному цих коронавірусів складає близько 54% [8]. Відтак, пошук і створення нових ефективних противірусних засобів як для людини, так і тварин, мають базуватися на моделях коронавірусів, що належать до різних груп.

Сучасні нанобіотехнології можуть бути використані для вирішення багатьох клінічних проблем, зокрема тих, що виникли внаслідок пандемії COVID-19 [9, 10]. Саме тому біосумісний [11] та біодоступний [12] C₆₀ фулерен викликає неабияку зацікавленість щодо застосування при коронавірусних інфекціях завдяки притаманній «специфічній» противірусній активності [13–17]. Так, встановлено, що ефективна доза C₆₀ фулеренів (250–1000 мкг/мл) щодо вірусу грипу типу А у 20 разів була меншою,

ніж відомого клінічного препарату римантадин [18.]. Комплекс C_{60} /полівінілпірролідон (ПВП) проявляв активність як проти ДНК, так і РНК-вірусів, зокрема проти вірусу простого герпесу (HSV-1). Після обробки вірусу грипу типу А комплексом C_{60} /ПВП морфологія вірусу змінювалася: була присутня велика кількість віріонів з порушеннями ліпідної оболонки [18.]. Автори [19] припускають, що інактивація вірусу Денге-2 при застосуванні карбоксифулерену відбувається на стадії абсорбції вірусу, внаслідок його гідрофобної взаємодії з ліпідною оболонкою вірусу. На підтвердження цим експериментальним фактам у роботі [20] *in silico* продемонстровано, що водорозчинні C_{60} фулерени утворюють пори в оболонці коронавірусу, руйнуючи її цілісність, і таким чином здатні викликати порушення відповідних стадій циклу його реплікації.

Показано, що хімічно модифікована молекула C_{60} стерично блокує ліпофільний канал протеази вірусів HIV-1 та HIV-2 [21, 22], є ефективним інгібітором полімерази NS5B та протеази NS3/4A вірусу гепатиту С [23]. Нарешті, у модельній роботі [24] продемонстрована здатність C_{60} фулерену блокувати білкові мішені 3CLpro (хімотрипсин-подібна протеаза) і RdRp (РНК-залежна РНК-полімераза) коронавірусу SARS-CoV-2 і таким чином пригнічувати його функціональну активність.

Відтак, метою цієї роботи було проведення комплексних модельних (*in silico* скринінг) та експериментальних (*in vitro* скринінг) досліджень водорозчинних C_{60} фулеренів як потенційних профілактичних/терапевтичних засобів проти найбільш поширених коронавірусів, що можуть нести загрозу життю людини і тварин. Як апатогенні для людини дослідні моделі для *in vitro* оцінювання протівірусної активності водорозчинних C_{60} фулеренів використано дві групи вірусів ТГС (α -коронавірус) і ВРХ (β -коронавірус).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для дослідження взаємодії C_{60} фулерену та ACE2 використали вбудований у QXP (швидкий пошук (Quick eXPlore)) алгоритм системного молекулярного докінгу (sdock+) [25, 26].

МД (молекулярна динаміка) розрахунки виконали у програмному пакеті Gromacs 2020 [27] та силовому полі Charmm36 [28]. МД складалася з наступних етапів: підготовка досліджуваної системи та генерування топології C_{60} фулерену за використання онлайн серверу SwissParam [29]. Для дослідження структурної організації мембранного білка ACE2 людини використали наявні дані Protein Data Bank (RCSB PDB) [30], а для побудови мембрани — web-ресурс CHARMM-GUI [31]. Потенційні кишені зв'язування для C_{60} фулерену у структурі ACE2 визначили за допомогою «cavity computational algorithm» у програмному пакеті Caver [32]. Далі проводили мінімізацію енергії системи, а потім — два етапи екваїбрації: (1) NVT (constant Number of particles, Volume, and Temperature) і (2) NPT (constant Number of particles, Pressure, and Temperature) упродовж 20 нс. Досліджуваний комплекс протонували відповідно до імплементованої у Gromacs 2020 функції “*ingh*”. Після того як дві взаємодіючі системи були об'єднані, їх помістили у квадратний бокс і заповнили молекулами води (TIP3P). Для імітації клітинного середовища у бокс додали іони Na^+/Cl^- (їх концентрація у боксі складала 0,15 М). Основний етап МД симуляції тривав 200 нс.

Для отримання водного розчину C_{60} фулеренів (C_{60} ФВР) був застосований метод, заснований на переведенні молекул C_{60} з толуолу у воду за умов ультразвукової обробки [33]. Одержаний C_{60} ФВР за максимальної концентрації 150 мкг/мл є типовим колоїдом, що містить як поодинокі молекули C_{60} , так і їх наноагрегати [34], і залишається високостабільним упродовж 18 місяців при +4 °С.

Для досліджень коронавірусів та визначення сполук, здатних знижувати їх

інфекційну активність, важливими є умови забезпечення вимог біобезпеки. Тому для досліджень було обрано представників родини *Coronaviridae* двох груп: α -коронавірус ТГС і β -коронавірус ВРХ (до групи β -коронавірусів також відноситься і збудник COVID-19). Ці віруси тварин є апатогенними для людини модельними об'єктами і тому слугували найоптимальнішим варіантом для проведення первинних досліджень з виявлення протикоронавірусної дії C₆₀ фулерену за умов *in vitro* у лабораторії з умовами біобезпеки рівня BSL-2, наявної в Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ).

Лінії культур клітин ВНК-21 (клітини нирки золотистого хом'ячка) та НВ (клітини нирки вівці) були одержані з кріосховища Національного Центру Штамів Мікроорганізмів ДНКІБШМ (зберігання у посудинах Дюара в атмосфері азоту, -196 °C). Як поживні середовища використовували DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) та 10% розчин фетальної сироватки крові ВРХ.

Культури клітин у посівній дозі 2×10^5 клітин/мл вирощували у 96-лункових плоскодонних культуральних планшетах за температури +37 °C в атмосфері 5% CO₂. Через 24 год, коли моношар клітин був сформований, проводили заміну поживного середовища на підтримуюче безсироваткове середовище і проводили необхідні експерименти.

Через 24, 48, 72, 96, 120 і 144 годин моношар клітин досліджували в інвертованому мікроскопі DM IL LED (Leica Microsystems GmbH, ФРН) на наявність цитотоксичної дії C₆₀ фулеренів (залежно від їх концентрації у діапазоні (3,6–150) мкг/мл) за порушенням цілісності і морфології клітинного моношару (дегенерації клітин різного ступеня), появою вогнищ дегенерованих клітин (вакуолізації, зернистості, підвищеної розпластаності клітин), визначивши таким чином значення максимально допустимої концентрації (МДК) наносполуки для тестованих систем *in vitro*.

У ряди лунок культурального планшета (по 4 лунки на розведення) з моношаром культур клітин ВНК-21 та НВ вносили з 1 по 8 десятикратні розведення вірусної суспензії в об'ємі 150 мкл на лунку. Після експозиції вірусів (ТГС або ВРХ) упродовж 1, 2, 4 і 6 годин з культур клітин видаляли нанесену вірусну суспензію і вносили по 150 мкл C₆₀ВРФ за значення МДК для кожної з досліджуваних систем *in vitro*.

Противірусну активність C₆₀ фулеренів у системах *in vitro* визначали за аналізом цитопатичних ефектів за дії коронавірусів ТГС і ВРХ. Контролем для вивчення цитопатогенної дії коронавірусів слугували лунки з культурою клітин (ВНК-21 і НВ) без внесення вірусу і C₆₀ фулерену. Крім того, проводили паралельні контролю з введенням коронавірусів у культури клітин для порівняння титру їх інфекційної активності. Цитопатогенну дію коронавірусів ТГС і ВРХ та за присутності C₆₀ фулеренів оцінювали через 24, 48, 96 та 144 годин після інфікування клітинних культур ВНК-21 і НВ. Зазначимо, що тривалість експерименту обмежена тим, що за такого часу дії коронавірусів відбувалася деструкція моношару клітин у досліджуваних системах *in vitro*.

Статистичну обробку результатів вимірювань проводили методами варіаційної статистики (ANOVA) з використанням програми Statistica 13.3. При аналізі експериментальних даних у різних групах використовували t-критерій, після чого виконували множинний порівняльний тест Даннета для порівняння всіх даних з контрольними. Припущення про те, що експериментальні дані відповідають нормальному розподілу та мають ідентичні стандартні відхилення були перевірені за допомогою тестів Шапіро-Уїлка та Бартлетта, відповідно. Повторюваність вимірювань складала не менше трьох разів. Значення ймовірності справедливості нульової гіпотези $p < 0,05$ вважали достатніми для висновку про статистичну значущість відмінностей.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

In silico дослідження

Припускається, що блокування/інгібування функціональної активності досліджуваних коронавірусів може реалізовуватися через такий молекулярний механізм дії водорозчинних C_{60} фулеренів: C_{60} фулерен безпосередньо взаємодіє з поверхневим протеїном клітин господаря, зокрема ACE2, і, таким чином, запобігає утворенню комплексу «коронавірус-ACE2» і його подальшому проникненню в клітину. Виходячи з такого припущення, проведено дизайн структурної організації рецепторного білка ACE2, а також оптимально можливих комплексів між C_{60} фулереном та ACE2, оцінено їх стабільність в імітованому клітинному середовищі та внесок кожної амінокислоти у зв'язування між C_{60} фулереном і протеїном за використання методів МД і молекулярного докінгу.

Структурна організація рецепторного білка ACE2. Проаналізувавши дані Protein Data Bank (RCSB PDB), для дослідження структурної організації мембранного білка ACE2 обрали PDB структуру 6m17 (The 2019-nCoV RBD/ACE2-B0AT1 complex) [35]. Спочатку всі молекули води та природні ліганди були видалені зі структури ACE2. Потім, перед поверхневим аналізом протеїну-мішені та виявленням потенційних кишень зв'язування для C_{60} фулерену за використання програмного пакету Caver, до білку додали усі відсутні атоми гідрогену та провели корекцію протонування амідів та бічних ланцюгів відповідно до клітинного рівня рН=7. Далі провели енергетичну мінімізацію досліджуваної структури. Як результат, встановили три потенційних сайти зв'язування між жолобком PD (пептидазний домен) і C_{60} фулереном, представлені на рис. 1.

Усі сайти зв'язування характеризуються присутністю у структурі амінокислот, які здатні утворювати міцні стекінг або катіон- π взаємодії із C_{60} фулереном.

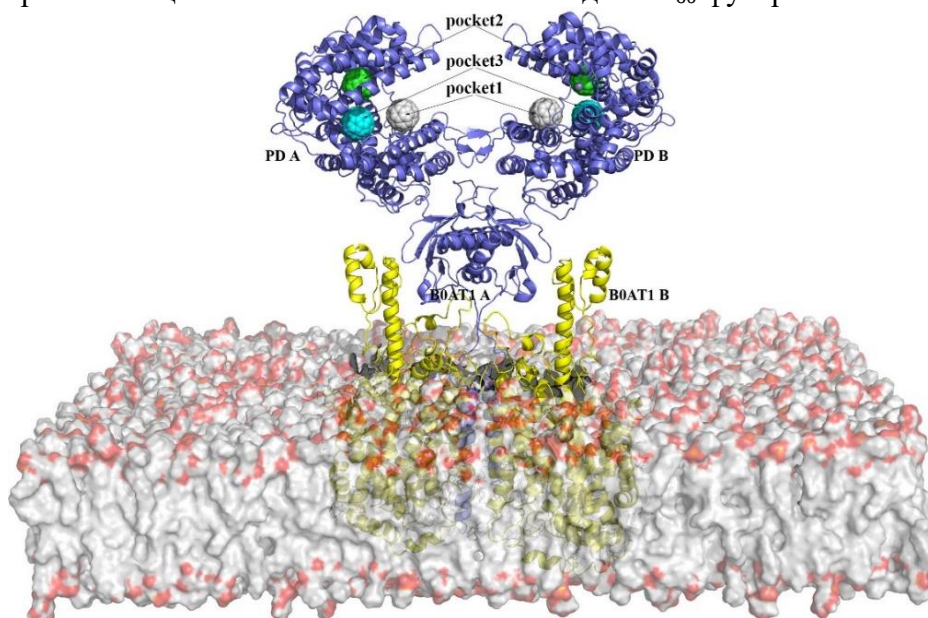


Рис. 1. Зображення вбудованого білка ACE2 у мембрану з виділеними структурними елементами та потенційними сайтами зв'язування (1, 2 і 3) для C_{60} фулерену. C_{60} фулерен показано сірим, блакитним і зеленим кольорами; мембрана — сірим, B0AT1 структура — жовтим і PD — фіолетовим кольором, відповідно.

Fig. 1. Image of the membrane-embedded ACE2 protein with highlighted structural elements and potential binding sites (1, 2 and 3) for C_{60} fullerene. C_{60} fullerene is shown in gray, blue, and green colors; membrane in gray, B0AT1 structure in yellow, and peptidase domain in purple, respectively.

Взаємодія C₆₀ фулерену з білком ACE2. Для молекулярного докінгу використали жорстку молекулу ACE2 та гнучку молекулу C₆₀. Максимальна кількість кроків розрахунку складала 300. Найкращі три «C₆₀-ACE2» комплекси, виходячи з внутрішніх скоринг-функцій QXR (контактна поверхня та оптимальна відстань між ключовими амінокислотами ACE2 і C₆₀ фулереном), відібрали для подальших досліджень.

Згідно результатів молекулярного докінгу у всіх випадках C₆₀ фулерен щільно заповнює сайти зв'язування і утримується там за рахунок різноманітних стекінг взаємодій (рис. 2А, С, Е і 3В). Так, сайт зв'язування 1 (рис. 2А) характеризується утворенням стекінг взаємодій з Phe 504, His 505, Phe 274, Tyr 127, Trp 271 та катіон-π взаємодії з Arg 273. Крім того, має місце стерична взаємодія з Asn 149.

Подібну картину спостерігали у сайті зв'язування 2 (рис. 2С): C₆₀ фулерен утворює стекінг з Trp 349 та His 401. Зазначимо, що стабільність такого комплексу потенційно є меншою за попередній варіант, оскільки тут C₆₀ фулерен затиснутий ароматичними амінокислотами лише з одного боку, що може спричинити його витіснення із сайту зв'язування.

Нарешті, сайт зв'язування 3 (рис. 2Е) відрізняється від двох попередніх тим, що тут C₆₀ фулерен є найбільш заглибленим (рис. 3В). C₆₀ фулерен утворює стекінг взаємодії з Trp 203, Tyr 510, Tyr 202 та катіон-π - з Arg 514 і Lys 562.

Важливо зазначити, що у всіх розглянутих випадках C₆₀ фулерен є затиснутим всередині кожного із сайтів зв'язування, що може стати, як причиною подальшого заглиблення C₆₀ фулерену у цей сайт (покращення зв'язування), так і причиною виштовхування C₆₀ фулерену з того чи іншого сайту зв'язування (руйнування комплексу).

Оцінку стабільності/конформаційних змін отриманих комплексів «C₆₀-ACE2» провели з використанням методу МД. Як бачимо, комплекси «C₆₀-ACE2» характеризуються значенням RMSD (Root-mean-square deviation) в межах 6 Å (рис. 3). Їх рухливість повністю корелює з рухливістю незв'язаного ACE2, винятком є лише комплекс 2, де на деяких етапах МД спостерігаються значні відхилення від інших структур (рис. 3А). Щодо C₆₀ фулерену, величина RMSD для комплексів 1 та 3 є однаковою, а для комплексу 2 — значно більшою (рис. 3В).

Загалом підчас проведення МД зафіксували такі ключові зміни у кожному з потенційних сайтів зв'язування:

1) для комплексу 1 (рис. 2В) спостерігали занурення C₆₀ фулерену у сайт зв'язування. Завдяки цьому він є затиснутий в амінокислотному середовищі та утворює такі ключові взаємодії: стекінг — з Phe 504, His 505, Phe 274, Tyr 127, Trp 271 та катіон-π — з Arg 273. Крім того, відбувається стеричне наближення Asn 149 та Gln 145, з якими існує теоретична можливість утворити міцні стеричні взаємодії. Отриманий «C₆₀-ACE2» комплекс 1 є стабільним упродовж усієї траєкторії динаміки;

2) для сайту зв'язування 2 (рис. 2D) спостерігали руйнування «C₆₀-ACE2» комплексу, оскільки C₆₀ фулерен втрачає ключові взаємодії з Trp 349 та His 401 і значно зміщується у борозні PD, після чого фіксуються стекінг взаємодії між Trp 349, His 345 та Met 62. Отже, «C₆₀-ACE2» комплекс 2 є нестабільним;

3) для комплексу 3 (рис. 2Е), як і для комплексу 1, спостерігали заглиблення C₆₀ фулерену у сайт зв'язування, внаслідок чого втрачається взаємодія з Arg 514 і Tyr 519. Але при цьому C₆₀ фулерен знаходиться глибше у сайті зв'язування та з усіх боків міцно затиснутий навколишніми амінокислотами.

Таким чином, відповідно до результатів молекулярного докінгу і МД можна зробити висновок, що C₆₀ фулерен здатний утворювати стабільні комплекси з ACE2 протеїном («C₆₀-ACE2» комплекси 1 і 3), а відтак — пригнічувати його функціональну

активність, що важливо для блокування взаємодії ACE2 з S-глікопротеїном «корони» SARS-CoV-2.

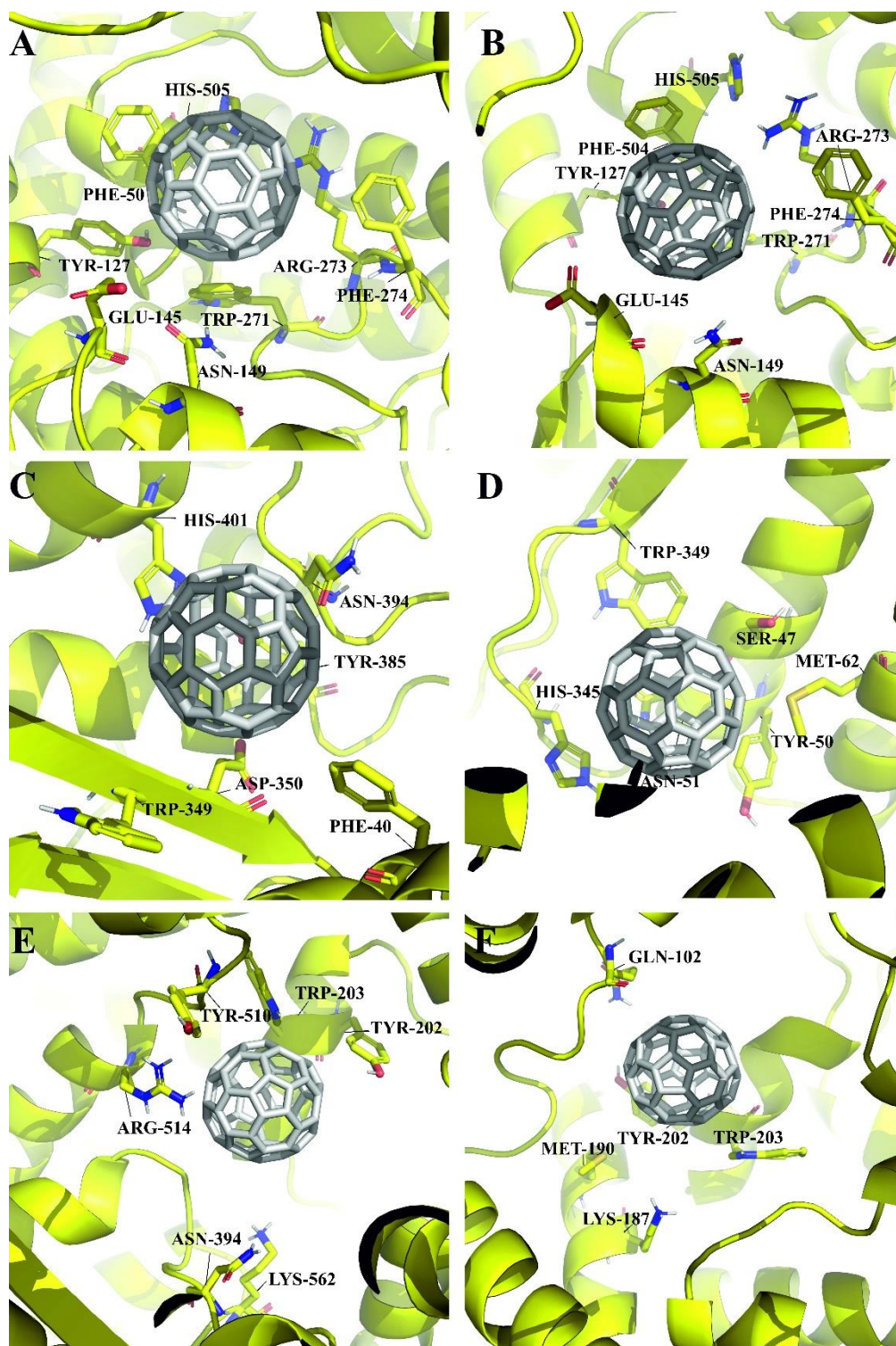


Рис. 2. Результати молекулярного докінгу (A, C, E) та МД (B, D, F): A, B — 1-й сайт зв'язування; C, D — 2-й сайт зв'язування; E, F — 3-й сайт зв'язування. У всіх випадках ACE2 — жовтий колір, C₆₀ фулерен — сірий колір.

Fig. 2. Results of molecular docking (A, C, E) and molecular dynamics (B, D, F): A, B — binding site 1; C, D — binding site 2; E, F — binding site 3. In all cases, ACE2 is yellow, C₆₀ fullerene is gray.

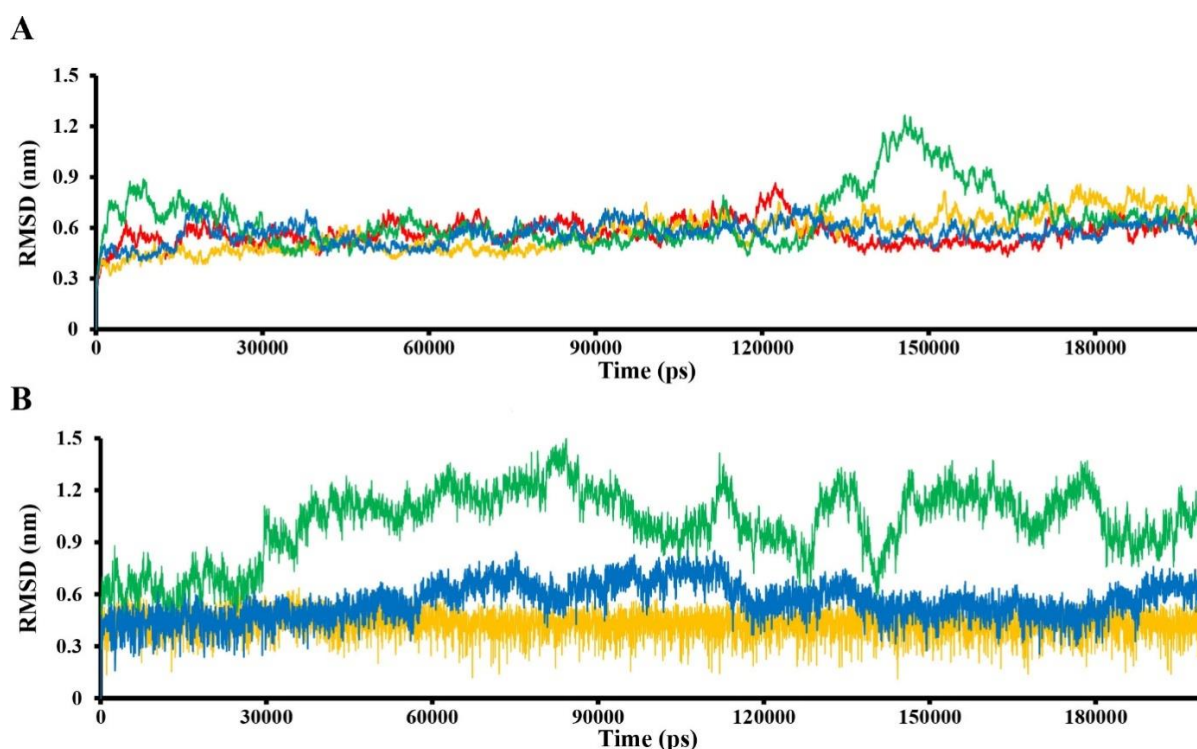


Рис. 3. Значення RMSD рухливості білка ACE2 в межах утворених «C₆₀-ACE2» комплексів (А) та C₆₀ фулерену (В): незв'язаний ACE2 — червоний колір, сайт зв'язування 1 — жовтий колір, сайт зв'язування 2 — зелений колір і сайт зв'язування 3 — синій колір.

Fig. 3. RMSD values of ACE2 protein mobility within the "C₆₀-ACE2" complexes formed (A) and single C₆₀ fullerene (B): unbound ACE2 — red color, binding site 1 — yellow color, binding site 2 — green color and binding site 3 — blue color.

Важливо зазначити, що саме використання програмного пакету Caver з великою надійністю здатне виділити потенційні кишень для зв'язування з різними лігандами [32]. У нашому випадку кожна така кишень (сайти зв'язування 1, 2 і 3) включає значну частину амінокислот, які містять ароматичну складову, що є критичним для зв'язування із C₆₀ фулереном. Крім того, рух цієї частини протеїну є важливим для зв'язування, наприклад, із SARS-CoV-2 спайк протеїном [36].

In vitro дослідження

Дослідження впливу водорозчинних C₆₀ фулеренів на різні штами коронавірусів (моделі, дані з яких можна екстраполювати до умов пандемічних штамів коронавірусів людини) є актуальним саме через циркулювання на цей момент у світі різних штамів коронавірусу людини, збудника COVID-19, який швидко мутує і представляє загрозу при зміні своїх властивостей навіть для імунних до перших штамів коронавірусу людей. Тому ми зосередилися на *in vitro* тестуванні інгібування інфекційних властивостей (реплікації) коронавірусів двох груп, збудників ТГС і ВРХ, за дії водорозчинних C₆₀ фулеренів.

Спочатку було протестовано широкий діапазон концентрацій C₆₀ФВР для визначення величини МДК для досліджуваних систем *in vitro*. Встановлено, що величина МДК у культурі клітин ВНК-21 і НВ склала 37,50±0,03 мкг/мл. Тест на цитотоксичність засвідчив, що водорозчинні C₆₀ фулерени не впливали на морфологію досліджуваних клітин, отриманих з різних видів тварин, за цієї концентрації.

Зазначимо, що визначення величини МДК у культурі клітин, як показника цитотоксичності противірусної сполуки, є важливим, оскільки дає можливість з'ясувати, чи не переважає токсичний ефект досліджуваної сполуки на клітини її антивірусну активність, тобто, чи можливо використовувати цю сполуку у подальшому як лікарський противірусний засіб.

Важливо зауважити, що згідно з попередніми результатами [37, 38] водорозчинні C_{60} фулерени у концентраціях до 24 та 144 мкг/мл не виявляли жодних токсичних ефектів ні у мезенхімальних стовбурових клітинах людини, ні у клітинах ембріональної нирки людини (НЕК293).

Застосування C_{60} ФВР у культурі клітин ВНК-21 за встановленого значення МДК через 1 год після інфікування клітинного моношару коронавірусом ТГС, адаптованого до клітин ВНК-21, знижувало титр його інфекційної активності на величину $2,00 \pm 0,02 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$.

Застосування C_{60} ФВР у культурі клітин НВ за встановленого значення МДК через 1 год після інфікування коронавірусом ВРХ, адаптованого до клітин НВ, знижувало титр його інфекційної активності на величину $\geq 2,28 \pm 0,02 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$.

Нарешті, при застосуванні C_{60} ФВР у культурах клітин ВНК-21 і НВ за встановленого значення МДК понад 1 год після інфікування відповідних клітинних моношарів коронавірусами ТГС і ВРХ, відповідно, достовірного противірусного ефекту не виявлено.

Одержані результати добре узгоджуються з даними [20], де показано що застосування C_{60} ФВР за відповідного значення МДК в системі *in ovo* демонструє противірусну активність щодо коронавірусу інфекційного бронхіту курей на ранніх стадіях взаємодії з чутливими клітинами (1–4 год).

ВИСНОВКИ

За результатами проведеного молекулярного докінгу та МД впливає, що C_{60} фулерен утворює принаймні два стабільних комплекси з АСЕ2 протеїном, пригнічуючи таким чином його функціональну активність і блокуючи потенційну взаємодію з коронавірусами.

За результатами проведених *in vitro* досліджень впливає, що водорозчинні C_{60} фулерени діють на коронавіруси двох груп, збудників ТГС і ВРХ, на ранній стадії реплікації (1 год) у чутливих клітинних системах, ВНК-21 і НВ, суттєво знижуючи їх інфекційну активність: на величину $2,00 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ і $\geq 2,28 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, відповідно. Це вказує на перспективу використання водорозчинних C_{60} фулеренів як потенційних протикоронавірусних наноагентів, здатних інгібувати реплікацію ДНК- і РНК-вмісних вірусів на початковій стадії інфікування при взаємодії з чутливими клітинами-господаря.

ПОДЯКА

Автори вдячні Dr. K. Hopfensperger (*Institute for Medical Virology and Epidemiology of Viral Diseases, Tübingen, Germany*) за допомогу у порівняльному аналізі вірусів ТГС та ВРХ.

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

Authors' ORCID ID

В. В. Гурмач  <https://orcid.org/0000-0002-0844-1586>

В. Р. Караушу  <https://orcid.org/0009-0007-9979-0020>

З. С. Клестова  <https://orcid.org/0000-0003-0771-7808>
 В. П. Берест  <https://orcid.org/0000-0001-7779-154X>
 Ю. І. Прилуцький  <https://orcid.org/0000-0002-9847-4137>

REFERENCES

1. Song Z, Xu Y, Bao L, Zhang L, Yu P, Qu Y, Zhu H, et al. From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. *Viruses*. 2019;11(1):59. <https://doi.org/10.3390/v11010059>
2. Lai C-C, Shih T-P, Ko W-C, Tang H-J, Hsueh P-R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;55(3):105924. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105924>
3. Fung TS, Liu DX. Human coronavirus: host-pathogen interaction. *Annual Rev Microbiol*. 2019;73:529–57. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115759>
4. Wang Q, Zhang Y, Wu L, Niu S, Song C, Zhang Z, et al. Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. *Cell*. 2020;181(4):894–904. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.045>
5. Saif LJ, Jung K. Comparative pathogenesis of bovine and porcine respiratory coronaviruses in the animal host species and SARS-CoV-2 in humans. *J Clin Microbiol*. 2020;58(8):e01355–20. <https://doi.org/10.1128/jcm.01355-20>
6. Urie NJ, Lombard JE, Shivley CB, Kopral CA, Adams AE, Earleywine TJ, et al. Prewaned heifer management on US dairy operations: Part V. Factors associated with morbidity and mortality in preweaned dairy heifer calves. *J Dairy Sci*. 2018;101(10):9229–44. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14019>
7. Saif LJ, Wesley R. Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory Coronavirus. In: *Diseases of Swine*. Iowa State Univ Press, 1999:295–325.
8. Woo PCY, Huang Y, Lau SKP, Yuen K-Y. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses*. 2010;2(8):1804–20. <https://doi.org/10.3390/v2081803>
9. Nikaeen G, Abbaszadeh S, Yousefinejad S. Application of nanomaterials in treatment, anti-infection and detection of coronaviruses. *Nanomedicine (Lond.)*. 2020;15(15):1501–12. <https://doi.org/10.2217/nmm-2020-0117>
10. Innocenzi P, Stagi L. Carbon-based antiviral nanomaterials: graphene, C-dots, and fullerenes. A perspective. *Chem Sci*. 2020;11(26):6606–22. <https://doi.org/10.1039/D0SC02658A>
11. Halenova T, Raksha N, Savchuk O, Ostapchenko L, Prylutskyi YuI, Ritter U, et al. Evaluation of the biocompatibility of water-soluble pristine C₆₀ fullerenes in rabbit. *BioNanoSci*. 2020;10:721–30. <https://doi.org/10.1007/s12668-020-00762-w>
12. Mchedlov-Petrosyan NO. Fullerenes in liquid media: an unsettling intrusion into the solution chemistry. *Chem Rev*. 2013;113(7):5149–93. <https://doi.org/10.1021/cr3005026>
13. Shoji M, Takahashi E, Hatakeyama D, Iwai Y, Morita Y, Shirayama R, et al. Anti-influenza activity of C₆₀ fullerene derivatives. *PLoS One*. 2013;8(6):e66337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066337>
14. Dechant PP, Wardman J, Keef T, Twarock R. Viruses and fullerenes - symmetry as a common thread? *Acta Crystallogr A Found Adv*. 2014;70(2):162–7. <https://doi.org/10.1107/S2053273313034220>
15. Goodarzi S, Da Ros T, Conde J, Sefat F, Mozafari M. Fullerene: biomedical engineers get to revisit an old friend. *Mater Today*. 2017;20(8):460–80. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.03.017>
16. Moussa F. Fullerene and derivatives for biomedical applications. *Nanobiomater*. 2018;113–36. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100716-7.00005-2>
17. Kraevaya OA, Peregodov AS, Godovikov IA, Shchurik EV, Martynenko VM, Shestakov AF, et al. Direct arylation of C₆₀Cl₆ and C₇₀Cl₈ with carboxylic acids: a synthetic avenue to water-soluble fullerene derivatives with promising antiviral activity. *Chem Commun (Camb)*. 2020;56(8):1179–82. <https://doi.org/10.1039/c9cc08400b>
18. Piotrovsky LB, Kiselev OI. Fullerenes and viruses. *Fuller, Nanotub Car N*. 2006;12(1–2):397–403. <https://doi.org/10.1081/fst-120027198>
19. Lin YL, Lei HY, Wen YY, Luh T, Chou CK, Liu HS. Light-independent inactivation of Dengue-2 virus by carboxyfullerene C3 isomer. *Virology*. 2000;275(2):258–62. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0490>
20. Hurmach V, Karaushu V, Klestova Z, Berest V, Prylutskyi Y. C₆₀ fullerene nanoparticles permeability through the model lipid envelope of coronavirus and their anticoronavirus effect in the *in ovo* system. *Biophysical Bulletin*. 2023;(50):17–24. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-50-02>
21. Sijbesma R, Srdanov G, Wudl F, Castoro JA, Wilkins C, Friedman CH, et al. Synthesis of a fullerene derivative for the inhibition of HIV enzymes. *J Am Chem Soc*. 1993;115(15):6510–12. <https://doi.org/10.1021/ja00068a006>
22. Marchesan S, Da Ros T, Spalluto G, Balzarini J, Prato M. Anti-HIV properties of cationic fullerene derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005;15(15):3615–18. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.05.069>

23. Kataoka H, Ohe T, Takahashi K, Nakamura S, Mashino T. Novel fullerene derivatives as dual inhibitors of Hepatitis C virus NS5B polymerase and NS3/4A protease. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016;26(19):4565–7. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.08.086>
24. Hurmach VV, Platonov MO, Prylutska SV, Scharff P, Prylutsky YuI, Ritter U. C₆₀ fullerene against SARS-CoV-2 coronavirus: an *in silico* insight. *Sci Rep*. 2021;11(1):17748. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97268-6>
25. McMartin C, Bohacek RS. QXP: powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design. *J Comput Aided Mol Des*. 1997;11(4):333–44. <https://doi.org/10.1023/a:1007907728892>
26. Warren GL, Andrews CW, Capelli A-M, Clarke B, LaLonde J, Lambert MH, et al. A critical assessment of docking programs and scoring functions. *J Med Chem*. 2006;49(20):5912–31. <https://doi.org/10.1021/jm050362n>
27. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftWareX*. 2015;1–2:19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
28. Huang J, MacKerell Jr AD. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J Comput Chem*. 2013;34(25):2135–45. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>
29. Zoete V, Cuendet MA, Grosdidier A. SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. *J Comput Chem*. 2011;32(11):2359–68. <https://doi.org/10.1002/jcc.21816>
30. RCSB Protein Data Bank [Internet]. The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank [cited 2024 Nov 5]. Available from: <https://www.rcsb.org/>
31. Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *J. Comput. Chem*. 2008;29:1859–65. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>
32. Jurcik A, Bednar D, Byska J, Marques SM, Furmanova K, Daniel L, et al. CAVER Analyst 2.0: Analysis and Visualization of Channels and Tunnels in Protein Structures and Molecular Dynamics Trajectories. *Bioinformatics*. 2018;34(20):3586–88. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty386>
33. Ritter U, Prylutsky YuI, Evstigneev MP, Davidenko NA, Cherepanov VV, Senenko AI, et al. Structural features of highly stable reproducible C₆₀ fullerene aqueous colloid solution probed by various techniques. *Fuller Nanotub Car N*. 2015;23(6):530–4. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2013.870900>
34. Prilutski Yu, Durov S, Bulavin L, Pogorelov V, Astashkin Yu, Yashchuk V, et al. Study of structure of colloidal particles of fullerenes in water solution. *Mol Cryst Liq Cryst*. 1998;324:65–70. <https://doi.org/10.1080/10587259808047135>
35. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*. 2020;367(6485):1444–8. <https://doi.org/10.1126/science.abb2762>
36. Shang J, Ye G, Shi K., Wan Y, Luo C, Aihara H, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*. 2020;581:221–4. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>
37. Tolkachov M, Sokolova V, Korolovych V, Prylutsky Yu, Eppe M, Ritter U, et al. Study of biocompatibility effect of nanocarbon particles on various cell types *in vitro*. *Mat-wiss u Werkstofftech*. 2016;47(2–3):216–21. <https://doi.org/10.1002/mawe.201600486>
38. Prylutska SV, Grebinyk AG, Lynchak OV, Byelinska IV, Cherepanov VV, Tauscher E, et al. *In vitro* and *in vivo* toxicity of pristine C₆₀ fullerene aqueous colloid solution. *Fuller Nanotub Car N*. 2019;27(9):715–28. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2019.1634055>

ANTICORONAVIRUS ACTIVITY OF C₆₀ FULLERENE: IN SILICO AND IN VITRO SCREENING

V. V. Hurmach¹, V. R. Karaushu², Z. S. Klestova³, V.P. Berest⁴,
Yu. I. Prylutsky²

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, NASU, 150 Zabolotnogo Str., Kyiv, 03143, Ukraine;

²Taras Shevchenko National University of Kyiv, ESC "Institute of Biology and Medicine", 64/13 Volodymyrska Str., Kyiv, 01601, Ukraine;

³The Institute for Medical Virology and Epidemiology of Viral Diseases, Elfriede-Aulhorn-Straße 6, 72076 Tübingen, Germany;

⁴V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine
e-mail: prylut@ukr.net

Submitted December 25, 2024; Revised April 1, 2025;

Accepted April 6, 2025

Background: The search for potential therapeutic agents against the most common coronaviruses, which can pose a threat to human and animal life, is an urgent issue of modern biomedicine.

Objective of the work was to evaluate *in silico* the ability of C₆₀ fullerene to interact with the membrane protein ACE2, thereby preventing the formation of the "coronavirus-ACE2" complex and its further penetration into the host cell, as well as the effectiveness of the anticoronavirus action of these carbon nanoparticles in *in vitro* systems.

Methods: The Protein Data Bank was used to study the structural organization of the human ACE2 membrane protein. The CHARMM-GUI and SwissParam web resources were used to construct the membrane and C₆₀ fullerene, respectively. Potential binding pockets for C₆₀ fullerene in the ACE2 structure were determined using the Caver software package. The system molecular docking algorithm (sdock+) was used to study the interaction between C₆₀ fullerene and ACE2. Molecular dynamics (MD) calculations were performed using the Gromacs 2020 software package. Cytotoxicological and virological methods were used in *in vitro* experiments. Statistical processing of experimental results was carried out using the Statistica 13.3 program.

Results: It was found three potential binding sites between the groove of the peptidase domain of the ACE2 protein and C₆₀ fullerene. According to the results of molecular docking and MD, it follows that C₆₀ fullerene forms two stable complexes with the ACE2 protein, thus blocking its potential interaction with coronaviruses. According to the results of *in vitro* studies, it follows that C₆₀ fullerenes at a maximum allowable concentration of 37.5 µg/ml act on the coronaviruses of swine (α-coronavirus) and cattle (β-coronavirus) at the early stage of replication (1 h) in sensitive cellular systems, significantly reducing their infectious activity by 2.00 TCID₅₀/ml and ≥2,28 TCID₅₀/ml, respectively.

Conclusions: C₆₀ fullerene has been shown to form two stable complexes with the membrane protein ACE2, thereby inhibiting its functional activity and blocking potential interaction with coronaviruses. It was established that the C₆₀ fullerenes show antiviral activity against coronaviruses of two groups at the initial stage of infection when interacting with sensitive host cells.

KEY WORDS: C₆₀ fullerene; animal coronaviruses; molecular docking; molecular dynamics; antiviral activity *in vitro*.

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-06>

УДК 57.013:57.04:57.05:577.353:616.7:616.8

C₆₀ ФУЛЕРЕН СПРИЯЄ ВІДНОВЛЕННЮ СКОРОТЛИВОЇ АКТИВНОСТІ MUSCULUS GASTROCNEMIUS ЩУРІВ ПІСЛЯ НЕЙРОГЕННОЇ АТРОФІЇ

Д. М. Ноздренко¹, М. С. Ангелов¹, І. М. Варенюк¹,
М. Е. Держинський¹, К. І. Богуцька¹, В. С. Теплюк², І. М. Неділько³,
В. П. Берест⁴, Ю. І. Прилуцький^{1,*}

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

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

³Комунальний заклад вищої освіти «Волинський медичний інститут», вул. Лесі Українки, 2, Луцьк, 43016, Україна;

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

*e-mail: prylut@ukr.net

Надійшла до редакції 13 квітня 2025 р. Переглянута 14 травня 2025 р.

Прийнята до друку 19 травня 2025 р.

Актуальність. Відновлення скоротливої активності скелетних м'язів після нейрогенної атрофії є складним і тривалим процесом. Відтак, пошук ефективних терапевтичних засобів для його прискорення є вкрай актуальним завданням сучасної біомедицини. Атрофія скелетних м'язів супроводжується зменшенням м'язової маси, втомлюваністю та зниженням скоротливої здатності, що пов'язано з активацією оксидативного стресу, запаленням і катаболічними реакціями.

Денервація запускає складні сигнальні каскади за участю Ca²⁺ та факторів транскрипції, які сприяють розпаду білків й порушенню функціональності міоцитів. Мітохондріальна дисфункція, мітофагія та порушення окисного фосфорилування поглиблюють дегенеративні процеси у м'язових волокнах. Крім атрофії м'язів, спостерігається ремоделювання оточуючих тканин, зокрема фіброз і девакуляризація, що ускладнює регенерацію. Одним із ключових факторів ініціації атрофії є окислювальний стрес, тому сучасні терапевтичні підходи спрямовані на його нейтралізацію за допомогою антиоксидантів, стовбурових клітин та позаклітинних везикул.

Мета роботи — дослідження дії C₆₀ фулеренів, що володіють антиоксидантними властивостями, на механокінетику скорочення *m. gastrocnemius* щурів упродовж 30 діб після нейрогенної атрофії, викликаній пошкодженням сідничного нерва.

Матеріали та методи. При аналізі міотичної відповіді з використанням тензометрії оцінювали такі механокінетичні параметри як рівень максимальної сили скорочення м'яза, час досягнення його максимальної сили скорочення та час утримання максимальної сили скорочення *m. gastrocnemius*. Додатково проводили гістологічні дослідження *m. gastrocnemius*.

Як цитувати: Ноздренко ДМ, Ангелов МС, Варенюк ІМ, Держинський МЕ, Богуцька КІ, Теплюк ВС, Неділько ІМ, Берест ВП, Прилуцький ЮІ. C₆₀ фулерен сприяє відновленню скоротливої активності *musculus gastrocnemius* щурів після нейрогенної атрофії. Biophysical Bulletin. 2025;53:72–81. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-06>

Citation: Nozdrenko DM, Anhelov MS, Vareniuk IM, Dzerzhynsky ME, Bogutska KI, Tepluk VS, Nedilko IM, Berest VP, Prylutsky YuI. C₆₀ fullerene promotes recovering rat *musculus gastrocnemius* contracting activity after neurogenic atrophy. Biophysical Bulletin. 2025;53:72–81. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-06> (in Ukrainian)

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

© Ноздренко Д. М., Ангелов М. С., Варенюк І. М., Держинський М. Е., Богуцька К. І., Теплюк В. С., Неділько І. М., Берест В. П., Прилуцький Ю. І., 2025.

Результати. Показано, що у травмованих тварин, які перорально щоденно вживали водний розчин C₆₀ фулерену (C₆₀ФВР) у дозі 1 мг/кг упродовж експерименту, мала місце позитивна динаміка досліджуваних механокінетичних параметрів скорочення *m. gastrocnemius* на рівні 29–39±3% порівняно з групою тварин, які не вживали C₆₀ФВР, що підтверджується гістологічним аналізом цих м'язів на 30 добу після ініціації пошкодження сідничного нерва.

Висновки. Одержані результати свідчать про перспективність використання C₆₀ФВР для відновлення скоротливої активності скелетних м'язів після нейрогенної атрофії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: C₆₀ фулерен; *m. gastrocnemius*; нейрогенна атрофія; механокінетичні параметри м'язового скорочення; гістологічний аналіз.

Нейрогенна атрофія — найважчий тип м'язової атрофії — може бути спричинена травмою або захворюванням нерва, що з'єднується з м'язом, і виникає, як правило, раптово, аніж фізіологічна атрофія, а відновлення її наслідків потребує значного часу [1]. Пошкодження сідничного нерва (*n. ischiadicus*) ініціює молекулярні процеси, які викликають трансформацію м'язової дисфункції в атрофічний стан [2].

Атрофія скелетних м'язів характеризується зменшенням м'язової маси та площі поперечного перерізу м'яза, внаслідок чого відбувається підвищення втомлюваності м'яза, зниження сили його скорочення і, відповідно, здатності до фізичних навантажень [3]. На сьогодні досліджено декілька патофізіологічних процесів, залучених до атрофії скелетних м'язів, включно з окислювальним стресом і запаленням, які активують системи убіквітин-протеасом, аутофагії лізосом і mTOR [3, 4]. Денервація ініціює плейотропні ефекти у скелетних м'язах, а молекулярні механізми, що лежать в основі нейрогенної м'язової атрофії, мають спільні риси з іншими причинами м'язової атрофії, включно з активацією чинників транскрипції FOXO та відповідною індукцією убіквітин-протеасомальної та лізосомальної деградації [2].

Після пошкодження *n. ischiadicus* м'яз перебуває у розслабленому стані, що підвищує внутрішньоклітинні рівні Ca²⁺, пов'язані з такими клітинними сигнальними шляхами як AMPK, cGMP, PLC-β, CREB і кальциневрин [5]. Крім того, ферменти, які беруть участь у циклі трикарбонових кислот і окислювальному фосфорилуванні, активуються надходженням Ca²⁺ у мітохондрії під час скорочення м'язів. Пошкодження *n. ischiadicus* спричиняє мітофагію та атрофію скелетних м'язів завдяки підвищеній чутливості до індукованого Ca²⁺ відкриття пори переходу проникності у мітохондріях, що перешкоджає нормальному синтезу білка в міоцитах [5].

Втрата рухової іннервації ініціює клітинні сигнальні шляхи у денервованих міофібрилах, спричиняючи локалізований прокатаболічний стан. Більшість форм м'язової атрофії супроводжуються значним підвищенням розпаду м'язових білків, що, в свою чергу, призводить до зростання м'язової жорсткості [6]. Навколишні тканини, окрім скелетних м'язів, також піддаються ремоделюванню, включно з прогресуючою деваскуляризацією та активацією фіброадипогенних попередників, які сприяють накопиченню фіброзно-жирової тканини та збільшенню рівня м'язової жорсткості. Нарешті, функціональне відновлення м'яза ускладняються нездатністю рухових нервових волокон, які регенерують, швидко вступати в контакт зі специфічними руховими шляхами. Це викликає підвищене фіброзоутворення у допоміжній системі м'яза та порушення точнісного позиціонування суглобів [7].

Окислювальний стрес є одним з ключових факторів, який ініціює атрофію скелетних м'язів [8, 9]. Він активується на ранніх стадіях м'язової атрофії та може регулюватися різними чинниками. Окислювальний стрес, зазвичай, визначають як дисбаланс між продукуванням оксидантів і антиоксидантів та характеризують утворенням токсичних вільних радикалів, особливо активних форм кисню (АФК). Наразі стратегії лікування атрофії скелетних м'язів спрямовані саме на «боротьбу» з окислювальним стресом і

здебільшого включають застосування антиоксидантних препаратів, стовбурових клітин і позаклітинних везикул [8].

Як перспективні антиоксиданти розглядають одну з алотропних видозмін вуглецю — C_{60} фулерени [10, 11]. Ця видозміна наведена під № 3 — у таблиці 1 посилання [11]. Молекулі C_{60} притаманна висока відновлювальна здатність, завдяки якій вона діє у біологічних системах як ефективний уловлювач АФК. У попередніх експериментах було показано, що застосування водорозчинних C_{60} фулеренів за низьких доз сприяє відновленню динаміки м'язового скорочення та фізіологічного стану організму після ішемічного пошкодження [12], механічної травми [13] та атрофії, викликаной ахіллотенотомією [14], скелетних м'язів щурів. Таким чином, метою цієї роботи було дослідити вплив C_{60} фулеренів-антиоксидантів на відновлення скоротливої активності *m. gastrocnemius* щурів шляхом оцінки механокінетичних параметрів скорочення м'яза та його гістологічного аналізу після нейрогенної атрофії, викликаной пошкодженням *n. ischiadicus*.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для отримання водного розчину C_{60} фулерену (C_{60} ФВР) використовували метод, що базується на перенесенні молекул C_{60} з толуолу у воду за ультразвукової обробки (8 Гц, 8 годин) [15]. Отриманий C_{60} ФВР у максимальній концентрації 0,15 мг/мл зберігає стабільність упродовж 12–18 місяців за температури +4–25°C. Він є типовим наноколоїдом, що містить як окремі молекули C_{60} , так і їх наноагрегати [16].

Експерименти проводили на щурах-самцях лінії Wistar віком від 1 до 2 місяців (наприкінці досліду) вагою 110–170±5 г. Протокол дослідження був затверджений комісією з питань біоетики ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка згідно з правилами «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» і норм біомедичної етики згідно із Законом України №3447–IV 21.02.2006 р., м. Київ, «Про захист тварин від жорстокого поводження» під час проведення медико-біологічних досліджень.

Тварин випадковим чином розподіляли на такі піддослідні групи: контроль (n=7); група «травма» (n=7; перерізання *n. ischiadicus*); група «травма+ C_{60} » (n=7; щоденне пероральне застосування C_{60} ФВР у дозі 1 мг/кг маси тіла тварини після ініціації травми).

Зазначимо, що вибір вищевказаної дози C_{60} ФВР ґрунтується на її високій ефективності за терапії різних м'язових патологій *in vivo* [12–14]. Крім того, загальна доза 30 мг/кг в експерименті значно нижча за значення LD_{50} , яке становило 600 мг/кг у випадку перорального введення щурам [17] і тому є безпечною для біотестування.

Анестезію тварин здійснювали внутрішньочеревним введенням Золетилу (40 мг/кг).

M. gastrocnemius і *n. ischiadicus* виділяли з оточуючих тканин. Виділений нерв перерізуали на 10 мм проксимальніше від розгалуження великогомілкового і малогомілкового нервів [18] і закріплювали на біполярному платиновому дротяному електроді для подальшої електричної стимуляції, а сухожилля м'яза під'єднували до тензометричної установки [19]. Краї шкіри навколо розтину підшивали до арматури верстата, утворюючи ванночку з м'язом і нервом, яку заповнювали вазеліновим маслом.

Дослідження наступних механокінетичних параметрів скорочення *m. gastrocnemius* для груп тварин «травма» і «травма+ C_{60} » [12–14] проводили на 30-ту добу після перерізання нерва:

- рівень максимальної сили скорочення м'яза (F_{max}) як показник загальної дисфункції м'язової системи. Зміна цього параметра може бути пов'язана як з порушеннями у нейронній компоненті, так і міотичними складовими досліджуваної патології;

- час досягнення максимальної сили скорочення м'яза ($t_{\max}$): максимальна генерація сили, на яку здатен активний м'яз, є важливим показником для швидких і нецілеспрямованих рухів. Величина його зміни порівняно з контролем вказує на рівень фізіологічної дисфункції нервово-м'язового препарату під час реалізації ним максимальних силових завдань;

- час утримання максимальної сили скорочення м'яза ($t_{\text{hold max}}$) як показник адаптивності м'язової системи до нових станів, викликаних патологічним впливом.

Важливо зазначити, що такі дослідження базуються на експериментально встановленому факті, що до 30 діб процеси атрофічної дегенерації в м'язі практично не відбуваються [20].

Для реєстрації електрофізіологічних сигналів використовували 12-ти розрядний аналого-цифровий та цифро-аналоговий перетворювач (АЦП-ЦАП, NI USB-6009, USA). Вихідні імпульси ЦАП формувалися генератором імпульсів (DS2A, Digitimer, USA), які здійснювали стимуляцію нервів (електричні імпульси тривалістю 2 мс, частотою 50 Гц і напругою 7 В). Тензометричні сигнали через підсилювач (Brownlee model 440, USA) подавали на АЦП і реєстрували з частотою 10 кГц.

Механокінетику скорочення *m. gastrocnemius* піддослідних щурів вивчали за різних електростимуляцій, а саме: *стимуляція 1* — скорочення, викликані 5 с стимуляційними пулами частотою 50 Гц, загальною тривалістю 200 с та *стимуляція 2* — скорочення, викликані 5 с стимуляційними пулами з різним часом (1, 2 і 3 с, відповідно) досягнення максимальної частоти 50 Гц, загальною тривалістю 200 с.

Зразки *m. gastrocnemius* фіксували у 10% формаліні і заливали у парафін. Виготовляли зрізи товщиною 5 мкм і забарвлювали їх гематоксиліном та пікрофуксином за Ван-Гізоном. Цифрові мікрофотографії зразків отримували за допомогою мікроскопа, суміщеного з комп'ютером (мікроскоп Olympus BX41 і цифрова фотокамера Olympus C-5050 Zoom), та проводили їх гістологічний аналіз.

Статистичний аналіз результатів проводили, використовуючи дисперсійний аналіз ANOVA у програмі Statistica 8.0. Кожна з одержаних експериментальних кривих скорочення *m. gastrocnemius* є результатом усереднення 10 аналогічних вимірювань ($M \pm SE$). Для оцінки достовірності виявлених змін застосовували двофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з *post-hoc* тестом за Бонферроні. Значення $p < 0,05$ вважалися достатніми для висновку про значущість відмінностей між групами.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Біомеханіка скорочення *m. gastrocnemius*

Механокінетику скорочення *m. gastrocnemius* піддослідних щурів вивчали за різних електростимуляцій (Рис. 1). Це необхідно для оцінки максимальної сили скорочення *m. gastrocnemius* (*стимуляція 1*, Рис. 2), часу досягнення максимальної сили скорочення *m. gastrocnemius* (*стимуляція 2*, Рис. 3) та її утримання (*стимуляція 2*, Рис. 4) на тлі нейрогенної атрофії.

Як видно з Рис. 2, максимальна сила *m. gastrocnemius* у контролі зменшується до рівня $88-70 \pm 6\%$ для 1-50 послідовного скорочення м'яза. У групі «травма» (30 діб після перерізання *n. ischiadicus*) відбувається зниження силової відповіді *m. gastrocnemius* на $26-35 \pm 2\%$ для 1-50 послідовного скорочення м'яза порівняно з контролем. Нарешті, у групі «травма+C₆₀» (30 діб після перерізання *n. ischiadicus* та за використання C₆₀ФВР) рівень силової відповіді *m. gastrocnemius* зріс на $20-25 \pm 3\%$ для 1-50 послідовного скорочення м'яза порівняно з групою «травма», суттєво наблизившись до контрольних значень.

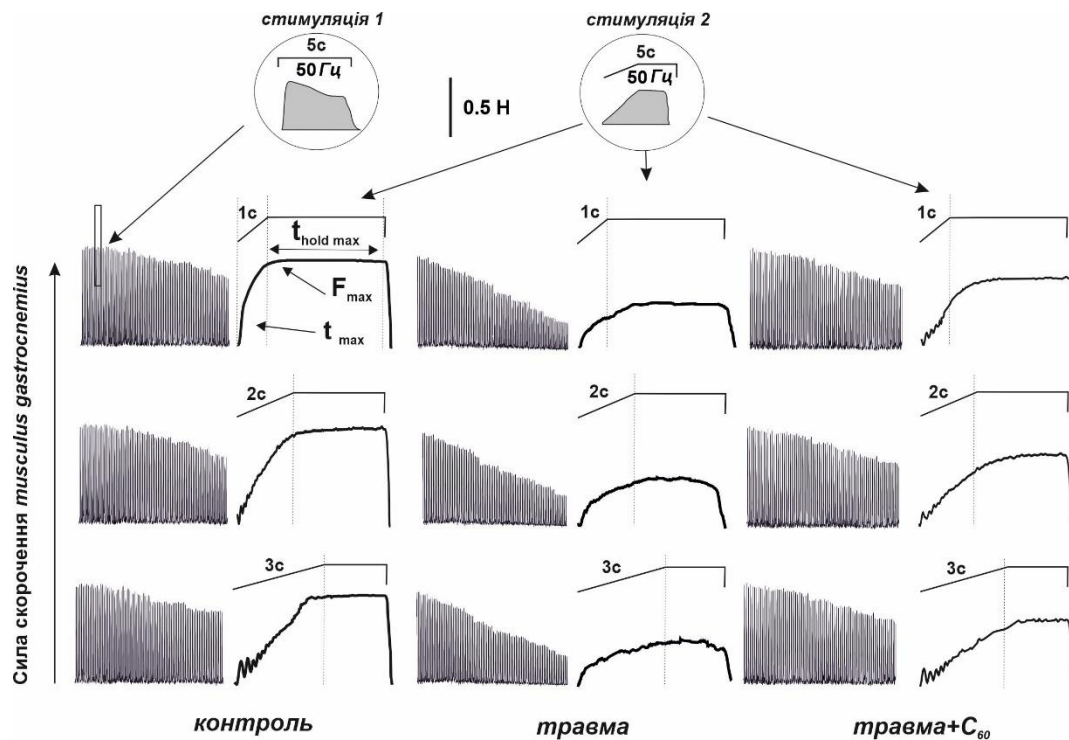


Рис. 1. Сила скорочення *m. gastrocnemius* щура за різних електростимуляцій (стимуляція 1 і стимуляція 2); травма та травма+C₆₀ — сила скорочення *m. gastrocnemius* через 30 діб після перерізання *n. ischiadicus* та за введення C₆₀ФВР у щоденній дозі 1 мг/кг, відповідно; $t_{hold\ max}$ — час утримання максимальної сили скорочення м'яза, F_{max} — рівень максимальної сили скорочення м'яза, t_{max} — час досягнення максимальної сили скорочення м'яза; контроль — нативний м'яз.

Fig. 1. Rat *m. gastrocnemius* contraction force under different electrical stimulations (stimulation 1 and stimulation 2); injury and injury+C₆₀ — contraction force of the *m. gastrocnemius* 30 days after *n. ischiadicus* transection and with administration of C₆₀FAS at a daily dose of 1 mg/kg, respectively; $t_{hold\ max}$ — time of holding the maximum muscle contraction force, F_{max} — level of maximum muscle contraction force, t_{max} — time of reaching the maximum muscle contraction force; control — native muscle.

Зазначимо, що ці результати добре узгоджуються з даними [21] щодо впливу екзогенних антиоксидантів C₆₀ фулеренів на розвиток втомлювальних процесів скелетних м'язів, викликаних їх довготривалою безрелаксативною стимуляцією.

Час досягнення максимальної сили скорочення *m. gastrocnemius* є одним з найважливіших механокінетичних параметрів скорочення м'яза, який відповідає за точність позиціонування суглобів. Його збільшення вказує на рівень фізіологічної дисфункції нервово-м'язового препарату під час реалізації ним еферентних сигналів [22]. Аналіз цього параметру (Рис. 3) показав його суттєве збільшення навіть через 30 діб після перерізання *n. ischiadicus* до 2380 ± 26 мс, 3655 ± 38 мс і 5240 ± 55 мс за 1, 2 і 3 с наростаючого стимуляційного сигналу, відповідно (у контролі — 1050 ± 12 мс, 2060 ± 22 мс і 3070 ± 28 мс, відповідно). Використання C₆₀ФВР суттєво зменшило цей параметр до 1450 ± 25 мс, 2450 ± 30 мс і 3270 ± 32 мс, відповідно, і, таким чином, позитивний ефект склав $39\text{--}41 \pm 3\%$ порівняно з групою «травма».

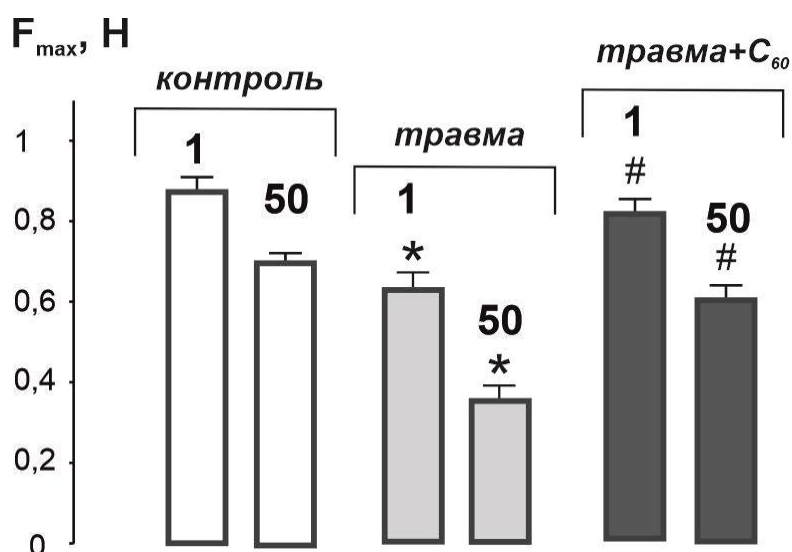


Рис. 2. Максимальна сила скорочення *m. gastrocnemius* (F_{max}) щура за використання стимуляції 1: травма та травма+C₆₀ — сила скорочення *m. gastrocnemius* через 30 діб після перерізування *n. ischiadicus* та за введення C₆₀ФВР у щоденній дозі 1 мг/кг, відповідно; контроль — нативний м'яз; 1 і 50 — перше і 50-е послідовне скорочення м'яза; * $p < 0,05$ щодо контрольної групи; # $p < 0,05$ щодо групи «травма».

Fig. 2. Maximum contraction force of the rat *m. gastrocnemius* (F_{max}) using stimulation 1: injury and injury+C₆₀ — contraction force of the *m. gastrocnemius* 30 days after *n. ischiadicus* transection and with administration of C₆₀FAS at a daily dose of 1 mg/kg, respectively; control — native muscle; 1 and 50 — the first and 50th consecutive contraction of the muscle; * $p < 0.05$ relative to the control group; # $p < 0.05$ relative to the "injury" group.

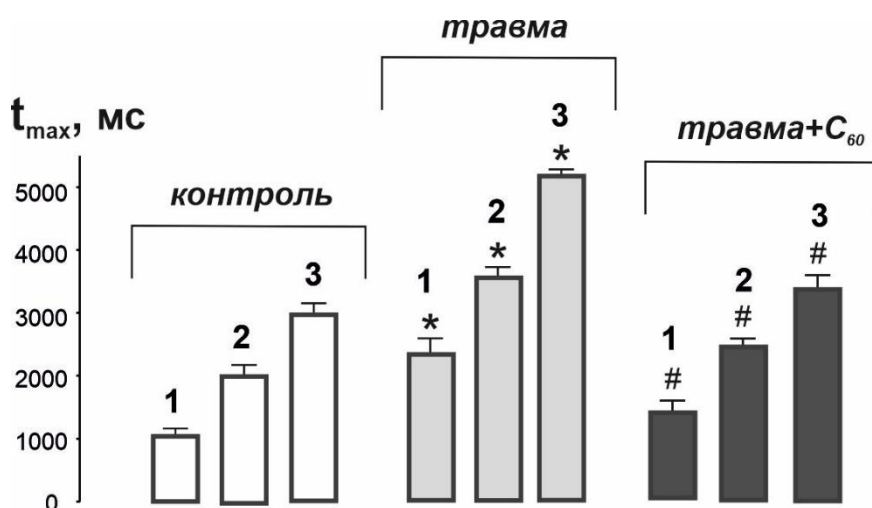


Рис. 3. Час досягнення максимальної сили скорочення *m. gastrocnemius* (t_{max}) щура за використання стимуляції 2: травма та травма+C₆₀ — сила скорочення *m. gastrocnemius* через 30 діб після перерізування *n. ischiadicus* та за введення C₆₀ФВР у щоденній дозі 1 мг/кг, відповідно; контроль — нативний м'яз; 1, 2 і 3 — тривалість наростаючого стимуляційного сигналу: 1, 2 і 3 с, відповідно, * $p < 0,05$ щодо контрольної групи; # $p < 0,05$ щодо групи «травма».

Fig. 3. Time to reach maximum contraction force of the rat *m. gastrocnemius* (t_{max}) using stimulation 2: injury and injury+C₆₀ — contraction force of the *m. gastrocnemius* 30 days after *n. ischiadicus* transection and with administration of C₆₀FAS at a daily dose of 1 mg/kg, respectively; control — native muscle; 1, 2 and 3 — duration of the increasing stimulation signal: 1, 2 and 3 s, respectively, * $p < 0.05$ relative to the control group; # $p < 0.05$ relative to the "injury" group.

Час утримання максимальної сили скорочення м'яза (досягнутого стаціонарного стану) є показником його адаптивності до нових станів, змінених патологічним впливом. Свідченням цього є наявність флуктуаційних коливань на фазах утримання стаціонарного стану або його зниження під час максимальної стимуляції внаслідок залишкових патологічних станів у м'язовій системі піддослідних тварин [23, 24].

Час утримання максимальної сили скорочення *m. gastrocnemius* зменшився до 3080 ± 35 мс, 1730 ± 20 мс та 870 ± 12 мс за 1, 2 і 3 с наростаючого стимуляційного сигналу, відповідно (у контролі — 3930 ± 44 мс, 2950 ± 35 мс та 1970 ± 20 мс, відповідно) (Рис. 4). Використання C_{60} ФВР збільшило цей параметр до 3720 ± 40 мс, 2890 ± 35 мс та 1810 ± 20 мс, відповідно, і, таким чином, позитивний ефект склав $17\text{--}52 \pm 3\%$ порівняно з групою «травма».

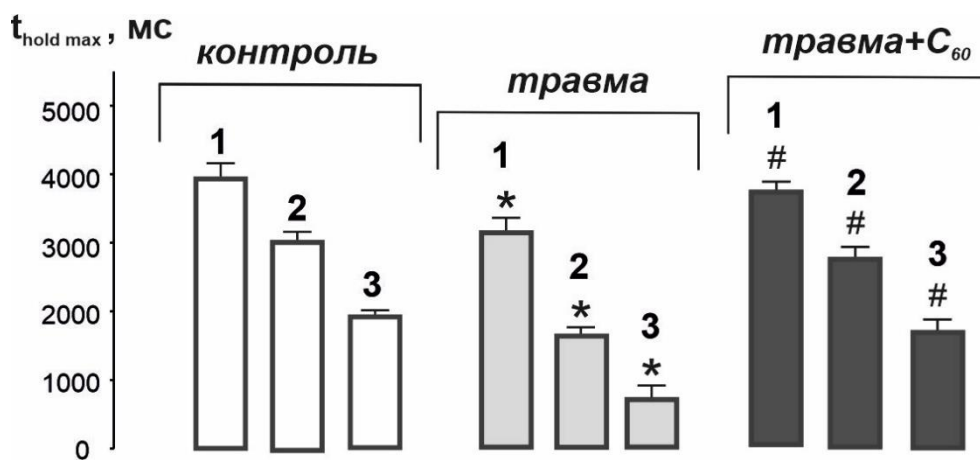


Рис. 4. Час утримання максимальної сили скорочення *m. gastrocnemius* ($t_{hold\ max}$) щура за використання стимуляції 2: травма та травма+ C_{60} – сила скорочення *m. gastrocnemius* через 30 діб після перерізання *n. ischiadicus* та за введення C_{60} ФВР у щоденній дозі 1 мг/кг, відповідно; контроль – нативний м'яз; 1, 2 і 3 – тривалість наростаючого стимуляційного сигналу: 1, 2 і 3 с, відповідно, * $p < 0,05$ щодо контрольної групи; # $p < 0,05$ щодо групи «травма».

Fig. 4. Time of holding the maximum muscle contraction of the rat *m. gastrocnemius* ($t_{hold\ max}$) using stimulation 2: injury and injury+ C_{60} – contraction force of the *m. gastrocnemius* 30 days after *n. ischiadicus* transection and with administration of C_{60} FAS at a daily dose of 1 mg/kg, respectively; control – native muscle; 1, 2 and 3 – duration of the increasing stimulation signal: 1, 2 and 3 s, respectively, * $p < 0.05$ relative to the control group; # $p < 0.05$ relative to the "injury" group.

Отже, дослідження скоротливої активності *m. gastrocnemius* щурів на тлі нейрогенної атрофії за перорального щоденного введення C_{60} ФВР у дозі 1 мг/кг упродовж експерименту виявило позитивну динаміку вищеописаних біомеханічних параметрів скорочення м'яза, а саме на рівні $29\text{--}39 \pm 3\%$. Можна припустити, що C_{60} фулерени здатні впливати на активність ендогенних антиоксидантів, перешкоджаючи виникненню дисфункції в м'язі щурів і покращуючи його скоротливу активність після нейрогенної атрофії, що відкриває перспективу їх практичного використання у біомедицині.

Гістологічний аналіз

Гістологічні дослідження засвідчили, що м'язові волокна *m. gastrocnemius* щурів контрольної групи мають чітку поперечну посмугованість, без будь-яких відхилень від нормальної будови (Рис. 5А).

У щурів групи «травма» через 30 днів спостерігаються значні деструктивні зміни м'язових волокон у *m. gastrocnemius* (Рис. 5Б). Частина м'язових волокон фрагментована, частина є звивистими. Поперечна посмугованість нечітка. М'язові волокна тонші порівняно з контрольною групою, неоднакової товщини, спостерігається фіброз. Збільшується кількість аморфної речовини сполучної тканини.

У щурів групи «травма+C₆₀» через 30 днів також спостерігаються деструктивні зміни м'язових волокон у *m. gastrocnemius* (Рис. 5В): частина м'язових волокон нормальної товщини, а частина тонкі; не усі м'язові волокна мають чітку поперечну посмугованість; на деяких ділянках має місце розростання колагенових волокон. Проте гістологічні зміни у цій групі тварин менш виражені, ніж у групі тварин з травмою, які не отримували C₆₀ФВР.

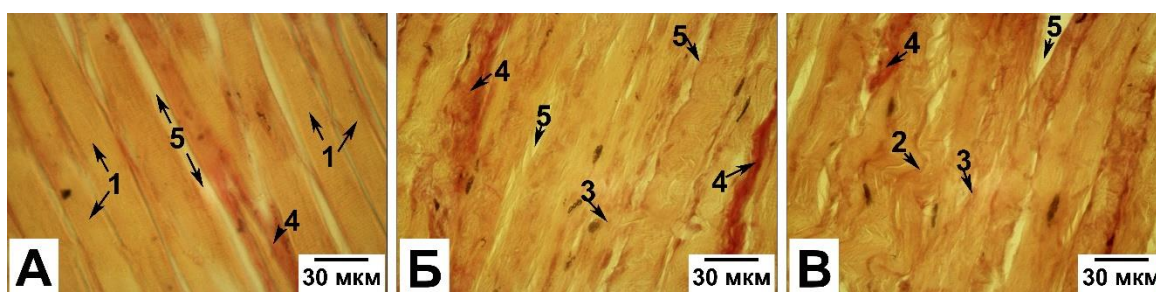


Рис. 5. М'язові волокна *m. gastrocnemius* щура: А) контроль; Б) через 30 днів після травми; В) через 30 днів після травми при застосуванні C₆₀ФВР. Забарвлення гематоксиліном та пікрофуксином за Ван-Гізеном. Масштаб – 30 мкм. Стрілками показано: 1 — незмінені м'язові волокна; 2 — звивисті м'язові волокна; 3 — фрагментовані м'язові волокна; 4 — колагенові сполучнотканинні волокна; 5 — аморфна речовина сполучної тканини.

Fig. 5. Muscle fibers of the rat *m. gastrocnemius*: A) control; B) 30 days after injury; C) 30 days after injury with the usage of C₆₀FAS. Staining with hematoxylin and picrofuchsin according to Van Gieson. Scale bar — 30 μm. Arrows indicate: 1 — unchanged muscle fibers; 2 — sinuous muscle fibers; 3 — fragmented muscle fibers; 4 — collagen connective tissue fibers; 5 — amorphous connective tissue substance.

ВИСНОВКИ

Таким чином, у проведених тестах цього дослідження має місце позитивна динаміка механокінетичних параметрів скорочення *m. gastrocnemius* щурів (на рівні 29–39±3%) на тлі нейрогенної атрофії за перорального щоденного введення C₆₀ФВР у дозі 1 мг/кг упродовж експерименту, що підтверджується гістологічним аналізом цих м'язів на 30 добу після ініціації пошкодження сідничного нерва. Відтак, це може слугувати підґрунтям для проведення подальших доклінічних випробувань антиоксидантів C₆₀ фулеренів, здатних зменшувати/корегувати патологічні стани м'язової системи, що виникають за атрофії скелетних м'язів унаслідок їх невикористання.

ПОДЯКА

Дослідження виконано за фінансової підтримки Міністерства освіти і науки України [тема №24БП018-02, 2024–2026].

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

Authors' ORCID ID

D. M. Nozdrenko  <https://orcid.org/0000-0001-7254-1533>
M. S. Anhelov  <https://orcid.org/0009-0000-9620-4689>
I. M. Varenjuk  <https://orcid.org/0000-0002-9881-5536>
K. I. Bogutska  <https://orcid.org/0000-0003-0202-8042>
V. S. Tepluk  <https://orcid.org/0000-0002-0611-2797>
V. P. Berest  <https://orcid.org/0000-0001-7779-154X>
Yu. I. Prylutsky  <https://orcid.org/0000-0002-9847-4137>

REFERENCES

1. Burns TM, Graham CD, Rose MR, Simmons Z. Quality of life and measures of quality of life in patients with neuromuscular disorders. *Muscle Nerve*. 2012;46(1):9–25. <https://doi.org/10.1002/mus.23245>
2. Ehmsen JT, Höke A. Cellular and molecular features of neurogenic skeletal muscle atrophy. *Exp Neurol*. 2020;331:113379. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113379>
3. Yin L, Li N, Jia W, Wang N, Liang M, Yang X, Du G. Skeletal muscle atrophy: From mechanisms to treatments. *Pharmacol Res*. 2021;172:105807. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105807>
4. Xu X, Talifu Z, Zhang C-J, Gao F, Ke H, Yun-Zhu P, et al. Mechanism of skeletal muscle atrophy after spinal cord injury: A narrative review. *Front Nutr*. 2023;10:1099143. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1099143>
5. Yadav A, Dabur R. Skeletal muscle atrophy after sciatic nerve damage: Mechanistic insights. *Eur J Pharmacol*. 2024;970:176506. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.176506>
6. Michael K. Relationship of skeletal muscle atrophy to functional status: a systematic research review. *Biol Res Nurs*. 2000;2(2):117–31. <https://doi.org/10.1177/109980040000200205>
7. Zambon AA, Falzone YM, Bolino A, Previtali SC. Molecular mechanisms and therapeutic strategies for neuromuscular diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2024;81(1):198. <https://doi.org/10.1007/s00018-024-05229-9>
8. Zhang H, Qi G, Wang K, Yang J, Shen Y, Yang X, et al. Oxidative stress: Roles in skeletal muscle atrophy. *Biochem Pharmacol*. 2023;214:115664. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115664>
9. Chen K, Yin Q, Guan J, Yang J, Ma Y, Hu Y, et al. Association between the oxidative balance score and low muscle mass in middle-aged US adults. *Front Nutr*. 2024;11:1358231. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1358231>
10. Eswaran SV. Water soluble nanocarbon materials: a panacea for all? *Curr Sci*. 2018;114:1846–50. <https://doi.org/10.18520/cs/v114/i09/1846-1850>
11. Mahor A, Singh PP, Bharadwaj P, Sharma N, Yadav S, Rosenholm JM, Bansal KK. Carbon-based nanomaterials for delivery of biologicals and therapeutics: A cutting-edge technology. *C-J Carbon Res*. 2021;7(1):19. <https://doi.org/10.3390/c7010019>
12. Nozdrenko DM, Bogutska KI, Prylutsky YuI, Korolovych VF, Evstigneev MP, Ritter U, Scharff P. Impact of C₆₀ fullerene on the dynamics of force-speed changes in soleus muscle of rat at ischemia-reperfusion injury. *Fiziol Zh*. 2015;61(2):48–59. <https://doi.org/10.15407/fz61.02.048>
13. Nozdrenko DN, Matvienko TY, Vygovska OV, Soroca VM, Bogutska KI, Nuryshchenko NE, et al. Activation of the cold and menthol receptor TRPM8 improves the post-traumatic recovery of rat muscle soleus during fullerene treatment. *Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii*. 2020;18(1):205–16. <https://doi.org/10.15407/nnn.18.01.205>
14. Nozdrenko D, Prylutska S, Bogutska K, Nurishchenko NY, Abramchuk O, Motuziuk O, et al. Effect of C₆₀ fullerene on recovery of muscle soleus in rats after atrophy induced by achillotenotomy. *Life (Basel)*. 2022;12(3):332. <https://doi.org/10.3390/life12030332>
15. 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. *Fuller Nanotub Carbon Nanostruct*. 2015;23(6):530–4. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2013.870900>
16. Prilutski YI, Durov SS, Yashchuk VN, Ogul'chansky TY, Pogorelov VE, Astashkin Y., et al. Theoretical predictions and experimental studies of self-organization C₆₀ nanoparticles in water solution and on the support. *Europ Phys J D*. 1999;9(1–4):341–3. <https://doi.org/10.1007/s100530050452>
17. Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M, Szwarc H, Wilson SR, Moussa F. [60]fullerene is a powerful antioxidant *in vivo* with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett*. 2005;5:2578–85. <https://doi.org/10.1021/nl051866b>
18. Saito H, Dahlin LB. Expression of ATF3 and axonal outgrowth are impaired after delayed nerve repair. *BMC Neurosci*. 2008;9:88. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-88>

19. Nozdrenko DN, Berehovi SM, Nikitina NS, Stepanova LI, Beregova TV, Ostapchenko LI. The influence of complex drug cocarnit on the nerve conduction velocity in *nerve tibialis* of rats with diabetic polyneuropathy. Biomed Res. 2018;29(19):3629–34. <https://doi.org/10.4066/biomedicalresearch.29-18-1055>
20. Gordon T, Fu SY. Long-term response to nerve injury. Adv Neurol. 1997;72:185–99.
21. Prylutsky Y, Nozdrenko D, Gonchar O, Prylutska S, Bogutska K, Franskevych D, et al. C₆₀ fullerene attenuates muscle force reduction in a rat during fatigue development. Heliyon. 2022;8(12):e12449. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12449>
22. Kostyukov AI, Cherkassky VL. Interaction of the movement-dependent, extrafusal and fusimotor after-effects in the firing of the primary spindle endings. Neuroscience. 1997;76(4):1257–66. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(96\)00431-9](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(96)00431-9)
23. Peng J, Chen X. Progress in research on the mechanism of denervated skeletal muscle atrophy. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. 2008;22(12):1511–4.
24. Giggins OM, Persson UM, Caulfield B. Biofeedback in rehabilitation. J Neuroeng Rehabil. 2013;10:60. <https://doi.org/10.1186/1743-0003-10-60>

C₆₀ FULLERENE PROMOTES RECOVERING RAT MUSCULUS GASTROCNEMIUS CONTRACTING ACTIVITY AFTER NEUROGENIC ATROPHY

D. M. Nozdrenko¹, M. S. Anhelov¹, I. M. Vareniuk¹, M. E. Dzerzhynsky¹, K. I. Bogutska¹,
V. S. Tepluk², I. M. Nedilko³, V. P. Berest⁴, Yu. I. Prylutsky^{1,*}

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

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

³Municipal Institution of Higher Education “Volyn Medical Institute”, 2 Lesya Ukrainka Str., Lutsk, 43016, Ukraine;

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

*Corresponding author: prylut@ukr.net

Submitted April 13, 2025; Revised May 14, 2025;

Accepted May 19, 2025

Background: Recovery of functional activity of skeletal muscles after neurogenic atrophy is a complex and long-term process. Therefore, the search for effective therapeutic means for its acceleration is an extremely urgent task in modern biomedicine. Skeletal muscle atrophy is characterized by a reduction in muscle mass, increased fatigue, and decreased contractile strength, driven by oxidative stress, inflammation, and activation of catabolic reactions. Denervation triggers complex signaling cascades involving Ca²⁺ and transcription factors that promote protein degradation and impair myocyte function. Mitochondrial dysfunction, mitophagy, and disrupted oxidative phosphorylation exacerbate degenerative changes in muscle fibers. In addition to muscle loss, surrounding tissues undergo remodeling, including fibrosis and devascularization, which further hinder regeneration. Oxidative stress is a key initiator of muscle atrophy, and current therapeutic strategies focus on its mitigation through antioxidants, stem cells, and extracellular vesicles.

Objective of the work was to study of the C₆₀ fullerenes with antioxidant properties on the mechanokinetics of rat *m. gastrocnemius* contraction for 30 days after neurogenic atrophy caused by sciatic nerve damage.

Methods: When analyzing the miotic response using tensometry, such mechanokinetic parameters as the level of maximum muscle contraction force, the time to reach its maximum contraction force and the time of holding the maximum force of *m. gastrocnemius* contraction were evaluated. Additionally, histological studies of *m. gastrocnemius* were performed.

Results: It was shown that in injured animals that received daily oral administration of C₆₀ fullerene aqueous solution (C₆₀FAS) at a dose of 1 mg/kg throughout the experiment, there was the positive dynamics in the studied mechanokinetic parameters of *m. gastrocnemius* contraction at the level of 29-39±3% compared to the group of animals that did not use C₆₀FAS, which was confirmed by histological analysis of these muscles on the 30th day after the initiation of sciatic nerve damage.

Conclusions: The results obtained indicate the prospects of using C₆₀FAS to recovering the functional activity of skeletal muscles after neurogenic atrophy.

KEYWORDS: C₆₀ fullerene; *m. gastrocnemius*; neurogenic atrophy; mechanokinetic parameters of muscle contraction; histological analysis.

**9-та МІЖНАРОДНА КОНФЕРЕНЦІЯ
«НАНОБІОФІЗИКА: ФУНДАМЕНТАЛЬНІ ТА ПРИКЛАДНІ АСПЕКТИ»**

6–9 жовтня 2025 року у Фізико-технічному інституті низьких температур імені Б.І. Веркіна НАН України в м. Харкові проходитиме 9-та Міжнародна конференція «Нанобіофізика: фундаментальні та прикладні аспекти» (NBP-2025).

Організатори заходу: Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України та Інститут фізики НАН України.

Мета конференції — представлення та обговорення нових досягнень та перспектив розвитку у галузі, що поєднує біофізику та нанотехнології, за наступними напрямками:

- Нанобіогібриди, сформовані 1-D або 2-D наноматеріалами з біомолекулами
- Біомолекули на наночастинках та наноструктурованих поверхнях
- Фізичні властивості біомолекулярних наносистем
- Теоретичні розрахунки та комп'ютерне моделювання нанобіосистем
- Прикладні аспекти нанобіофізики
- Круглий стіл «Історія біофізики в Харкові»

Формат конференції: онлайн або змішаний у залежності від безпекової ситуації.

Контакти: e-mail: nbp2025@ilt.kharkov.ua

Детальну інформацію стосовно конференції можна знайти на офіційному сайті NBP-2025 за посиланням: <http://www.ilt.kharkov.ua/nbp2025>.

**9th INTERNATIONAL CONFERENCE
“NANOBIOPHYSICS: FUNDAMENTAL AND APPLIED ASPECTS”**

6-9 October 2025 the 9th International Conference “NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects” (NBP-2025) will be held at B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the NAS of Ukraine, Kharkiv, Ukraine.

A series of the NBP international conference is organized on biennial basis by combined efforts of the B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the NAS of Ukraine and the Institute of Physics of the NAS of Ukraine

NANOBIOPHYSICS conference series is devoted to discussion of urgent problems in a new scientific field combining biophysics and nanotechnology as well as its progress and prospects, which will be discussed during the following sessions:

1. Nanobiohybrids of 1-D or 2-D nanomaterials with biomolecules
2. Biomolecules on nanoparticles and nanostructured surfaces
3. Physical properties of biomolecular nanosystems
4. Theoretical calculations and computer modeling of nanobiosystems
5. Applied aspects of nanobiophysics
6. Round table “History of Biophysics in Kharkiv”

Conference format: online or mixed depending on security situation

Contacts: e-mail: nbp2025@ilt.kharkov.ua

Registration, abstracts submission and information updates will be available at the Conference site: <http://www.ilt.kharkov.ua/nbp2025>

За інформацією Фізико-технічного інституту низьких температур імені Б.І. Веркіна НАН України

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. 53

Збірник наукових праць

Укр. та англ. мовами.

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

Підписано до друку 30.05.2025. Формат 60×84 1/8.
Папір офсетний. Друк цифровий.
Ум. друк. арк. 6,91. Обл.-вид. арк. 8,04. 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