

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

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

Біофізичний Вісник

Випуск 54

Заснований 1998 р.

Харків 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 № 30 від 24.11.2025).

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 сцинтиляційних матеріалів Національної академії наук України, Харків, Україна

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

Гордієнко О. І., д.ф.-м.н., професор, 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 сцинтиляційних матеріалів Національної академії наук України, Харків, Україна

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

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

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

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

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

Попов А. О., к.т.н., доцент, 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

© Н. В. Хміль, А. В. Шестопалова, В. Г. Колесніков, 3D представлення комплексу 6VYB-5JXG на першій сторінці обкладинки, 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 54

Founded in 1998

Kharkiv 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 (November 24, 2025, Protocol No. 30).

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

© N. V. Khmil, A. V. Shestopalova, V. G. Kolesnikov, the 3D representations of the complex 6VYB-5JXG on the first page of the cover, 2025

ЗМІСТ

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

N. V. Khmil, A. V. Shestopalova, V. G. Kolesnikov*In silico* analysis of binding sites for potential inhibitors targeting the complex of furin protease

9–26

БІОМЕДИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ

A. Plokhotnichenko, V. Karachevtsev

AgNPs Incorporated in PMMA-PVP blended nanofibers: spectroscopy monitoring of AgNP dissolution in PMMA nanopores

27–35

МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

N. V. Kachur, A. V. Fedorenko, H. V. Dorozinska, V. M. Ryzhykh, V. P. Maslov

Express method for investigating natural water quality using a sensor device based on surface plasmon resonance and a conductometer

36–48

МЕДИЧНА ФІЗИКА

Ю. Ушенко, І. Солтис, В. Гарасим, О. Салега

Методи і засоби поляризаційно-інтерференційного відтворення і дискретного фазового сканування джонс-матричних зображень полікристалічних плівок дегідратованої жовчі

49–70

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

V. S. Hoidina, Y. O. Posokhov, Y. G. Kot, O. A. Nakonechna, V. Y. Prokopiuk

The impact of different lyophilization regimes on the protein composition of human cord blood serum

71–82

С. І. Кондратенко, О. О. Горобченко, З. П. Ліннік, С. М. Кормош, І. М. Митенко, О. В. Позняк, Л. В. ЧабанАналіз фенотипового різноманіття справжніх листків у ліній салату листкового (*Lactuca sativa* var. *secalina* L.), створених методами фізичного і хімічного мутагенезу

83–99

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

В. В. Гурмач, В. Р. Караушу, З. С. Клестова, В. П. Берест, Ю. І. Прилуцький	100–
Моделювання взаємодії C ₆₀ фулерену з білковими мішенями SARS-CoV-2	107

ХРОНІКА

Тиждень біофізики в Україні: онлайн зустріч Харківського відділення Українського біофізичного товариства	108–
	111

CONTENTS

MOLECULAR BIOPHYSICS

N. V. Khmil, A. V. Shestopalova, V. G. Kolesnikov

In silico analysis of binding sites for potential inhibitors targeting the complex of furin protease 9–26

BIOMEDICAL ENGINEERING

A. Plokhotnichenko, V. Karachevtsev

AgNPs Incorporated in PMMA-PVP blended nanofibers: spectroscopy monitoring of AgNP dissolution in PMMA nanopores. 27–35

METHODS OF BIOPHYSICAL INVESTIGATIONS

**N. V. Kachur, A. V. Fedorenko, H. V. Dorozinska, V. M. Ryzhykh,
V. P. Maslov**

Express method for investigating natural water quality using a sensor device based on surface plasmon resonance and a conductometer 36–48

MEDICAL PHYSICS

Y. Ushenko, I. Soltys, V. Harasym, O. Saleha

Methods and means of polarization-interference layer reconstruction and discrete phase scanning of jones matrix images of polycrystalline films of dehydrated bile 49–70

ACTION OF PHYSICAL AGENTS ON BIOLOGICAL OBJECTS

**V. S. Hoidina, Y. O. Posokhov, Y. G. Kot, O. A. Nakonechna,
V. Y. Prokopiuk**

The impact of different lyophilization regimes on the protein composition of human cord blood serum 71–82

**S. I. Kondratenko, O. O. Gorobchenko, Z. P. Linnik, S. M. Kormosh,
I. M. Mytenko, O. V. Pozniak, L. V. Chaban**

Analysis of phenotypic diversity of true leaves in lettuce lines (*Lactuca sativa* var. *secalina* L.) created by physical and chemical mutagenesis 83–99

MOLECULAR BIOPHYSICS**V. V. Hurmach, V. R. Karaushu, Z. S. Klestova, V. P. Berest, Yu. I. Prylutsky**Modeling the interaction of C₆₀ fullerene with SARS-CoV-2 protein targets

100–

107

CHRONICLEBiophysics week in Ukraine: online meeting of the Kharkiv branch
of the Ukrainian biophysical society

108–

111

IN SILICO ANALYSIS OF BINDING SITES FOR POTENTIAL INHIBITORS TARGETING THE COMPLEX OF FURIN PROTEASE AND THE SARS-COV-2 SPIKE PROTEIN

N. V. Khmil^{1,2*}, A. V. Shestopalova², V. G. Kolesnikov²

¹Kharkiv National University of Radio Electronics, 14 Nauky Ave., Kharkiv, 61166, Ukraine;

²O. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics National Academy of Sciences of Ukraine,
12 Acad. Proskura str., Kharkiv, 61085, Ukraine

*Corresponding author: khmilnatali@gmail.com

Submitted April 28, 2025; Revised July 7, 2025;

Accepted August 29, 2025

Background: COVID-19 is an infectious disease caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Efforts to fight the virus include the development and investigation of vaccines, monoclonal antibodies, and specific antiviral drugs targeting key stages in the viral life cycle.

Objectives: The aim of this study is to investigate the potential sites of furin protease binding to the S protein in different conformations and to evaluate the binding affinity of non-specific antiviral drugs and the macrocyclic peptidomimetic inhibitor 8 (PI8) to the S protein–furin protease complex using a molecular docking approach.

Material and Methods: The three-dimensional structures of the S protein (PDB IDs: 6VYB, 6VXX, 7VHJ) from the Protein Data Bank (www.rcsb.org) were docked with furin protease (PDB ID: 5JXG) using the ClusPro 2.0 server. Non-specific antiviral drugs, such as remdesivir, chloroquine, favipiravir, nelfinavir, and PI8, were docked onto 6VYB-5JXG, 6VXX-5JXG, and 7VHJ-5JXG complexes using the AutoDock Vina program. The ligands were energy-minimized using the Universal Force Field (UFF) and converted to PDBQT format with OpenBabel. Protein optimization was performed using AutoDock Tools. Docking results were visualized using the Discovery Studio 2024 Visualizer.

Results: The binding affinity of the studied ligands with the S protein–furin protease complexes was verified by molecular docking studies. PI8, nelfinavir, and remdesivir showed high binding affinity with the 7VHJ-5JXG structure due to the fully modeled structure of the furin cleavage site. The best docking scores of PI8 with 6VYB-5JXG, 6VXX-5JXG, and 7VHJ-5JXG complexes were -9.7 kcal/mol, -9.5 kcal/mol, and -9.9 kcal/mol, respectively. The interaction between the S protein–furin complexes and PI8 involves specific amino acid residues, primarily within the catalytic site of furin and the reactive site loop of PI8. Docking studies showed that remdesivir acts directly on the furin cleavage site of the S protein (in the 7VHJ-5JXG complex), forming energetically favorable interactions through hydrogen bonds and hydrophobic contacts, with a high binding affinity (binding energy score is -9.1 kcal/mol). The energetically favorable interactions of the 6VYB-5JXG, 6VXX-5JXG, and 7VHJ-5JXG complexes with nelfinavir are also confirmed by low binding energy scores of -8.2 kcal/mol, -8.9 kcal/mol, and -9.3 kcal/mol, respectively.

Conclusion: According to the results of molecular docking, PI8, nelfinavir, and remdesivir demonstrate energetically favorable interactions with the studied complexes and can be considered promising inhibitors targeting the SARS-CoV-2 S protein–furin protease complexes.

KEY WORDS: SARS-CoV-2 spike protein; furin protease; antiviral drugs; molecular docking; human health.

Citation: Khmil NV, Shestopalova AV, Kolesnikov VG. *In silico* analysis of binding sites for potential inhibitors targeting the complex of furin protease. Biophysical Bulletin. 2025;54:9–26. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-54-01>

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

COVID-19 is an infectious disease caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which has affected more than 7.0 million people worldwide [1]. Over the past five years, the virus has spread rapidly across countries due to its ability to transmit through respiratory pathways. Additionally, the virus has the capacity for asymptomatic and pre-symptomatic transmission. Therefore, individuals infected with SARS-CoV-2 can transmit the virus before showing symptoms — such as respiratory distress, headache, fatigue, sore throat, and high fever — or even without developing symptoms, making detection and containment particularly challenging. The combination of immune evasion and high infectivity may also contribute to the widespread transmission of SARS-CoV-2 [2].

Efforts to fight the virus include the development of vaccines, monoclonal antibodies, and specific antiviral drugs targeting key stages in the viral life cycle, with research on these treatments currently ongoing [3, 4]. Most studies focus on the numerous structural and nonstructural viral proteins encoded by SARS-CoV-2, including the SARS-CoV-2 spike glycoprotein (S protein), papain-like protease (PLpro), and the main protease (Mpro) [5, 6]. Additionally, studying human cell proteases, such as furin and type II transmembrane serine protease (TMPRSS2), is crucial for understanding the mechanisms involved in the activation of the SARS-CoV-2 S protein.

The attachment of SARS-CoV-2 to the host cell is a critical step in the infection process, mediated by interactions between the S protein and the host cell's angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor. The viral S protein is a structural trimeric protein, approximately 1,273 amino acids long, that belongs to the class I viral fusion proteins [7]. The S protein consists of the S1 subunit, which contains a signal peptide and a receptor-binding domain (RBD), and the S2 subunit, which includes the fusion peptide (FP), heptapeptide repeat sequences 1 and 2 (HR1, HR2), the transmembrane domain (TM), and the cytoplasmic domain [8]. The S1 and S2 subunits of the S protein are separated by a cleavage site recognized by furin-like proteases during its biogenesis in infected cells. Additionally, the S2 subunit contains an S2' cleavage site located immediately upstream of the first FP, exposing the FP, facilitating membrane fusion. The TM domain anchors the S protein to the viral envelope, while the HR1 and HR2 regions help form the post-fusion structure [9]. The dynamic transitions among the prefusion "open," postfusion "closed," and intermediate "semi-open" conformations are essential for the S protein's role in facilitating viral entry [10, 11]. The proteolytic activation of the S protein by host proteases is necessary to convert its precursor form into a biologically active form, enabling the subsequent fusion of viral and cellular membranes.

Upon binding with the ACE2 receptor, the S protein is processed by host cell proteases at two distinct sites. The furin protease cleaves the S1/S2 site, which contains multiple arginine residues [12]. Additionally, TMPRSS2 targets the S2' site, priming the S protein and facilitating membrane fusion [13]. As a result of this priming, the N-terminal S1 domain binds to the host ACE2 receptor via the receptor-binding domain, while the C-terminal S2 domain undergoes significant structural transformations. These transitions from prefusion conformations to transient intermediates enable its insertion into the target host membrane [14].

The SARS-CoV-2 S protein has a cleavage site (682Arg-683Arg-684Ala-685Arg) at the S1/S2 boundary, which is cleaved by furin to prime the S protein for TMPRSS2 protease processing [15]. The furin cleavage site is unique to the SARS-CoV-2 S protein and is lacking in other coronaviruses, such as SARS-CoV, making it particularly efficient at utilizing host proteases for entry [16, 17]. This fusion event enables the viral genome to be released into the host cell cytoplasm, where it begins the replication process. Furin inhibition can block this important activation step, preventing the virus from effectively infecting host cells. Therefore, host molecules essential for the completion of viral replication and infection are emerging as potential targets for drug development [18].

Numerous well-known drugs with different pharmacological properties have been tested and used to treat various diseases, including COVID-19 [19–21]. The ligands selected for our study, such as remdesivir, nelfinavir, and favipiravir, have been investigated as potential candidates for inhibiting the spread of the coronavirus using *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* methods within the framework of anti-COVID therapy protocols. Evidence suggests that these drugs can inhibit specific proteins, such as proteases and the S protein binding site on ACE2, which are critical for coronavirus infection, by forming stable complexes with them [22–24]. However, for some drugs, such as chloroquine and PI8, no reliable data confirms the presence of target molecules in SARS-CoV-2 [25].

Given that the virus is constantly evolving, it is crucial to continue searching for drugs capable of forming stable complexes with various critical protein systems of SARS-CoV-2. Due to the absence of a resolved structure for the region containing the furin cleavage site, it remains unclear whether furin can bind to additional sites on viral S glycoproteins to cleave them. Furthermore, understanding the effect of antiviral drugs on these complexes is essential. Therefore, elucidating the mode of interaction between furin and the spike glycoprotein will be critical for the effective design of antiviral drugs and antibodies.

The aim of this study is to investigate the potential sites of furin protease binding to the S protein in different conformations and to evaluate the binding affinity of non-specific antiviral drugs and the macrocyclic peptidomimetic inhibitor 8 (PI8) to the S protein–furin protease complex using a molecular docking approach.

MATERIALS AND METHODS

The three-dimensional structures of the S protein in its "open" (PDB ID: 6VYB), "closed" (PDB ID: 6VXX), and modified furin site (PDB ID: 7VHJ) conformations were obtained from the Protein Data Bank (www.rcsb.org). The 6VYB, 6VXX, and 7VHJ structures represent the best available experimental models of the S protein trimer in distinct conformational states, each of which is biologically relevant for spike activation and processing. In the study, these proteins were docked with furin protease (PDB ID: 5JXG) using the ClusPro 2.0 server. As the PDB files lacked hydrogen atoms, Kollman charges were assigned to match the electrostatic potentials, and hydrogen atoms were added using AutoDock Tools to optimize the proteins appropriately. The protonation states of amino acid residues at pH 7 were verified using PROPKA 3.1 [26]. In the next stage, non-specific antiviral drugs, including remdesivir, chloroquine, favipiravir, nelfinavir, and PI8, were docked onto the three constructed targets via the ClusPro 2.0 server — 6VYB-5JXG, 6VXX-5JXG, and 7VHJ-5JXG.

Ligands were downloaded in Structural Data File (SDF) format from the PubChem database (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov). Log P values for all ligands were obtained from the PubChem database (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), where they were reported following calculation using the XLogP3 3.0 algorithm. XLogP3 employs an atom-additive (AA) method that estimates log P by summing the contributions of individual atoms based on their chemical environments. The structural formulas and some physicochemical properties of the studied ligands are shown in Figure 1.

Molecular docking was performed using the AutoDock Vina program [27]. Before docking, the ligands were minimized in energy using the Universal Force Field (UFF) and converted to PDBQT format with OpenBabel [28]. All docking studies were conducted as target docking, with the grid box encompassing the interacting chains of the S protein and furin protease. The grid box dimensions were set to 70 Å×70 Å×70 Å with a grid spacing of 0.508 Å. To increase the likelihood of identifying the global minimum of the scoring function, the exhaustiveness parameter in AutoDock Vina was set to 50. High-affinity binding complexes were subsequently analyzed using Discovery Studio 2024 Client software.

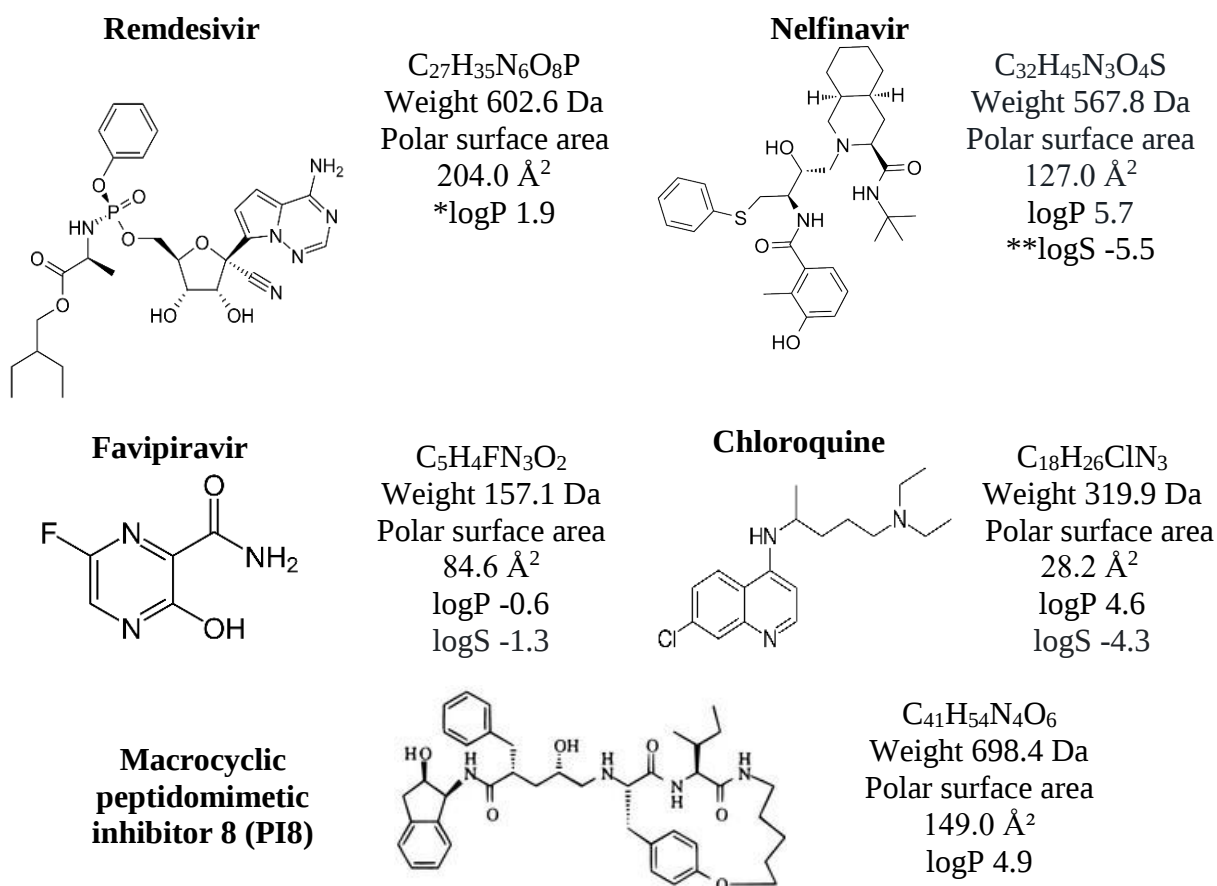


Fig. 1. Structures and physicochemical properties of ligands (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

*logP — refers to the logarithm of the octanol/water partition coefficient as a measure of hydrophobicity of a compound;

**logS — directly related to the water solubility of a drug.

RESULTS AND DISCUSSION

The activation of the S glycoprotein by the host protease furin is an essential step in the replication of SARS-CoV-2. Furin protease represents a highly selective serine protease that binds with the S protein and activates it via proteolytic cleavage [29]. The inhibition of the S protein-furin protease complex is a promising approach for the treatment of COVID-19. Therefore, protein-protein complexes are important targets for the development of antiviral drugs, as the specificity of these interactions determines ligand binding affinity and the effectiveness of therapy.

The docking of the S protein in its "open," "closed," and modified furin site conformations with the furin protease was performed using the ClusPro 2.0 web-based server. This server utilizes a docking program based on the Fast Fourier Transform (FFT) correlation approach, employing pairwise potentials [30]. It selects the centers of highly populated clusters of low-energy structures rather than relying solely on the lowest-energy conformations.

The interaction energy between the two proteins is expressed as:

$$E = w_1 E_{rep} + w_2 E_{attr} + w_3 E_{elec} + w_4 E_{DARS},$$

where E_{rep} and E_{attr} — the repulsive and attractive forces described by the van der Waals interaction energy; E_{elec} is an electrostatic energy; E_{DARS} is a pairwise structure-based potential; w_1 , w_2 , w_3 , and w_4 are the weight coefficients.

To analyze molecular interactions between the amino acid residues of protein structures, we used the generated models with a balanced parameter set. The weight coefficients used were:

$w_1 = 0.4$, $w_2 = -0.4$, $w_3 = 600$, and $w_4 = 1.0$. The protein-protein molecular docking studies revealed that the SARS-CoV-2 S protein in its different conformations binds to the furin protease, with binding energy scores presented in Table 1.

Table 1. Binding energy score of the SARS-CoV-2 S protein in different conformations with furin protease using Cluspro web server

Complex	Cluster	Representative	Binding energy score, kcal/mol
6VYB-5JXG	1	Center	-222.2
		Lowest energy	-254.7
6VXX-5JXG	1	Center	-220.9
		Lowest energy	-236.8
7VHJ-5JXG	1	Center	-213.7
		Lowest energy	-235.8

In Table 1, the center energy is the average interaction energy of the similar docking poses within a first cluster. The center energy is calculated for the pose that represents the center of the cluster (i.e., the most representative pose of that cluster). The lowest energy refers to the interaction energy of the pose with the lowest energy value within a first cluster. This represents the most energetically favorable pose among all poses in the cluster. The protein-protein docking of furin and the S protein in "open" conformation showed the binding affinity of furin with the lowest energy of -254.7 kcal/mol, which can be considered a potential candidate for further analysis, like the other two structures.

The unmodeled structure of the region containing the furin cleavage site of the S protein structures from the PDB in both the "open" (6VYB) and "closed" (6VXX) conformations has significantly influenced the outcomes of our modeling. Most researchers have reported some success in reconstructing the structure of the furin cleavage site of 6VYB structure after successfully modeling the entire SARS-CoV-2 S protein using the Protein Homology/Analogy Recognition Engine [31]. It was found that an antiparallel β -sheet connects the S1 and S2 regions of the S protein, comprising a few amino acid residues Arg-Arg-Ala-Arg in a short loop. Some acid residues protrude out of the main body of the SARS-CoV-2 S protein, which forms an antiparallel β -sheet along with a short loop comprising a furin cleavage site.

Our study demonstrates that furin can interact with the S protein outside the furin cleavage site, exhibiting high binding affinity (Table 1). This finding suggests alternative mechanisms for the S protein-furin interactions. In the 6VYB-5JXG and 6VXX-5JXG complexes, furin predominantly interacts with the receptor-binding domain of the S1 subunit, specifically with regions not designed for direct cleavage. Such interactions could arise from electrostatic or hydrophobic contacts between the proteins. In the 7VHJ-5JXG complex, the interacting amino acids are located near the fusion peptide (FP) and heptapeptide repeat sequence 1 (HR1), owing to the presence of the cleavage site. The results of N. Vankadari using molecular dynamics and computational model-based selective docking and simulation show that SARS-CoV-2 spike glycoprotein amino acid residues from Asp657 up to Gln690 are the prime residues interacting with the furin protease; this is mediated via van der Waals bonds and hydrogen bonding [32].

Alternative pathways for the S protein activation and hydrolysis are being investigated using molecular docking analysis and immunoblotting to identify precisely possible cleavage

sites to prevent viral entry into the target cell [33]. The identification of cathepsin cleavage sites in the S1/S2 fusion peptide region – not at the canonical site – suggests their assistance in activating cleavage of the S protein to promote membrane fusion [34]. Therefore, our results provide valuable insights into how furin interacts with additional regions of the S protein and affects its function.

AutoDock Vina program performs molecular docking and virtual screening of ligands with proteins, predicting noncovalent interactions and the binding affinity using a scoring function that is considered as the sum of intermolecular and intramolecular contributions. In this study, the binding energy scores of remdesivir, chloroquine, favipiravir, nelfinavir, and PI8 towards the S protein-furin protease complex were calculated by Autodock Vina 1.1.2 software. Autodock results demonstrated that these ligands can successfully dock with the SARS-CoV-2 S protein-furin complexes, as indicated by the AutoDock Vina scores presented in Table 2. The docked models with the lowest binding energy scores indicated the most energetically favorable interactions between the ligands and the target proteins.

Table 2. Binding energy score of studied ligands with target the SARS-CoV-2 S protein-furin protease complex

Ligand	Binding energy score, kcal/mol		
	6VYB-5JXG	6VXX-5JXG	7VHJ-5JXG
PI8	-9.7	-9.5	-9.9
Nelfinavir	-8.2	-8.9	-9.3
Remdesivir	-7.8	-8.2	-9.1
Chloroquine	-5.9	-6.3	-7.4
Favipiravir	-5.8	-5.9	-6.9

To verify the correctness of the above-described docking procedure, we have carried out re-docking calculations. The predictive power of docking in identifying binding sites of the studied ligands was assessed in PyMol by testing the SARS-CoV-2 spike protein (S protein) in different conformations from the PDB database with the studied ligands (PDB IDs: 7QG7, 3EL0, 7AAP, 4V2O, 1D4K). The RMSD between the ligand's original pose and the docking pose was less than 2 Å. So comparative analysis showed that AutoDock Vina demonstrated good agreement in re-docking these protein-ligand complexes.

According to Table 2, the highest binding affinity was observed for 7VHJ-5JXG docked by PI8, with an AutoDock Vina score of -9.9 kcal/mol. The amino acids involved were Arg214 from the C chain of the S protein and Asp258 from furin, interacting through electrostatic forces, such as π -cation and π -anion contacts. Additionally, Trp64 from the C chain of the S protein, along with Leu227 and His364 from furin, interacted via hydrophobic forces (π -sigma, π -alkyl). Furthermore, Asp191 of furin formed a hydrogen bond (Fig. 2).

The PI8 interacts with the 6VYB-5JXG with a binding energy score of -9.7 kcal/mol. In this case, the molecular binding is stabilized through hydrogen bonds with Ser253, His364 and Ser368 of furin, as well as hydrophobic interactions through five amino acid residues, including Arg193, His194, Leu227, Asn295, and Thr365 of furin. Additionally, a π -anion interaction with Asp258 is observed (Fig. 3).

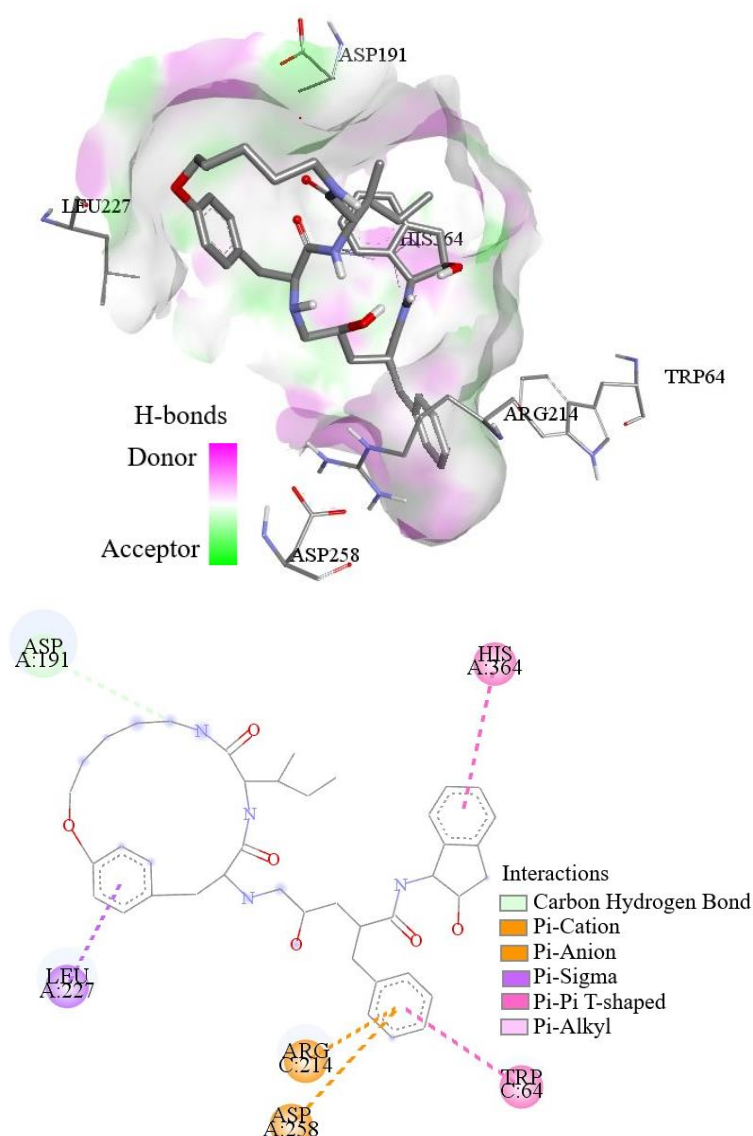


Fig. 2. The 3D and 2D representations of the complex 7VHJ-5JXG and its molecular interactions with PI8. Figures obtained with Discovery Studio software. The interacting residues of corresponding chains of the S protein and furin protease with PI8 (coloring by element, all C atoms of ligand are in dark gray, red — O, gray — H, blue — N) are labeled and shown as stick models. The ligand interaction diagram of PI8 with the 7VHJ-5JXG complex is shown, and the types of intermolecular interactions are labeled.

The PI8 also interacts with high binding affinity to 6VXX-5JXG, which is -9.5 kcal/mol. The molecular interaction is facilitated by hydrogen bonds with Tyr28 and Gly366 of furin, and hydrophobic interactions through residues Phe32, His194, Leu227, and Ser253 of furin. Additionally, a π -anion interaction occurs with Asp154 (Fig. 4).

It is also necessary to note that PI8 has a lipophilicity of $\log P = 4.9$, which allows it to bind specifically and with high affinity to all the studied complexes, interacting with residues such as Leu227, Trp64, Ala292, Ser253, and Ser368, as illustrated in Figs. 2–4.

Our docking study suggests that PI8 could potentially act by inhibiting furin's interaction with the SARS-CoV-2 S glycoprotein at the binding sites, regardless of the conformation state of the S protein. The interaction between the S protein-furin complexes and PI8 involves specific amino acid residues, primarily within the active (catalytic) site of furin and the reactive site loop of PI8. As shown in the figures above, these interactions include hydrogen bonds, van

der Waals forces, and hydrophobic interactions. Our results are consistent with Van Lam's findings that the peptide-based drugs bind furin protease with higher affinity than other drugs [35].

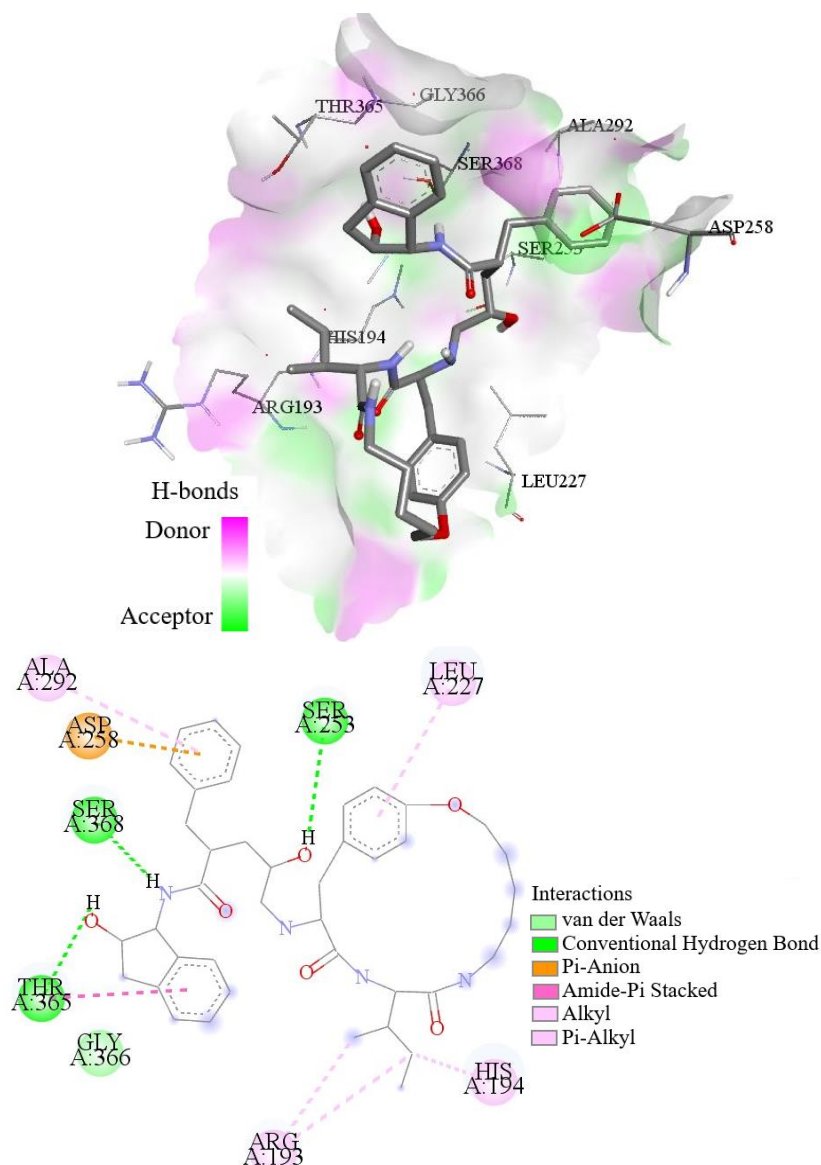


Fig. 3. The 3D and 2D representations of the complex 6VYB-5JXG and its molecular interactions with PI8. Figures obtained with Discovery Studio software. The interacting residues of furin protease with PI8 (coloring by element, all C atoms of ligand are in dark gray, red — O, gray — H, blue — N) are labeled and shown as stick models. The ligand interaction diagram of PI8 with the 6VYB-5JXG complex is shown, and the types of intermolecular interactions are labeled.

It is known that remdesivir inhibits the polymerase activity of the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) via RNA chain termination, thereby inhibiting SARS-CoV-2 replication and transcription [36]. Remdesivir also binds to Mpro, but with slightly weaker affinity than to RdRp [37]. As shown by Nguyen et al., the binding mechanisms of remdesivir to these two targets differ in that electrostatic interactions are the main force stabilizing the RdRp–remdesivir complex, while van der Waals interactions dominate in the Mpro–remdesivir case. Remdesivir demonstrated considerable binding affinity with the S protein in its "closed" conformation (6XXV) by forming hydrogen bonds with amino acid residues in the RBD and

HR1 sequence [38]. However, the binding affinity for the S protein in its "open" conformation was slightly lower, which is associated with the involvement of the transmembrane domain of the S protein. These results are consistent with our study, which found that the binding affinity of remdesivir to the 6VXX-5JXG complex was higher than that to the 6VYB-5JXG complex: -8.2 kcal/mol vs. -7.8 kcal/mol.

In the complex 6VYB-5JXG, remdesivir forms hydrophobic interactions only with the furin protease (Fig. 5).

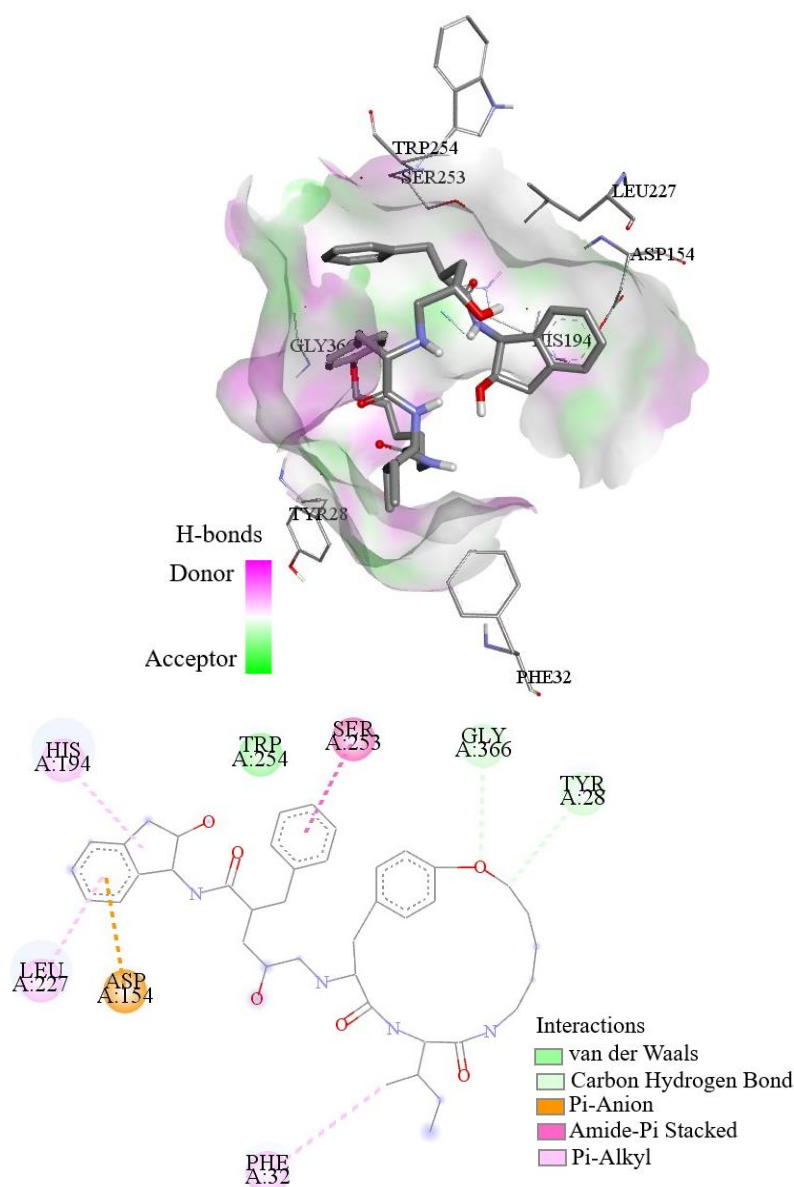


Fig. 4. The 3D and 2D representations of the complex 6VXX-5JXG and its molecular interactions with PI8. Figures obtained with Discovery Studio software. The interacting residues of furin protease with PI8 (coloring by element, all C atoms of ligand are in dark gray, red — O, gray — H, blue — N) are labeled and shown as stick models. The ligand interaction diagram of PI8 with the 6VXX-5JXG complex is shown, and the types of intermolecular interactions are labeled.

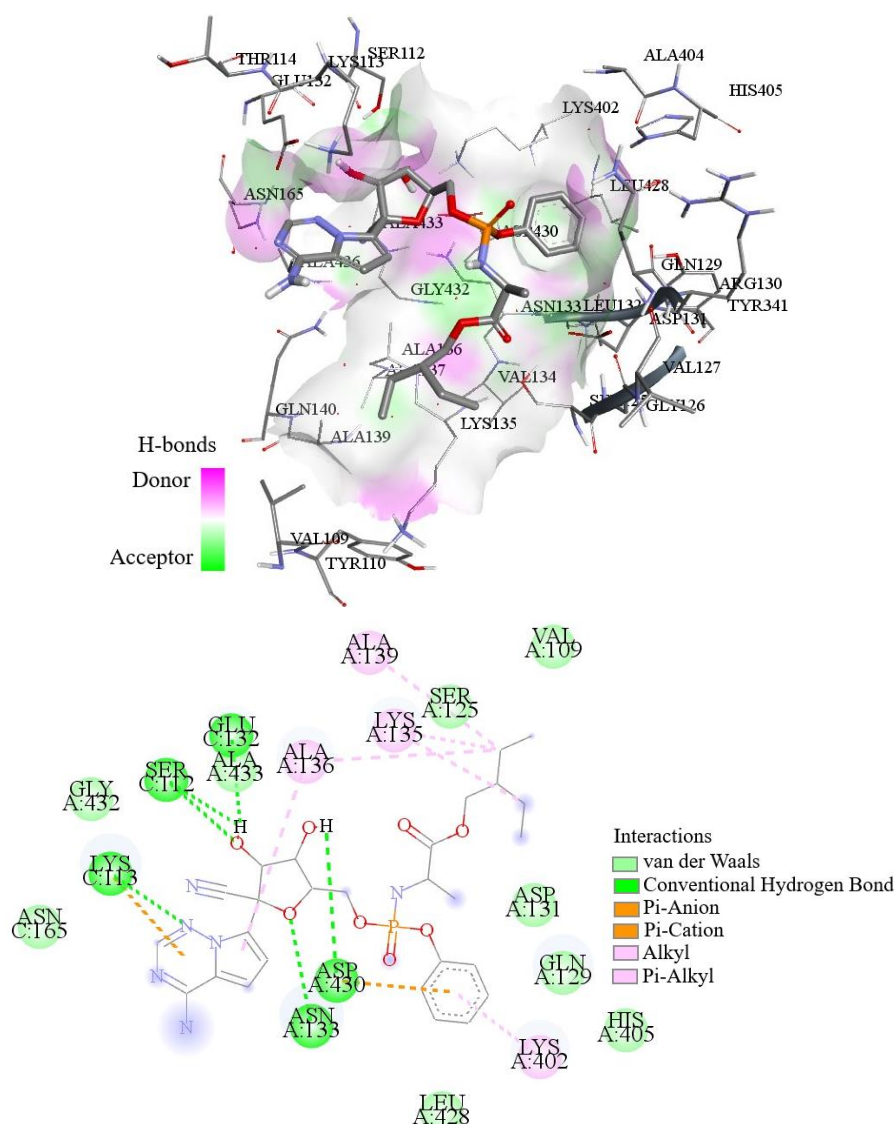


Fig. 5. The interacting residues of corresponding chains of the S protein and furin protease (gray) with remdesivir (coloring by element, all C atoms of ligand are in dark gray, red — O, gray — H, blue — N) are labeled and shown as stick models. The ligand interaction diagram of remdesivir with the 6VYB-5JXG complex is shown, and the types of intermolecular interactions are labeled.

However, hydrogen bonds are formed with the S protein's C chain (Lys113, Ser112, and Glu132) and the furin protease (Asn133, Asp430, and Ala433). In the complex 6VXX-5JXG, remdesivir forms hydrogen bonds (Thr29, His194, Asp215, and Thr365) and hydrophobic interaction (Asp191, and His364) only with furin (Fig. 6).

Our docking studies showed that remdesivir directly targets the furin cleavage site of the S protein (in the 7VHJ-5JXG complex), forming an energetically favorable complex through hydrogen bonds and hydrophobic interactions with high binding affinity. Remdesivir interacts with 7VHJ-5JXG with the high binding energy score of -9.1 kcal/mol. The molecular binding is stabilized through hydrogen bonds with Asp174, Asp179, and Gln183 of furin, as well as Ser679,

and Ala681 of the S protein. Hydrophobic interactions are mediated by Arg357 of furin and Ser682 of the S protein, while π -stacking interactions involve Tyr186 of furin (Fig. 7).

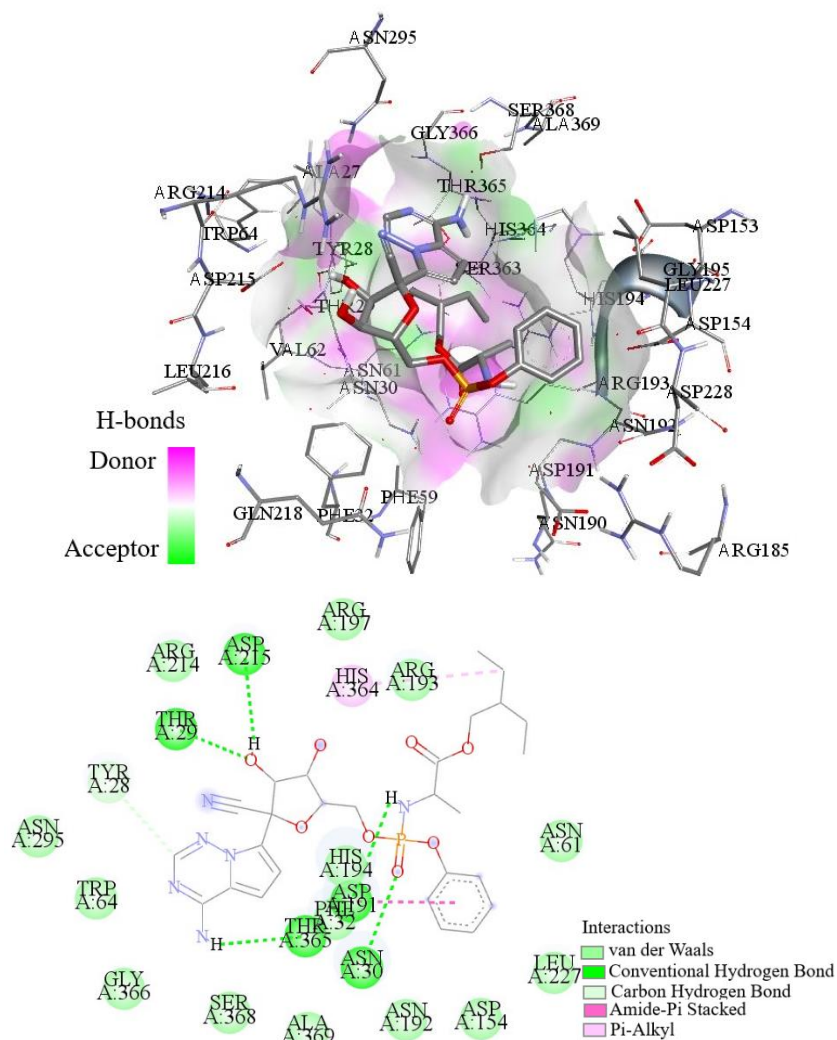


Fig. 6. The interacting residues of furin protease (gray) with remdesivir (coloring by element, all C atoms of ligand are in dark gray, red — O, gray — H, blue — N) are labeled and shown as stick models. The ligand interaction diagram of remdesivir with the 6VXX-5JXG complex is shown, and the types of intermolecular interactions are labeled.

Remdesivir, which has moderate lipophilicity ($\log P = 1.9$), showed corresponding binding affinity to the complexes – particularly to complex 7VGH-5JXG – through interactions with Ser682, Ala681, and Ser679 (Fig. 7). In general, remdesivir exhibits specificity for RNA-dependent RNA polymerase. Upon conversion to its active hydrophilic metabolite (GS-441524) within the cell, remdesivir mimics a nucleoside and incorporates into viral RNA during replication [39].

Our binding affinity calculations using AutoDock Vina for nelfinavir showed that the binding affinities with the S protein-furin protease complexes ranged from -8.2 kcal/mol to -9.3 kcal/mol. We showed that the SARS-CoV-2 S protein-furin complex (7VHJ-5JXG), which includes amino acid residues of the furin cleavage site, interacts with nelfinavir with the highest binding affinity of -9.3 kcal/mol (Fig.8). At the same time, the binding affinities decreased with

a reduction in the total number of contacts (hydrogen bonds and hydrophobic interactions) between nelfinavir and furin protease of this complex.

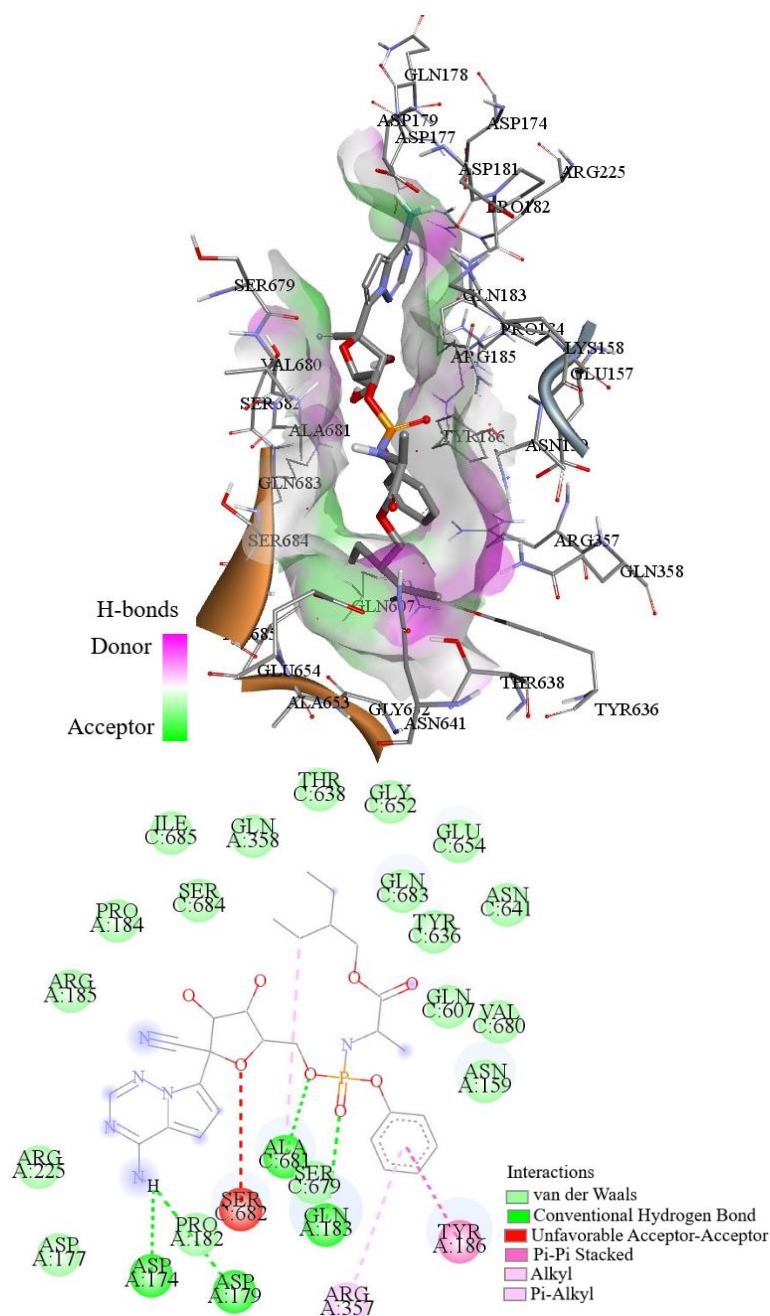


Fig. 7. The interacting residues of corresponding chains of the S protein (brown) and furin protease (gray) with remdesivir (coloring by element, all C atoms of ligand are in dark gray, red — O, gray — H, blue — N) are labeled and shown as stick models. The ligand interaction diagram of remdesivir with the 7VHJ-5JXG complex is shown, and the types of intermolecular interactions are labeled.

Furthermore, our protein-ligand docking results align with those of Bashir and co-authors, who identified Ser368, Thr365, and His364 as key residues in the binding active site of furin [31]. Our findings demonstrated that the high affinity of nelfinavir for 7VHJ-5JXG is primarily due to the formation of hydrogen bonds with His364, and Thr365 of the furin protease.

Additionally, hydrophobic interactions involving His194, and Leu227 of furin and Arg214 of the S protein contributed to the conformational stability of the 7VHJ-5JXG-nelfinavir complex. Trp64 of the S protein forms an electrostatic interaction with the ligand.

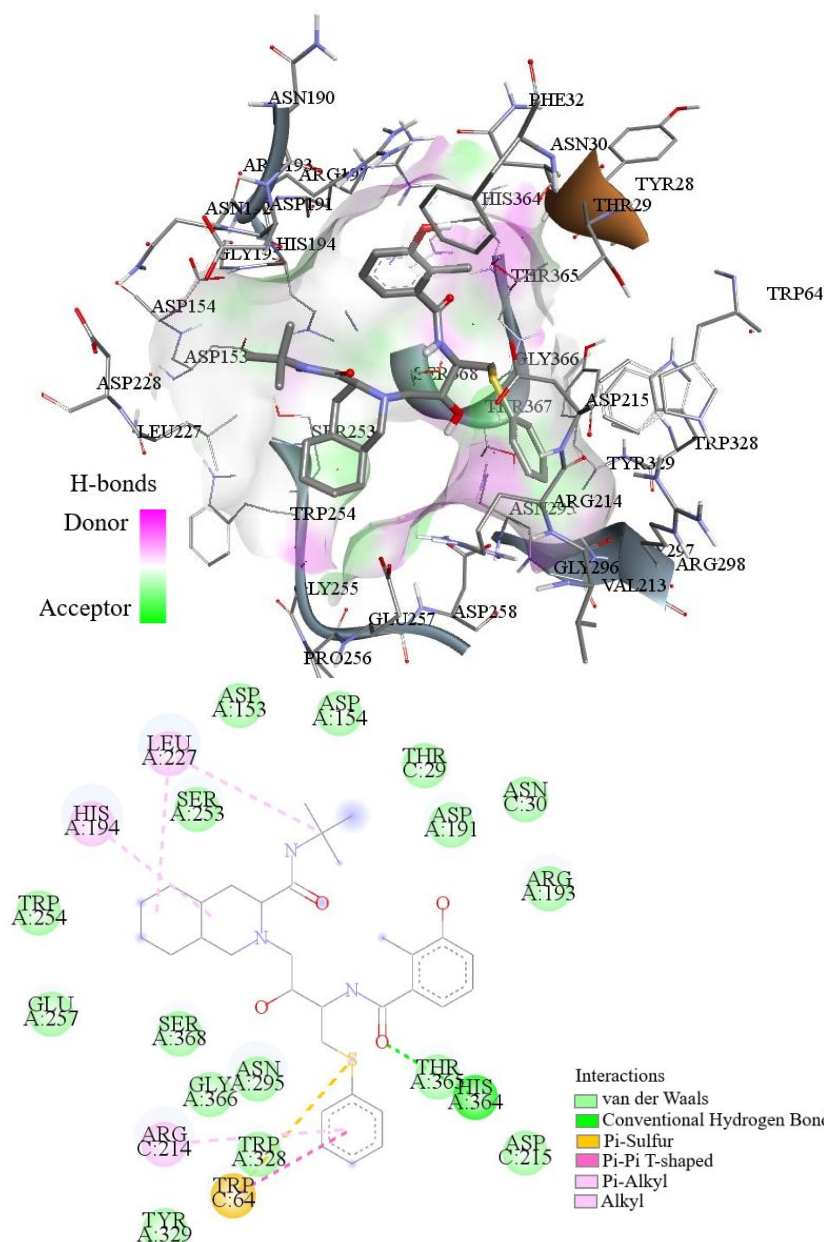


Fig.8. The key intermolecular interactions between nelfinavir and the 7VHJ-5JXG complex are shown. The interacting residues of corresponding chains of the S protein (brown) and furin protease (gray) with nelfinavir (coloring by element, all C atoms of ligand are in dark gray, red — O, gray — H, blue — N) are labeled and shown as stick models. 2D ligand interaction diagrams between nelfinavir and the 7VHJ-5JXG complex are shown. Various types of intermolecular interactions are labeled in the legend.

The catalytic domain of furin has a cavity with an active site surrounded by negatively charged residues. This configuration allows inhibitors to bind to the enzyme and interact with the catalytic triad — Asp153, His194, and Ser368 — essential for its catalytic activity by hydrolyzing the virus' peptide bonds [40]. Our studies showed that nelfinavir and PI8 bind favorably to the catalytic domain of furin, especially of the 7VHJ-5JXG complex.

We demonstrated that the lipophilicity of nelfinavir influences the binding affinity of the studied complexes. Nelfinavir contains benzene rings and aliphatic chains, which enable it to specifically interact with the hydrophobic pockets of these complexes. These pockets are formed by hydrophobic amino acid residues, particularly in complex 7VGH-5JXG, where Trp64 and Leu227 play a key role (Fig. 8).

Chloroquine is known to have a broad spectrum of antiviral activity and is primarily used for the prevention and treatment of malaria and rheumatic diseases [41]. However, it has been found to interact with ACE2 and the coronavirus spike protein by inhibiting ACE2, thereby suppressing the replication of SARS-CoV-2.

We have shown that chloroquine binds to amino acid residues of the receptor-binding domain (RBD) of the spike protein in its "closed" conformation through interactions with Phe515 (via hydrogen bonding); Phe464, Pro426, and Leu518 (via hydrophobic interactions); and Glu516 (via electrostatic π -anion interaction). The binding energy score was -6.3 kcal/mol, which is consistent with the findings reported in Badrauli's work [42].

As noted by Khatabi, chloroquine can also bind to nonstructural proteins. The binding affinity of chloroquine to the SARS-CoV-2 main protease was -3.07 kcal/mol, which is lower than its affinity for ACE2. The stability of the SARS-CoV-2 main protease–chloroquine complex was provided by the same nonpolar hydrophobic amino acid residues as in our study, such as phenylalanine, valine, proline, and leucine [43]. The presence of benzene rings contributes to chloroquine's high lipophilicity ($\log P = 4.6$) and facilitates its hydrophobic interactions with nonpolar amino acid residues in chain C of the S protein, including Val126, Ile119, Phe194, Trp104, and Ile203 (figure not shown).

In the 6VYB-5JXG and 6XXV-5JXG structures, favipiravir demonstrated the lowest binding affinity of -5.9 kcal/mol and -5.8 kcal/mol, respectively, which are consistent with the results of Eweas A.F. et al. [38].

It is known that favipiravir is a target-specific drug that acts as a substrate for the RNA-dependent RNA polymerase, thereby preventing viral transcription and replication [44]. Favipiravir has also been reported as an antiviral option against the main viral protease of SARS-CoV-2, although it was originally developed to treat influenza. Molecular docking results showed a strong binding affinity (-4.4 kcal/mol) and numerous interactions, including both hydrogen bonds and hydrophobic contacts [45].

Our study demonstrated that, unlike other studied ligands, favipiravir forms an energetically favorable complex with the B chain of the S protein in the "open" conformation of 6VYB-5JXG through a hydrogen bond (with Asn354), a hydrophobic interaction (with Ala344), and a halogen bond (with Val341). In the 6XXV-5JXG and 7VHJ-5JXG structures, favipiravir binds only to furin amino acid residues through hydrogen bonds (Glu157, Pro256, Asp306, Ala292), hydrophobic interaction (Tyr186), and halogen bonds (Glu654, Gln183, Asp301, Glu331) (figures not shown). Favipiravir contains polar functional groups that result in low lipophilicity ($\log P = -0.6$), and thus it tends to interact with hydrophilic or polar amino acids such as tyrosine and glutamic acid.

Summarizing the docking results of five ligands investigated as potential inhibitors of the S protein–furin complex, it is notable that PI8 and remdesivir form interactions with all three complexes analyzed. These contacts occur directly within the active site of furin. Nelfinavir and favipiravir also interact with the furin active site, although only in two of the three investigated complexes. In contrast, chloroquine does not interact with the furin active site; instead, it binds solely to the C chain of the S protein, i.e., outside the furin cleavage site. To date, despite numerous studies on the therapeutic potential of chloroquine for the treatment of COVID-19 and its demonstrated antiviral and anti-inflammatory properties, the precise mechanism of its action remains insufficiently understood. In particular, it is still unclear

whether there are specific molecular targets in the SARS-CoV-2 life cycle that can be inhibited by chloroquine [25].

These concluding remarks support the promising antiviral properties of PI8, remdesivir, nelfinavir, and favipiravir against a broad range of RNA viruses [35–38, 45], including their potential as inhibitors of SARS-CoV-2 protein complexes at the molecular level. At the same time, the unexplored potential of chloroquine as a possible inhibitor of certain viral molecular targets warrants further investigation.

CONCLUSIONS

Our results demonstrate that furin can interact with the S protein in both "open" and "closed" conformations, even outside the canonical furin cleavage site. These interactions indicate alternative mechanisms for the S protein–furin binding, potentially compensating for the unmodeled structure of the region containing the furin cleavage site. Moreover, the fully modeled structure of the furin cleavage site in the 7VHJ structure facilitated an energetically favorable, near-canonical interaction involving the fusion peptide and the heptapeptide repeat sequence 1.

This study also showed that, regardless of furin's binding location on the S protein, inhibitors preferentially bind to furin — particularly at its catalytic site — rather than to the S protein within the investigated SARS-CoV-2 S protein–furin complexes, thereby preventing S protein processing. The potential binding sites of several non-specific antiviral drugs, including remdesivir, chloroquine, favipiravir, nelfinavir, and PI8, were evaluated on the 6VYB-5JXG, 6VXX-5JXG, and 7VHJ-5JXG structures.

In silico docking study was performed using the target docking mode of AutoDock Vina. Screening of all ligands revealed that PI8, nelfinavir, and remdesivir exhibited the highest binding affinity for the 7VHJ-5JXG structure, likely due to the fully modeled structure of the furin cleavage site. The binding energy scores were -9.9 kcal/mol for PI8, -9.3 kcal/mol for nelfinavir, and -9.1 kcal/mol for remdesivir.

A detailed atomic-level understanding of S protein–furin interactions with antiviral agents, enabled by molecular docking technologies, could support the development of new therapeutic agents or drug combinations to combat COVID-19. Therefore, this study of inhibitors targeting the SARS-CoV-2 S protein–furin protease complex provides valuable insights for assessing these compounds as potential antiviral drugs against SARS-CoV-2.

CONFLICT OF INTEREST

The authors report that there is no conflict of interest.

Authors' ORCID ID

N. V. Khmil  <https://orcid.org/0000-0001-7916-5921>

A. V. Shestopalova  <https://orcid.org/0000-0001-7613-7212>

REFERENCES

1. WHO. 2020. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) weekly epidemiological updates. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>
2. Sanche S, Lin YT, Xu C, Romero-Severson E, Hengartner N, Ke R. High contagiousness and rapid spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(7):1470–77. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200282>
3. Sanders JM, Monogue ML, Jodlowski TZ, Cutrell JB. Pharmacologic treatments for coronavirus disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA.* 2020;323(18):1824–36. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.6019>
4. Khmil NV, Kolesnikov VG, Boiechko-Nemovcha AO. Binding characteristics of systemic glucocorticoids to the SARS-CoV-2 spike glycoprotein: *in silico* evaluation. *Low Temp Phys.* 2025;51:96–103 <https://doi.org/10.1063/10.0034652>

5. Zhang L, Lin D, Sun X, Curth U, Drosten C, Sauerhering L, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science*. 2020;368(6489):409-12. <https://doi.org/10.1126/science.abb3405>
6. Khmil NV, Shestopalova AV, Kolesnikov VG, Boiechko-Nemovcha AO. Identification of potential corticosteroid binding sites on the SARS CoV-2 main protease Mpro- in silico docking study. *Biophysical Bulletin*. 2024;51:53–63. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2024-51-04>
7. Huang Y, Yang C, Xu XF, Xu W, Liu SW. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin*. 2020;41(9):1141–49. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
8. Zhang J, Xiao T, Cai Y, Chen B. Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Curr Opin Virol*. 2021;50:173–82. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.08.010>
9. Hulswit RJ, de Haan CA, Bosch BJ. Coronavirus spike protein and tropism changes. *Adv Virus Res*. 2016;96:29–57. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.004>
10. Cai Y, Zhang J, Xiao T, Peng H, Sterling SM, Walsh RM, et al. Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science*. 2020;369(6511):1586–92. <https://doi.org/10.1126/science.abd4251>
11. Gur M, Taka E, Yilmaz SZ, Kilinc C, Aktas U, Golcuk M. Conformational transition of SARS-CoV-2 spike glycoprotein between its closed and open states. *J Chem Phys*. 2020;153(7):075101. <https://doi.org/10.1063/5.0011141>
12. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A Multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Mol Cell*. 2020;78(4):779-84.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.022>
13. Strobelt R, Adler J, Shaul Y. The Transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2) non-protease domains regulating severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spike-mediated virus entry. *Viruses*. 2023;15(10):2124. <https://doi.org/10.3390/v15102124>
14. Marcink TC, Kicmal T, Armbruster E, Zhang Z, Zipursky G, Golub KL, et al. Intermediates in SARS-CoV-2 spike-mediated cell entry. *Sci Adv*. 2022;8(33):eabo3153. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abo3153>
15. Peacock TP, Goldhill DH, Zhou J, Baillon L, Frise R, Swann OC, et al. The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission in ferrets. *Nat Microbiol*. 2021;6(7):899–909. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00908-w>
16. Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, Canard B, Seidah NG, Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res*. 2020;176:104742. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104742>
17. Holmes EC, Goldstein SA, Rasmussen AL, Robertson DL, Crits-Christoph A, Wertheim JO, et al. The origins of SARS-CoV-2: A critical review. *Cell*. 2021;184(19):4848–56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.017>
18. Cheng YW, Chao TL, Li CL, Chiu MF, Kao HC, Wang SH, et al. Furin inhibitors block SARS-CoV-2 spike protein cleavage to suppress virus production and cytopathic effects. *Cell Rep*. 2020;33(2):108254. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108254>
19. Brown AJ, Won JJ, Graham RL, Dinnon KH, Sims AC, Feng JY, et al. Broad spectrum antiviral remdesivir inhibits human endemic and zoonotic deltacoronaviruses with a highly divergent RNA dependent RNA polymerase. *Antiviral Res*. 2019;169:104541. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104541>
20. Nguyen TH, Guedj J, Anglaret X, Laouénan C, Madelain V, Taburet AM, et al. Favipiravir pharmacokinetics in Ebola-Infected patients of the JIKI trial reveals concentrations lower than targeted. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(2):e0005389. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005389>
21. Garriga C, Pérez-Elías MJ, Delgado R, Ruiz L, Nájera R, Pumarola T, et al. Mutational patterns and correlated amino acid substitutions in the HIV-1 protease after virological failure to nelfinavir- and lopinavir/ritonavir-based treatments. *J Med Virol*. 2007;79(11):1617–28. <https://doi.org/10.1002/jmv.20986>
22. Agostini ML, Andres EL, Sims AC, Graham RL, Sheahan TP, Lu X, et al. Coronavirus susceptibility to the antiviral remdesivir (GS-5734) is mediated by the viral polymerase and the proofreading exonuclease. *mBio*. 2018;9(2):e00221-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00221-18>
23. Grein J, Ohmagari N, Shin D, Diaz G, Asperges E, Castagna A, et al. Compassionate use of remdesivir for patients with severe Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;382(24):2327–36. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2007016>
24. Driouich JS, Cochin M, Lingas G, Moureau G, Touret F, Petit PR, et al. Favipiravir antiviral efficacy against SARS-CoV-2 in a hamster model. *Nat Commun*. 2021;12(1):1735. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21992-w>

25. Jia Y, Tian W, Li Y, Teng Y, Liu X, Li Z, et al. Chloroquine: Rapidly withdrawing from first-line treatment of COVID-19. *Heliyon*. 2024;10(17):e37098. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37098>
26. Søndergaard CR, Olsson MH, Rostkowski M, Jensen JH. Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of pKa values. *J Chem Theory Comput*. 2011;7(7):2284–95. <https://doi.org/10.1021/ct200133y>
27. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*. 2010;31(2):455–61. <http://doi.org/10.1002/jcc.21334>
28. O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminform*. 2011;3:33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>
29. Dahms SO, Jiao GS, Than ME. Structural studies revealed active site distortions of human furin by a small molecule inhibitor. *ACS Chem Biol*. 2017;12(5):1211–16. <https://doi.org/10.1021/acschembio.6b01110>
30. Kozakov D, Brenke R, Comeau SR, Vajda S. PIPER: an FFT-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins*. 2006;65(2):392–406. <https://doi.org/10.1002/prot.21117>
31. Bashir A, Li S, Ye Y, Zheng Q, Knanghat R, Bashir F, et al. SARS-CoV-2 S protein harbors furin cleavage site located in a short loop between antiparallel β -strand. *Int J Biol Macromol*. 2024;281(Pt 1):136020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136020>
32. Vankadari N. Structure of furin protease binding to SARS-CoV-2 spike glycoprotein and implications for potential targets and virulence. *J Phys Chem Lett*. 2020;11(16):6655–63. <https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.0c01698>
33. Bollavaram K, Leeman TH, Lee MW, Kulkarni A, Upshaw SG, Yang J, et al. Multiple sites on SARS-CoV-2 spike protein are susceptible to proteolysis by cathepsins B, K, L, S, and V. *Protein Sci*. 2021;30(6):1131–43. <https://doi.org/10.1002/pro.4073>
34. Bosch BJ, Bartelink W, Rottier PJ. Cathepsin L functionally cleaves the severe acute respiratory syndrome coronavirus class I fusion protein upstream of rather than adjacent to the fusion peptide. *J Virol*. 2008;82(17):8887–90. <https://doi.org/10.1128/JVI.00415-08>
35. Van Lam van T, Ivanova T, Hardes K, Heindl MR, Morty RE, Böttcher-Friebertshäuser E, et al. Design, synthesis, and characterization of macrocyclic inhibitors of the proprotein convertase furin. *ChemMedChem*. 2019;14(6):673–85. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800807>
36. Gordon CJ, Tchesnokov EP, Woolner E, Perry JK, Feng JY, Porter DP, et al. Remdesivir is a direct-acting antiviral that inhibits RNA-dependent RNA polymerase from severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 with high potency. *J Biol Chem*. 2020;295(20):6785–97. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013679>
37. Nguyen HL, Thai NQ, Truong DT, Li MS. Remdesivir strongly binds to both RNA-dependent RNA polymerase and main protease of SARS-CoV-2: evidence from molecular simulations. *J Phys Chem B*. 2020;124(50):11337–48. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.0c07312>
38. Eweas AF, Alhossary AA, Abdel-Moneim AS. Molecular docking reveals ivermectin and remdesivir as potential repurposed drugs against SARS-CoV-2. *Front Microbiol*. 2021;11:592908. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.592908>
39. Sukeishi A, Itohara K, Yonezawa A, Sato Y, Matsumura K, Katada Y, et al. Population pharmacokinetic modeling of GS-441524, the active metabolite of remdesivir, in Japanese COVID-19 patients with renal dysfunction. *CPT: Pharmacomet Syst Pharmacol*. 2022;11(1):94–103. <https://doi.org/10.1002/psp4.12736>
40. Thomas G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Mol Cell Biol*. 2002;22(3):753–66. <https://doi.org/10.1038/nrm934>
41. Jorge A, Ung C, Young LH, Melles RB, Choi HK. Hydroxychloroquine retinopathy - implications of research advances for rheumatology care. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14(12):693–703. <https://doi.org/10.1038/s41584-018-0111-8>
42. Badraoui R, Adnan M, Bardakci F, Alreshidi MM. Chloroquine and hydroxychloroquine interact differently with ACE2 domains reported to bind with the coronavirus spike protein: mediation by ACE2 polymorphism. *Molecules*. 2021;26(3):673. <https://doi.org/10.3390/molecules26030673>
43. El Khatabi K, Aanouz I, Alaqarbeh M, Ajana MA, Lakhlifi T, Bouachrine M. Molecular docking, molecular dynamics simulation, and ADMET analysis of levamisole derivatives against the SARS-CoV-2 main protease (M^{Pro}). *Bioimpacts*. 2022;12(2):107–13. <https://doi.org/10.34172/bi.2021.22143>
44. Shannon A, Selisko B, Le NT, Huchting J, Touret F, Piorkowski G, et al. Rapid incorporation of favipiravir by the fast and permissive viral RNA polymerase complex results in SARS-CoV-2 lethal mutagenesis. *Nat Commun*. 2020;11(1):4682. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18463-z>

45. Yadav P, Rana M, Chowdhury P. DFT and MD simulation investigation of favipiravir as an emerging antiviral option against viral protease (3CL^{pro}) of SARS-CoV-2. J Mol Struct. 2021;1246:131253. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131253>

АНАЛІЗ IN SILICO САЙТІВ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ПОТЕНЦІЙНИХ ІНГІБІТОРІВ КОМПЛЕКСУ ФУРИНОВОЇ ПРОТЕАЗИ ТА СПАЙК БІЛКА SARS-COV-2

Н. В. Хміль^{1,2}, А. В. Шестопалова², В. Г. Колесніков²

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

²Інститут радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України, вул. Ак. Проскури, 12, Харків, 61085, Україна
e-mail: khmilnatali@gmail.com

Надійшла до редакції 28 квітня 2025 р. Переглянута 7 липня 2025 р.

Прийнята до друку 29 серпня 2025 р.

Актуальність. COVID-19 — це інфекційне захворювання, спричинене коронавірусом важкого гострого респіраторного синдрому (SARS-CoV-2). Зусилля у боротьбі з вірусом включають розробку та дослідження вакцин, моноклональних антитіл і специфічних противірусних препаратів, спрямованих на важливі мішені у життєвому циклі вірусу.

Мета роботи. Метою цього дослідження є вивчення потенційних сайтів зв'язування фуринової протеази з S-білком у різних конформаціях та оцінка спорідненості зв'язування неспецифічних противірусних препаратів та макроциклічного пептидоміметичного інгібітора 8 (PI8) з комплексом S-білок-фуринова протеаза методом молекулярного докінгу.

Матеріали та методи. Тривимірні структури S білка (PDB IDs: 6VYB, 6VXX, 7VHJ) з бази даних PDB (www.rcsb.org) були стиковані до фуринової протеази (PDB ID: 5JXG) за допомогою сервера ClusPro 2.0. Неспецифічні противірусні препарати, такі як ремдесивір, хлорохін, фавіпіравір, нелфінавір, а також PI8, були стиковані до комплексів 6VYB-5JXG, 6VXX-5JXG і 7VHJ-5JXG за допомогою AutoDock Vina. Ліганди були енергетично мінімізовані за допомогою універсального силового поля (UFF) і конвертовані у формат PDBQT за допомогою OpenBabel. Оптимізація білків здійснювалася з використанням інструментів AutoDock. Результати докінгу були візуалізовані у програмі Discovery Studio 2024.

Результати. Спорідненість зв'язування досліджених лігандів із комплексами S-білок–фуринова протеаза підтверджена результатами молекулярного докінгу. PI8, нелфінавір і ремдесивір показали високу спорідненість зв'язування зі структурою 7VHJ-5JXG через визначеність структури у сайті розщеплення фурином. Найкращі результати молекулярного докінгу для PI8 з комплексами 6VYB-5JXG, 6VXX-5JXG і 7VHJ-5JXG становлять -9.7 ккал/моль, -9.5 ккал/моль і -9.9 ккал/моль відповідно. Взаємодія між комплексами S-білок–фуринова протеаза і PI8 відбувається через специфічні амінокислотні залишки, розташовані головним чином у каталітичному центрі фурину та петлі реактивного сайту PI8. Дослідження показали, що ремдесивір безпосередньо впливає на сайт розщеплення фурином S білка (у комплексі 7VHJ-5JXG), утворюючи енергетично сприятливі взаємодії завдяки водневим зв'язкам і гідрофобним контактам із високою спорідненістю зв'язування (енергетичний показник зв'язування становив -9.1 ккал/моль). Енергетично сприятливі взаємодії комплексів 6VYB-5JXG, 6VXX-5JXG і 7VHJ-5JXG з нелфінавіром також підтверджуються низькими енергетичними показниками, які становлять -8.2 ккал/моль, -8.9 ккал/моль і -9.3 ккал/моль відповідно.

Висновки. Згідно з результатами молекулярного докінгу, PI8, нелфінавір і ремдесивір демонструють енергетично сприятливі взаємодії з досліджуваними комплексами та мають потенціал для використання як перспективні інгібітори, спрямовані на комплекси SARS-CoV-2 S-білка з фуриною протеазою.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: спайк білок SARS-CoV-2; фуринова протеаза; противірусні препарати; молекулярний докінг; здоров'я людини.

Original article<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-54-02>

UDC 620.3:577.343

AgNPs INCORPORATED IN PMMA-PVP BLENDED NANOFIBERS: SPECTROSCOPY MONITORING OF AgNP DISSOLUTION IN PMMA NANOPORES

Alexander Plokhotnichenko, Victor Karachevtsev *

B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, 47 Nauky Ave., Kharkiv, 61103, Ukraine

**Corresponding author: karachevtsev@ilt.kharkov.ua*

Submitted May 16, 2025; Revised September 11, 2025;

Accepted September 29, 2025

Background: Electrospun polymeric nanofibers incorporated with some biologically active nanoparticles have a huge range of various applications in biomedical fields. Blending several polymers with different properties allows one to obtain a new material with improved characteristics, as well as to control the incorporation and release of medical agents.

Objectives: To elaborate an approach for the preparation of biocompatible nanofibers using a blend of two polymers (polyvinylpyrrolidone (PVP) and polymethyl methacrylate (PMMA)) with incorporated silver nanoparticles (AgNPs) and to apply the absorption spectroscopy for determining of the average nanoparticle diameter and monitoring of AgNP dissolution from PMMA nanopores.

Materials and methods: A blend of hydrophilic (PVP) and water-insoluble (PMMA) polymers is proposed for nanofiber preparation with incorporated AgNPs. The absorption peak position of the band due to localized surface plasmon resonance (LSPR) and its intensity in the UV-vis spectrum were used to characterize AgNPs and to estimate the influence of the environment.

Results: A new method for fabricating nanofibers from a mixture of two polymers, one water-soluble (PVP) and the other soluble only in organic solvents (PMMA), with AgNPs, has been developed. The diameter of the nanofibers is determined to be in the range of 2-4 μm . The average nanoparticle diameter determined by the position of the absorption peak due to LSPR in the UV-vis spectrum is 35-40 nm. The peak shift of this band in different environments was determined in comparison with the spectrum obtained in an aqueous solution. A decrease in the intensity of the band was observed with an increase in the mat incubation time in the oxidizing solution, and a blue shift of the band maximum was detected, which indicates a decrease in the average size of AgNPs during their dissolution.

Conclusions: In the blended nanofibers, PVP environment of AgNPs facilitates their incorporation into PMMA and provides access of water molecules to nanoparticles, while PMMA provides the mechanical strength of the nanofibers. The appearance of AgNPs from the polymeric nanofibers soaked in water was not detected, since they are fixed in the structure of the water-insoluble polymer. Nevertheless, the experiments with the mat soaking in the oxidative solution showed that the nanopores in PMMA incorporated with AgNPs are open. This observation indicates the possibility of a gradual release of Ag^+ ions from such nanofibers.

KEYWORDS: electrospinning; nanofibers; polyvinylpyrrolidone; polymethyl methacrylate; silver nanoparticles; antibacterial agent.

Citation: Plokhotnichenko A, Karachevtsev V. AgNPs Incorporated in PMMA-PVP blended nanofibers: spectroscopy monitoring of AgNP dissolution in PMMA nanopores. *Biophysical Bulletin*. 2025;54:27–35. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-54-02>

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

Recently, the electrospinning technique for nanofiber production has drawn a lot of attention due to different applications, including biomedical fields such as wound dressing, drug delivery, tissue engineering, and regenerative medicine. In addition, they also demonstrate high antibacterial and antimicrobial efficacy [1–6]. The nanofibers possess unique properties such as high surface area-to-volume ratio, tunable porosity, flexibility, and superior mechanical and physicochemical properties.

A wide spectrum of natural and synthetic polymers is exploited for the electrospinning technique individually or in different combinations to fabricate nanofiber mats. Hydrophilic polymers (e.g. polyvinylpyrrolidone, PVP), polyvinyl alcohol (PVA), chitosan, sodium alginate, and others) are very often employed in electrospinning as they are suitable for the incorporation of hydrophilic compounds [6, 7]. Other polymers such as poly- ϵ -caprolactone (PCL), polylactic acid, and others are also exploited to produce nanofibers, although they are hydrophobic [8]. Nevertheless, they are biocompatible and allow improvement in nanofibers' mechanical performance and hydrolysis resistance [6].

Blending polymers formed by biopolymers, natural polymers, and synthetic polymers have improved characteristics of nanofibers such as mechanical properties and biocompatibility [9–11]. A variety of functional agents, such as various drugs, antimicrobial compounds, or nanoparticles, can be incorporated into nanofibers, producing multifunctional nanofibers that have been applied for many medical treatments and antimicrobial purposes. In the conventional blending electrospinning method, different polymers are mixed and dissolved in a solvent in which the two polymers are soluble for subsequent electrospinning. Functional agents can be incorporated by dissolving or dispersing in the polymeric mixture before electrospinning. The agent release from nanofibers can be prolonged depending on the interaction between the polymers and the agent. The agent speed release can be controlled by balancing the hydrophilicity–hydrophobicity of the nanofiber medium.

Water-soluble PVP is one of the most commonly used polymers for the nanofiber preparation [12]. This polymer is non-toxic, biocompatible, and biodegradable. PVP is often used for the incorporation of different drugs or antimicrobial agents or as a stabilizer and capping agent in the synthesis of metallic nanoparticles, avoiding agglomeration of the colloidal particles (e.g. AgNPs [13]). Recently, AgNPs, due to attractive properties, including excellent electrical conductivity, chemical stability, antifungal, and bactericidal properties has been widely used in various fields of nanomedicine such as diagnostics, cancer therapy, pharmaceutical applications, antibacterial area, wound dressings etc. [see review [14] and references therein]. The interaction between PVP and silver atoms of nanoparticles less than 50 nm in diameter occurs via an amide group, while for larger nanoparticles, the carbonyl groups of PVP are also included in the interaction [15].

Polymethyl methacrylate (PMMA) is not often applied to electrospinning, there are a few works about the production of PMMA nanofibers by electrospinning, which mainly focus on optimizing the electrospinning parameters [16–19]. Blend PMMA and hydrophilic polymers (PVA, PEO, and chitosan) were applied to nanofibers formed by electrospinning [7, 10, 11].

In the present study, we propose a new approach to prepare nanofibers incorporated with antibacterial nanoparticles (AgNPs) using a blend of two polymers: hydrophilic PVP and water-insoluble PMMA. This approach is based on using a PVP as a capping and stabilizing agent for AgNP formation, drying, and then mixing with PMMA in organic solvents. In the proposed preparation scheme, AgNPs prepared in an aqueous medium with a water-soluble polymer are surrounded by this polymer after mixing with PMMA, and this environment is retained in the nanofibers. The PVP surrounding the AgNPs facilitates their incorporation into PMMA and provides access for water molecules to the nanoparticles when the nanofiber mat is soaked in

water. The release of AgNPs from the nanofiber mat by soaking in water is studied by absorption spectroscopy.

MATERIALS AND METHODS

PVP ($M_w=40\,000$ Da), AgNO_3 , AgCl , and glucose were purchased from Sigma-Aldrich (Europe). PMMA ($M_w=996$ kDa) was kindly provided by researchers from the Institute for Single Crystals of the NAS of Ukraine. Organic solvents: chloroform was purchased from BioMax (Ukraine), and acetone was purchased from Anri-Pharm Group (Ukraine). The molecular structures of PVP and PMMA are presented in Fig. 1.

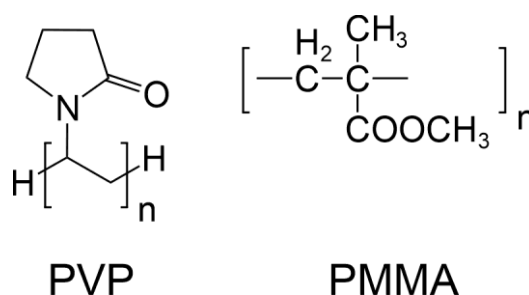


Fig. 1. The molecular structures of PVP and PMMA.

PVP:AgNPs preparation

AgNPs were synthesized in an aqueous PVP solution with AgCl as precursor material, with glucose reduction at a concentration of 8 mg/ml. AgNPs were grown at $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30–90 min. Absorption spectra in the UV-visible spectral range were used to control the appearance of AgNPs in the suspension and to estimate the size of the nanoparticles. The PVP: AgCl concentration ratio of 240:1.6 mg/ml was determined to be optimal for the growth of AgNPs.

PMMA:PVP:AgNPs preparation

To prepare the polymer blend, in the first step, an aqueous solution of PVP:AgNPs was dried with warm air. In the next step PVP:AgNPs powder was dissolved in chloroform at a concentration of 160 mg/ml and mixed with PMMA solution in chloroform at the same concentration in a volume ratio of 1:2. Then, an equal volume of acetone was added to the mixture. After stirring, the solution became stable and was used for electrospinning. According to our calculations, the w/w ratio AgNPs:polymer (PMMA:PVP) for the nanofibers and films is 1:500.

UV-visible absorption spectroscopy

UV-visible absorption spectra observed in the range of 200–800 nm were recorded using a double-channel spectrophotometer (Hitachi M 356, Japan). The diameter of the nanofibers in the mats obtained by electrospinning was estimated from high-resolution microphotographs.

Fabrication of nanofibers using electrospinning

Setup for fabrication of nanofibers basically consists of a syringe with a metal needle used as a tip, a counter electrode as a ground collector at some distance from the tip, a high voltage power supply providing a positive potential applied to the tip (10–30 kV) and mechanical device that ensures uniform movement of the syringe piston. A syringe pump carries the polymer solution from the syringe to the needle. In our experiments, nanofibers were drawn at 15–20 kV, the distance to the collector was about 8 cm, solution feed rate was about 0.7 ml/hour. The

collector was metal for producing thick mats and glass (on a metal base) for thin samples prepared for microphotography.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of PMMA:PVP:AgNPs nanofibers

A thin disk of nanofiber mat was produced by depositing nanofibers from PMMA:PVP:AgNPs solution in chloroform/acetone onto a metallic collector. A photo of this sample is shown in Fig. 2. The diameter of the prepared ring is about 35 mm.



Fig. 2. Photo of samples of polymer nanofiber mat with incorporated AgNPs.

Microphotographs of two different sections of a sample of thin mat formed by PMMA:PVP:AgNPs nanofibers obtained in transmitted light are shown in Fig. 3. The diameter of the nanofibers estimated from the right part of the Figure is in the range from 2 to 4 μm .

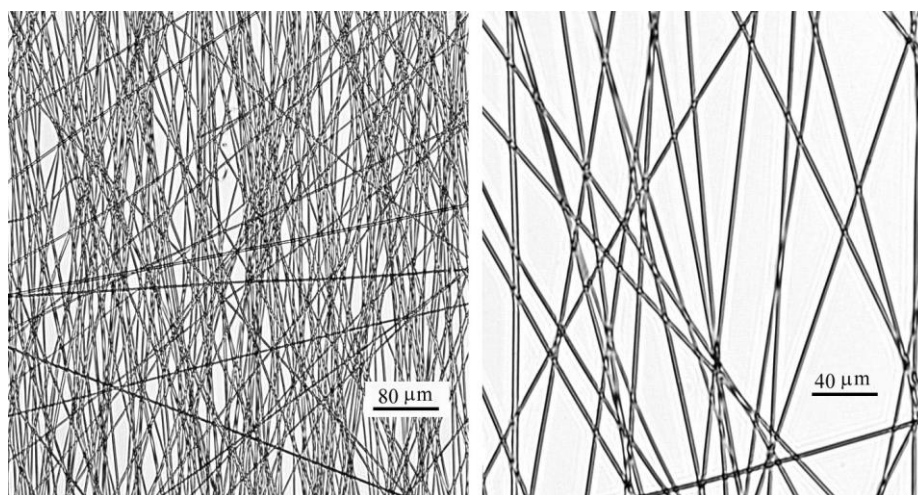


Fig. 3. Microphotographs of two different sections (middle and edge) of a thin mat formed from PMMA:PVP:AgNPs nanofibers.

Characterization of AgNPs in different environments

The appearance of AgNPs in the suspension and the estimation of the nanoparticle diameter were monitored by UV-visible absorption spectroscopy. Fig. 3a shows the absorption spectra of AgNPs during nanoparticle synthesis: 30, 60, 90, and 120 minutes. These spectra are characterized by the appearance of a band in the violet region, which is due to the phenomenon of localized surface plasmon resonance (LSPR). The increase in the absorption intensity with time shows the nanoparticle fabrication process, which slows down after 90 min. Fig. 3a shows

that the band due to LSPR has a maximum at about 416 nm. Based on the position of the peak, the average diameter of the nanoparticles was determined to be 35–40 nm [20].

As can be seen from Fig. 3a, AgNPs absorption spectra after 90 and 120 minutes of growth almost coincide, indicating that the silver reduction reaction has been over. This observation makes it possible to estimate the concentration of AgNPs in the solution and polymer nanofibers.

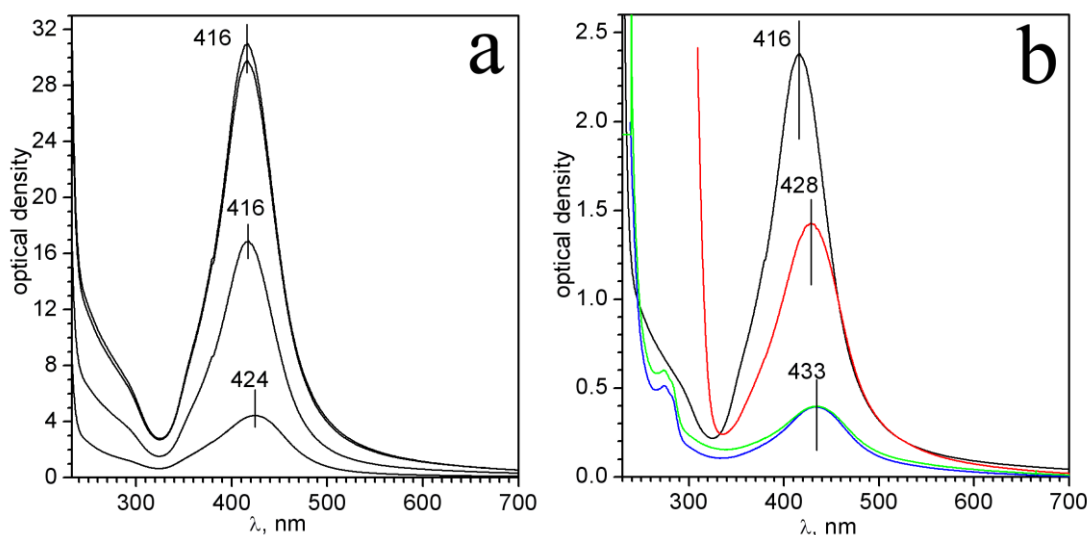


Fig. 3. Absorption spectra of AgNPs: a – enhancement of the intensity of the band due to LSPR obtained by increasing the silver reduction time: 30, 60, 90 and 120 minutes; b – change of AgNP spectrum in different conditions: in aqueous solution (black), in the solution of PMMA:PVP in chloroform-acetone mixture (red); in dry polymer film prepared from fresh solution (blue) and after one week (green). The numbers shown in the figure indicate the peak position in nm.

Nanofibers obtained from PMMA:PVP:AgNPs had a diameter of about 2–4 μm estimated from high-resolution photos by visual analysis. Fig. 3a shows the absorption spectra of AgNPs during the synthesis of nanoparticles and their change after the incorporation into PMMA:PVP mixture (Fig. 3b).

Fig. 3b shows that the peak of the band due to LSPR of AgNPs in a chloroform-acetone mixture of PMMA:PVP is red-shifted by about 12 nm compared to the spectrum obtained in aqueous solution. It could be explained by a change in the nanoparticle environment. The small red shift of the band peak in the PMMA:PVP:AgNPs film (about 5 nm) compared to the spectrum of this mixture in chloroform-acetone may also be due to a change in the interaction of the nanoparticles with the polymer in the solid state. It can be assumed that, in this case, the main factor influencing the band position is the change in the dielectric constant of the nearest environment of AgNPs [21]. For this frequency range, the value of the dielectric coefficient can be assumed to be equal to the square of the refractive index, which increases with the transition from the PVP aqueous solution to the PMMA:PVP chloroform-acetone solution and then to the solid phase of the polymer blend. This assumption is confirmed experimentally when spectra obtained by soaking a nanofiber mat containing AgNPs in various immersion liquids are compared (Fig. 4a). When soaking the mat in vaseline oil, the absorption spectrum of AgNPs has the same characteristics as in the polymer mixture film (Fig. 3b). When the mat is wetted with water in an amount minimally necessary to fill the space between the nanofibers, the maximum of the AgNPs absorption band is blue-shifted by 15 nm compared to the film or the mat in vaseline oil. It means that in the surroundings of AgNPs, molecules of water appear. Note that the spectral analysis of the water solution after the mat wetting showed the availability

of PVP that demonstrates water-soluble polymer release from nanofibers. Finally, when the sample is washed with a large amount of water and the PVP is almost completely removed from the fiber material, the absorption band (Fig. 4a) is positioned in a spectrum (at 417 nm) similar to the spectrum of AgNPs in the aqueous PVP solution (Fig. 3b).

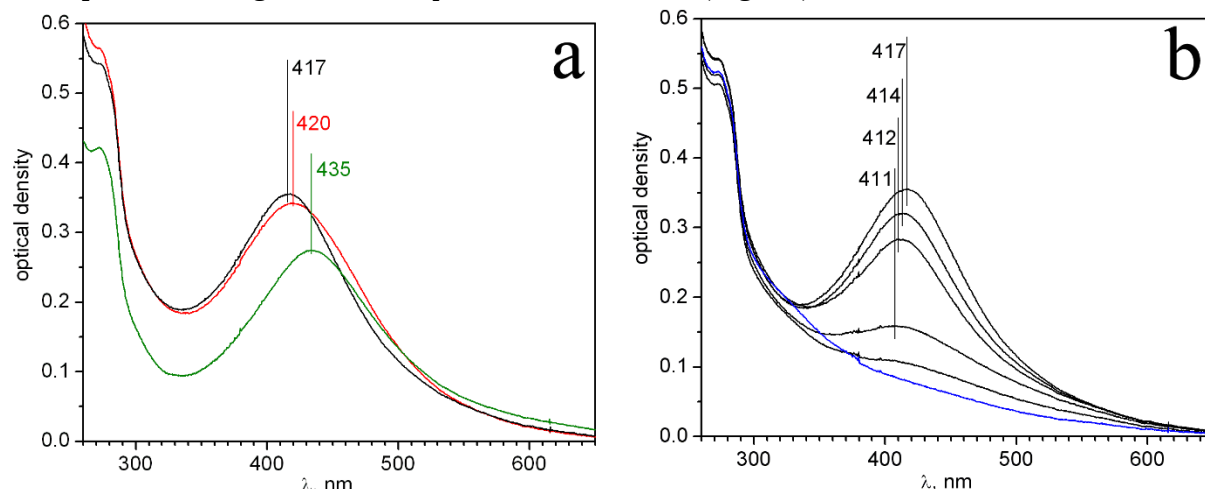


Fig. 4. Absorption spectra of AgNPs in different environments (a): in solid polymer mixture when the mat is immersed in Vaseline oil (green), in PMMA fibers surrounded by an aqueous solution of PVP (red), in PMMA fibers surrounded by water (black); or (b) at treating of the mat by the oxidative solution during different time intervals: 0, 0.5, 1.5, 4.5, and 7.5 min (black spectra, the intensity of the band decreases with increasing time), the blue line is corresponding to the spectrum after the AgNP treatment for 18 min (when AgNPs are completely dissolved).

We attempted to detect the release of AgNPs after an incubation of the PMMA:PVP:AgNPs mat in water. The rinse water spectrum shows the presence of PVP, no band characteristic of AgNPs was detected. It is assumed that AgNPs are retained in the nanopores of PMMA in nanofibers. Thus, a relatively slow release of silver ions in an aqueous medium from such nanofibers with the incorporation of AgNPs is expected. A prerequisite for this is the availability of the surrounding aqueous medium to the AgNPs fixed in the PMMA fibers after the PVP dissolution.

To check whether the nanopores in PMMA containing AgNPs are open, we placed the nanofiber mat in a weak oxidative solution prepared by adding H_2SO_4 (25 μL , density 1.8 g/ml) and $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (25 mg) in 1 L of water. In such a solution, metallic silver is converted to a soluble salt according to the following reaction:



It is assumed that AgNPs located in open pores should dissolve in this oxidative solution. We washed the mats in this solution for different time intervals and monitored the dissolution of AgNPs by the intensity of the band due to LSPR after each time interval. For spectroscopy measurement, each washed mat was fixed between two quartz plates. To reduce the effect of light scattering, the samples were mounted near the detector (photomultiplier) as soon as possible.

A decrease in the intensity of the band due to LSPR was observed with an increase in the mat incubation time in the oxidizing solution. In addition, a slight blue shift of the band maximum is observed, which indicates a decrease in the average size of AgNPs during their dissolution (Fig. 4b). The spectra were recorded after the following time intervals: 0.5, 1.5, 4.5, 7.5, and 18 minutes. After 18 min, the band due to LSPR disappeared in the spectrum almost completely, indicating the dissolution of AgNPs. The gradual decrease in the band intensity

with increasing time of mat soaking in the oxidative solution indicates that the nanopores with AgNPs are open and can be successfully used for the release of Ag⁺ ions. Thus, a relatively slow release of Ag⁺ ions in an aqueous medium from such nanofibers with the incorporation of AgNPs can be obtained.

CONCLUSIONS

A new approach to preparing a blend of two polymers incorporated with antimicrobial agents for electrospinning: water-soluble PVP and soluble only in organic solvents PMMA is developed. In the obtained nanofibers, PMMA provides the mechanical strength of the nanofibers and can facilitate the gradual release of antimicrobial agents. This approach is based on using a water-soluble PVP as a capping and stabilizing agent for the growth of AgNPs in an aqueous medium, preventing their aggregation, drying, and then mixing with PMMA in an organic solvent. The PVP surrounding the AgNPs facilitates their incorporation into PMMA and provides access for water molecules to the nanoparticles when the nanofiber mat is soaked in water. This approach allows the preparation of nanofibers with the gradual release of silver ions from the robust PMMA environment. The average nanoparticle diameter determined by the position of the absorption peak of the band due to LSPR in the UV-vis spectrum is 35-40 nm. The diameter of the nanofibers is determined to be in the range of 2-4 μm. Although the appearance of AgNPs in water from the obtained polymeric nanofibers was not detected, nevertheless, the experiments with the mat soaking in the oxidative solution showed that the nanopores in PMMA incorporated with AgNPs are open. This observation indicates the possibility of a gradual release of silver ions from such nanofibers. Thus, the membrane prepared from these nanofibers can provide a gradual release of the antimicrobial agent. Nanofibers loaded with antimicrobial nanoparticle AgNPs can be used in various biomedical fields, including the fabrication of effective wound dressing materials due to their similarity to the extracellular matrix and excellent protection from microorganisms, and can be used for drug delivery.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by funding from the National Academy of Sciences of Ukraine (Grant 0123U100628).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Authors' ORCID ID

Karachevtsev Victor  <https://orcid.org/0000-0003-4580-6465>

REFERENCES

1. Abadi B, Goshtasbi N, Bolourian S, Tahsili J, Adeli-Sardou M, Forootanfar H. Electrospun hybrid nanofibers: Fabrication, characterization, and biomedical applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:986975. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.986975>
2. Fromager B, Marhuenda E, Louis B, Bakalara N, Cambedouzou J, Cornu D. Recent advances in electrospun fibers for biological applications. *Macromol.* 2023;3:569–613. <https://doi.org/10.3390/macromol3030033>
3. Liu H, Gough CR, Deng Q, Gu Z, Wang F, Hu X. Recent advances in electrospun sustainable composites for biomedical, environmental, energy, and packaging applications. *Int J Mol Sci.* 2020;21:4019. <https://doi.org/10.3390/ijms21114019>
4. Dong Y, Zheng Y, Zhang K, Yao Y, Wang L, Li X, Yu J, Ding B. Electrospun nanofibrous materials for wound healing. *Adv Fiber Mater.* 2020;2:212–27. <https://doi.org/10.1007/s42765-020-00034-y>
5. Cleeton C, Keirouz A, Chen X, Radacsi N. Electrospun nanofibers for drug delivery and biosensing. *ACS Biomater Sci Eng.* 2019;5:4183–205. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00853>

6. Keirouz A, Chung M, Kwon J, Fortunato G, Radacsi N. 2D and 3D electrospinning technologies for the fabrication of nanofibrous scaffolds for skin tissue engineering: A review. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.* 2020;12:e1626. <https://doi.org/10.1002/wnan.1626>
7. Plokhhotnichenko AM, Karachevtsev VA. Electrospinning production of polymer nanofibers containing Ag nanoparticles or carbon nanotubes. *Low Temp Phys.* 2022;48:339–43. <https://doi.org/10.1063/10.0009740>
8. Huo P, Han X, Zhang W, Zhang J, Kumar P, Liu B. Electrospun Nanofibers of Polycaprolactone/Collagen as a Sustained-Release Drug Delivery System for Artemisinin. *Pharmaceutics.* 2021;13:1228. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081228>
9. Maliszewska I, Czapka T. Electrospun polymer nanofibers with antimicrobial activity. *Polymers.* 2022;14:1661. <https://doi.org/10.3390/polym14091661>
10. Zupančič S, Sinha-Ray Sumit, Sinha-Ray Suman, Kristl J, Yarin AL. Controlled release of ciprofloxacin from core-shell nanofibers with monolithic or blended core. *Mol Pharm.* 2016;13:1393–404. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00039>
11. Zupančič S, Sinha-Ray Sumit, Sinha-Ray Suman, Kristl J, Yarin AL. Long-term sustained ciprofloxacin release from pmma and hydrophilic polymer blended nanofibers. *Mol Pharm.* 2016;13:295–305. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00804>
12. Virginia C, Khasanah A, Jauhari J, Sriyanti I. Electrospinning and characterization nanofibers and nanoparticle of Polyvinylpyrrolidone. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering.* 2020;50:012039. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/850/1/012039>
13. Restrepo CV, Villa CC. Synthesis of silver nanoparticles, influence of capping agents, and dependence on size and shape: A review. *Environ Nanotechnol Monit Manag.* 2021;15:100428. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100428>
14. Liao C, Li Y, Tjong SC. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2019;20:449. <https://doi.org/10.3390/ijms20020449>
15. Wang H, Qiao X, Chen J, Wang X, Ding S. Mechanisms of PVP in the preparation of silver nanoparticles. *Mat Chem Phys.* 2005;94:449–53. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2005.05.005>
16. Khanlou HM, Ang BC, Talebian S, Afifi AM, Andriyana A. Electrospinning of polymethyl methacrylate nanofibers: optimization of processing parameters using the Taguchi design of experiments. *Text Res J.* 2015;85:356–68. <https://doi.org/10.1177/0040517514547208>
17. Piperno S, Lozzi L, Rastelli R, Passacantando M, Santucci S. PMMA nanofibers production by electrospinning. *Appl Surf Sci.* 2006;252:5583–6. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2005.12.142>
18. Wang H, Liu Q, Yang Q, Li Y, Wang W, Sun L, Zhang C, Li Y. Electrospun poly(methyl methacrylate) nanofibers and microparticles. *J Mater Sci.* 2010;45:1032–8. <https://doi.org/10.1007/s10853-009-4035-1>
19. Macossay J, Marruffo A, Rincon R, Eubanks T, Kuang A. Effect of needle diameter on nanofiber diameter and thermal properties of electrospun poly(methyl methacrylate). *Polym Adv Technol.* 2007;18:180–3. <https://doi.org/10.1002/pat.844>
20. Paramelle D, Sadovoy A, Gorelik S, Free P, Hobleya J, Fernig DG. A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst.* 2014;139:4855–61. <https://doi.org/10.1039/C4AN00978A>
21. Willets KA, Van Duyne RP. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annu Rev Phys Chem.* 2007;58:267–97. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607>

AgNPs ІНКОРПОРОВАНІ ДО НАНОВОЛОКОН З СУМІШІ ПММА-ПВП: СПЕКТРОСКОПІЧНИЙ МОНІТОРИНГ РОЗЧИНЕННЯ AgNPs В НАНОПОРАХ ПММА

Олександр Плохотніченко, Віктор Карачевцев 

*Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б. І. Веркіна Національної академії наук України,
просп. Науки, 47, Харків, 61103, Україна*

*e-mail: karachevtsev@ilt.kharkov.ua

Надійшла до редакції 16 травня 2025 р. Переглянута 11 вересня 2025 р.

Прийнята до друку 29 вересня 2025 р.

Актуальність. Електропрядене полімерне нановолокно, об'єднане з деякими біологічно активними наночастинками, має величезний спектр різноманітних застосувань у біомедичних галузях. Змішування декількох полімерів з різними властивостями дозволяє отримати новий матеріал з поліпшеними характеристиками, а також контролювати введення і вивільнення лікарських речовин.

Мета роботи. Розробити методику отримання біосумісних нановолокон з використанням суміші двох полімерів (полівінілпіролідону (ПВП) і поліметилметакрилату (ПММА)) з вбудованими наночастинками срібла (AgNPs) і застосувати спектроскопію поглинання для визначення середнього діаметра наночастинок і моніторингу розчинення AgNPs з нанопор ПММА.

Матеріали та методи. Запропоновано суміш гідрофільних (ПВП) та водонерозчинних (ПММА) полімерів для отримання нановолокна з включеними AgNPs. Положення піку поглинання смуги, яка викликана локалізованим поверхневим плазмонним резонансом (LSPR)) та її інтенсивність в УФ-спектрі були використані для характеристики AgNPs та оцінки впливу навколишнього середовища.

Результати. Розроблено новий метод виготовлення нановолокон, утворених сумішшю двох полімерів: водорозчинного (ПВП) і розчинного лише в органічних розчинниках (ПММА) з AgNPs. Діаметр нановолокон розташований в діапазоні 2–4 мкм. Середній діаметр наночастинок, визначений з положення піку поглинання смуги, яка обумовлена LSPR в УФ-спектрі, становить 35–40 нм. Визначено зсув піку смуги у різних середовищах порівняно зі спектром, отриманим у водному розчині. Спостерігалось зменшення інтенсивності смуги зі збільшенням часу інкубації мату в окислювальному розчині, а також виявлено зміщення максимуму смуги в синю область, що свідчить про зменшення середнього розміру AgNPs під час їх розчинення.

Висновки. У нановолокнах ПВП середовище AgNPs полегшує їхнє включення в ПММА та забезпечує доступ молекул води до наночастинок, тоді як ПММА забезпечує механічну міцність нановолокон. Поява AgNPs із полімерних нановолокон, змочених водою, не виявлена, оскільки вони закріплені в структурі водонерозчинного полімеру. Тим не менш, експерименти із замочуванням мату в окислювальному розчині показали, що нанопори в ПММА зі включенням AgNPs відкриті. Це спостереження вказує на можливість поступового вивільнення іонів Ag^+ з таких нановолокон.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: електропрядіння; полімерні нановолокна; полівінілпіролідон; поліметилметакрилат; наночастинки срібла; антибактеріальний засіб.

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-54-03>

UDC 535.394:537.874.35:543.555:543.311

EXPRESS METHOD FOR INVESTIGATING NATURAL WATER QUALITY USING A SENSOR DEVICE BASED ON SURFACE PLASMON RESONANCE AND A CONDUCTOMETER

N. V. Kachur¹, A. V. Fedorenko¹, H. V. Dorozinska², V. M. Ryzhykh³,
V. P. Maslov^{1*}

¹Department of sensory systems, Institute of Semiconductor Physics of National Academy of Sciences of Ukraine, 41, Nauki ave., Kyiv, 03028, Ukraine;

²Department of Information and Measurement Technologies, National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute", 37, Beresteyskyi ave., Kyiv, 03056, Ukraine;

³Institute of Armament and Military Equipment of the Armed Forces of Ukraine, 28 B, prosp. Povitroflotskyi, Kyiv, 03049, Ukraine

*Corresponding author: vpmaslov@ukr.net

Submitted January 14, 2025; Revised July 30, 2025;

Accepted August 12, 2025

Background: One of the urgent contemporary issues is natural water pollution, which directly affects humanity's life support. This problem is associated with industrial and agricultural intensification and climate change. Water quality standards in Ukraine are defined by state standards, which regulate both organoleptic properties, such as turbidity and odor, and permissible concentrations of harmful substances.

Objective: The objective of this study was to develop a methodology for rapid natural water quality assessment using the SPR method and a conductometer and to simultaneously determine the durability of sensors with protective coatings.

Materials and methods: This study explores the feasibility of combining surface plasmon resonance (SPR) and conductometric methods to monitor the quality of natural water. The first stage involved modeling the concentration dependencies of SPR parameters and conductivity when adding controlled amounts of organic (sugar) and inorganic (table salt and soda) impurities to distilled water. Biological contamination was simulated using live yeast suspensions. Subsequently, samples of coastal water from the Dnipro River in Kyiv, the Stugna River near Vasylkiv, and a pond connected to the Stugna River near Borova village in Fastiv district were analyzed. All SPR studies were conducted using an improved sensor element with an additional protective zinc oxide layer, which reduced measurement errors typically associated with sensor replacement. To validate the reliability of the rapid assessment methods, water samples were additionally analyzed using standard laboratory methods at "Ukrkhimanaliz".

Results: The SPR results indicated that the Stugna River was the most polluted, followed by the pond, with the Dnipro River exhibiting the least pollution.

Conclusions: Summarizing the measurement results, it can be concluded that combining SPR and conductivity measurements enables rapid and objective assessment of natural water pollution levels. This corresponds to the total harmful impurities. Given the small dimensions and autonomy of the devices used in the developed methodology, river water monitoring can be carried out in field conditions by one person.

KEY WORDS: surface plasmon resonance; electrical conductivity; natural water control; natural water pollution; chemical analysis; optical properties.

Citation: Kachur NV, Fedorenko AV, Dorozinska HV, Ryzhykh VM, Maslov VP. Express method for investigating natural water quality using a sensor device based on surface plasmon resonance and a conductometer. Biophysical Bulletin. 2025;54:36–48. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-54-03>

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

One of the urgent contemporary issues is natural water pollution, which directly affects humanity's life support. This problem is associated with industrial and agricultural intensification and climate change.

Water quality standards in Ukraine are defined by state standards [1–3], which regulate both organoleptic properties, such as turbidity and odor, and permissible concentrations of harmful substances.

Currently, many methods have been developed for monitoring, identifying impurities, and disinfecting water. Natural water contains a large number of insoluble substances, including sand particles, clay, silt, phytoplankton, and oxides of aluminum, iron, and manganese [4]. These particles affect water transparency. The first method for monitoring water turbidity was Jackson's candle turbidimeter [4], consisting of a candle and a cylinder. To measure turbidity, water was poured into the cylinder until the candlelight transformed into a shapeless spot. Turbidity in Jackson Turbidity Units was determined by the height of the water column.

Today, gravimetric, visual, and optical methods are used to study turbidity. The gravimetric method [5] is the most accurate but also time-consuming. It involves filtering a shaken water sample through a paper or membrane filter. The collected particles are washed with cold distilled water, dried, and the particle content is determined by the difference in the filter's mass before and after drying.

Optical methods for controlling the number of insoluble particles rely on light scattering on these particles. The nephelometric method [6] measures the intensity of light scattered by particles in a water sample, with particle concentration determined by comparison with a standard dispersive system. For rapid monitoring, a visual method [4] is used, where the color of water in a transparent cylinder is compared to a standardized sample.

The method of luminescence measurement can detect organic pollutants. When water is irradiated at specific wavelengths, peaks appear that correspond to various organic pollutants, such as chlorophyll [7]. Colorimetric sensors enable quick and selective pollutant detection through color changes resulting from chemical or quasi-chemical reactions with nanoparticles used as the sensor material [8, 9].

Chromatography allows for the quantitative detection of impurities, such as micro- and nanoplastics [10]. To identify pathogens, DNA-based biosensors, molecular biosensors, and fluorescent sensors are used [7]. Recently, machine learning and artificial intelligence technologies have been applied to analyze natural water quality [11, 12].

In recent years, special attention has been given to the implementation of innovative methods based on optical and chemical sensors, which provide rapid and accurate analysis [13, 14]. These approaches enable the detection of even microscopic pollutants, such as nanoplastics and traces of organic compounds resulting from anthropogenic activities [15].

Significant advances in machine learning and artificial intelligence technologies have made it possible to apply these technologies to water quality monitoring, significantly increasing the accuracy, objectivity, and productivity of monitoring [16–18]. The application of these technologies allows for the automation of impurity and contaminant detection processes, reducing analysis time and improving decision-making efficiency. For example, surface plasmon resonance-based methods are employed to assess water contamination levels [19]. Relevant studies have confirmed the effectiveness of these technologies in water quality control [20, 21], making them promising for implementation in water supply facilities.

MATERIALS AND METHODS

A new method for monitoring drinking water purification was developed and patented [22, 23], involving a surface plasmon resonance (SPR)-based device to assess the efficiency of water purification via freeze-thawing. These experiments were conducted on the “Plasmon-6” device

Fig. 1, developed by the V. E. Lashkaryov Institute of Semiconductor Physics, NAS of Ukraine. The main parameters of the device are presented in Table 1.

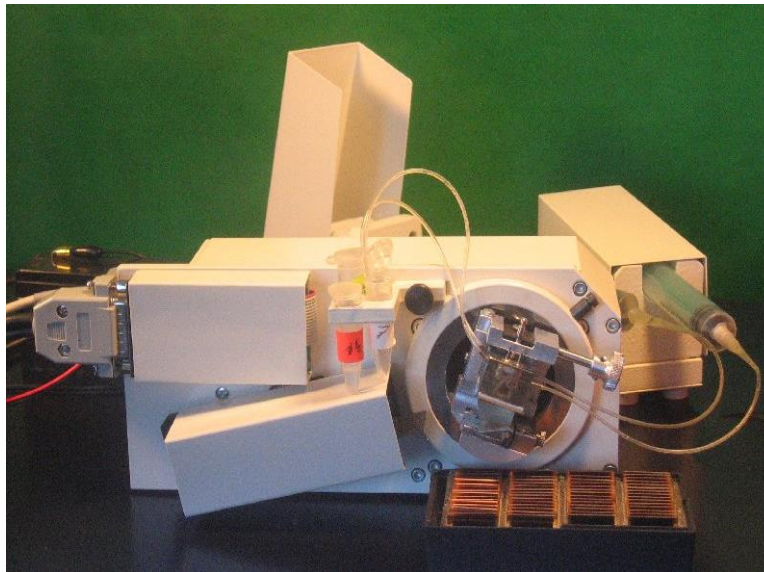


Fig. 1. Appearance of the "Plasmon-6" Device.

Table 1. Key technical specifications of the "Plasmon-6" Device

Parameter	Value
1	2
Baseline Noise (RIU) ang. sec	1.0–1.43
Absolute Measurement Error (RIU)	0.00005-0.0003
Surface Plasmon Resonance Curve Measurement Time	< 3 sec
Kinetics Measurement Speed	2 units/sec
GaAs Laser Wavelength	650 nm

Surface plasmon resonance is a phenomenon that occurs when free electrons in a thin metal layer are excited by incident light at a specific angle. In the case of gold, surface electrons collectively oscillate in response to light of a particular wavelength, producing peaks in the reflected light spectrum that do not appear in the incident light spectrum. This effect, occurring on the metal film surface, extends into the surrounding environment and decreases exponentially with distance. Molecular interactions on the surface influence the plasmon wave attenuation, resulting in changes in surface plasmon characteristics, such as shifts in resonance angle and alterations in the refractive index of the surface layer. This allows for real-time monitoring of chemical and biological reactions.

The device uses a prism-based method for plasmon excitation and operates in the Kretschmann optical configuration (Fig. 2) [24].

The "Plasmon-6" SPR device consists of a semiconductor laser, a glass prism, and a silicon photodiode. The sensor element, where plasmon excitation occurs, is positioned on the prism. Optical contact is maintained by immersion liquid. To obtain angular responses, the SPR sensor performs mechanical scanning by rotating the prism. The device operates as follows: the prism changes its position incrementally (driven by a stepper motor) within the range of total internal reflection angles at the prism-metal interface relative to the laser beam direction. During each scan, the reflection characteristics are measured, and the resonance angle is determined. The sensor response is displayed as an angular shift in reflection characteristics and a corresponding

change in resonance angle due to variations in the refractive index of the medium in contact with the gold film. The measured resonance angle range spans from 38° to 69° , corresponding to refractive index changes from 1.00 to 1.5.

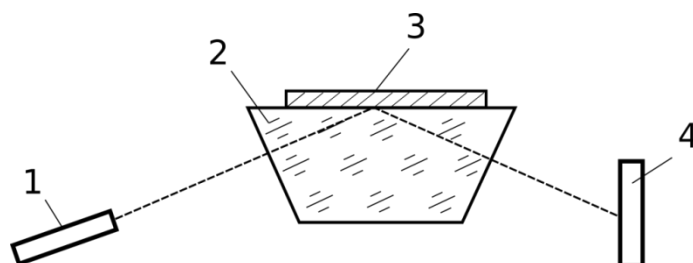


Fig. 2. Optical Scheme of the SPR Device Based on Kretschmann Geometry: 1 — laser, 2 — total internal reflection prism, 3 — sensor element, 4 — photodetector.

This compact device is suitable for autonomous rapid monitoring of pollution in natural ponds and rivers. This approach does not determine the specific composition of impurities but their total quantity by measuring the shift in the SPR minimum angle of the water samples being studied. The device's error at the research wavelength of 650 nm is 8×10^{-5} RIU. For repeated studies, a sensor element with an additional zinc oxide layer [25] was proposed, significantly enhancing the durability of the gold-sensitive layer. In these studies, the wear resistance of the gold layer was tested by performing multiple measurements on a single sensor with the additional layer, measuring the SPR minimum angle of various natural water samples.

Simultaneously with the SPR characteristics measurement, a conductometer was used to analyze water samples. We used TDS-3 conductometer (Chanitex, China) Fig. 3 to provide these experiments. Its technical description provided in Table 2.



Fig. 3. Appearance of conductometer TDS-3.

Table. 2. Technical description of conductometer TDS-3

Parameter	Value
Range, ppm	0–9.990
Accuracy, %	±2
Size, mm	155×31×23
Weight, g	76

For easier comparison of measurement results with the results obtained by the Ukrkhimanaliz laboratory, the measured conductivity was converted into ppm in accordance with the calibration curve provided by the manufacturer.

The objective of this study was to develop a methodology for rapid natural water quality assessment using the SPR method and a conductometer and to simultaneously determine the durability of sensors with protective coatings.

The first research stage involved modeling the concentration dependencies of SPR indicators by adding controlled amounts of organic (sugar) and inorganic (table salt and baking soda) impurities to distilled water. Biological contamination was modeled using suspensions of live yeast.

To investigate the influence of inorganic impurities on the SPR shift, we dissolved 1, 2.5, 3.5, 4.5, and 5.5 g of table salt (TM “1”) in 100 milliliters of distilled water using a magnetic stirrer.

To analyze the influence of organic impurities on the SPR shift, we dissolved 1.3, 2.7, 3.5, 4.5, and 5.5 g of sugar (TM “1”) in 100 milliliters of distilled water using a magnetic stirrer.

For studying the influence of pH on the SPR shift, we dissolved 0.7, 1.4, 2.1, 2.8, and 3.5 g of baking soda (TM “1”) in 100 milliliters of distilled water using a magnetic stirrer.

To model biological contamination, 20 g of pressed yeast (TM “Lvivski Premium”) were stirred in 300 milliliters of water at the room temperature (~22°C). The suspension was kept for 30 minutes at room temperature and measurements were carried out using conductometric and SPR methods. The obtained suspension was highly concentrated and exceeded the upper sensitivity limit of SPR measurements. Moreover, such a high concentration is not realistic in natural river water. After that, the suspension was kept for another 4 hours and repeated measurements were taken. Therefore, to better align with the research objectives, various amounts of water were added to the concentrated suspension, and a calibration SPR curve was constructed. Then, 1.3, 2.6, 4.0, 5.3, and 6.6 g of this suspension were mixed with 100 milliliters of distilled water for each sample.

For each sample, the angle of the SPR minimum was measured. The instrument's cuvette was cleaned with distilled water and ethanol after each measurement. Each measurement was repeated 10 times to estimate the measurement error. Additionally, we conducted 10 measurements of the conductivity of each sample. After each measurement, the conductometer was cleaned with distilled water.

In the second stage, four samples of coastal water were taken from different locations: the Dnipro River in Kyiv, the Stuhna River near Vasylkiv, a pond from the Stuhna River near Borova in the Fastiv district. Samples were collected between October 30 and November 4, 2024. Volume of each sample was 1 liter. For SPR and conductometry analyze samples of 50 ml volume were taken from each bottle. Rest volume of samples were transferred to the “Ukrkhimanaliz” during 12 hours. After each SPR measurement, the sensor element was rinsed with distilled water and alcohol to reduce errors from contamination by residues of previous samples. All measurements were carried out at room temperature (20 °C). However, during the measurements performed using the “Plasmon-6” device, the samples were heated by the

instrument itself, which led to a decrease in the sample density, causing a shift of the SPR curve. So to minimize temperature influence we provide SPR measurements during 2 hours each sample.

To verify the accuracy of these rapid assessment methods, the water samples were additionally analyzed in the “Ukrkhimanaliz” laboratory using standard methods. Certificates of analyzed samples are stored in our laboratory.

Error of measurements was estimated as systematic error, which include influence of temperature, mechanical backlashes, etc., and random error. Systematic error for wavelength 650 nm is 8×10^{-5} RIU.

To determine the random measurement error, we used Student's method [26]. First, we calculated the arithmetic mean of the measured minimum SPR angle or conductivity using the formula:

$$a_m = \frac{\sum_{i=1}^N a_i}{N},$$

where a_m — the mean value of the measured quantity, a_i — the measured value, N — quantity of measurements.

After that, we determined the absolute deviation of the measured quantity from the mean:

$$\Delta a_i = |a_i - a_m|$$

And calculated the standard error of the mean [26]:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N \Delta a_i^2}{N(N-1)}},$$

where S — the standard error of the mean.

The confidence probability was taken as 0.95, and accordingly, the Student's coefficient for 10 measurements was 2.3 (for salt, sugar, yeast and conductometry measurements) and 1.98 for 1700 measurements. Thus, the value of the random error was calculated using the formula:

$$a_r = 2.3S$$

The minimum duration of analysis using the surface plasmon resonance (SPR) method is 1 minute, while the measurement with a conductometer takes 30–50 seconds. Thus, the total duration of the study does not exceed 2 minutes. The method allows for the assessment of the overall level of contamination and does not involve the identification of specific impurities. Preliminary studies were conducted on various substances to determine the sensitivity and selectivity of the conductometer. It was found that the conductometer is not sensitive to organic contaminants that do not conduct electric current (e.g., yeast suspension), which are present in river water. Therefore, to ensure objective monitoring, it was proposed to use two devices based on different physical principles.

RESULTS AND DISCUSSION

The research results are shown in Fig. 4–7.

The modeling conducted showed that for sensors with different sensitivities and designs, the concentration dependencies exhibit a common trend: a higher SPR minimum angle corresponds to a greater quantity of impurities. Thus, in monitoring natural water, the pollution

level can be evaluated based on this parameter. More polluted water will have a larger SPR minimum angle.

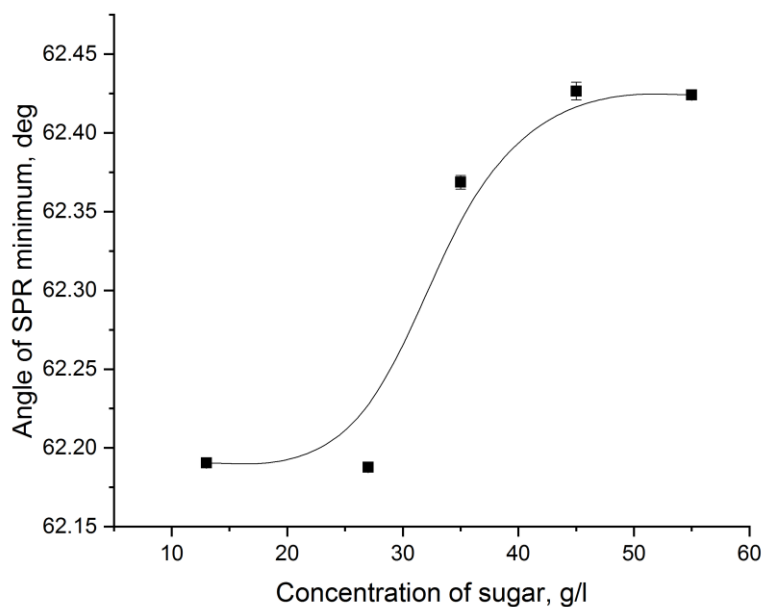


Fig. 4. Concentration dependence of the SPR minimum angle for sugar.

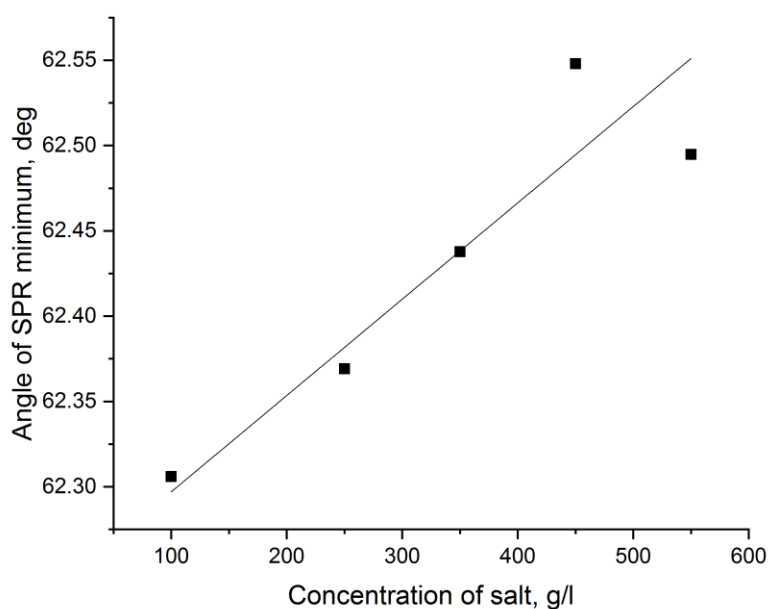


Fig. 5. Concentration dependence of the SPR minimum angle for salt.

In addition to the SPR minimum angle, samples were also analyzed using the conductometric method (Fig. 8).

After 30 minutes of preparation, the suspension showed zero conductivity on the conductometer.

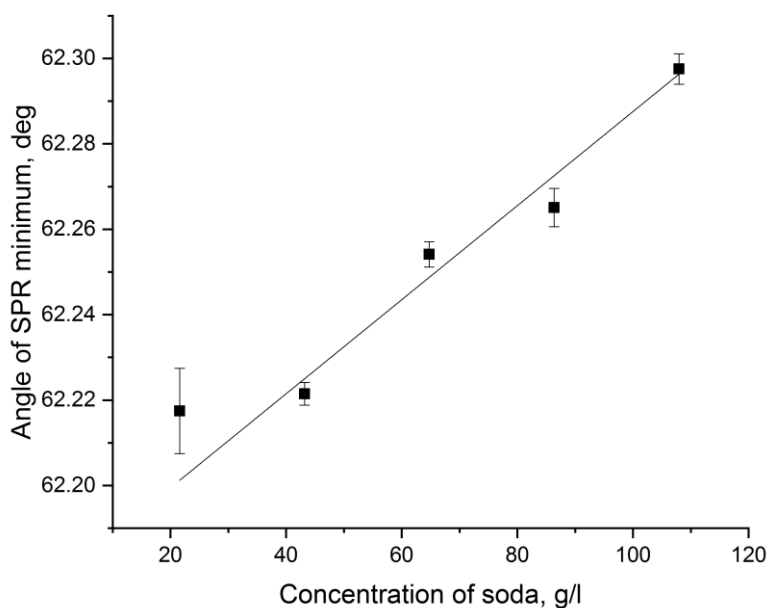


Fig. 6. Concentration dependence of the SPR minimum angle for soda.

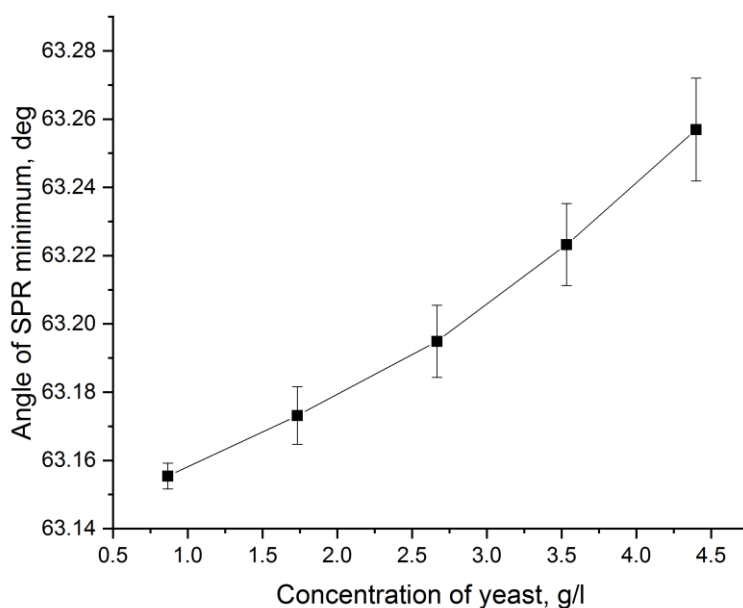


Fig. 7. Concentration dependence of the SPR minimum for aqueous yeast suspensions.

However, for organic impurities like sugar, this method was not informative, although it demonstrated a linear relationship for inorganic impurities. In measurements of yeast at a concentration of 20 g of "Lvivski Premium" pressed yeast per 300 ml of water, the following observations were made: 30 minutes after preparation, the suspension showed zero conductivity, but after 4 hours of activity, as a result of yeast activity, both organic and inorganic contaminants were formed in the suspension. The latter were detected by the conductometer as the conductive component. This result can be explained by the yeast's

metabolic activity, which produces new chemical compounds, including acetic acid, known for its good conductivity.

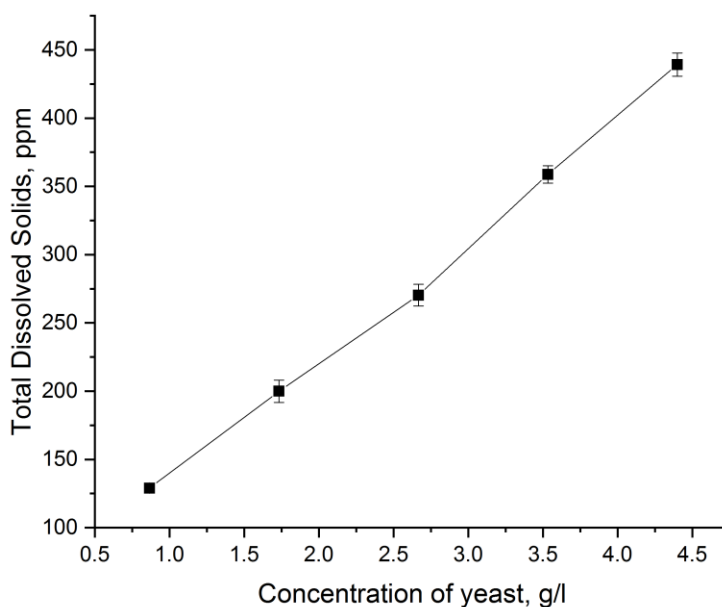


Fig. 8. Total dissolved solids for yeast after 4 hours of yeast's activity.

Consequently, it was decided to monitor water quality using both methods to ensure an objective assessment of natural water containing both organic and inorganic pollutants.

In Table 3 and Figs. 9, 10, the values of the SPR index and water conductivity are presented.

Table 3. Measurement results and comparison of selected parameters from laboratory analyses by "Ukrkhimanaliz" (from certificates)

Samples/ Measurement Results	Total Salt Content* mg/dm ³	Ammono-nium Concentration*, mg/dm ³	Total Impurities, mg/dm ³	pH*	Adjusted Total Salt Content Considering Sample pH	SPR Degrees	Total Dissolved Solids, ppm
Dnipro	345	0.42	345.42	8	43.1775	62.2403± 5.49×10 ⁻⁴	118.5±0.4
Stuhna	469	1.48	470.48	8	58.81	62.249± 1.57×10 ⁻³	136.2±0.6
Pond	617	1.4	618.4	8	77.3	62.9619± 2.41×10 ⁻⁴	144.6±0.5

Note: *Based on measurement results from "Ukrkhimanaliz".

**The instrumental error of the "Plasmon-6" SPR device at a wavelength of 650 nm is 8×10^{-5} RIU.

The measurement results can be summarized by stating that the combination of the surface plasmon resonance (SPR) method and conductivity measurement allows for the rapid, not exceed 2 minutes, and objective characterization of natural water pollution, which corresponds to the sum of selected harmful impurities. Given the small dimensions and autonomy of the devices used in the developed methodology, river water monitoring can be carried out in field conditions by one person.

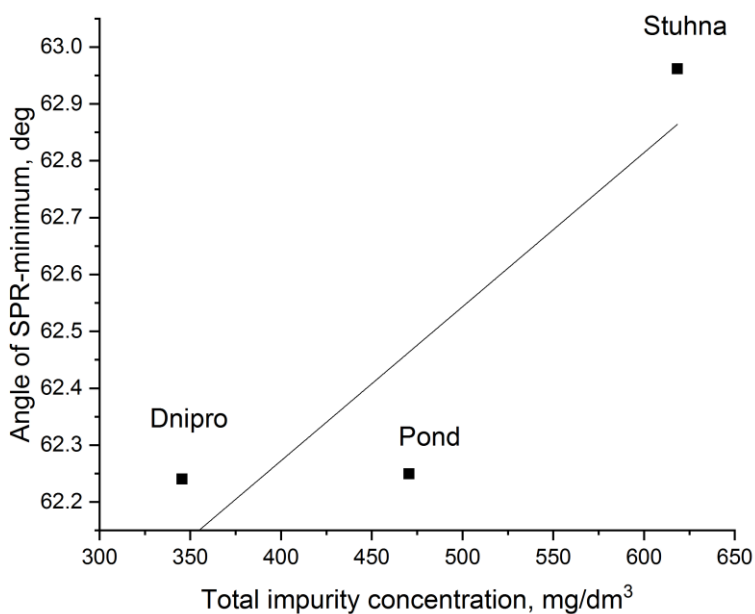


Fig. 9. Dependence of the SPR minimum angle on the total concentration of selected impurities in surface natural water samples.

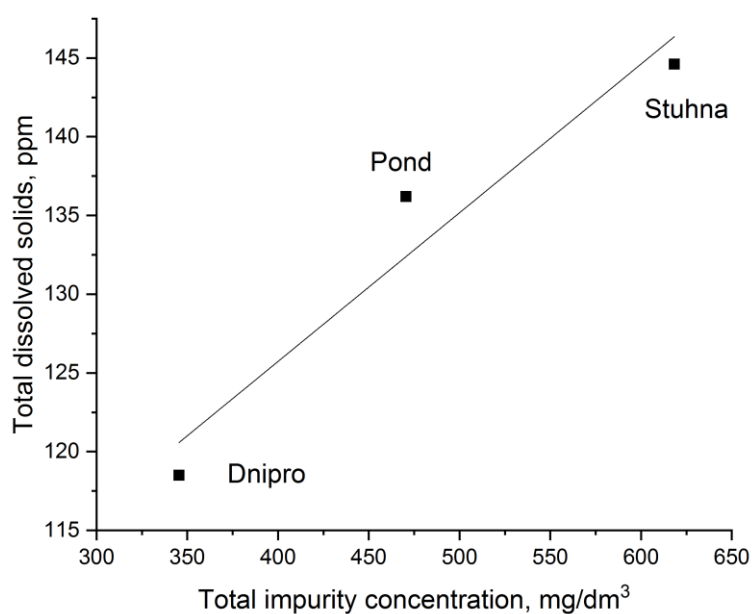


Fig. 10. Dependence of total dissolved solids on the total concentration of selected impurities in surface natural water samples.

All SPR measurements were carried out on a single sensor with an additional protective layer [26], which helped reduce the measurement error typically associated with sensor changes.

The SPR results showed that the most polluted river was Stuhna, followed by the pond, with the least pollution observed in the Dnipro River near Kyiv.

CONCLUSIONS

The measurement results can be summarized by stating that the combination of the surface plasmon resonance (SPR) method and conductivity measurement allows for the rapid, not exceed 2 minutes, and objective characterization of natural water pollution, which corresponds to the sum of selected harmful impurities. Given the small dimensions and autonomy of the devices used in the developed methodology, river water monitoring can be carried out in field conditions by one person.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

Authors' ORCID ID

Nataliya Kachur  <https://orcid.org/0000-0001-6868-8452>
Artem Fedorenko  <https://orcid.org/0000-0001-6201-6129>
Hanna Dorozinska  <https://orcid.org/0000-0002-9352-3761>
Vasyl Ryzhykh  <https://orcid.org/0000-0003-4008-3560>
Volodymyr Maslov  <https://orcid.org/0000-0001-7795-6156>

REFERENCES

1. State Standard of Ukraine. Drinking water. Requirements and control methods of quality. (DSTU 7525:2014). 2014. Available from: http://icwc.org.ua/docs/dstu_7525_2014.pdf (in Ukrainian)
2. Water quality. Determination and investigation of color (ISO 7887:2011, IDT). 2011. Available from: <https://www.iso.org/standard/46425.html>
3. State Standard of Ukraine. Environmental protection. Quality of natural irrigation water. Agronomical criteria (DSTU 2730:2015). 2015. Available from: https://zakon.isu.net.ua/sites/default/files/normdocs/1-10395-zahyst_dovkilliya_yakist_pryrodnoyi_vody_dlya_zroshen.pdf (in Ukrainian)
4. Jethra R. Turbidity measurement. ISA Transactions. 1993;32(4):397–405. [https://doi.org/10.1016/0019-0578\(93\)90075-8](https://doi.org/10.1016/0019-0578(93)90075-8)
5. Aiswarya L, Siddharam, Sandeepika M. Soil moisture distribution pattern under drip irrigation in sandy loam soil using gravimetric method. Asian J Soil Sci Plant Nutr. 2024;10(2):198–204. <https://doi.org/10.9734/AJSSPN/2024/v10i2276>
6. Matos T, Martins MS, Henriques R, Goncalves LM. A review of methods and instruments to monitor turbidity and suspended sediment concentration. J Water Process Eng. 2024;64:105624. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.105624>
7. Bieroza M, Acharya S, Benisch J, ter Borg RN, Hallberg L, Negri C, et al. Advances in Catchment Science, Hydrochemistry, and aquatic ecology enabled by high-frequency water quality measurements. Environ Sci Technol. 2023;57(12):4701–19. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c07798>
8. Cho HH, Jung DH, Heo JH, Lee CY, Jeong SY, Lee JH. Gold nanoparticles as exquisite colorimetric transducers for water pollutant detection. ACS Appl Mater Interfaces. 2023;15(16):19785–806. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c00627>
9. Singh R, Mehra R, Walia A, Gupta S, Chawla P, Kumar H, et al. Colorimetric sensing approaches based on silver nanoparticles aggregation for determination of toxic metal ions in water sample: a review. Int J Environ Anal Chem. 2023;103(6):1361–76. <https://doi.org/10.1080/03067319.2021.1873315>
10. Okoffo ED, Thomas KV. Quantitative analysis of nanoplastics in environmental and potable waters by pyrolysis-gas chromatography–mass spectrometry. J Hazard Mater. 2024;464:133013. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.133013>
11. Kaur G, Braveen M, Krishnapriya S, Wawale SG, Castillo-Picon J, Malhotra D, et al. Machine learning integrated multivariate water quality control framework for prawn harvesting from fresh water ponds. J Food Qual. 2023;2023:1–9. <https://doi.org/10.1155/2023/3841882>
12. Pérez-Beltrán CH, Robles AD, Rodriguez NA, Ortega-Gavilán F, Jiménez-Carvelo AM. Artificial intelligence and water quality: From drinking water to wastewater. TrAC Trends Anal Chem. 2024;172:117597. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117597>
13. Murphy K, Heery B, Sullivan T, Zhang D, Paludetti L, Lau KT, et al. A low-cost autonomous optical sensor

- for water quality monitoring. *Talanta*. 2015;132:520–7. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.045>
14. Yaroshenko I, Kirsanov D, Marjanovic M, Lieberzeit PA, Korostynska O, Mason A, et al. Real-time water quality monitoring with chemical sensors. *Sensors*. 2020;20(12):3432. <https://doi.org/10.3390/s20123432>
 15. Wang Y-X, Fu S-F, Xu M-X, Tang P, Liang J-G, Jiang Y-F, et al. Integrated passive sensing chip for highly sensitive and reusable detection of differential-charged nanoplastics concentration. *Sensors*. 2023;8(10):3862–72. <https://doi.org/10.1021/acssensors.3c01406>
 16. Zhu M, Wang J, Yang X, Zhang Y, Zhang L, Ren H, et al. A review of the application of machine learning in water quality evaluation. *Eco-Environ. Health*. 2022;1(2):107–16. <https://doi.org/10.1016/j.eehl.2022.06.001>
 17. Li Y, Wang X, Zhao Z, Han S, Liu Z. Lagoon water quality monitoring based on digital image analysis and machine learning estimators. *Water Res*. 2020;172:115471. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115471>
 18. Nasir N, Kansal A, Alshaltone O, Barneih F, Sameer M, Shanableh A, et al. Water quality classification using machine learning algorithms. *J Water Process Eng*. 2022;48:102920. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102920>
 19. Mohseni-Dargah M, Falahati Z, Dabirmanesh B, Nasrollahi P, Khajeh K. Machine learning in surface plasmon resonance for environmental monitoring. In: Mohsen Asadnia, Amir Razmjou and Amin Beheshti, editors. *Artificial Intelligence and Data Science in Environmental Sensing*. Academic Press; 2022. p. 269–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90508-4.00012-5>
 20. Zhang P, Chen Y-P, Wang W, Shen Y, Guo J-S. Surface plasmon resonance for water pollutant detection and water process analysis. *Trends Anal Chem*. 2016;85:153–65. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.09.003>
 21. Sayed FA, Elsayed HA, Al-Dossari M, Eissa MF, Mehaney A, Aly AH. Angular surface plasmon resonance-based sensor with a silver nanocomposite layer for effective water pollution detection. *Sci Rep*. 2023;13(1):21793. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48837-4>
 22. Radov DH, Maslov VP, Ushenin YV, Dorozinsky G, Kushnir H, Konchenko A, Kachur N, inventors; Radov DH, Maslov VP, Ushenin YV, Dorozinsky G, Kushnir H, Konchenko A, Kachur N, assignee. Method for controlling water purification degree. Ukraine patent; U 115844, 2017 Apr 25. 5 p. Available from: <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/804176/> (in Ukrainian)
 23. Radov DH, Bezruk ZD, Maslov VP, Dorozinsky G, Dorozinska HV, Konchenko A. Study of water purification patterns from tap water using freezing method. *Bull Natl Tech Univ “KhPI”, Ser Mech Technol Syst Complexes*. 2016;50:137–41. Available from: <http://mtsc.khpi.edu.ua/article/view/99937> (in Ukrainian)
 24. Dorozinsky G, Maslov V, Klestova Z, Ushenin Yu, Dorozinska H, Blotska O, Yuschenko A. Development high sensitivity sensor based on surface plasmon resonance phenomenon. 2019 IEEE 39th International Conference on Electronics and Nanotechnology (ELNANO). Kyiv, Ukraine, 2019, p. 249–252. <https://doi.org/10.1109/ELNANO.2019.8783945>
 25. Fedorenko A, Kachur N, Sulima OV, Maslov V. Protective properties of ZnO nanofilm against wear and mechanical damage of sensitive SPR sensor element. *Funct Mater*. 2024;31(2):199–204. <https://doi.org/10.15407/fm31.02.199>
 26. Berendsen HJC. *A Student's Guide to Data and Error Analysis*. Berendsen H, editor. Cambridge: Cambridge University Press; 2011. 225 p.
 27. Maslov V, Kachur N, Fedorenko A, inventors; Lashkariyov institute of semiconductor physics of National Academy of Sciences of Ukraine, assignee. Sensitive element of a device for studying liquid and gaseous substances based on the phenomenon of surface plasmon resonance. Ukraine patent; U 154656, 2023 Nov 29. Available from: <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1773421/> (in Ukrainian)

ЕКСПРЕС-МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКОСТІ ПРИРОДНОЇ ВОДИ ЗА ДОПОМОГОЮ СЕНСОРНОГО ПРИЛАДУ НА ОСНОВІ ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОНОВОГО РЕЗОНАНСУ ТА КОНДУКТOMETРА

Н. В. Качур¹, А. В. Федоренко¹, Г. В. Дорожинська², В. М. Рижих³,
В. П. Маслов^{1*}

¹Інститут фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України, пр. Науки, 41, Київ, 03028, Україна;

²Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», пр. Берестейський, 37, Київ, 03056, Україна;

³Центральний науково-дослідний інститут озброєння та військової техніки Збройних Сил України, пр. Повітряних сил, 28, Київ, 03049, Україна

*e-mail: vpmaslov@ukr.net

Надійшла до редакції 14 січня 2025 р. Переглянута 30 липня 2025 р.

Прийнята до друку 12 серпня 2025 р.

Актуальність: Однією з актуальних проблем сучасності є забруднення природних вод, яке безпосередньо впливає на життєзабезпечення людства. Ця проблема пов'язана з інтенсифікацією

промисловості, сільського господарства та зміною клімату. Норми якості води в Україні визначаються державними стандартами, які регламентують як органолептичні показники, такі як каламутність і запах, так і допустимі концентрації шкідливих речовин.

Мета роботи: Метою даної роботи була розробка нового високочутливого методу визначення якості води.

Матеріали і методи: У цьому дослідженні визначається доцільність поєднання поверхневого плазмонного резонансу (ППР) і кондуктометричних методів для моніторингу якості природної води. Перший етап включав моделювання концентраційних залежностей параметрів ППР та електропровідності при додаванні до дистильованої води контрольованих кількостей органічних (цукор) і неорганічних (кухонна сіль і сода) домішок. Біологічне забруднення моделювали за допомогою розчинів живих дріжджів. Згодом було проаналізовано проби прибережної води р. Дніпро в Києві, р. Стугна біля м. Василькова та ставка, що сполучається з р. Стугна біля с. Борова Фастівського району. Усі ППР-дослідження проводилися з використанням покращеного сенсорного елемента з додатковим захисним шаром оксиду цинку, який зменшив помилки вимірювання, зазвичай пов'язані із заміною датчика. Для перевірки достовірності методів експрес-оцінки зразки води додатково досліджено стандартними лабораторними методами в компанії ТОВ «Укрхіманаліз».

Результати: Результати ППР-досліджень показали, що найбільш забруднена р. Стугна, за нею ставок, а найменше забруднення у р. Дніпро.

Висновки: Підсумовуючи результати вимірювань можна зробити висновок, що поєднання ППР-вимірювань і електропровідності дозволяє швидко та об'єктивно оцінити рівень забруднення природних вод. Це відповідає загальній кількості шкідливих домішок, нормованих на одиницю значення рН. Повторні дослідження з використанням вдосконаленого сенсорного елемента підтвердили, що оксид цинку як додатковий шар на сенсорі ефективно захищає золоте нанопокриття, зменшує помилки, пов'язані із заміною сенсора, і значно продовжує термін експлуатації сенсора, зберігаючи низький рівень помилок.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: поверхневий плазмонний резонанс; електропровідність; контроль природної води; забруднення природних вод; хімічний аналіз; оптичні властивості.

МЕТОДИ І ЗАСОБИ ПОЛЯРИЗАЦІЙНО-ІНТЕРФЕРЕНЦІЙНОГО ВІДТВОРЕННЯ І ДИСКРЕТНОГО ФАЗОВОГО СКАНУВАННЯ ДЖОНС- МАТРИЧНИХ ЗОБРАЖЕНЬ ПОЛІКРИСТАЛІЧНИХ ПЛІВОК ДЕГІДРАТОВАНОЇ ЖОВЧІ

Юрій Ушенко^{1*}, Ірина Солтис², Василь Гарасим², Олександр Салега²

¹Кафедра комп'ютерних наук, Навчально-науковий інститут фізико-технічних та комп'ютерних наук, Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, вул. Сторожинецька, 101, м. Чернівці, 58029, Україна;

²Кафедра поліграфічних, мультимедійних і оптичних технологій, Навчально-науковий інститут фізико-технічних та комп'ютерних наук, Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, вул. Сторожинецька, 101, м. Чернівці, 58029, Україна

*Автор для листування: y.ushenko@chnu.edu.ua

Надійшла до редакції 10 лютого 2025 р. Переглянута 31 жовтня 2025 р.

Прийнята до друку 10 листопада 2025 р.

Актуальність. Сучасні методи Мюллер-матричної поляриметрії спрямовані на визначення критеріїв та практичне застосування таких маркерів у диференціальній діагностиці патологічних і некротичних змін біологічних тканин органів людини. Разом з тим, маловивченими і актуальними є питання, пов'язані із матричними дослідженнями іншого класу об'єктів — дегідратованих (висушених) плівок біологічних рідин (БР), полікристалічна структура яких пов'язана зі складом і співвідношенням розчинених речовин. Поляриметрія дегідратованих плівок БР на макроскопічному рівні забезпечує можливість одержання інформації про її молекулярну мікроструктуру. Окрім цього, БР є більш легкодоступними і не потребують травматичної, часом небезпечної, біопсії.

Мета роботи. Розроблення та експериментальна апробація діагностичної ефективності нової техніки поляризаційно-інтерференційної реконструкції та пошарового фазового сканування об'єктних полів комплексних амплітуд з алгоритмічним відтворенням дійсної та уявної складових Джонс-матричних зображень полікристалічних плівок дегідратованої жовчі здорових донорів і хворих на жовчокам'яну хворобу.

Матеріали і методи. Використано поляризаційну інтерферометрію, цифрове фазове сканування та статистичний аналіз алгоритмічно відтворених дійсної та уявної складових Джонс-матричних зображень плівок дегідратованої жовчі.

Результати. Представлені та фізично проаналізовані результати статистичного аналізу методу поляризаційно-інтерференційного картографування з цифровим Фур'є відтворенням і фазовим скануванням розподілів комплексних амплітуд і алгоритмічним обчисленням дійсної та уявної складових Джонс-матричних зображень зразків плівок жовчі. Установлені максимально чутливі до змін полікристалічної структури дегідратованих плівок жовчі статистичні маркери і продемонстровано високу точність (97,6%) диференціальної діагностики жовчокам'яної хвороби.

Як цитувати: Ушенко Ю., Солтис І., Гарасим В., Салега О. Методи і засоби поляризаційно-інтерференційного відтворення і дискретного фазового сканування джонс-матричних зображень полікристалічних плівок дегідратованої жовчі. Біофізичний вісник. 2025;54:49–70. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-54-04>

Citation: Ushenko Y, Soltys I, Harasym V, Saleha O. Methods and means of polarization-interference layer reconstruction and discrete phase scanning of jones matrix images of polycrystalline films of dehydrated bile. Biophysical Bulletin. 2025;54:49–70. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-54-04>

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

Висновки. Установлені загальні сценарії трансформації статистичної структури сукупності Джонс-матричних зображень, які відтворені у різних фазових площинах об'єктного поля плівок дегідратованої жовчі. Визначено сукупність найбільш чутливих до патологічних змін структури самозібраних у процесі дегідратації молекулярних мереж (у подальшому надмолекулярних мереж) плівок жовчі діагностичних маркерів. Ними виявилися асиметрія та ексцес, які характеризують координатні розподіли величини дійсних та уявних складових елементів матриці Джонса.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: поляризація; матриця Джонса; оптична анізотропія; біологічна рідина; статистичні моменти; полікристалічні плівки дегідратованої жовчі.

За останні роки у різноманітних галузях медицини широкого та ефективного розповсюдження набули сучасні методи лазерної поляризаційної оптичної діагностики полікристалічної структури біологічних препаратів [1–4]. Методологічним узагальненням та розвитком методів і систем поляриметрії стали техніки Мюллер-матричної поляризаційного картографування, які забезпечують одержання вичерпної повної інформації про оптично анізотропну складову препаратів біологічних тканин і рідин [5–15].

Переважним чином весь арсенал методів і систем Мюллер-матричної поляриметрії спрямований на визначення і практичне застосування критеріїв (маркерів) диференціальної діагностики та динаміки патологічних і некротичних змін біологічних тканин органів людини. При цьому мало вивченими і актуальними на сьогодні є питання, пов'язані із матричними дослідженнями іншого класу об'єктів — полікристалічних плівок дегідратованих біологічних рідин (БР), які є більш легкодоступними і не потребують травматичної, часом небезпечної, біопсії.

БР є однією з найважливіших систем забезпечення життєдіяльності організму. Будь-які, як фізіологічні, так і патологічні процеси, що відбуваються в живому організмі, супроводжуються відповідними змінами на молекулярному рівні і можуть слугувати основою для діагностики різних захворювань на самих ранніх стадіях [16, 17]. Сучасна лабораторна та клінічна діагностика зосереджена в основному на визначенні численних кількісних показників (до прикладу, рівень гемоглобіну, еритроцитарні індекси, рівень гематокриту, кількість ретикулоцитів, швидкість осідання еритроцитів, кількість еритроцитів, тромбоцитів, лейкоцитів, білірубін, лужна фосфатаза, холестерин та багато інших), які характеризують БР. Морфологічні дослідження в біології та медицині зосереджені переважно на клітинних елементах, тоді як морфологічний аналіз БР донедавна залишався недоступним для клінічної практики [3]. Крапля БР, що лежить на горизонтальній площині, є зручною моделлю самоорганізованої системи для дослідження фізико-хімічних процесів, властивості якої визначаються складом розчинених у рідині речовин, умовами зовнішньої дегідратації та матеріалом підкладки [19, 20].

На сьогоднішній день для оцінки зображень дегідратованих плівок БР в основному використовується візуальний аналіз — світлова або поляризаційна мікроскопія [21–23]. При цьому важлива інформація про архітекtonіку надмолекулярних самоорганізованих мереж БР та їх оптичні анізотропні властивості, які можна отримати за допомогою поляризаційної інтроскопії, виявляється невідомою (недоступною). Наразі зроблено лише перші кроки в цьому напрямку. Так, у серії публікацій [24–35] розроблено та експериментально апробовано методи 2D поляризаційного картографування мікроскопічних зображень дегідратованих плівок крові та її плазми, сечі та інших БР з використанням різних (статистичних, кореляційних, Фур'є) алгоритмів обробки даних. В результаті були знайдені перші об'єктивні критерії (маркери), які забезпечили можливість диференціальної діагностики різних патологій в урології, гінекології та онкології. Однак подальший розвиток цих методів був обмежений наявністю деполаризованого багатократно розсіяного фону, який спотворює однозначність

взаємозв'язків між полікристалічною архітектонікою плівок дегідратованих БР і одержаними поляризаційними мапами (координатними розподілами азимута і еліптичності поляризації). Ще одним негативним фактором була відсутність алгоритмів диференціації компонент об'єктного поля з різною кратністю світлорозсіювання в об'ємі полікристалічних плівок дегідратованих БР.

Одним із шляхів подолання цих проблем стали нові лазерні методи пошарової поляризаційно-інтерференційної Мюллер-матричної поляриметрії полікристалічної архітектоніки біологічних тканин і рідин [36–41]. Суть цих методів полягає у можливості алгоритмічного 2D цифрового Фур'є відтворення об'єктних полів комплексних амплітуд з наступним їх дискретним фазовим скануванням. У результаті такого перетворення одержується масив величин ортогональних складових амплітуди і фазових зсувів між ними. Кожному рівню величини фазового зсуву у такому відтвореному полі відповідає певна кратність світлорозсіювання в об'ємі біологічного зразка. Шляхом покрокового фазового сканування можна мінімізувати вплив дифузного деполаризованого фону і виділити складову з мінімальною кратністю світлорозсіювання. Таким чином у даній фазовій вибірці серед множини комплексних амплітуд об'єктного поля реалізуються максимально сприятливі для диференціальної діагностики умови — алгоритмічного відтворення поляризаційних мап, які однозначно пов'язані зі параметрами полікристалічної архітектоніки дегідратованих плівок. Разом з тим, основним вимірюваним параметром в зазначених поляриметричних техніках є вектор Стокса, чотири параметри якого утворюються комбінаціями ортогонально поляризованих складових інтенсивності у точках лазерного об'єктного поля. Внаслідок цього зазначений векторно-параметричний підхід не забезпечує можливості реалізації прямої Фур'є-реконструкції розсіяних полів комплексних амплітуд з подальшим їх покроковим фазовим скануванням. При цьому необхідною умовою є проміжне «перекодування» розподілів дійсних і уявних складових комплексних амплітуд розсіяного лазерного поля в розподіли параметрів вектора Стокса. Одержані Стокс-параметричні масиви є базисом для алгоритмічного розрахунку сукупності Мюллер-матричних зображень для різних фазових вибірок об'єктного поля.

Наша робота спрямована на розроблення та експериментальну апробацію іншої, Джонс-матричної методології, яка більш адаптована до описання поляризаційно-неоднорідних лазерних полів полікристалічних плівок дегідратованих біологічних рідин. Зазначений аналітичний формалізм забезпечує можливість прямої поляризаційно-інтерференційної реконструкції і покрокового фазового сканування об'єктного поля комплексних амплітуд з алгоритмічним відтворенням пошарових дійсної та уявної складових Джонс-матричних зображень. Прикладним аспектом роботи є визначення найбільш чутливих до змін надмолекулярних мереж полікристалічних плівок дегідратованої жовчі статистичних маркерів, які характеризують зміни відповідних пошарових Джонс-матричних зображень. Зазначений підхід забезпечить можливість розширення функціональних можливостей ранньої доклінічної діагностики жовчно-кам'яної хвороби на її «доконкретній» латентній стадії відомими біохімічними і інструментальними (УЗ інтроскопія, комп'ютерна томографія та магнітно-резонансна томографія) методами [42].

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Коротка теорія

У наближенні однократного розсіювання (коефіцієнт ослаблення $\tau \leq 0,01$) оптичні властивості полікристалічної плівки дегідратованої жовчі можуть бути описані за

допомогою шести типів механізмів оптичної анізотропії [43–46]. Перші три типи механізми пов'язані з формуванням фазових зсувів між лінійно ($0^\circ \div 90^\circ$; $45^\circ \div 135^\circ$) і циркулярно (право- ($\otimes$); ліво- ($\oplus$)) поляризованими ортами комплексної амплітуди оптичної хвилі. Вони одержали назву фазової анізотропії і характеризуються лінійним ($LB(0,90)$; $(45,135)$) і циркулярним $CB \otimes, \oplus$) двопроменезаломленням

$$LB_{0;90} = \frac{2\pi}{\lambda}(n_0 - n_{90})h, \quad (1)$$

$$LB_{45;135} = \frac{2\pi}{\lambda}(n_{45} - n_{135})h, \quad (2)$$

$$CB_{\otimes;\oplus} = \frac{2\pi}{\lambda}(n_{\otimes} - n_{\oplus})h, \quad (3)$$

де $(n_0, n_{90}, n_{45}, n_{135}, n_{\otimes}, n_{\oplus})$ — індекси заломлення-поглинання; $\lambda = 0,6328$ мкм — довжина хвилі (у нашому випадку He-Ne лазера); h — геометрична товщина шару.

Інші три типи механізмів формують амплітудну анізотропію — лінійний ($LD(0,90)$; $(45,135)$) і циркулярний ($CD \otimes, \oplus$) дихроїзм

$$LD_{0;90} = \frac{2\pi}{\lambda}(\chi_0 - \chi_{90})h, \quad (4)$$

$$LD_{45;135} = \frac{2\pi}{\lambda}(\chi_{45} - \chi_{135})h, \quad (5)$$

$$CD_{\otimes;\oplus} = \frac{2\pi}{\lambda}(\chi_{\otimes} - \chi_{\oplus})h, \quad (6)$$

де $(\chi_0, \chi_{90}, \chi_{45}, \chi_{135}, \chi_{\otimes}, \chi_{\oplus})$ — індекси поглинання.

Враховуючи незначне поглинання в червоній області спектру оптично тонкими полікристалічними плівками дегідратованої жовчі ми обмежились розглядом фазових зсувів, які обумовлені механізмами лінійного і циркулярного двопроменезаломлення ((1)–(3)). Поляризаційні прояви кожного з таких механізмів фазової анізотропії з вичерпною повнотою описуються наступними парціальними Джонс матричними операторами [43–46]

$$J(LB_{0;90}) = \begin{vmatrix} \exp(-0.5iLB_{0;90}) & 0 \\ 0 & \exp(0.5iLB_{0;90}) \end{vmatrix}, \quad (7)$$

$$J(LB_{45;135}) = \begin{vmatrix} \cos 0.5LB_{45;135} & -i \sin 0.5LB_{45;135} \\ -i \sin 0.5LB_{45;135} & \cos 0.5LB_{45;135} \end{vmatrix}, \quad (8)$$

$$J(CB_{\otimes;\oplus}) = \begin{vmatrix} \cos C B_{\otimes;\oplus} & \sin C B_{\otimes;\oplus} \\ -\sin C B_{\otimes;\oplus} & \cos C B_{\otimes;\oplus} \end{vmatrix}. \quad (9)$$

У відповідності з (7)–(9) матриця Джонса фазової анізотропії полікристалічної плівки дегідратованої жовчі приймає вигляд

$$\{J\} = \begin{vmatrix} j_{11} & j_{12} \\ j_{21} & j_{22} \end{vmatrix} =$$

$$= \left\| \begin{array}{cc} \cos 0.5|V| - i \frac{LB_{0;90}}{|V|} \sin 0.5|V| & \frac{(CB_{\otimes;\oplus} - iLB_{45;135})}{|V|} \sin 0.5|V| \\ - \frac{(CB_{\otimes;\oplus} + iLB_{45;135})}{|V|} \sin 0.5|V| & \cos 0.5|V| + i \frac{LB_{0;90}}{|V|} \sin 0.5|V| \end{array} \right\|. \quad (10)$$

Тут $|V|$ — модуль узагальненого вектору фазової анізотропії

$$|V| = (LB^2 + CB^2_{\otimes;\oplus})^{0.5}, \quad (11)$$

$$LB = \left((LB^2_{0;90}) + (LB^2_{45;135}) \right)^{0.5}. \quad (12)$$

Тут (12) означає інтегральний рівень лінійного двопронезаломлення.

Аналіз співвідношень (10)–(12) виявив, що кожен з сукупності комплексних елементів J_{ik} матриці Джонса $\{J\}$ є функціоналом параметрів лінійного (LB) і циркулярного ($CB_{\otimes;\oplus}$) двопронезаломлення надмолекулярних мереж полікристалічної плівки дегідратованої жовчі.

Експериментальну (діагностично актуальну) інформацію про структуру матриці Джонса полікристалічного шару дегідратованої жовчі традиційно отримують у вигляді її дійсної ($Re\{J\}$) та уявної ($Im\{J\}$) частин сукупності матричних елементів. У відповідності з цим можна одержати (співвідношення (10)) наступні вирази парціальних «дійсних» і «уявних» матричних операторів

$$Re\{J\} = \left\| \begin{array}{cc} \cos 0.5(LB^2 + CB^2_{\otimes;\oplus})^{0.5} & \frac{CB_{\otimes;\oplus}}{(LB^2 + CB^2_{\otimes;\oplus})^{0.5}} \sin 0.5(LB^2 + CB^2_{\otimes;\oplus})^{0.5} \\ \frac{-CB_{\otimes;\oplus}}{(LB^2 + CB^2_{\otimes;\oplus})^{0.5}} \sin 0.5(LB^2 + CB^2_{\otimes;\oplus})^{0.5} & \cos 0.5(LB^2 + CB^2_{\otimes;\oplus})^{0.5} \end{array} \right\|, \quad (13)$$

$$Im\{J\} = \left\| \begin{array}{cc} \frac{-LB_{0;90}}{(LB^2 + CB^2_{\otimes;\oplus})^{0.5}} \sin 0.5(LB^2 + CB^2_{\otimes;\oplus})^{0.5} & \frac{LB_{45;135}}{(LB^2 + CB^2_{\otimes;\oplus})^{0.5}} \sin 0.5(LB^2 + CB^2_{\otimes;\oplus})^{0.5} \\ \frac{LB_{45;135}}{(LB^2 + CB^2_{\otimes;\oplus})^{0.5}} \sin 0.5(LB^2 + CB^2_{\otimes;\oplus})^{0.5} & \frac{-LB_{0;90}}{(LB^2 + CB^2_{\otimes;\oplus})^{0.5}} \sin 0.5(LB^2 + CB^2_{\otimes;\oplus})^{0.5} \end{array} \right\|. \quad (14)$$

Аналіз (13), (14) виявив аналітичні взаємозв'язки між параметрами двопронезаломлення полікристалічної плівки дегідратованої жовчі і ($Re\{J\}$) та ($Im\{J\}$):

- дійсні частини діагональних матричних елементів $J_{11;22}$ переважним чином визначаються співвідношеннями між фазовими зсувами, які сформовані інтегральним лінійним (12) і циркулярним (3) двопронезаломленням

$$Re(J_{11;22}) \sim LB^2 + CB^2_{\otimes;\oplus}, \quad (15)$$

- дійсні частини недиагональних матричних елементів $J_{12;21}$ переважним чином визначаються проявами циркулярного двопронезаломлення (3)

$$Re(J_{12;21}) \sim CB^2_{\otimes;\oplus}, \quad (16)$$

- за рахунок незначної величини параметрів фазової анізотропії ($\Delta n_{0;90;45;135;\otimes;\oplus} \sim 10^{-3}$) і реалізації відповідної до цього аналітичної умови

$\left(\sin 0.5 (LB^2 + CB^2_{\otimes;\oplus})^{0.5} / (LB^2 + CB^2_{\otimes;\oplus})^{0.5} \right) \rightarrow 0.5$ уявні частини діагональних матричних елементів $J_{11;22}$ переважним чином визначаються проявами «орієнтаційного» (2) лінійного двопронезаломлення $LB_{0;90}$

$$Im(J_{11;22}) \sim LB_{0;90}, \quad (17)$$

• уявні частини недіагональних матричних елементів $J_{12;21}$ переважним чином визначаються проявами іншої складової «орієнтаційного» (3) лінійного двопронезаломлення $LB_{45;135}$

$$Im(J_{12;21}) \sim LB_{45;135}. \quad (18)$$

Методика Джонс-матричного картографування полікристалічних плівок дегідратованої жовчі

На рис. 1 приведено оптичну схему поляризаційного інтерферометра Маха-Цандера, яка слугує вимірювальною платформою для відтворення дійсної та уявної складових елементів матриці Джонса полікристалічних плівок дегідратованої жовчі.

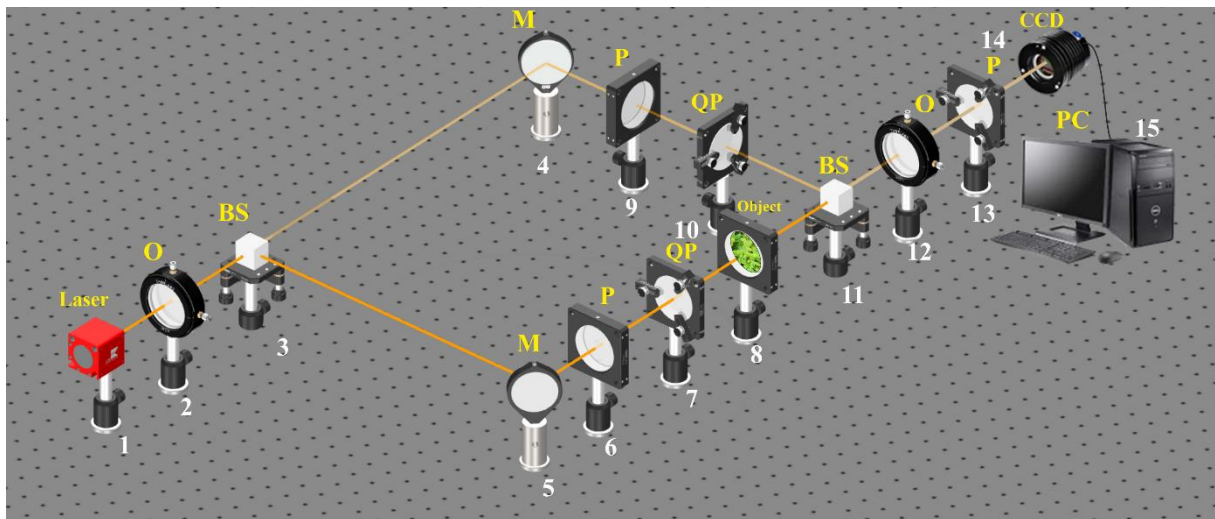


Рис. 1. Оптична схема поляризаційно-інтерференційного вимірювання елементів матриці Джонса: 1 — He-Ne лазер; 2 — коліматор — «O»; 3, 11 — світлоподільники — «BS»; 4, 5 — обертальні дзеркала — «M»; 6, 9, 13 — поляризатори «P»; 7, 10 — чвертьхвильові пластинки — «QP»; 8 — зразок дегідратованої плівки біологічної рідини; 12 — поляризаційний об'єктив — «O»; 14 — цифрова камера — «CCD»; 15 — персональний комп'ютер — «PC».

Fig. 1. Optical setup of the polarization-interference measurement of the Jones matrix elements: 1 — He-Ne laser; 2 — collimator — «O»; 3, 11 — beam splitters — «BS»; 4, 5 — rotating mirrors — «M»; 6, 9, 13 — polarizers — «P»; 7, 10 — quarter-wave plates — «QP»; 8 — sample of a dehydrated biological-fluid film; 12 — polarization objective — «O»; 14 — digital camera — «CCD»; 15 — personal computer — «PC».

Паралельний пучок ($\varnothing = 2 \times 10^3 \mu m$) He-Ne ($\lambda = 0.6328 \mu m$) лазера 1, який сформований оптичним коліматором 2, за допомогою 50% світлоподільника 3 розділяється на «об'єктний» і «опорний». «Об'єктний» лазерний пучок обертальним дзеркалом 5 спрямовується крізь поляризаційний фільтр 6–7 у напрямку зразка

полікристалічної плівки дегідратованої жовчі 8. Сформоване поляризаційно-неоднорідне зображення зразка жовчі 8 поляризаційним об'єктивом 12 спрямовується у площину світлочутливих пікселів ($a \times b$) цифрової CCD камери 14. «Опорний або референтний» лазерний пучок обертальним дзеркалом 4 спрямовується крізь поляризаційний фільтр 9–10 у площину поляризаційно-неоднорідного мікроскопічного зображення зразка полікристалічної плівки дегідратованої жовчі 8. У результаті формується інтерференційна картина або інтерференційне зображення зразка 8. Сформоване інтерференційне зображення поляризаційно фільтрується шляхом повороту площини пропускання поляризатора-аналізатора 13, який розташований перед цифровою CCD камерою 14.

Методика поляризаційної інтерферометрії розподілів комплексних елементів матриці Джонса містить наступні експериментальні кроки та алгоритмічні дії:

1. Послідовно за допомогою поляризаційного фільтра формуються два колінеарних стани лінійної поляризації в «опромінюючому» (Ir) і «референтному» (Re) паралельних лазерних пучках - $Ir(0^0) - Re(0^0) \equiv p$ і $Ir(90^0) - Re(90^0) \equiv r$.

2. Для кожного сформованого стану лінійної поляризації (p і r) реєструються парціальні інтерференційні картини за допомогою обертання площини пропускання поляризатора-аналізатора 13 на кути $\Omega = 0^0$; $\Omega = 90^0$.

3. Розрахунок елементів матриці Джонса $\{J\}$ (співвідношення (10)) включає послідовне опромінення зразку полікристалічної плівки дегідратованої жовчі лінійно поляризованими пучками з азимутами 0^0 (вектор Джонса $\begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix}$) і 90^0 (вектор Джонса $\begin{pmatrix} 0 \\ 1 \end{pmatrix}$)

$$E^0 = \begin{pmatrix} E_x^0 \\ E_y^0 \end{pmatrix} = \begin{vmatrix} j_{11} & j_{12} \\ j_{21} & j_{22} \end{vmatrix} \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} \Rightarrow \begin{pmatrix} j_{11} \\ j_{21} \end{pmatrix} \Rightarrow \begin{cases} E_x^0 = \begin{vmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 0 \end{vmatrix} \begin{pmatrix} j_{11} \\ j_{12} \end{pmatrix} \Rightarrow j_{11}, \\ E_y^0 = \begin{vmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 1 \end{vmatrix} \begin{pmatrix} j_{11} \\ j_{12} \end{pmatrix} \Rightarrow j_{21}, \end{cases} \quad (19)$$

$$E^{90} = \begin{pmatrix} E_x^{90} \\ E_y^{90} \end{pmatrix} = \begin{vmatrix} j_{11} & j_{12} \\ j_{21} & j_{22} \end{vmatrix} \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \end{pmatrix} \Rightarrow \begin{pmatrix} j_{12} \\ j_{22} \end{pmatrix} \Rightarrow \begin{cases} E_x^{90} = \begin{vmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 0 \end{vmatrix} \begin{pmatrix} j_{12} \\ j_{22} \end{pmatrix} \Rightarrow j_{21}, \\ E_y^{90} = \begin{vmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 1 \end{vmatrix} \begin{pmatrix} j_{12} \\ j_{22} \end{pmatrix} \Rightarrow j_{22}. \end{cases} \quad (20)$$

4. Для кожного експериментального зареєстрованого координатного розподілу величини інтенсивності у парціальних інтерференційних картинах лазерного об'єктного поля зразка плівки жовчі застосовують цифрове двомірне Фур'є перетворення $\Phi(u, v)$ [36–41]

$$\begin{cases} j_{11} \equiv \Phi_x^0 = \frac{1}{A \times B} \sum_{a=0}^{A-1} \sum_{b=0}^{B-1} E_x^0 (E_x^0)^*(a, b) \exp \left[-i2\pi \left(\frac{a \times v}{A} + \frac{b \times v}{B} \right) \right], \\ j_{21} \equiv \Phi_y^0 = \frac{1}{A \times B} \sum_{a=0}^{A-1} \sum_{b=0}^{B-1} E_y^0 (E_y^0)^*(a, b) \exp \left[-i2\pi \left(\frac{a \times v}{A} + \frac{b \times v}{B} \right) \right], \\ j_{21} \equiv \Phi_x^{90} = \frac{1}{A \times B} \sum_{a=0}^{A-1} \sum_{b=0}^{B-1} E_x^{90} (E_x^{90})^*(a, b) \exp \left[-i2\pi \left(\frac{a \times v}{A} + \frac{b \times v}{B} \right) \right], \\ j_{22} \equiv \Phi_y^{90} = \frac{1}{A \times B} \sum_{a=0}^{A-1} \sum_{b=0}^{B-1} E_y^{90} (E_y^{90})^*(a, b) \exp \left[-i2\pi \left(\frac{a \times v}{A} + \frac{b \times v}{B} \right) \right]. \end{cases} \quad (21)$$

де $E_{x,y}^{0,90}$ — ортогональні компоненти комплексної амплітуди для різних орієнтацій площини пропускання поляризатора-аналізатора $\Omega = 0^0$; $\Omega = 90^0$; * — позначає операцію комплексного спряження; (u, v) — просторові частоти і $(a = 1120, b = 960)$ — кількість пікселів цифрової CCD камери.

5. З виразів (21) обчислюють дійсні (Re) та уявні (Im) складові сукупності елементів матриці Джонса

$$Re \begin{cases} j_{11} \equiv \Phi_x^0 = \frac{1}{A \times B} \sum_{a=0}^{A-1} \sum_{b=0}^{B-1} E_x^0 (E_x^0)^*(a, b) \cos \left[2\pi \left(\frac{a \times v}{A} + \frac{b \times v}{B} \right) \right], \\ j_{21} \equiv \Phi_y^0 = \frac{1}{A \times B} \sum_{a=0}^{A-1} \sum_{b=0}^{B-1} E_y^0 (E_y^0)^*(a, b) \cos \left[2\pi \left(\frac{a \times v}{A} + \frac{b \times v}{B} \right) \right], \\ j_{21} \equiv \Phi_x^{90} = \frac{1}{A \times B} \sum_{a=0}^{A-1} \sum_{b=0}^{B-1} E_x^{90} (E_x^{90})^*(a, b) \cos \left[2\pi \left(\frac{a \times v}{A} + \frac{b \times v}{B} \right) \right], \\ j_{22} \equiv \Phi_y^{90} = \frac{1}{A \times B} \sum_{a=0}^{A-1} \sum_{b=0}^{B-1} E_y^{90} (E_y^{90})^*(a, b) \cos \left[2\pi \left(\frac{a \times v}{A} + \frac{b \times v}{B} \right) \right]. \end{cases} \quad (22)$$

$$Im \begin{cases} j_{11} \equiv \Phi_x^0 = \frac{1}{A \times B} \sum_{a=0}^{A-1} \sum_{b=0}^{B-1} E_x^0 (E_x^0)^*(a, b) \sin \left[2\pi \left(\frac{a \times v}{A} + \frac{b \times v}{B} \right) \right], \\ j_{21} \equiv \Phi_y^0 = \frac{1}{A \times B} \sum_{a=0}^{A-1} \sum_{b=0}^{B-1} E_y^0 (E_y^0)^*(a, b) \sin \left[2\pi \left(\frac{a \times v}{A} + \frac{b \times v}{B} \right) \right], \\ j_{21} \equiv \Phi_x^{90} = \frac{1}{A \times B} \sum_{a=0}^{A-1} \sum_{b=0}^{B-1} E_x^{90} (E_x^{90})^*(a, b) \sin \left[2\pi \left(\frac{a \times v}{A} + \frac{b \times v}{B} \right) \right], \\ j_{22} \equiv \Phi_y^{90} = \frac{1}{A \times B} \sum_{a=0}^{A-1} \sum_{b=0}^{B-1} E_y^{90} (E_y^{90})^*(a, b) \sin \left[2\pi \left(\frac{a \times v}{A} + \frac{b \times v}{B} \right) \right]. \end{cases} \quad (23)$$

Принципи пошарового фазового сканування полів комплексних амплітуд полікристалічних плівок дегідратованої жовчі

У реальному випадку багатократного розсіювання (коефіцієнт ослаблення $\tau > 0,01$) в об'ємі полікристалічної плівки дегідратованої жовчі алгоритмічно відтворені ((21)–(23)) Джонс-матричні зображення являють собою результат інтегрального усереднення по сукупності всіх фазових зсувів між ортогональними складовими комплексних амплітуд.

Для «виокремлення» діагностично актуальної складової об'єктного поля, яка сформована актами мінімального розсіювання ($\tau \rightarrow 0,01$), ми використали наступну методику.

1. Шляхом покрокового цифрового сканування φ_k фазового масиву $\varphi_{xy} = \varphi_{xy}^{90} - \varphi_{xy}^0$ у об'єктному полі комплексних амплітуд визначаються пошарові Джонс-матричні зображення $j_{ik}(\varphi_{xy}, E_x^0, E_y^0, E_x^{90}, E_y^{90})$ надмолекулярних мереж полікристалічних плівок дегідратованої жовчі.

$$\begin{cases} E_x^0 \rightarrow |E_x^0(\Omega = 0^0)|, \\ E_y^0 \rightarrow |E_y^0(\Omega = 90^0)| \exp(i\varphi_{xy}^0), \\ \varphi_{xy}^0 = \varphi_y^0 - \varphi_x^0. \end{cases} \quad (24)$$

$$\begin{cases} E_x^{90} \rightarrow |E_x^{90}(\Omega = 0^0)|, \\ E_y^{90} \rightarrow |E_y^{90}(\Omega = 90^0)| \exp(i\varphi_{xy}^{90}), \\ \varphi_{xy}^{90} = \varphi_y^{90} - \varphi_x^{90}. \end{cases} \quad (25)$$

2. З одержаної сукупності пошарових координатних розподілів (a, b) комплексних Джонс-матричних елементів $j_{ik}(\varphi_{xy}, E_x^0, E_y^0, E_x^{90}, E_y^{90})$ обчислюються дійсні ($Re j_{ik}(a, b)$) і уявні ($Im j_{ik}(a, b)$) складові Джонс-матричних зображень, які переважно сформовані актами одноразової взаємодії (співвідношення (13)–(18)) з надмолекулярними мережами зразків полікристалічних плівок дегідратованої жовчі.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Етичне схвалення та згода на участь

Це дослідження було проведено відповідно до принципів Гельсінської декларації, а також відповідно до вимог Міжнародної конференції з гармонізації — належної клінічної практики та місцевих регуляторних вимог. Етичне схвалення було отримано від Етичного комітету Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці (протокол №7 від 25.03.2025).

Коротка характеристика зразків жовчі

Для дослідження використовувалася пухирна жовч (порції В) здорових донорів (контрольна група 1, 21 зразок) і пацієнтів з жовчнокам'яною хворобою (дослідна група 2, 21 зразок). Для отримання цієї порції проводилося традиційне дуоденальне зондування за допомогою одноразових дуоденальних зондів. Розкриття сфінктера та скорочення жовчного міхура досягалося введенням через зонд збудників скорочення жовчного міхура: 33% розчину магнію сульфату, 10% розчину сорбіту. Отриману жовч виливали на чашки Петрі та відсмоктували клаптики слизу. Нативні препарати полікристалічних плівок жовчі виготовлялися шляхом нанесення краплі рідини (об'ємом 30 мкл) на предметне оптично однорідне скло з подальшою її дегідратацією при кімнатній температурі.

Оптико-геометричні параметри зразків полікристалічних плівок дегідратованої жовчі донорів і хворих пацієнтів наведені у таблиці 1.

Таблиця 1. Оптико-геометричні параметри плівок дегідратованої жовчі

Table 1. Optical-geometrical parameters of dehydrated bile films

Параметри	
Кількість зразків q	42
Геометрична товщина h , мкм	50 ± 5 мкм
Коефіцієнт ослаблення τ	$0,09 \pm 0,01$

Вимірювання геометричної товщини h експериментальних зразків здійснювалося шляхом послідовного фокусування об'єктиву світлового мікроскопа на передню і задню поверхні плівок дегідратованої жовчі. Коефіцієнт ослаблення τ вимірювали згідно зі стандартним методом фотометрії ослаблення інтенсивності освітлювального променя [47] з використанням інтегральної сфери для вимірювання інтенсивності розсіяного випромінювання [48].

Наведені у таблиці 1 параметри вказують на наявність багатократного розсіювання в об'ємі полікристалічних плівок ($\tau \gg 0,01$). Для визначення оптимальної величини фазового зсуву ($\varphi(\tau \rightarrow 0,01)$), яка відповідає одноразово розсіяній компоненті, ми скористалися наступними модельними припущеннями. При однократному ($q = 1$) проходженні лазерного випромінювання з довжиною хвилі $\lambda = 0,6328$ мкм скрізь шар з геометричною товщиною $h \sim 50$ мкм і оптичним двопрomezаломленням $\Delta n \sim 1,5 \times 10^{-3}$ формується фазовий зсув (співвідношення (1), (2), (12)) між ортогональними складовими амплітуди $\varphi \cong \frac{\pi}{4}$.

У нашій роботі ми представили експериментальні результати для двох «граничних» випадків — алгоритмічного відтворення Джонс-матричних зображень за розподілами

комплексних амплітуд дифузно і однократно розсіяних ($\varphi = \frac{\pi}{4}$) компонент об'єктного поля полікристалічних плівок дегідратованої жовчі.

На першому етапі з метою установлення основних закономірностей формування і фазової трансформації координатної і статистичної структури $Re(j_{ik}(a, b))$ і $Im(j_{ik}(a, b))$ досліджувалися зразки полікристалічних плівок дегідратованої жовчі здорових донорів.

«Дійсні» Джонс-матричні зображення дегідратованих плівок жовчі

Результати поляризаційно-інтерференційного картографування з алгоритмічним відтворенням пошарових розподілів величини елементів дійсної складової Джонс-матричних зображень $Re(j_{ik}(a, b))$ (фрагменти (1), (2) і (5), (6)) і гістограм $G(Re(j_{ik}))$ (фрагменти (3), (4) і (7), (8)) дегідратованої плівки жовчі наведені на серії рис. 2 та рис. 3.

Аналіз одержаних даних виявив індивідуальну, відмінну від звичайних мікроскопічних зображень, координатну структуру сукупності розподілів матричних елементів $Re(j_{ik}(a, b))$. Річ у тім, що реконструйовані Джонс-матричні зображення (співвідношення (22)), визначається не поглинанням оптичного випромінювання, а специфікою розподілів лінійного і циркулярного двоприменезаломлення (співвідношення (15), (16)). Окрім цього, величини і положення екстремумів гістограм $G(Re(j_{ik}))$ є залежними від величини фазового зсуву φ_k сканування поля комплексних амплітуд дегідратованої полікристалічної плівки жовчі, — рис. 2 і рис. 3, фрагменти (3), (4) і (7), (8). Даний факт підтверджує припущення про можливість фазової селекції компонент об'єктного поля з різною кратністю світлорозсіяння.

Кількісно цей процес характеризують результати статистичного аналізу інтегрального (рис. 2) і фазового (рис. 3) Джонс-матричних зображень $Re(j_{ik}(a, b))$ дегідратованої полікристалічної плівки жовчі, які наведені у таблиці 2.

Таблиця 2. Статистичні моменти 1-го–4-го порядків Z_i , які характеризують координатні розподіли реальних частин Джонс-матричних зображень $Re(j_{ik}(a, b))$

Table 2. Statistical moments of the 1st–4th orders Z_i , which characterize the spatial distributions of the real parts of the Jones-matrix images $Re(j_{ik}(a, b))$

Z_i	$Re\{J_{11}\}$	$Re\{J_{22}\}$	$Re\{J_{12}\}$	$Re\{J_{21}\}$
Z_1	$0,320 \pm 0,017$	$0,360 \pm 0,017$	$0,470 \pm 0,025$	$0,420 \pm 0,025$
Z_2	$0,240 \pm 0,015$	$0,270 \pm 0,014$	$0,330 \pm 0,017$	$0,310 \pm 0,017$
Z_3	$0,310 \pm 0,016$	$0,290 \pm 0,015$	$0,210 \pm 0,012$	$0,250 \pm 0,012$
Z_4	$0,450 \pm 0,027$	$0,410 \pm 0,021$	$0,310 \pm 0,018$	$0,340 \pm 0,018$
$\varphi_k = \pi/4$				
Z_i	$Re\{J_{11}\}$	$Re\{J_{22}\}$	$Re\{J_{12}\}$	$Re\{J_{21}\}$
Z_1	$0,210 \pm 0,012$	$0,190 \pm 0,011$	$0,240 \pm 0,012$	$0,220 \pm 0,012$
Z_2	$0,150 \pm 0,007$	$0,120 \pm 0,007$	$0,190 \pm 0,011$	$0,160 \pm 0,009$
Z_3	$0,590 \pm 0,029$	$0,63 \pm 0,04$	$0,64 \pm 0,03$	$0,71 \pm 0,04$
Z_4	$0,77 \pm 0,04$	$0,82 \pm 0,05$	$0,89 \pm 0,05$	$0,94 \pm 0,06$

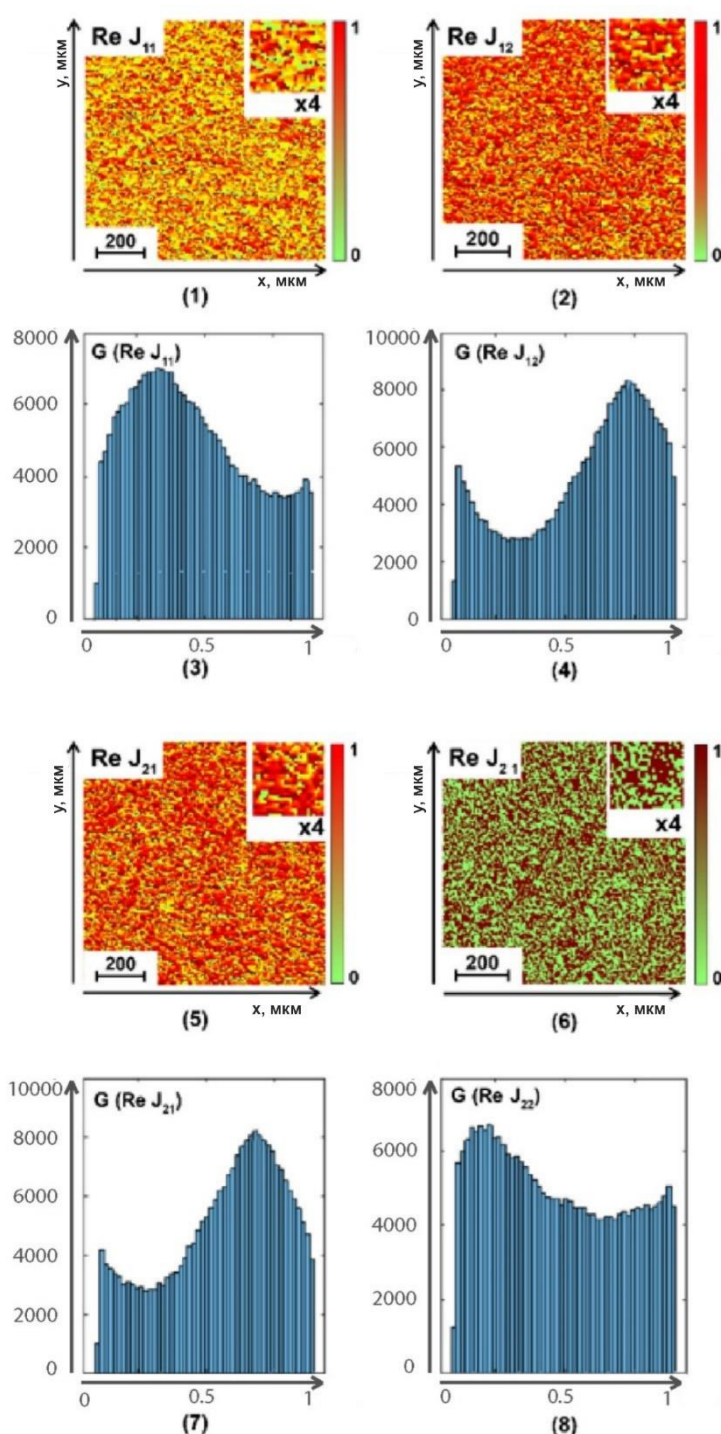


Рис. 2. Координатні мапи (фрагменти (1), (2), (5), (6)) і гістограми (фрагменти (3), (4), (7), (8)) розподілів випадкових значень величини реконструйованих (співвідношення (19)–(21)) реальних складових Джонс-матричних зображень $\text{Re}(J_{ik}(a, b))$ полікристалічної плівки дегідратованої жовчі.

Fig. 2. Coordinate maps (fragments (1), (2), (5), (6)) and histograms (fragments (3), (4), (7), (8)) of the distributions of the random values of the reconstructed (relations (19)–(21)) real components of the Jones-matrix images $\text{Re}(J_{ik}(a, b))$ of a polycrystalline dehydrated-bile film.

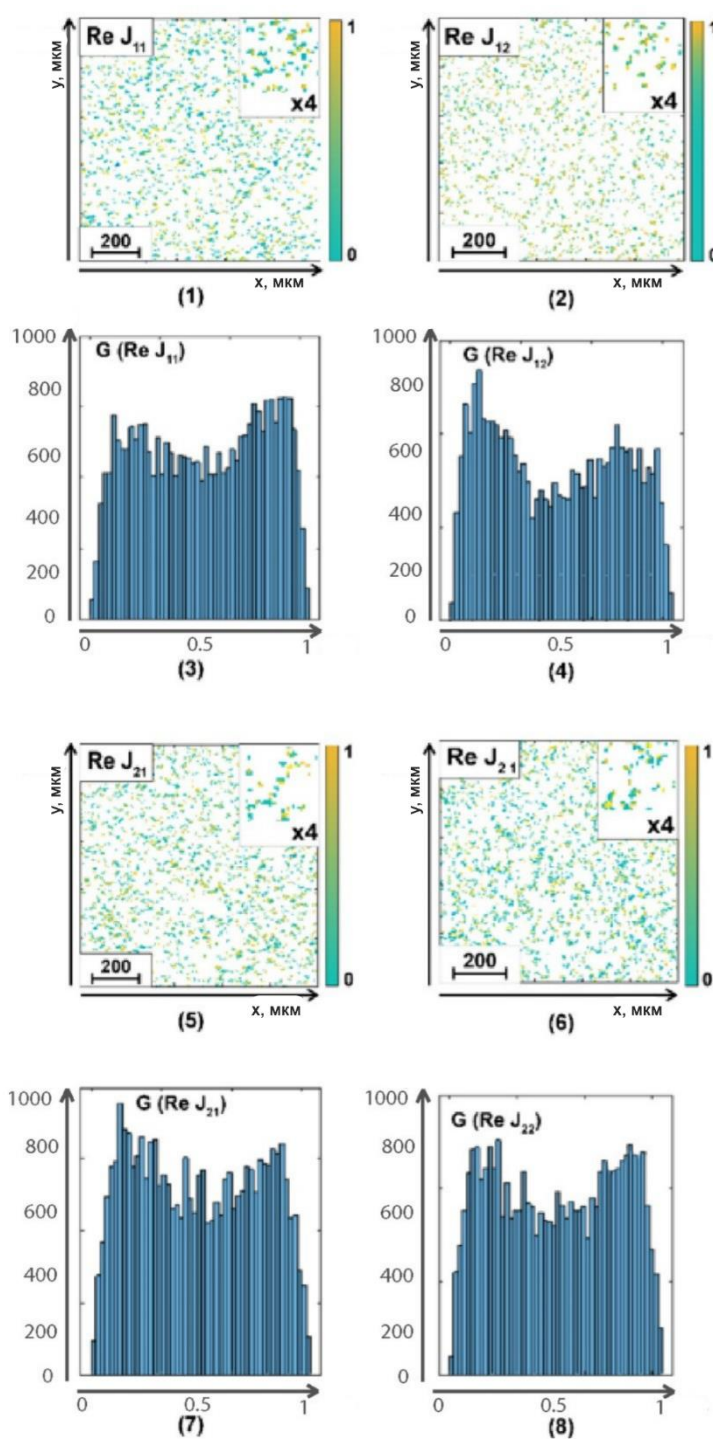


Рис. 3. Координатні мапи (фрагменти (1), (2), (5), (6)) і гістограми (фрагменти (3), (4), (7), (8)) розподілів випадкових значень величини реконструйованих (співвідношення (19)–(21)) у фазовій площині $\varphi = \pi/4$ (співвідношення (22), (23)) реальних складових Джонс-матричних зображень $Re(J_{ik}(a, b))$ полікристалічної плівки дегідратованої жовчі.

Fig. 3. Coordinate maps (fragments (1), (2), (5), (6)) and histograms (fragments (3), (4), (7), (8)) of the distributions of the random values of the reconstructed (relations (19)–(21)) real components of the Jones-matrix images $Re(J_{ik}(a, b))$ in the phase plane $\varphi = \pi/4$ (relations (22), (23)) of a polycrystalline dehydrated-bile film.

Виявлено:

- Статистичну подібність координатних розподілів (a, b) величини дійсної (Re) складової матричних елементів $Z_{i=1\div 4}(Re(J_{11})) \approx Z_{i=1\div 4}(Re(J_{11}))$ і $Z_{i=1\div 4}(Re(J_{12})) \approx Z_{i=1\div 4}(Re(J_{21}))$, — максимальні відмінності між величинами статистичних моментів $Z_{i=1;2;3;4}(Re(j_{ik}(a, b)))$ не перевищують 10%.

- Протилежні тенденції у зміні (зменшені $\downarrow$) величини середнього ($Z_{i=1}$) і дисперсії ($Z_{i=2}$) та (збільшенні $\uparrow$) асиметрії ($Z_{i=3}$) і ексцесу ($Z_{i=4}$), які характеризують трансформацію Джонс-матричних зображень $Re(j_{ik}(a, b))$ у різних фазових площинах $(\varphi_k(a, b))$ полікристалічної плівки жовчі - $\begin{pmatrix} Z_{i=1;2} \downarrow \\ Z_{i=3;4} \uparrow \end{pmatrix}$.

- Величини середнього і дисперсії $Z_{i=1;2}(Re(j_{ik}(a, b)))$ зі збільшенням величини параметру фазового сканування $\varphi_k \uparrow$ незначно зменшуються (у межах від 30% до 50%).

- Величини статистичних моментів вищих порядків $Z_{i=3;4}(Re(j_{ik}(a, b)))$, які характеризують асиметрію та ексцес розподілів величини дійсної складової матричних елементів $Re(j_{ik})$, зі збільшенням величини параметру фазового сканування $\varphi_k \uparrow$ суттєво зростають до 2-х ($j_{11;22}(a, b)$) і 3-х ($j_{12;21}(a, b)$) разів.

Одержані результати можна пов'язати із наявними літературними даними досліджень процесів кристалізації жовчі [49–53]. Відомо, що жовч являє собою оптично гомогенний міцелярний розчин з невеликою кількістю клітин циліндричного епітелію, лейкоцитів, лейкоцитодів, слизу. До його складу також входять оптично анізотропні голчасті кристали жирних кислот, кристали моногідрату холестерину, кристали білірубінату кальцію.

На етапі дегідратації формується оптично кристалічна — твердо кристалічна фаза, що утворюється за рахунок дендритного та дисклінаційного механізмів кристалізації.

За даними [42, 49–53] нуклеація з жовчі кальцієвими солями холестерину і білірубінату грає ключову роль в утворенні жовчного каміння. Тому в рамках нашого методу відтворення Джонс-матричних зображень такі процеси супроводжуються зростанням параметрів оптичної анізотропії надмолекулярних мереж плівок жовчі. Відповідно до цього найбільш виразно поляризаційні прояви особливостей оптичної анізотропії (співвідношення (15), (16)) характеризуються статистичними моментами $Z_{i=3;4}(Re(j_{11;22}(LB^2 + CB^2 \otimes \oplus)))$ і $Z_{i=3;4}(Re(j_{12;21}(CB^2 \otimes \oplus)))$.

Зі зменшенням величини зсуву фазового сканування $\varphi_k \downarrow$ виділяється більш оптично тонкий об'єм дегідратованої плівки жовчі. У результаті має місце зменшення лінійного $LB \downarrow$ і циркулярного $CB \otimes \oplus \downarrow$ двопроменезаломлення дегідратованих плівок жовчі.

У результаті змінюється статистика Джонс-матричних зображень $Re(j_{11;22}(LB^2 + CB^2 \otimes \oplus)) - \begin{pmatrix} Z_{i=1;2} \downarrow \\ Z_{i=3;4} \uparrow \end{pmatrix}$ і $Re(j_{12;21}(CB^2 \otimes \oplus)) - \begin{pmatrix} Z_{i=1;2} \downarrow \\ Z_{i=3;4} \uparrow \end{pmatrix}$.

Кількісно найбільш чутливими до таких змін полікристалічної архітекtonіки виявилися статистичні моменти 3-го і 4-го порядків, які характеризують асиметрію та ексцес координатних розподілів дійсних складових парціальних елементів $Re(j_{12;21}(CB^2 \otimes \oplus))$ матриці Джонса.

«Уявні» Джонс-матричні зображення дегідратованих плівок жовчі

Рис. 4 та рис. 5 ілюструють результати Джонс матричного поляризаційно-інтерференційного картографування уявних складових Джонс-матричних зображень $Im(j_{ik}(a, b))$ (фрагменти (1), (2) і (5), (6)) і гістограм $G(Im(j_{ik}))$ (фрагменти (3), (4) і (7), (8)) дегідратованої плівки жовчі.

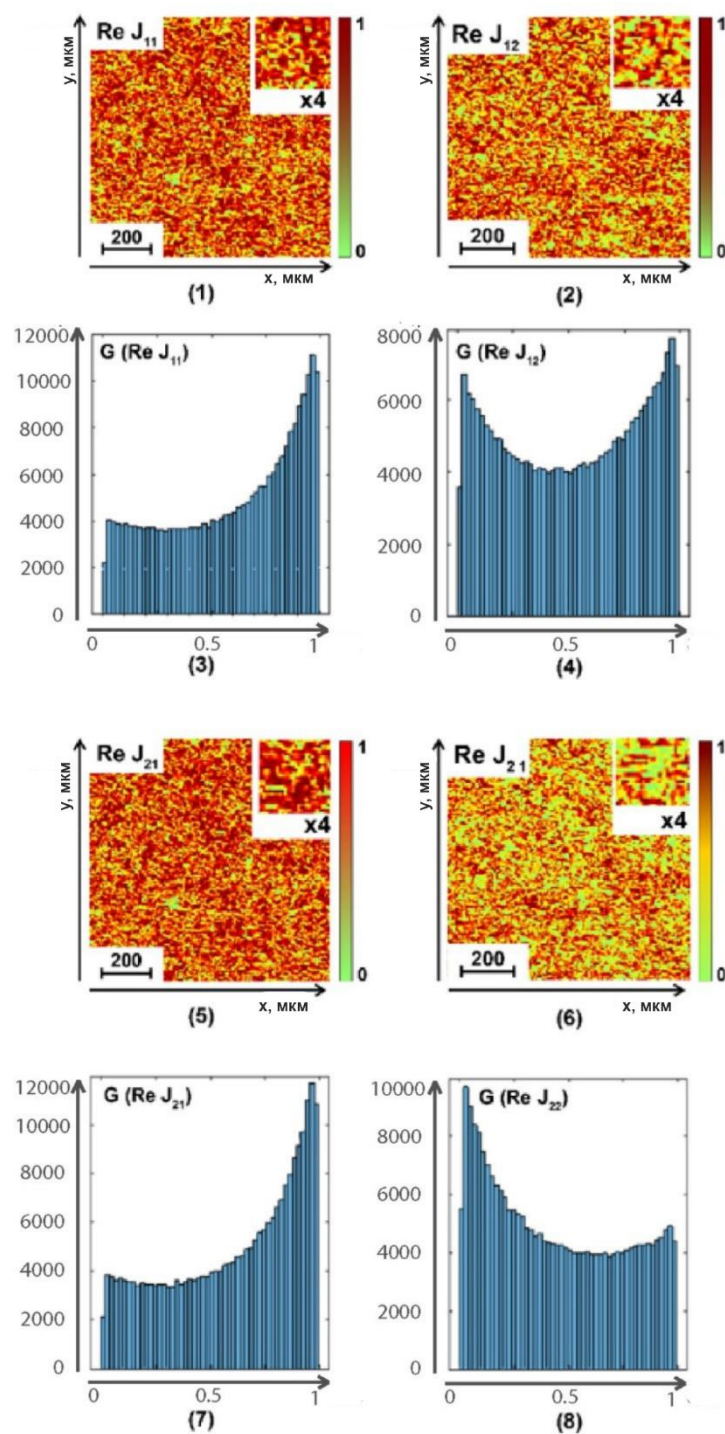


Рис. 4. Координатні мапи (фрагменти (1), (2), (5), (6)) і гістограми (фрагменти (3), (4), (7), (8)) розподілів випадкових значень величини реконструйованих (співвідношення (19)–(21)) уявних складових Джонс-матричних зображень $Im(J_{ik}(a, b))$ полікристалічної плівки дегідратованої жовчі.

Fig. 4. Coordinate maps (fragments (1), (2), (5), (6)) and histograms (fragments (3), (4), (7), (8)) of the distributions of the random values of the reconstructed (relations (19)–(21)) imaginary components of the Jones-matrix images $Im(J_{ik}(a, b))$ of a polycrystalline dehydrated-bile film.

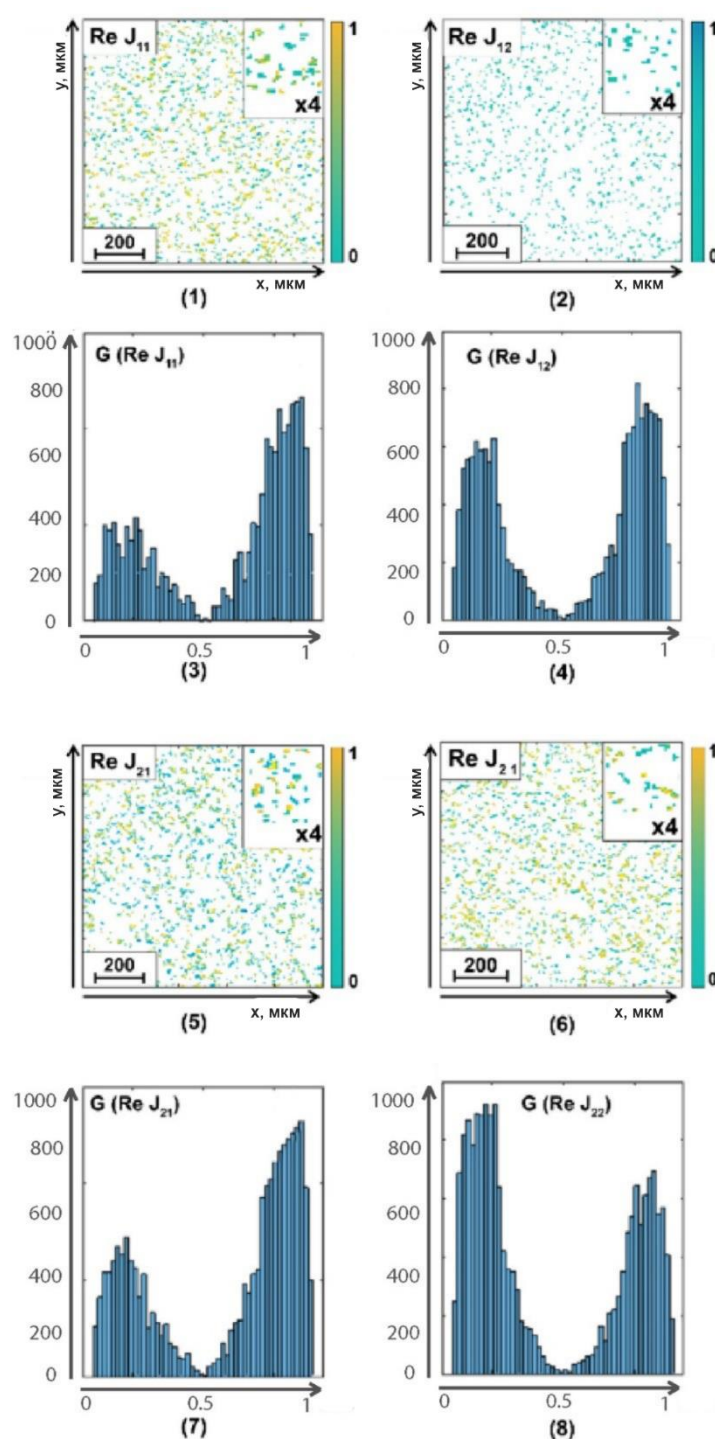


Рис. 5. Координатні мапи (фрагменти (1), (2), (5), (6)) і гістограми (фрагменти (3), (4), (7), (8)) розподілів випадкових значень величини реконструйованих (співвідношення (19)–(21)) у фазовій площині $\varphi = \pi/4$ (співвідношення (22), (23)) уявних складових Джонс-матричних зображень $Im(J_{ik}(a, b))$ полікристалічної плівки дегідратованої жовчі.

Fig. 5. Coordinate maps (fragments (1), (2), (5), (6)) and histograms (fragments (3), (4), (7), (8)) of the distributions of the random values of the reconstructed (relations (19)–(21)) imaginary components of the Jones-matrix images $Im(J_{ik}(a, b))$ in the phase plane $\varphi = \pi/4$ (relations (22), (23)) of a polycrystalline dehydrated-bile film.

Аналіз одержаних даних виявив:

- Кореляцію між модельними (співвідношення (17)–(18)) і експериментальними даними про структуру сукупності уявної складової Джонс-матричних зображень $Im(j_{ik}(a, b))$ полікристалічних мереж дегідратованої плівки жовчі — $Im(j_{11}(a, b)) \approx Im(j_{22}(a, b))$ і $Im(j_{12}(a, b)) \approx Im(j_{21}(a, b))$, — рис. 4 і рис. 5, фрагменти (1), (2) і (5), (6).
- Структура сукупності гістограм $G(Im(J_{11;12;21;22}))$ ймовірнісних розподілів випадкових значень $Im(J_{11;12;21;22})$ полікристалічної плівки дегідратованої жовчі має асиметричну за розташуванням і величиною екстремумів побудову, — рис. 4 і рис. 5, фрагменти (3), (4) і (7), (8).
- При фазовому пошаровому скануванні об'єктного поля, що сформоване в об'ємі оптично анізотропної полікристалічної плівки жовчі, має місце значна залежність (трансформація величини і положення екстремумів, діапазонів зміни гістограм $G(Im(J_{ik}))$) від зміни величини фазового зсуву φ_k , — рис. 4 і рис. 5, фрагменти (3), (4) і (7), (8).

Таблиця 3 ілюструє кількісні дані статистичного аналізу, що характеризують сценарії фазової трансформації Джонс-матричних зображень $Im(J_{ik}(a, b))$ полікристалічної плівки жовчі.

Таблиця 3. Статистичні моменти 1-го–4-го порядків Z_i , які характеризують координатні розподіли уявних частин Джонс-матричних зображень полікристалічної плівки дегідратованої жовчі

Table 3. Statistical moments of the 1st–4th orders Z_i , characterizing the spatial distributions of the imaginary parts of the Jones-matrix images of a polycrystalline dehydrated-bile film

Z_i	$Im\{J_{11}\}$	$Im\{J_{22}\}$	$Im\{J_{12}\}$	$Im\{J_{21}\}$
Z_1	$0,220 \pm 0,021$	$0,270 \pm 0,017$	$0,280 \pm 0,017$	$0,240 \pm 0,017$
Z_2	$0,140 \pm 0,008$	$0,160 \pm 0,008$	$0,170 \pm 0,008$	$0,150 \pm 0,008$
Z_3	$0,330 \pm 0,016$	$0,310 \pm 0,016$	$0,350 \pm 0,016$	$0,320 \pm 0,016$
Z_4	$0,490 \pm 0,021$	$0,420 \pm 0,021$	$0,450 \pm 0,021$	$0,480 \pm 0,021$
$\varphi_k = \pi/4$				
Z_i	$Im\{J_{11}\}$	$Im\{J_{22}\}$	$Im\{J_{12}\}$	$Im\{J_{21}\}$
Z_1	$0,110 \pm 0,005$	$0,160 \pm 0,009$	$0,160 \pm 0,009$	$0,130 \pm 0,005$
Z_2	$0,070 \pm 0,003$	$0,090 \pm 0,017$	$0,110 \pm 0,007$	$0,080 \pm 0,005$
Z_3	$0,96 \pm 0,06$	$1,03 \pm 0,06$	$0,79 \pm 0,04$	$0,83 \pm 0,05$
Z_4	$1,71 \pm 0,09$	$1,78 \pm 0,09$	$1,37 \pm 0,07$	$1,44 \pm 0,08$

У рамках статистичного аналізу виявлено:

- Незначні відмінності (до 10%–15%) між значеннями сукупності статистичних параметрів $Z_{i=1;2;3;4}(Im(J_{ik}(a, b)))$.
- Зі збільшенням величини параметру фазового сканування $\varphi_k \uparrow$ значення центральних статистичних моментів 1-го і 2-го порядків зменшуються $Z_{i=1;2}(Im(J_{ik}(a, b))) \downarrow$ в 1,5–2 рази. Статистичні моменти вищих порядків $Z_{i=3;4}(Im(J_{ik}(a, b)))$, які характеризують асиметрію та ексцес розподілів $Im(J_{11;12;21;22})$, є максимально чутливими і досить стрімко зростають у межах від 3 до 4 разів.

З фізичної точки зору одержані результати можна пояснити тим, що величина уявної складової Джонс матричних елементів $Im(J_{11;22})$ і $Im(J_{12;21})$ переважним чином визначається варіаціями значень параметрів лінійного двопроменезаломлення $LB_{0;90}$ (співвідношення (17)) і $LB_{45;135}$ (співвідношення (18)), відповідно. У результаті

відмінності між значеннями центральних статистичних моментів $Z_{i=1,2,3,4}(Im(J_{ik}))$, які характеризують розподіли $Im(J_{11,22}(LB_{0,90}))$ і $Im(J_{12,21}(LB_{45,135}))$ є незначними.

У результаті фазового сканування $\varphi_k \downarrow$, з інтегральних орієнтаційних розподілів $\gamma(a, b)$ виділяються різні за розподілами підансамблі напрямів оптичних осей біологічних кристалів — $(\gamma_{0,90;min} \leq \gamma_{0,90} \leq \gamma_{0,90;max})$ і $(\gamma_{45,135;min} \leq \gamma_{45,135} \leq \gamma_{45,135;max})$. Відповідно до цього змінюється статистична структура Джонс-матричних зображень дегідратованих плівок жовчі - $Im(J_{11,22}(\varphi_k, LB_{0,90}))$ і $Im(J_{12,21}(\varphi_k, LB_{45,135}))$. Кількісно це проявляється у порушенні співрозмірності величин центральних статистичних моментів $Z_{i=1,2}(Im(J_{11,22}(\varphi_k))) < Z_{i=1,2}(Im(J_{12,21}(\varphi_k)))$ і $Z_{i=3,4}(Im(J_{11,22}(\varphi_k))) > Z_{i=3,4}(Im(J_{12,21}(\varphi_k)))$.

Біомедичне застосування

У даному розділі наведено приклад дослідження ефективності методу поширювального Джонс-матричного картографування для диференціальної діагностики зразків дегідратованих плівок жовчі здорових донорів (контрольна група 1, 21 зразок) і пацієнтів з жовчнокам'яною хворобою (дослідна група 2, 21 зразок), — таблиця 1.

У межах обох груп обчислювалися середні значення ($\tilde{Z}_{3,4}$), статистичні похибки ($\pm\sigma_{3,4}$) і статистична значимість (p) виявлених найбільш чутливих маркерів (таблиця 2 і таблиця 3), які характеризують асиметрію і ексцес розподілів величини $Re(J_{11,12}(\varphi_k = \pi/4))$ і $Im(J_{11,12}(\varphi_k = \pi/4))$. Далі, згідно постулатів доказової медицини [54] визначалася збалансована точність диференціальної діагностики жовчнокам'яної хвороби (ЖКХ) за наступним алгоритмом

$$Ac = ((C - c) + (D - d)) / (C + D), \quad (24)$$

де c — кількість хибно позитивних заключень; d — кількість хибно негативних заключень.

Одержані результати представлені у таблиці 4.

Таблиця 4. Статистичні параметри розподілів дійсної і уявної частин матричних елементів J_{11} і J_{12} дегідратованих плівок жовчі здорових донорів і хворих на ЖКХ

Table 4. Statistical parameters of the distributions of the real and imaginary parts of the matrix elements J_{11} and J_{12} of dehydrated bile films from healthy donors and patients with gallstone disease (GSD)

Z_i	$Re\{J_{11}(\pi/4)\}$		$Ac, \%$	$Re\{J_{12}(\pi/4)\}$		$Ac, \%$
	Група 1	Група 2		Група 1	Група 2	
$\tilde{Z}_3 \pm \sigma_3$	0,590±0,029	0,380±0,023	92,9	0,69±0,03	0,320±0,017	97,6
p	$p < 0,001$			$p < 0,001$		
$\tilde{Z}_4 \pm \sigma_4$	0,78±0,04	0,51±0,04	92,9	0,91±0,05	0,450±0,024	97,6
p	$p < 0,001$			$p < 0,001$		
Z_i	$Im\{J_{11}(\pi/4)\}$		$Ac, \%$	$Im\{J_{12}(\pi/4)\}$		$Ac, \%$
	Група 1	Група 2		Група 1	Група 2	
$\tilde{Z}_3 \pm \sigma_3$	0,96±0,06	0,71±0,04	83,3	0,79±0,04	0,41±0,02	90,5
p	$p < 0,001$			$p < 0,001$		
$\tilde{Z}_4 \pm \sigma_4$	1,71±0,08	1,38±0,07	83,3	1,43±0,07	0,89±0,03	90,5
p	$p < 0,001$			$p < 0,001$		

Установлено наступні максимальні рівні діагностичної точності диференціальної діагностики ЖКХ шляхом статистичного аналізу у фазовій площині $\varphi_k = \pi/4$:

- розподіли $Re(J_{11}(LB^2 + CB^2_{\otimes;\oplus}))$ — точність диференціальної діагностики складає $Ac(Z_{i=3;4}) = 92,9\%$;
- розподіли $Re(J_{12}(CB^2_{\otimes;\oplus}))$ — максимальна точність диференціальної діагностики складає $Ac(Z_{i=3;4}) = 97,6\%$;
- розподіли $Im(J_{11}(LB_{0;90})) - Ac(Z_{i=3;4}) = 83,3$;
- розподіли $Im(J_{12}(LB_{45;135})) - Ac(Z_{i=3;4}) = 90,5\%$.

З фізичної точки одержані результати можна пояснити тим, що для патологічного стану (ЖКХ) процес кристалізації жовчі супроводжується ростом концентрації білірубінату і карбонату кальцію ($CB_{\otimes;\oplus} \uparrow$), а також підвищенням лінійного двопронезаломлення ($LB \uparrow$) кристалів жирних кислот моногідрату холестерину. За рахунок цього зростають величини середнього і дисперсії ($Z_{1;2} \uparrow$), які характеризують розподіли величин $Re(J_{11}(LB^2 + CB^2_{\otimes;\oplus}))$, $Re(J_{12}(CB^2_{\otimes;\oplus}))$ і $Im(J_{11}(LB_{0;90}))$, $Im(J_{12}(LB_{45;135}))$ плівок дегідратованої жовчі пацієнтів хворих на ЖКХ. Навпаки, величини найбільш чутливих до змін параметрів оптичної анізотропії (таблиця 2 і таблиця 3) статистичних маркерів $Z_{3;4} \downarrow$, значно зменшуються. За рахунок цього у межах контрольної і дослідної груп зразків жовчі формуються максимальні відмінності значеннями асиметрії і ексцесу розподілів $Re(J_{11;22})$ і $Im(J_{11;22})$.

З порівняльного аналізу одержаних даних випливає, що домінуючою патологічною ознакою ЖКХ є зростання впливу сферолітної компоненти $CB_{\otimes;\oplus} \uparrow$ самозібраної полікристалічної мережі у процесі дегідратації плівок дегідратованої жовчі. На даний факт вказує максимальна відмінність між статистичними маркерами $Z_{3;4}(Re\{J_{12}(CB_{\otimes;\oplus}, \pi/4)\})$ для обох груп. За рахунок цього і досягається найвищий рівень (97,6%) збалансованої точності диференціальної діагностики ЖКХ.

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Представлені та фізично проаналізовані результати експериментальної апробації розробленого нами методу поляризаційно-інтерференційного картографування з цифровим голографічним відтворенням розподілів комплексних амплітуд фазово-неоднорідних об'єктних полів і алгоритмічним обчисленням у серії фазових площин координатних розподілів величини дійсної та уявної складових елементів матриці Джонса плівок полікристалічних плівок дегідратованої жовчі.

1. Статистичний аналіз координатних розподілів величини дійсної (Re) і уявної (Im) складової Джонс-матричних елементів дегідратованих плівок біологічних рідин виявив відмінність від нормальної ($Z_{i=3;4} = 0$) статистики набору Джонс матричних зображень $\begin{pmatrix} Re(j_{ik}(m \times n)) \\ Im(j_{ik}(m \times n)) \end{pmatrix}$ — всі центральні статистичні моменти 1-го–4-го порядків відмінні від нуля — $Z_{i=1;2;3;4} \begin{pmatrix} Re(j_{ik}(m \times n)) \\ Im(j_{ik}(m \times n)) \end{pmatrix} \neq 0$.

2. Установлені сценарії трансформації статистичної структури сукупності Джонс-матричних зображень у різних шарах полікристалічної складової дегідратованих плівок жовчі — $Z_{i=1;2} \left\{ \varphi_k \downarrow, \begin{pmatrix} Re(j_{ik}(m \times n)) \\ Im(j_{ik}(m \times n)) \end{pmatrix} \right\} \downarrow$ і $Z_{i=3;4} \left\{ \varphi_k, \begin{pmatrix} Re(j_{ik}(m \times n)) \\ Im(j_{ik}(m \times n)) \end{pmatrix} \right\} \uparrow$.

3. Визначено сукупність найбільш чутливих до змін надмолекулярних мереж плівок дегідратованої жовчі діагностичних маркерів — статистичні моменти 3-го і 4-го порядків — $Z_{i=3;4} \left\{ \varphi, \left(\begin{matrix} Re(j_{ik}(m \times n)) \\ Im(j_{ik}(m \times n)) \end{matrix} \right) \right\}$.

4. Установлені наступні максимальні діапазони зміни величини $Z_{i=3;4} \left\{ \left(\begin{matrix} Re(j_{ik}(m \times n)) \\ Im(j_{ik}(m \times n)) \end{matrix} \right) \right\}$ зі збільшенням кроку фазового сканування φ_k — від 5 до 8 разів.

ВИСНОВКИ

1. Розроблена аналітична Джонс-матрична модель взаємодії поляризованого лазерного випромінювання з полікристалічними дегідратованими плівками жовчі.

2. Установлені та фізично обґрунтовані діагностично актуальні взаємозв'язки між параметрами лінійного і циркулярного двопротенезаломлення полікристалічних дегідратованих плівок жовчі та дійсною і уявною складовими елементів матриці Джонса.

3. Експериментально апробована нова техніка поляризаційно-інтерференційної реконструкції та пошарового фазового сканування об'єктних полів комплексних амплітуд з алгоритмічним відтворенням дійсної та уявної складових Джонс-матричних зображень полікристалічних плівок дегідратованої жовчі.

4. Продемонстрована висока точність (до 97,6%) Джонс-матричної диференціальної діагностики жовчнокам'яної хвороби.

ПОДЯКА

Дослідження виконано за підтримки гранту Національного фонду досліджень України №2023.03/0174.

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Authors' ORCID ID

Юрій Ушенко  <https://orcid.org/0000-0003-1767-1882>

Ірина Солтис  <https://orcid.org/0000-0003-2156-7404>

Василь Гарасим  <https://orcid.org/0009-0009-4284-2736>

Олександр Салега  <https://orcid.org/0000-0002-0735-3920>

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ghosh N. Tissue polarimetry: concepts, challenges, applications, and outlook. J Biomed Opt. 2011;16(11):110801. <https://doi.org/10.1117/1.3652896>
2. Jacques SL. Polarized light imaging of biological tissues. In: Boas D, Pitris C, Ramanujam N, editors. Handbook of Biomedical Optics. 2nd ed. CRC Press; 2011. p. 649–69. <https://doi.org/10.1201/b10951-34>
3. Layden D, Ghosh N, Vitkin IA. Quantitative polarimetry for tissue characterization and diagnosis. In: Wang RK, Tuchin VV, editors. Advanced Biophotonics: Tissue Optical Sectioning. CRC Press; 2013. p. 73–108. <https://doi.org/10.1201/b15256-6>
4. Vitkin A, Ghosh N, de Martino A. Tissue Polarimetry. In: Andrews DL, editor. Photonics: Scientific Foundations, Technology and Applications. John Wiley & Sons; 2015. p. 239–321. <https://doi.org/10.1002/9781119011804.ch7>
5. Pishak VP, Ushenko AG, Gryhoryshyn P, Yermolenko SB, Rudeychuk VM, Pishak OV. Study of polarization structure of biospeckle fields in crosslinked tissues of human organism: 1. Vector structure of skin biospeckles. Proc SPIE Int Soc Opt Eng. 1997;418:418–24. <https://doi.org/10.1117/12.295715>
6. Ushenko AG. Depolarization of a laser emission field as the correlation development of its polarization structure. Int Conf Correlation Opt. 1997;3317:331–39. <https://doi.org/10.1117/12.295701>

7. Ushenko AG, Burkovets DN, Yermolenko SB, Arkheliyuk AD, Pishak VP, Yuzko AM, et al. Stokes polarimetry of biotissues. Fourth Int Conf Correlation Opt. 1999;3904:527–33. <https://doi.org/10.1117/12.370448>
8. Józwicki R, Patorski K, Angelsky OV, Ushenko AG, Burkovets DN, Ushenko YA. Automatic polarimetric system for early medical diagnosis by biotissue testing. Opt Appl. 2002;32(4):603–12. Available from: https://www.dbc.wroc.pl/Content/40764/PDF/optappl_3204p603.pdf
9. Ushenko AG, Pishak VP. Coherent-domain optical methods: biomedical diagnostics, environmental and material science. In: Laser Polarimetry of Biological Tissue. Principles and Applications. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2004. p. 67–93. https://doi.org/10.1007/0-387-29989-0_3
10. Olar EI, Ushenko AG, Ushenko YA. Correlation microstructure of the Jones matrices for multifractal networks of biotissues. Laser Phys. 2004;14(7):1012–18. <https://doi.org/10.1117/12.797380>
11. Yermolenko S, Ushenko A, Ivashko P, Goudail F, Gruia I, Gavrilă C, et al. Spectropolarimetry of cancer change of biotissues. Ninth Int Conf Correlation Opt. 2009;7388:404–10. <https://doi.org/10.1117/12.853585>
12. Ushenko AG, Fediv AI, Marchuk YF. Correlation and fractal structure of Jones matrices of human bile secret. Eur Conf Biomed Opt. 2009;7368_1Q. https://doi.org/10.1364/ecbo.2009.7368_1q
13. Angelsky OV, Ushenko AG, Ushenko YA, Pishak VP, Peresunko AP. Statistical, Correlation, and Topological Approaches in Diagnostics of the Structure and Physiological State of Birefringent Biological Tissues. In: Handbook of Photonics for Biomedical Science. CRC Press; 2010. p. 283–322. <https://doi.org/10.1201/9781439806296>
14. Angelsky OV, Polyanskii PV, Mokhun II, Zenkova CY, Bogatyryova HV, Felde ChV, et al. Optical measurements: polarization and coherence of light fields. In: Modern Metrology Concerns. Luigi Cocco, ed. 2012. p. 263–316. <https://doi.org/10.5772/36553>
15. Ushenko AG, Dubolazov OV, Ushenko VA, Novakovskaya OY, Olar OV. Fourier polarimetry of human skin in the tasks of differentiation of benign and malignant formations. Appl Opt. 2016;55(12):B56–B60. <https://doi.org/10.1364/AO.55.000B56>
16. Hunter R. Foundations of Colloid Science. Clarendon Press, Oxford University Press; 2001. p. 806. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00170-X](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00170-X)
17. Chen X, Chen PG, Ouazzani J, Liu Q. Numerical simulations of sessile droplet evaporating on heated substrate. Eur Phys J Spec Top. 2017;226(6):1325–35. <https://doi.org/10.1140/epjst/e2016-60203-y>
18. Dash S, Garimella SV. Droplet evaporation on heated hydrophobic and superhydrophobic surfaces. Phys Rev E. 2014;89(042402):1–8. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.89.042402>
19. Gleason K, Putnam SA. Microdroplet evaporation with a forced pinned contact line. Langmuir. 2014;30(34):10548–55. <https://doi.org/10.1021/la5020863>
20. Hu H, Larson RG. Evaporation of a sessile droplet on a substrate. J Phys Chem B. 2020;106:1334–44. <https://doi.org/10.1021/la501770g>
21. Serra J. Image Analysis and Mathematical Morphology. Academic Press, London. 1982. p. 610. <https://doi.org/10.1002/cyto.990040213>
22. Shirvaikar M, Trivedi M. Developing texture-based image clutter measures for object detection. Opt Eng. 1992;31(12):2628–39. <https://doi.org/10.1117/12.60013>
23. Thiele U. Patterned deposition at moving contact lines. Adv Colloid Interface Sci. 2014;206:399–413. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.11.002>
24. Ushenko VO, Vanchuliak OYa, Sakhnovskiy MY. Polarization-interference mapping of biological fluids polycrystalline films in differentiation of weak changes of optical anisotropy. Proc SPIE. 2017;10396:103962O. <https://doi.org/10.1117/12.2273794>
25. Trifonyuk L, Sdobnov A, Baranowski W, Ushenko V, Olar O, Dubolazov A., et al. Differential Mueller matrix imaging of partially depolarizing optically anisotropic biological tissues. Lasers Med Sci. 2020;35:877–91. <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02878-2>
26. Ushenko AG, Dubolazov AV, Ushenko VA, Ushenko YA, Pidkamin LY, Soltys IV., et al. Mueller-matrix mapping of optically anisotropic fluorophores of molecular biological tissues in the diagnosis of death causes. Proc SPIE. 2016;9971:99712L. <https://doi.org/10.1117/12.2237662>
27. Ushenko VA, Pavlyukovich ND, Trifonyuk L. Spatial-frequency azimuthally stable cartography of biological polycrystalline networks. Int J Opt. 2013;2013:683174. <https://doi.org/10.1155/2013/683174>
28. Dubolazov AV, Pashkovskaya NV, Ushenko YA, Marchuk YF, Ushenko VA, Novakovskaya OY. Birefringence images of polycrystalline films of human urine in early diagnostics of kidney pathology. Appl Opt. 2016;55:B85–B90. <https://doi.org/10.1364/AO.55.000B85>
29. Ushenko AG, Pashkovskaya NV, Dubolazov OV, Ushenko YA, Marchuk YF, Ushenko VA. Mueller matrix images of polycrystalline films of human biological fluids. Rom Rep Phys. 2015;67(4):1467–79. Available from: https://rrp.nipne.ro/2015_67_4/A26.pdf

30. Lee HR, Lotz C, Groeber-Becker FK, Dembski S, Novikova T. Digital histology with Mueller polarimetry and FastDBSCAN. *Appl Opt.* 2022;61(32):9616–24. <https://doi.org/10.1364/AO.461732>
31. Kim M, Lee HR, Ossikovski R, Malfait-Jobart A, Lamarque D, Novikova T. Optical diagnosis of gastric tissue biopsies with Mueller microscopy and statistical analysis. *J Eur Opt Soc Rapid Publ.* 2022;18(2):10. <https://doi.org/10.1051/jeos/2022011>
32. Lee HR, Li P, Yoo TSH, Lotz C, Groeber-Becker FK, Dembski, et al. Digital histology with Mueller microscopy: how to mitigate an impact of tissue cut thickness fluctuations. *J Biomed Opt.* 2019;24(7):076004. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.24.7.076004>
33. Li P, Lee HR, Chandel S, Lotz C, Groeber-Becker FK, Dembski S, et al. Analysis of tissue microstructure with Mueller microscopy: logarithmic decomposition and Monte Carlo modeling. *J Biomed Opt.* 2020;25(1):015002. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.25.1.015002>
34. Lee HR, Yoo TSH, Li P, Lotz C, Groeber-Becker FK, Dembski S, et al. Mueller microscopy of anisotropic scattering media: theory and experiments. *Proc SPIE Unconv Opt Imaging.* 2018;10677:1067718. <https://doi.org/10.1117/12.2306943>
35. Ma H, He H, Ramella-Roman JC. Mueller matrix microscopy. In: Ramella-Roman JC, Novikova T, editors. *Polarized Light in Biomedical Imaging and Sensing.* Springer, Cham. 2023. p. 281–320. https://doi.org/10.1007/978-3-031-04741-1_11
36. Ushenko A, Soltys I, Dubolazov A, Ushenko Y, Bilookyi V, Bilookyi O, et al. 3D Jones-matrix thesiography of biological fluid facies. *J Innov Opt Health Sci.* 2025;18(2):2443002. <https://doi.org/10.1142/S1793545824430028>
37. Ushenko A, Dubolazov A, Zheng J, Litvinenko A, Gorsky M, Ushenko Y, et al. 3D polarization-interference holographic histology for wavelet-based differentiation of the polycrystalline component of biological tissues with different necrotic states. *Forensic applications.* *J Biomed Opt.* 2024;29(5):052920. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.29.5.052920>
38. Ushenko A, Zheng J, Litvinenko A, Gorsky M, Wanchuliak O, Dubolazov A, et al. 3D digital polarization-holographic wavelet histology in determining the duration of mechanical damage to the myocardium. *J Biophotonics.* 2024;17(3):e202300372. <https://doi.org/10.1002/jbio.202300372>
39. Ushenko A, Pavlyukovich N, Khukhlina O, Pavlyukovich O, Soltys I, Dubolazov A, et al. Blood plasma film multifractal scanning in COVID-19 consequences diagnostics. *J Biophotonics.* 2024;17(11):e202400356. <https://doi.org/10.1002/jbio.202400356>
40. Ushenko A, Dubolazov A, Zheng J, Bakun O, Gorsky M, Ushenko Y, et al. Mueller matrix polarization interferometry of optically anisotropic architectonics of biological tissue object fields: the fundamental and applied aspects. *Front Phys.* 2024;11:1302254. <https://doi.org/10.3389/fphy.2023.1302254>
41. Ushenko O, Bilookyi O, Zheng J, Dubolazov A, Olar O, Ushenko Y, et al. 3D digital holographic polarimetry of laser speckle fields formed by polycrystalline blood films: a tool for differential diagnosis of thyroid pathology. *Front Phys.* 2024;12:1426469. <https://doi.org/10.3389/fphy.2024.1426469>
42. Thamer SJ. Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of Gallstone Disease: A Brief Review. *Biomed Chem Scsi.* 2022;1(2):70–7. <https://doi.org/10.48112/bcs.v1i2.99>
43. Jones CR. A New calculus for the treatment of optical systems. VII Properties of the N-matrices. *J Opt Soc Am.* 1948;38(8):671–85. <https://doi.org/10.1364/josa.38.000671>
44. Azzam RMA. Propagation of partially depolarized light through anisotropic media with or without depolarization: A differential 4×4 matrix calculus. *J Opt Soc Am.* 1978;68(12):1756–67. <https://doi.org/10.1364/JOSA.68.001756>
45. Arteaga O, Canillas A. Analytic inversion of the Mueller-Jones polarization matrices for homogeneous media. *Opt Lett.* 2010;35(4):559–61. <https://doi.org/10.1364/OL.35.000559>
46. Barakat R. Exponential versions of the Jones and Mueller–Jones polarization matrices. *J Opt Soc Am A.* 1996;13(1):158–63. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.13.000158>
47. Marchesini R, Bertoni A, Andreola S, Melloni E, Sichirollo AE. Extinction and absorption coefficients and scattering phase functions of human tissues in vitro. *Appl Opt.* 1989;28(12):2318–24. <https://doi.org/10.1364/AO.28.002318>
48. Edwards DK, Gier JT, Nelson KE, Roddick RD. Integrating sphere for imperfectly diffuse samples. *J Opt Soc Am.* 1961;51(11):1279–88. <https://doi.org/10.1364/JOSA.51.001279>
49. Hahm JS, Sung IK, Yang SC, Rhee JC, Lee MH, Kee CS, et al. Biliary proteins in patients with and without gallstones. *Korean J Intern Med.* 1992;7(1):18–24. <https://doi.org/10.3904/kjim.1992.7.1.18>
50. Portincasa P, Moschetta A, Calamita G, Margari A, Palasciano G. Pathobiology of cholesterol gallstone disease: from equilibrium ternary phase diagram to agents preventing cholesterol crystallization and stone formation. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metab Disord.* 2003;3(1):69–84. <https://doi.org/10.2174/1568008033340397>

51. Portincasa P, Moschetta A, van Erpecum KJ, Calamita G, Margari A, van Berge-Henegouwen GP, et al. Pathways of cholesterol crystallization in model bile and native bile. *Dig Liver Dis.* 2003;35(2):118–26. [https://doi.org/10.1016/s1590-8658\(03\)00009-4](https://doi.org/10.1016/s1590-8658(03)00009-4)
52. Portincasa P, van Erpecum KJ, Di Ciaula A, Wang DQH. The physical presence of gallstone modulates ex vivo cholesterol crystallization pathways of human bile. *Gastroenterol Rep (Oxf).* 2019;7(1):32–41. <https://doi.org/10.1093/gastro/goy044>
53. Helen H Wang, Piero Portincasa, Min Liu, David Q-H Wang. Effects of biliary phospholipids on cholesterol crystallization and growth in gallstone formation. *Adv Ther.* 2023;40(3):743–68. <https://doi.org/10.1007/s12325-022-02407-8>
54. Principles of forensic medicine. SP Robinson, ed. Greenwich Medical Media, 1996, p. 192.

METHODS AND MEANS OF POLARIZATION-INTERFERENCE LAYER RECONSTRUCTION AND DISCRETE PHASE SCANNING OF JONES MATRIX IMAGES OF POLYCRYSTALLINE FILMS OF DEHYDRATED BILE

Yuriy Ushenko^{1*}, Iryna Soltys², Vasyi Harasym², Oleksandr Saleha²

¹Department of Computer Science, Educational and Scientific Institute of Physical-Technical and Computer Sciences, Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University, 101 Storozhynetska St., Chernivtsi, 58029, Ukraine;

²Department of Optics and Publishing-Printing Business, Educational and Scientific Institute of Physical-Technical and Computer Sciences, Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University, 101 Storozhynetska St., Chernivtsi, 58029, Ukraine

*Corresponding author: y.ushenko@chnu.edu.ua

Submitted February 10, 2025; Revised October 31, 2025;

Accepted November 10, 2025

Background: Modern methods of Mueller matrix polarimetry are aimed at determining the criteria and practical application of such markers in the differential diagnosis of pathological and necrotic changes in biological tissues of human organs. At the same time, little-studied and relevant are the issues related to matrix studies of another class of objects — dehydrated (dried) films of biological fluids (BF), the polycrystalline structure of which is associated with the composition and ratio of dissolved substances. Polarimetric analysis of the BF dehydrated film at the macroscopic level enables the retrieval of information about its molecular microstructure. In addition, BF are more easily accessible and do not require traumatic, sometimes dangerous, biopsy.

Objectives: Development and experimental testing of the diagnostic efficiency of a new technique of polarization-interference reconstruction and layer-by-layer phase scanning of object fields of complex amplitudes with algorithmic reproduction of the real and imaginary components of Jones matrix images of polycrystalline films of dehydrated bile from healthy donors and patients with cholelithiasis.

Materials and methods: Polarization interferometry, digital phase scanning and statistical analysis of algorithmically reproduced real and imaginary components of Jones matrix images of dehydrated bile films were used.

Results: The results of the statistical analysis of the polarization-interference mapping method with digital Fourier reconstruction and phase scanning of complex amplitude distributions and algorithmic calculation of the real and imaginary components of Jones matrix images of bile film samples are presented and physically analyzed. Statistical markers that are most sensitive to changes in the polycrystalline structure of dehydrated bile films are established and high accuracy (97.6%) of differential diagnosis of cholelithiasis is demonstrated.

Conclusions: General scenarios for the transformation of the statistical structure of the set of Jones matrix images, which are reproduced in different phase planes of the object field of dehydrated bile films, are established. A set of structures of self-assembled molecular networks (hereinafter referred to as supramolecular networks) formed during the dehydration of bile films, which are diagnostic markers most sensitive to pathological changes, has been identified. They turned out to be asymmetry and kurtosis, which characterize the coordinate distributions of the values of the real and imaginary components of the Jones matrix.

KEYWORDS: polarization; Jones matrix; optical anisotropy; biological fluid; statistical moments; polycrystalline films of dehydrated bile.

THE IMPACT OF DIFFERENT LYOPHILIZATION REGIMES ON THE PROTEIN COMPOSITION OF HUMAN CORD BLOOD SERUM

V. S. Hoidina^{1, 2,*}, Y. O. Posokhov³, Y. G. Kot⁴, O. A. Nakonechna¹,
V. Y. Prokopiuk^{1, 2}

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

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine,
23 Pereyaslavskaya str., 61016, Kharkiv, Ukraine;

³National Technical University "Kharkiv Polytechnic Institute", 2 Kyrpychova str., 61002, Kharkiv, Ukraine;

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

*e-mail: vs.hoidina@knmu.edu.ua

Submitted May 14, 2025; Revised July 21, 2025;

Accepted September 29, 2025

Background: Modern medicine is confronted with the challenge of minimizing the side effects of drug treatment of serious diseases, including oncological pathologies. One of the most perspective concepts is the use of cord blood serum as a source of regenerative components to support the patient's health. The serum contains a variety of growth factors, cytokines and immunosuppressive cells that promote tissue repair and regulation of the immune response. An important goal is to preserve the biological activity of cord blood serum protein fractions during long-term preservation. Lyophilization is considered one of the most effective methods of stabilizing biological substances. However, the optimal temperature regime for the preservation of cord blood proteins during lyophilization requires further investigation.

Objectives: To evaluate the effect of different lyophilization regimes on the composition and stability of cord blood serum proteins.

Materials and methods: Cord blood serum was examined after freezing to -20°C and lyophilization with previous cooling to -20°C and -80°C. The total protein content was calculated using a standardized determination kit, and the remaining dry mass was weighed on an analytical balance. The protein composition was examined by spectrofluorimetry and polyacrylamide gel electrophoresis. The residues of aromatic amino acids (tyrosine-tryptophan, tryptophan) were analyzed by spectrofluorimetry. The peaks in the protein profiles of the analytical samples were electrophoretically examined and the preservation of the biomaterial was compared.

Results: It has been shown that freezing and lyophilization at -80°C provide high stability of protein fractions without significant loss of total protein or its structural changes. On the contrary, lyophilization at -20°C was accompanied by a significant decrease in the total amount of protein and protein fractions, changes in protein structure, indicating aggregation, denaturation, and degradation of protein molecules. The densitogram of lyophilized cord blood serum when cooled to -80°C was significantly close to the result of the frozen sample, while the analysis of the peaks of lyophilized serum cooled to -20°C showed a significant decrease in parameters.

Conclusions: Lyophilization of human cord blood serum with preliminary cooling at -80°C allows preserving the protein concentration, the number of fractions and the structure of proteins according to electrophoresis and spectrofluorimetry. Lyophilization of cord blood serum with preliminary cooling at -20°C significantly reduces the protein concentration, the number of fractions and changes the structure of proteins compared to frozen serum.

Citation: Hoidina VS, Posokhov YO, Kot YG, Nakonechna OA, Prokopiuk VY. The impact of different lyophilization regimes on the protein composition of human cord blood serum. Biophysical Bulletin. 2025;54:71–82. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-54-05>

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

KEYWORDS: cord blood serum, spectrofluorimetry, electrophoresis, lyophilization, freezing, storage, cryopreservation, regenerative medicine.

The challenges of modern medicine require minimizing the possible negative effects of drug treatment of many serious diseases on the general condition of the organism [1]. It is well known that many patients with severe diseases, in particular cancer patients, have problematic consequences due to the general negative effect of chemotherapy and radiation therapy on the condition of the immune system, liver, kidneys, etc. [2, 3]. One of the modern areas in which regenerative medicine is developing is the inclusion of cord blood serum (CBS) to reduce the harmful effects of drugs on patients' organisms and improve post-treatment recovery and rehabilitation [4].

It is known that human cord blood is a source that is rich in myeloid suppressor cells, which are a perspective object of clinical research related to their immunosuppressive properties, as well as the ability to affect autoimmune and inflammatory diseases as an immunomodulator [5, 6]. Modern scientific investigations of the components of human cord blood are aimed at finding ways to use all components of the feto-placental complex, which will further allow to evaluate the regenerative properties of the components of the CBS and successfully include them in treatment protocols [7, 8].

CBS are a source of cytokines and growth factors that have anti-inflammatory, antiapoptotic and angiogenic effects and can be used in various fields of regenerative medicine [9]. In addition, CBS can be added to the culture medium to increase proliferative activity, colony-forming effect, and the number of cell generations. That means that culture medium supplemented with CBS supports the proliferation and differentiation of conjunctival and limbal epithelial cells. It has been determined that CBS contains a higher concentration of growth factors and cytokines than fetal bovine serum or adult serum [10]. Thus, the addition of CBS to the culture medium may have a better overall effect on the functioning of the cellular medium and is important for further clinical research [11].

The question of how to preserve cord blood, namely freezing, lyophilization, and the correct temperature regime, which will help to maximize the preservation of cord blood components for further use in medical practice, is relevant. The informational biomarkers in the circulating low molecular weight serum proteome were investigated using continuous elution electrophoresis. The results of the research showed that sequential concentrated fractions of serum proteins demonstrate a clear high-resolution ability of 1–2 kDa below 20 kDa [12].

The issue of the preservation of cord blood serum proteins under different lyophilization regimes is still uncertain. Thus, the effective lyophilization of proteins [13, 14], test system [15], plasma [16] and probiotics [17, 18] was demonstrated.

It has been shown that the efficiency of lyophilization depends on the selected protocol, primarily on the initial cooling temperature, which should ensure complete freezing. According to various authors, this temperature ranges from -20 °C and -80 °C [13–19], which corresponds to the refrigeration equipment found in most laboratories.

Thus, the aim of the research was to investigate the effect of different lyophilization temperatures (-20°C and -80°C) on the composition of the protein component of human CBS.

MATERIALS AND METHODS

CBS was obtained during labor with the informed consent of women in labor without extragenital, infectious pathology and gestosis.

We analyzed frozen to -20°C CBS and lyophilized in two modes (with preliminary cooling at -20°C and -80°C). CBS were lyophilized using an Alpha 1-2 LD plus freeze dryer (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Germany).

For lyophilization, the serum was poured into glass vials, 3 ml per vial. The first part of the serum was cooled to -80°C , the samples were transferred to the freeze-drying module, where the temperature was -35°C , the pressure was reduced to 30 Pa for 6 hours. After that, the temperature was then increased at a rate of $1-3^{\circ}$ per hour to 35°C , after which lyophilization was stopped.

The second part of the serum was cooled to -20°C , the samples were transferred to the freeze-drying module, where the temperature was -20°C , the pressure was reduced to 30 Pa for 6 hours. After that, the temperature was then increased at a rate of $1-3^{\circ}$ per hour to 35°C , after which lyophilization was stopped.

Total protein was measured using the «Total Protein Concentration Test Kit for Human Serum» («Phyllisit», Ukraine). Before starting the analysis, the Biuret reagent was prepared according to the kit instructions, calibration and physiological solutions were made, 1.0 ml of the reagent was added to each test tube with the test sample, mixed and left for 30 minutes at room temperature. Measurements were performed using a SM600 spectrophotometer (Utrao, China) at a wavelength of 550 nm [20].

The dry residue was weighed on an analytical balance AD50 (Axis, Ukraine) at the calculation of 5 ml of liquid CBS after the lyophilization process in two regimes (-20°C and -80°C).

Spectrofluorimetric analysis and polyacrylamide gel electrophoresis were used to study the preservation of the protein composition.

Spectrofluorimetric analysis of aromatic amino acids (tyrosine and tryptophan) in the protein fractions of CBS was carried out using a fluorescence spectrometer FL 8500 (Perkin Elmer, USA). For the research, the samples of the protein fractions of CBS were dissolved in phosphate-salt buffer (0.01 M, pH 7.4) in a ratio of 1:10. The samples were mixed thoroughly, and the supernatant was transferred to quartz cuvettes for analysis. Excitation was performed at a wavelength of 280 nm for tyrosine-tryptophan and 295 nm for tryptophan. The emission was recorded in the range of 300–400 nm [21].

Denaturing electrophoresis in a polyacrylamide gel (NuPAGE™ Bis-Tris Mini Protein Gels, 4–12%) was performed using the XCellSureLock Mini-Cell Electrophoresis System (Thermo Fisher Scientific, USA) with the addition of appropriate buffers and reducing agents. For electrophoretic separation, 10-cell cassettes with a gradient polyacrylamide gel “NuPAGE™ Bis-Tris Mini Protein Gels, 4–12%” (Invitrogen) were used. Samples were mixed with reagents in eppendorf tubes (total volume 20 μL per cell), heated at 70°C for 10 minutes in a dry thermoblock Eppendorf ThermoStat plus. After that, the solutions were loaded into the gel using Gel Loading Tips (Invitrogen, LC1001). Electrophoresis was performed at 200 V for 50 minutes [22].

Statistical processing of the data was performed using the Graph Pad Prism program (Graph Pad, USA). The data were compared using the nonparametric Mann-Whitney U test. The results of concentrations were presented as the median (Me) range. Differences at $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

After calculating the total protein, it was determined that the -80°C CBS lyophilizate showed a slight increase in total protein concentration of 4% from the frozen sample. The CBS lyophilized at -20°C demonstrated a 16% decrease in total protein levels compared to the frozen CBS. Lyophilization at -80°C allows almost complete preservation of the protein concentration, and a slight increase may be due to the loss of some water or changes in the phase state of proteins. Lyophilization at -20°C is accompanied by a noticeable decrease in total protein

content, which may indicate damage of protein structures due to possible denaturation and aggregation processes (Fig. 1).

The dry residue was 0.3 g per 5 ml or 0.06 g per 1 ml.

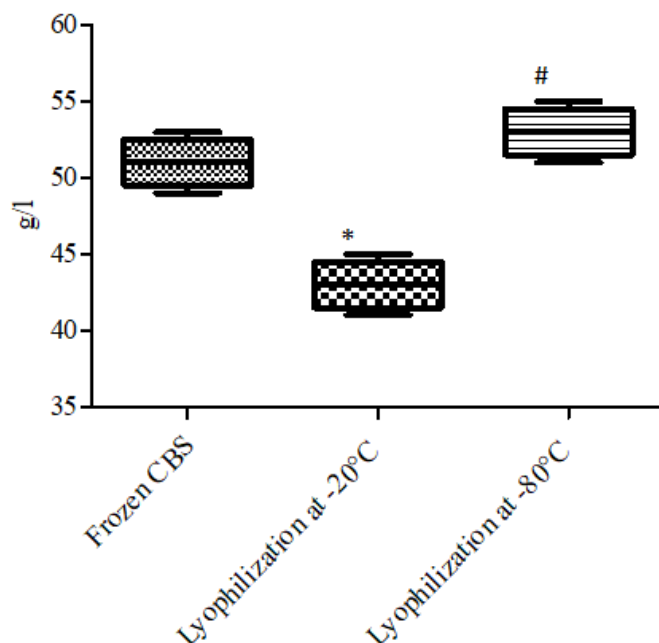


Fig. 1. Changes in the concentration of total protein in frozen and lyophilized CBS at different temperature conditions (-20°C and -80°C); * — the index is statistically different from frozen CBS, $p < 0.05$; # — the index is not statistically different from frozen CBS, $p > 0.05$. Data are presented as $m \pm \text{SD}$ ($n=6$).

The fluorescence analysis showed that the main contribution to the emission spectrum when excited at tyrosine wavelengths (280 nm) is made by tryptophan residues. This is due to the effective energy transfer from tyrosine to tryptophan, which is typical for proteins containing both types of amino acids. The observed fluorescence maximum at 335–336 nm indicates the dominance of the tryptophan signal even upon tyrosine excitation. Comparison of the spectra upon excitation of tryptophan and tyrosine shows a similar shape and intensity ratio, which confirms the presence of both residues in the proteins. At the same time, the higher total fluorescence intensity upon tyrosine excitation indicates the presence of tyrosine residues in a certain number of CBS proteins. The observed small shift of the emission maximum upon excitation of different amino acid residues may be related to conformational changes of proteins, which result in a change in the polarity of the serine surrounding the indole chromophore of tryptophan amino acid residues.

Spectrofluorimetry revealed that in frozen CBS the maximum emission is at 340 nm, which corresponds to the values for tryptophan located on the protein surface, and is assumed to be in contact with bound water molecules and other polar groups [23]. The mentioned maximum value occupies an intermediate position between the corresponding values for tryptophan fluorescence in a rather hydrophobic environment inside the protein globule (330 nm) and on the protein surface in contact with free water molecules (350 nm) [23]. The CBS lyophilizate at -20°C demonstrated a shift of the maximum to 337 nm, which may indicate changes in the structure of proteins that lead to a shift of the indole chromophore of tryptophan amino acid residues to a more hydrophobic environment, for example, closer to the middle of the protein globule. Usually, a decrease in the polarity of the microenvironment of tryptophan amino acid residues is accompanied by an increase in the intensity of their fluorescence maximum [24], however, the absence of a corresponding increase in the fluorescence intensity in the case of CBS lyophilized at -20°C may be due to two factors: (a) the aforementioned decrease in the level of total protein under these conditions; (b) a possible increase in the fluorescence

suppression of tryptophan amino acid residues by closely spaced electron acceptor groups (carboxyl, protonated amino group), which occurs as a result of the discussed change in the structure of proteins. The CBS lyophilizate at -80°C gives a maximum fluorescence intensity at 339 nm, indicating a lower degree of structural changes compared to the temperature regime of -20°C , and is also closer to the frozen CBS in terms of emission intensity (Fig. 2).

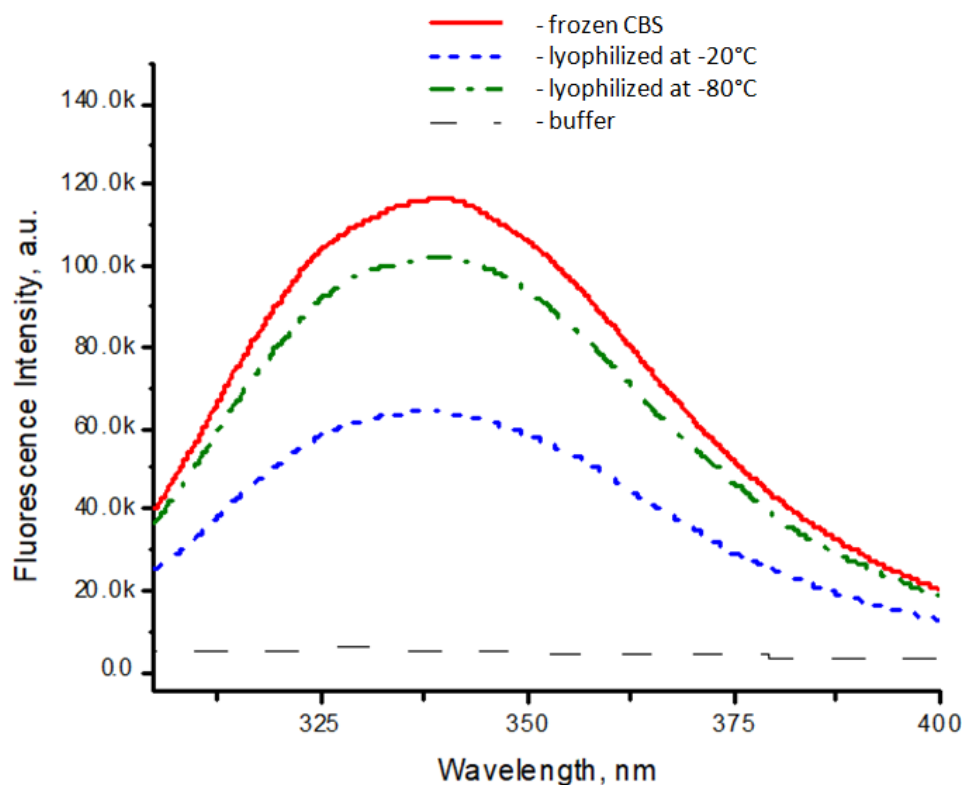


Fig. 2. Fluorescence intensity of tryptophan in human serum and cord blood lyophilizate at different temperature conditions -20°C and -80°C . Data are presented as $m \pm \text{SD}$ ($n=6$).

The method of tyrosine-tryptophan spectrofluorimetry also allowed us to assess the change in the fluorescence intensity of aromatic amino acids in frozen human CBS and in lyophilized serum obtained at different temperature regimes (-20°C and -80°C). The data obtained indicate that the highest fluorescence intensity with a maximum of about 340 nm is observed in frozen CBS, but the serum lyophilizate when cooled to -80°C demonstrates a slight decrease in intensity, but retains the profile. This indicates the high stability of the protein structure of this sample. The CBS lyophilizate when cooled to -20°C is characterized by a significant decrease in the fluorescent signal, which indicates damage or changes in the state of protein molecules. The probable cause of this condition is denaturation and aggregation of the protein component. As a result of the first process mentioned above, the fluorescence suppression of tryptophan amino acid residues by closely spaced electron acceptor groups (carboxyl, protonated amino group) may increase, and as a result of the second process, the availability of aromatic residues for excitation and emission will decrease (Fig. 3).

The highest level of fluorescence is observed in the frozen sample of CBS, indicating that the natural structure of proteins is preserved. After the lyophilization process at -20°C , the fluorescence decreased by 45% relative to the frozen CBS, which can be explained by changes in the spatial structure of proteins (even their denaturation) and subsequent protein aggregation. On the other hand, lyophilization at -80°C demonstrates the preservation of intensity at a level

closer to the frozen material, which may indicate minimal damage to the protein structure (Fig. 4).

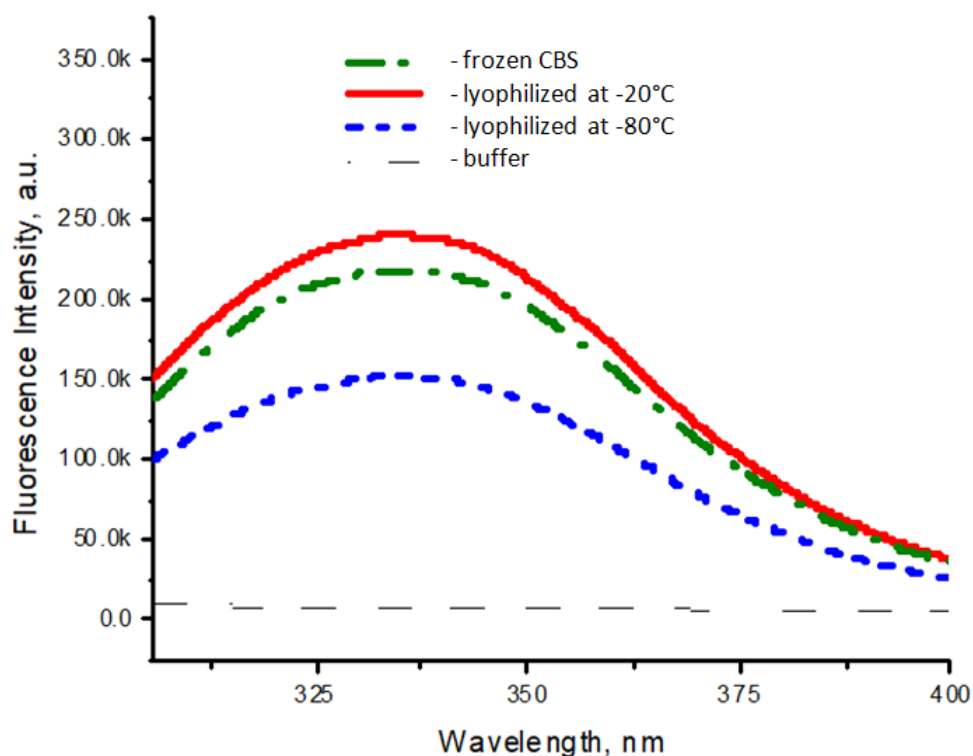


Fig. 3. Fluorescence intensity of tyrosine-tryptophan in human serum and cord blood lyophilized at different temperature conditions -20°C and -80°C. Data are presented as $m \pm SD$ ($n=6$).

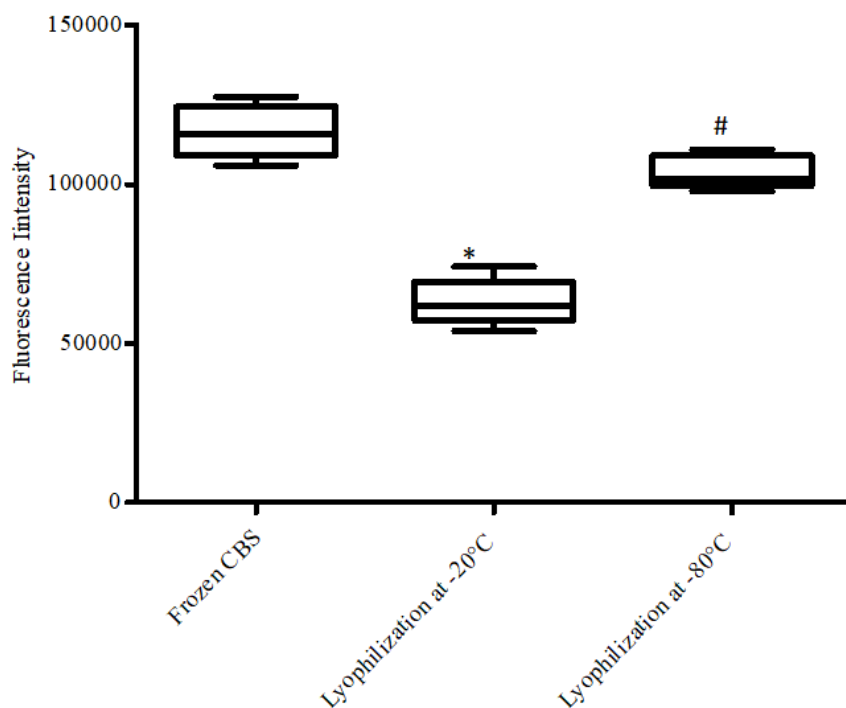


Fig. 4. Results of tryptophan fluorescence of protein fractions of frozen CBS and CBS lyophilized at -20°C and -80°C; * — the index is statistically different from frozen CBS, $p < 0.05$; # — the index is not statistically different from frozen CBS, $p > 0.05$. Data are presented as $m \pm SD$ ($n=6$).

Therefore, it was discovered that lyophilization at -20°C causes significant structural changes in the protein components of CBS, which is expressed in a decrease in the fluorescence

intensity of tryptophan amino acid residues and a shift in the maximum of their fluorescence band. In contrast, lyophilization at -80°C better preserves the native structure of proteins, as evidenced by the almost complete preservation of the emission intensity of tryptophan amino acid residues and a slight shift in the maximum of their fluorescence band.

The densitograms of frozen CBS and lyophilized CBS at -80°C were found to be similar by electrophoresis, both samples demonstrate a complex protein profile with several distinct peaks, indicating the presence of a significant number of protein components of different molecular weights. The densitogram showing the analysis of CBS lyophilizate at -20°C revealed a much smaller number of intense peaks, which may indicate a reduced protein concentration, possible degradation and denaturation of protein components, as well as a reaction to the effect of specific conditions of sample obtaining and preparation (Fig. 5, 6, 7).

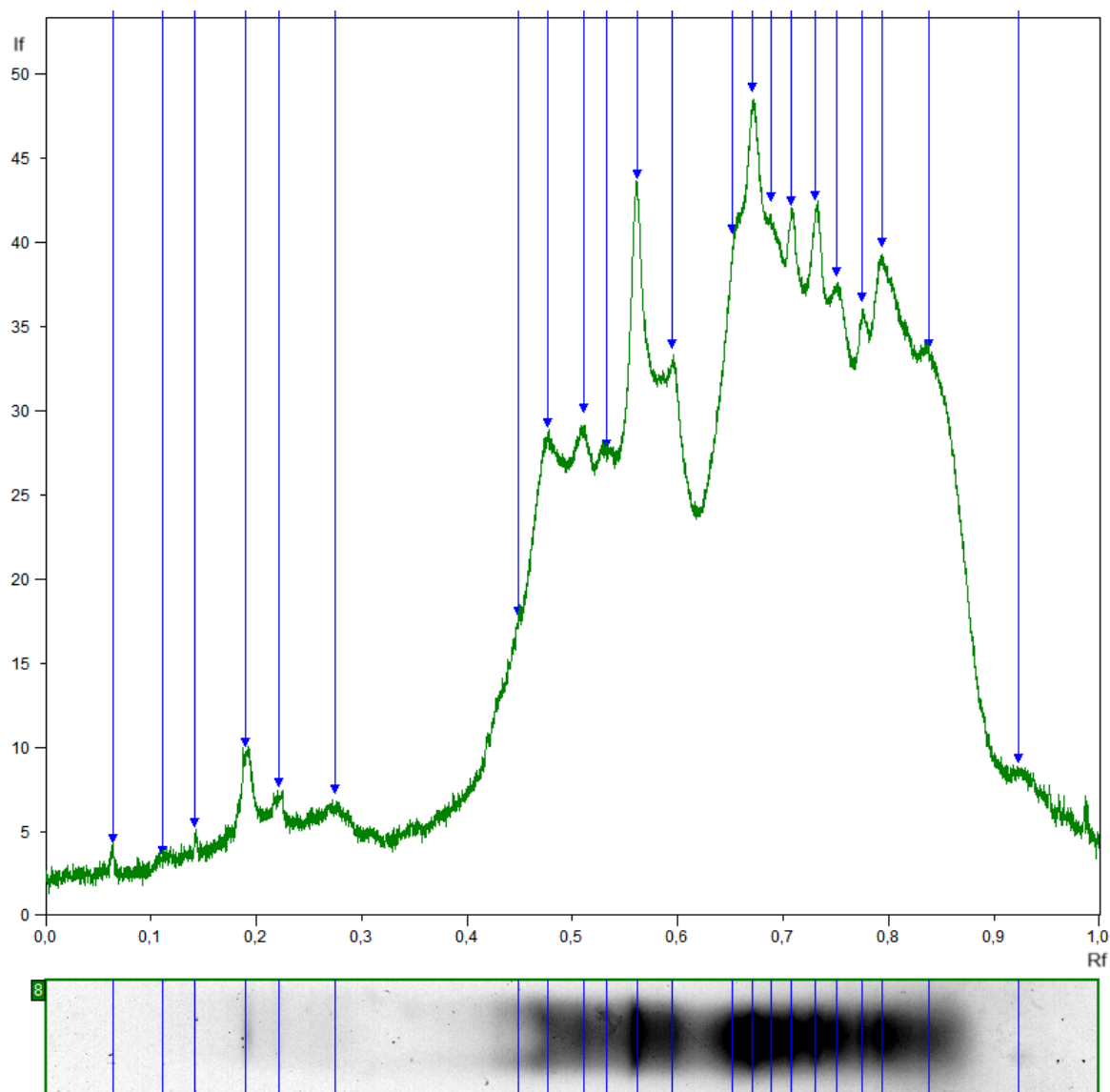


Fig. 5. Graphic representation of the densitogram of electrophoretic separation of proteins of frozen human CBS by denaturing electrophoresis in polyacrylamide gel. Rf (horizontal axis) reflects the relative migration of protein components in the polyacrylamide gel; signal intensity (vertical axis) indicates the degree of protein staining, which correlates with the concentration in the sample. Data are presented as $m \pm SD$ ($n=6$).

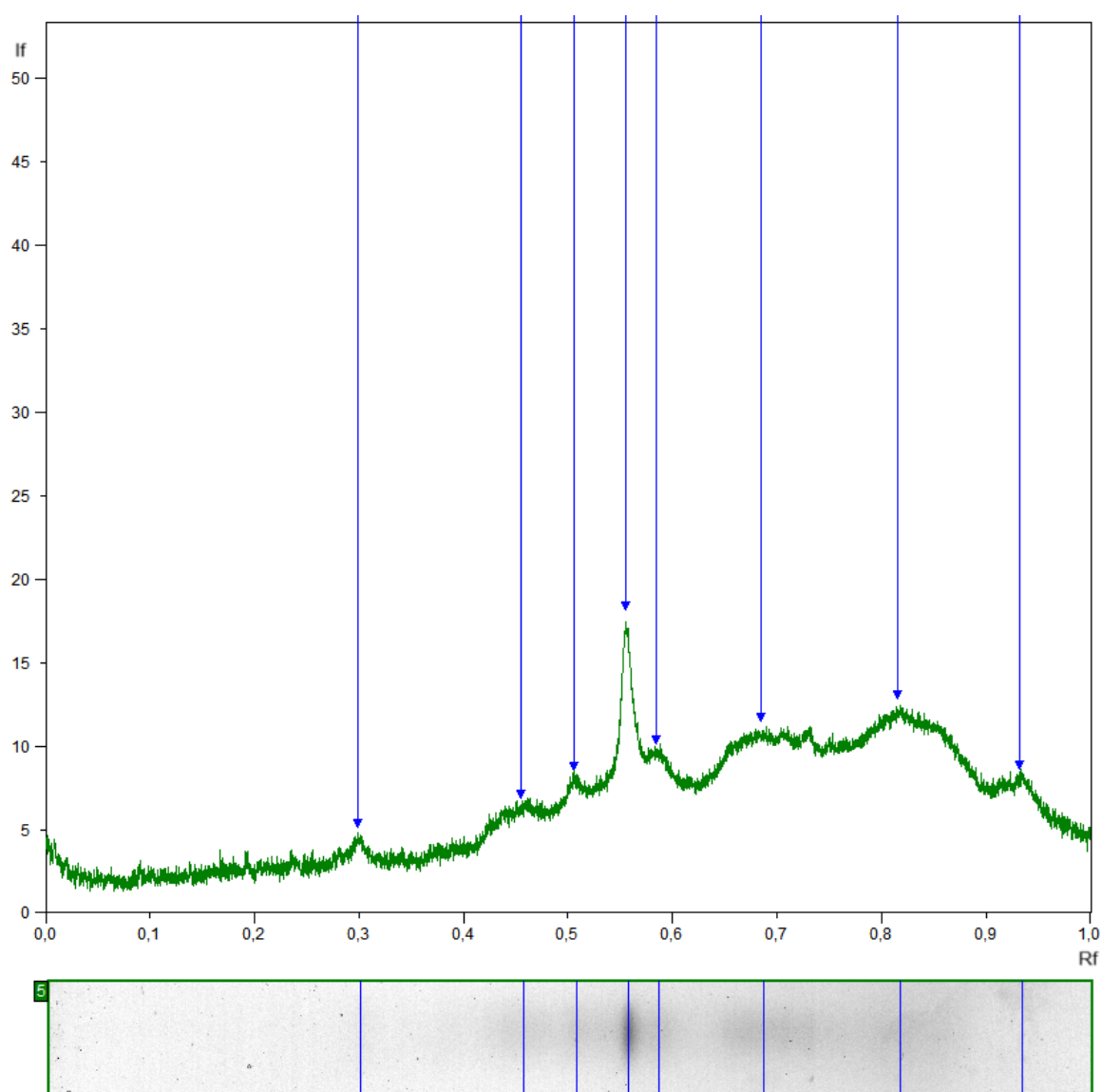


Fig. 6. Graphic representation of the densitogram of electrophoretic separation of proteins of lyophilized CBS at -20°C by denaturing electrophoresis in polyacrylamide gel. Rf (horizontal axis) reflects the relative migration of protein components in the polyacrylamide gel; signal intensity (vertical axis) indicates the degree of protein staining, which correlates with the concentration in the sample. Data are presented as $m \pm \text{SD}$ ($n=6$).

In summary, the results obtained indicate that lyophilization is a perspective method of long-term storage of human CBS with minimal loss of its protein composition and properties. In particular, the analysis of the total protein concentration showed that in samples lyophilized at a cooling temperature of -80°C , the protein content was practically the same as in frozen control serum. This is confirmed by the results of spectrofluorimetric analysis, where the fluorescence intensity of the aromatic amino acids tyrosine and tryptophan in lyophilized samples at -80°C remained almost at the level of the frozen sample. Instead, lyophilization at a cooling temperature of -20°C was accompanied by significant losses of protein fractions, a decrease in total protein concentration, and a decrease in fluorescence intensity. This may be due to partial denaturation of protein molecules.

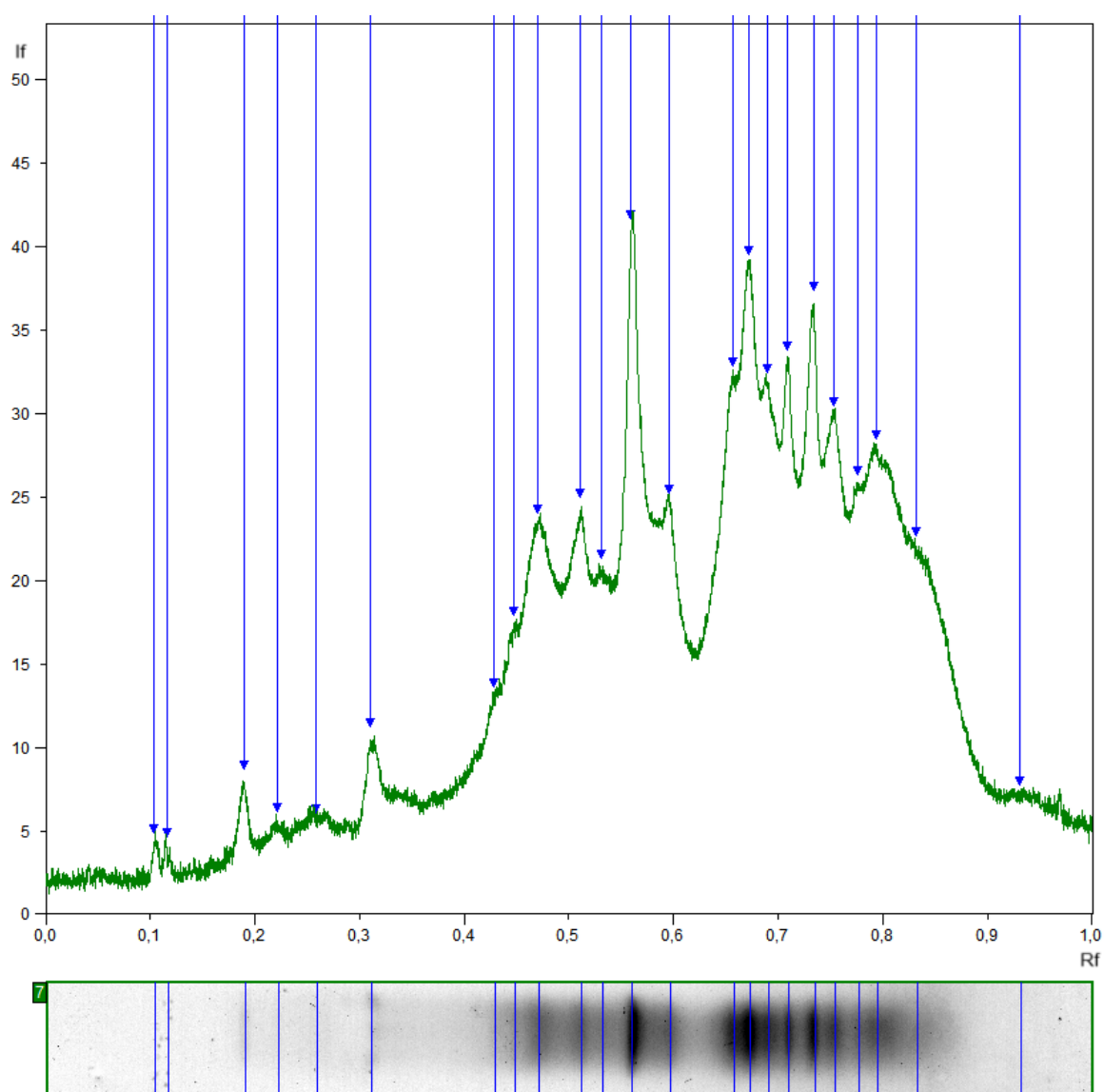


Fig. 7. Graphic representation of the densitogram of electrophoretic separation of proteins of lyophilized CBS at -80°C by denaturing electrophoresis in polyacrylamide gel. Rf (horizontal axis) reflects the relative migration of protein components in the polyacrylamide gel; signal intensity (vertical axis) indicates the degree of protein staining, which correlates with the concentration in the sample. Data are presented as $m \pm \text{SD}$ ($n=6$).

The data obtained are consistent with the literature, which indicates the benefits of lyophilization over traditional storage at higher temperatures for biomaterials containing proteins [13–19]. For example, a study of freeze-drying for extracellular vesicle preparations stored at -80°C showed better results than just freezing [25]. The high level of preservation of protein components in lyophilizates at -80°C allows us to consider this method as optimal for the preparation of stable CBS products for further use in research, in particular in the area of regenerative medicine [26, 27].

CONCLUSIONS

Research into the preservation of serum composition is important for the further use of CBS in various areas. Storage of the lyophilized product is less costly than freezing, which significantly affects the choice.

Lyophilization of human CBS with pre-cooling at -80°C allows to maintain protein concentration, number of fractions and protein structure according to electrophoresis and spectrofluorimetry. Lyophilization of CBS with pre-cooling at -20°C significantly reduces the protein concentration, number of fractions and changes the structure of proteins compared to frozen CBS.

It is important to study the composition of serum to understand the effect of storage. The effect of such serum on the organism remains unexplored and requires further research.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

Authors' ORCID ID

В. С. Гойдіна  <https://orcid.org/0000-0002-7062-2003>
 Є. О. Посохов  <https://orcid.org/0000-0001-8395-9089>
 Ю. Г. Кот  <https://orcid.org/0000-0003-2591-4098>
 О. А. Наконечна  <https://orcid.org/0000-0002-2614-1587>
 В. Ю. Прокопюк  <https://orcid.org/0000-0003-4379-4130>

REFERENCES

1. Zhang P, Chen Z, Lu D, Wu Y, Fan M, Qian J, Ge J. Overexpression of COX5A protects H9c2 cells against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;524(1):43–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.013>
2. Wu BB, Leung KT, Poon EN. Mitochondrial-targeted therapy for doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1912. <https://doi.org/10.3390/ijms23031912>
3. He L, Liu F, Li J. Mitochondrial sirtuins and doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol.* 2021;21(3):179–91. <https://doi.org/10.1007/s12012-020-09626-x>
4. Montague C, Holt Y, Vlok M, Dhanraj P, Boodhoo K, Maartens M, et al. Combined therapeutic use of umbilical cord blood serum and amniotic membrane in diabetic wounds. *Biochimie.* 2024;227(Pt A):193–204. <https://doi.org/10.1016/j.bioci.2024.07.012>
5. Bizymi N, Georgopoulou A, Mastrogamvraki N, Matheakakis A, Gontika I, Fragiadaki I, et al. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in the umbilical cord blood: biological significance and possible therapeutic applications. *J Clin Med.* 2022;11(3):727. <https://doi.org/10.3390/jcm11030727>
6. Azizi R, Aghebat-Maleki L, Nouri M, Marofi F, Negargar S, Yousefi M. Stem cell therapy in Asherman syndrome and thin endometrium: stem cell-based therapy. *Biomed Pharmacother.* 2018;102:333–43. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.091>
7. Bae SH, Jo A, Park JH, Lim CW, Choi Y, Oh J, et al. Bioassay for monitoring the anti-aging effect of cord blood treatment. *Theranostics.* 2019;9(1):1–10. <https://doi.org/10.7150/thno.30422>
8. Castellano JM, Mosher KI, Abbey RJ, McBride AA, James ML, Berdnik D, et al. Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice. *Nature.* 2017;544:488–92. <https://doi.org/10.1038/nature22067>
9. Maharajan N, Cho GW, Choi JH, Jang CH. Regenerative therapy using umbilical cord serum. *In Vivo.* 2021;35(2):699–705. <https://doi.org/10.21873/invivo.12310>
10. Ang LP-K, Do TP, Thein ZM, Reza HM, Tan XW, Yap C, et al. Ex vivo expansion of conjunctival and limbal epithelial cells using cord blood serum-supplemented culture medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(9):6138–47. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6527>
11. Huang L, Critser PJ, Grimes BR, Yoder MC. Human umbilical cord blood plasma can replace fetal bovine serum for in vitro expansion of functional human endothelial colony-forming cells. *Cytotherapy.* 2011;13(6):712–21. <https://doi.org/10.3109/14653249.2010.548380>
12. Triebel J, Markl-Hahn H, Harris D, Bertsch T. High resolution continuous elution electrophoresis for the evaluation of low abundance serum proteins. *Clin Lab.* 2022;68(4). <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2021.210827>
13. Karunanithy V, Abdul Rahman NHB, Abdullah NAH, Fauzi MB, Lokanathan Y, Min Hwei AN, Maarof M. Effectiveness of Lyoprotectants in Protein Stabilization During Lyophilization. *Pharmaceutics.* 2024;16(10):1346. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16101346>
14. Butreddy A, Yadav JK, Ajjarapu S, Sarabu S, Dudhipala N. Instability of therapeutic proteins — An overview of stresses, stabilization mechanisms and analytical techniques involved in lyophilized proteins. *Int J Biol Macromol.* 2021;167:309–25. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2020.11.188>

15. Prado NO, Lalli LA, Blanes L., Zanette DL, Aoki MN. Lyophilization of molecular biology reactions: A review. *Mini-Rev Med Chem.* 2023;23(4):480–496. <https://doi.org/10.2174/1389557522666220802144057>
16. Zaza M, Kalkwarf KJ, Holcomb JB. Dried Plasma. In: *Damage Control Resuscitation. Identification and Treatment of Life-Threatening Hemorrhage.* PC Spinella, ed. 2020. p. 145–62. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20820-2_8
17. Fan X, Shi Y, Li R, Yang R, Yang X, Hang F, et al. Preliminary study on the effect of pre-freezing methods on lyophilization quality and storage stability of probiotics. *Drying Technol.* 2024;42(9):1480–92. <https://doi.org/10.1080/07373937.2024.2361351>
18. Sang Y, Wang J, Zhang Y, Gao H, Ge S, Feng H, et al. Influence of temperature during freeze-drying process on the viability of *Bifidobacterium longum* BB68S. *Microorganisms.* 2023;11(1):181. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010181>
19. Pogozhykh D, Pogozhykh O, Prokopyuk V, Kuleshova L, Goltsev A, Blasczyk R, et al. Influence of temperature fluctuations during cryopreservation on vital parameters, differentiation potential, and transgene expression of placental multipotent stromal cells. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8:66. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0512-7>
20. Felicit. Insrtuctions [Internet]. [cited 2025 Apr 30]. Available from: <http://felicit.com.ua/instructions>
21. Devanesan S, AlSalhi MS, Masilamani V, Alqahtany F, Rajasekar A, Alenazi A, et al. Fluorescence spectroscopy as a novel technique for premarital screening of sickle cell disorders. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021;34:102276. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102276>
22. Nowakowski AB, Wobig WJ, Petering DH. Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics.* 2014;6(5):1068–78. <https://doi.org/10.1039/c4mt00033a>
23. Ladokhin AS. Fluorescence spectroscopy in peptide and protein analysis. In: RA Meyers, editor. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: applications, theory, and instrumentation.* Chichester; New York: John Wiley & Sons Ltd. 2000. p. 5762–79. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a1611>
24. Freifelder D. *Physical biochemistry: applications to biochemistry and molecular biology.* San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1976. 570 p. Available from: https://catalog.nlm.nih.gov/permalink/01NLM_INST/1o1phhn/alma994868803406676
25. Trenkenschuh E, Richter M, Heinrich E, Koch M, Fuhrmann G, Friess W. Enhancing the stabilization potential of lyophilization for extracellular vesicles. *Adv Healthc Mater.* 2022;11(5):2100538. <https://doi.org/10.1002/adhm.202100538>
26. Li Z, Zhu K, Ren L, Yuan X. Sulfonium-containing glycopolypeptides tethering trehalose for protein stabilization. *ACS Macro Lett.* 2022;11(11):1278–84. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.2c00508>
27. Yuan F, Li YM, Wang Z. Preserving extracellular vesicles for biomedical applications: consideration of storage stability before and after isolation. *Drug Deliv.* 2021;28(1):1501–9. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1951896>

ВПЛИВ РІЗНИХ РЕЖИМІВ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ НА БІЛКОВИЙ СКЛАД СИРОВАТКИ КОРДОВОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

В. С. Гойдіна^{1,2,*}, Є. О. Посохов³, Ю. Г. Кот⁴, О. А. Наконечна¹,

В. Ю. Прокопюк^{1,2}

¹Харківський національний медичний університет, просп. Науки, буд. 4, м. Харків, 61022, Україна;

²Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, буд. 23,
м. Харків, 61016, Україна;

³Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», вул. Кирпичова 2,
м. Харків, 61002, Україна;

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

*e-mail: vs.hoidina@knmu.edu.ua

Надійшла до редакції 14 травня 2025 р. Переглянута 21 липня 2025 р.

Прийнята до друку 29 вересня 2025 р.

Актуальність. Сучасна медицина стикається з необхідністю мінімізації побічних ефектів медикаментозного лікування важких захворювань, зокрема онкопатологій. Одним з перспективних підходів є застосування сироватки кордової крові як джерела регенеративних компонентів для підтримки організму пацієнтів. Сироватка містить широкий спектр факторів росту, цитокінів та імуносупресивних клітин, що сприяють відновленню тканин та регуляції імунної відповіді. Важливим завданням є збереження біологічної активності білкових фракцій сироватки пуповинної крові при тривалому зберіганні. Ліофілізація розглядається як один із найбільш ефективних методів стабілізації біологічних речовин. Проте оптимальний температурний режим для збереження білків СКК під час ліофілізації потребує подальшого дослідження.

Мета — оцінити вплив різних режимів ліофілізації на склад і стабільність білків сироватки кордової крові.

Матеріали і методи. Досліджували сироватку кордової крові після заморожування до -20°C та ліофілізації з попереднім охолодженням до -20°C та до -80°C . Визначали загальний вміст білку стандартним набором для визначення, залишок сухої речовини зважували на аналітичних вагах. Білковий склад вивчали методами спектрофлуориметрії та електрофорезу в поліакриламідному гелі. Спектрофлуориметрично аналізували залишки ароматичних амінокислот (тирозин-триптофан, триптофан). Електрофоретично досліджували піки у протеїнових профілях аналітичних зразків та порівнювали збереженість біоматеріалу.

Результати. Було показано, що заморожування та ліофілізація при -80°C забезпечують високу стабільність кількості білкових фракцій без значної втрати загальної кількості білку або її структурних змін. Натомість ліофілізація при -20°C супроводжувалася достовірним зниженням загальної кількості білку та білкових фракцій, зміною структури білку, що свідчить про агрегацію, денатурацію та деградацію білкових молекул. Денситограма ліофілізованої сироватки кордової крові при охолодженні до -80°C була значно наближеною до результату замороженого зразка, у той час, як аналіз піків ліофілізованої сироватки при охолодженні до -20°C показав значне зниження показників.

Висновки. Ліофілізація СКК людини з попереднім охолодженням -80°C дозволяє зберегти концентрацію білку, кількість фракцій та структуру білків за даними електрофорезу та спектрофлуориметрії. Ліофілізація СКК з попереднім охолодженням -20°C значно знижує концентрацію білку, кількість фракцій та змінює структуру білків у порівнянні з замороженою СКК.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: сироватка кордової крові; спектрофлуориметрія; електрофорез; ліофілізація; заморожування; зберігання; кріоконсервування; регенеративна медицина.

АНАЛІЗ ФЕНОТИПОВОГО РІЗНОМАНІТТЯ СПРАВЖНИХ ЛИСТКІВ У ЛІНІЙ САЛАТУ ЛИСТКОВОГО (*LACTUCA SATIVA* VAR. *SECALINA* L.), СТВОРЕНИХ МЕТОДАМИ ФІЗИЧНОГО І ХІМІЧНОГО МУТАГЕНЕЗУ

С. І. Кондратенко¹, О. О. Горобченко², З. П. Ліннік¹,
С. М. Кормош³, І. М. Митенко¹, О. В. Позняк⁴, Л. В. Чабан⁴

¹ Інститут овочівництва і багаторічності НААН, вул. Овочівників, 1, с. Селекційне Харківського р-ну Харківської обл., 62478, Україна;

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

³ Інститут аграрних ресурсів та регіонального розвитку НААН, проспект свободи, 17, с. Велика Бакта Берегівського р-ну Закарпатської обл., 90252, Україна;

⁴ Дослідна станція “Маяк” Інституту овочівництва і багаторічності НААН, вул. Незалежності, 39, с. Крути Ніжинського р-ну Чернігівської обл., 16645, Україна

e-mail: gorobchenko@karazin.ua

Надійшла до редакції 8 серпня 2025 р. Переглянута 2 вересня 2025 р.

Прийнята до друку 10 листопада 2025 р.

Актуальність. Для розширення генотипового різноманіття салату листкового (*Lactuca sativa* var. *secalina* L.) доцільно використовувати методи фізичного і хімічного мутагенезу, які дозволяють змінювати корисні ознаки вихідної форми, які потім можна прискорено стабілізувати за рахунок інбридингу. Біофізичні методи фенотипової ідентифікації і класифікації досліджуваних змін, які ґрунтуються на технології мультиспектральної візуалізації, наразі є ще недостатньо удосконаленими. Тому є доцільним проводити біометричні вимірювання і морфолого-ідентифікаційний аналіз фенотипу мутантних генотипів за бальною оцінкою рівнів прояву якісних ознак.

Мета. Визначити особливості мутагенного впливу γ -опромінювання і біологічно-активних речовин мутагенної дії на генотипову мінливість якісних ознак листової пластинки рослин салату листкового вегетативної фази розвитку та дослідити кореляційні зв'язки між асоціацією якісних ознак, що визначають фенотип справжнього листка і кількісними ознаками ліній салату листкового мутантного походження.

Методи. Непараметрична статистика та критерії для порівняння рослинних об'єктів, методи ботанічної класифікації салату листкового, кореляційний аналіз.

Результати. Вивчено мутагенний вплив трьох біологічно активних речовин (ДМС (еталон), ДМУ-1, ДМУ-5) та γ -променів у дозах 11 і 15 кР на генотипову мінливість салату листкового за комплексом якісних ознак. Проведено порівняльний аналіз розбіжностей між якісними ознаками вихідної форми (сорт Шар малиновий) та створених на її основі 17 мутантних ліній. В результаті випробування мутагенів підтверджено їх високу ефективність в індукції мутаційних змін в геномі салату листкового,

Як цитувати: Кондратенко СІ, Горобченко ОО, Ліннік ЗП, Кормош СМ, Митенко ІМ, Позняк ОВ, Чабан ЛВ. Аналіз фенотипового різноманіття справжніх листків у ліній салату листкового (*Lactuca sativa* var. *secalina* L.), створених методами фізичного і хімічного мутагенезу. Біофізичний вісник. 2025;54:83–99. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-54-06>

Citation: Kondratenko SI, Gorobchenko OO, Linnik ZP, Kormosh SM, Mytenko IM, Pozniak OV, Chaban LV. Analysis of phenotypic diversity of true leaves in lettuce lines (*Lactuca sativa* var. *secalina* L.) created by physical and chemical mutagenesis. Biophysical Bulletin. 2025;54:83–99. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-54-06>

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

пов'язаних з морфологією листкової пластинки. Найбільшу ефективність виявив препарат ДМУ-1 за дії якого одержано 6 мутантних ліній. За дії γ -опромінювання дозою 15 кР одержано 4 лінії. За дії γ -опромінювання дозою 11 кР і ДМС створено по 3 лінії, відповідно. За використання препарату ДМУ-5 одержано 1 лінію.

Висновки. Встановлені кореляційні зв'язки між рівнями прояву якісних і кількісних ознак дозволяють проводити відбір потенційно високопродуктивних мутантних ліній салату листового залежно від успадкованих мутаційних змін, які визначають морфологію справжнього листка. Зокрема, виникає можливість проводити добір мутантних генотипів за прогнозом рівня прояву кількісної ознаки «Ширина листка» ($r_s = 0,483$), що є важливою в аспекті прогнозу потенційної продуктивності.

KEYWORDS: лінії салату листового; справжній листок; якісні і кількісні ознаки; хімічний і фізичний мутагенез; кореляційні залежності.

Серед існуючих зеленних культур салат посівний (*Lactuca sativa* L.) відзначається найбільшим рівнем світового виробництва [1–3]. Серед усього видового різноманіття особливу популярність на ринку користується салат посівний листовий (*Lactuca sativa* var. *secalina* L.). Основними вимогами до сучасних сортів даного виду є відмінні смакові якості, оригінальні форма і забарвлення листя, висока продуктивність та біологічна цінність, стійкість до стресових факторів вирощування [4–6]. Традиційна селекційна схема створення нових сортів салату листового передбачає проведення штучної гібридизації з подальшим індивідуальним, груповим та масовим відборами. Квітки салату листового факультативно запильні, оскільки ще в бутонах відбувається самозапилення через пилкові трубки [7–9]. Внаслідок чого існуюча традиційна технологія схрещування не є ефективною, оскільки обумовлена складною анатомією і малими розмірами квітки, що здатна до самозапилення, а також особливу біологію цвітіння у даного виду рослин [10–12].

Для розширення сортового різноманіття салату листового у селекційній практиці доцільно використовувати альтернативні, більш ефективні методи створення вихідного матеріалу. Одним із них є індукований мутагенез, за допомогою якого можна змінити лише одну або декілька ознак вихідної форми, які потім можна стабілізувати за відносно короткий проміжок часу в результаті проведення інбридингу протягом декількох поколінь [13]. Мутації можуть вплинути на еволюцію та поліпшення салату посівного (*Lactuca sativa* L.). Поряд зі звичайною гібридизацією, штучною або природною, індукований мутагенез є ефективним заходом створення генетичної мінливості, яку можна використовувати у фізіологічних чи генетичних дослідженнях [14–16]. Застосування мутагенезу також дуже ефективно в селекції різних видів салату для поліпшення низки господарсько-цінних ознак (стійкості до хвороб, підвищення врожайності, придбання нових корисних якісних ознак тощо) особливо у тих випадках, коли за звичайного схрещування генотипова мінливість у потомствах була пов'язана тільки з рекомбінацією тих ознак, які вже існують у батьківських компонентах [17, 18]. Мутаційна селекція вважається нетрансгенною, вона є більш прийнятною для споживачів і практично не зустрічає протидії з боку захисників навколишнього середовища, урядів, виробників та широкого загалу. Хоча процес мутагенезу може бути нескладним, все ж таки потрібна деяка практика і досвід, щоб визначити правильну дозу мутагену, що забезпечує високу частоту мутацій і низьку летальність. Через випадковий характер мутагенезу необхідно встановити велику популяцію ліній, що мутували, для того щоб вони були практично корисними для селекційного процесу. Може знадобитися велика площа експериментальної ділянки, щоб виростити рослини покоління M_1 і отримати достатньо насіння для селекції покоління M_2 [14, 19]. Існує п'ять основних видів салату посівного — головчастий (var. *capitata*), напівголовчастий (var. *acefala* Alef.), ромен (var. *longifolia*), листовий (var. *secalina*), стебловий (var. *angustana* jirish), які належать до групи зеленних культур. Здатність до самозапилення салату ще до розкриття квіток створює умови для

його обмеженої генетичної мінливості порівняно з іншими перехресно-запилюваними культурами. Мутагенні агенти, такі як рентгенівські промені, ультрафіолетове випромінювання, нейтрони, протони, альфа-, бета- і γ -промені, або хімічні мутагени, такі як етилметансульфонат (ЕМС) і диметилсульфат (ДМС) використовуються в селекції для незначного збільшення частоти мутацій, для отримання альтернативних за фенотипом мутантів порівняно із вихідними формами або як джерело цінних корисних ознак [20–23]. Дослідженням з індукованого мутагенезу салату листкового приділяється значної уваги у країнах з розвинутим аграрним сектором економіки. Завдяки чому вдалося вирішити ряд важливих проблем, пов'язаних з покращенням господарсько-цінних показників даної зеленної культури [24, 25]. Доведено, що найбільшого ефекту від використання різних за природою мутагенних чинників досягається якщо в разі об'єкта обробки використовувати повітряно-сухе насіння салату листкового [14, 19].

Продуктивним органом салату листкового є розетка листків. Залежно від сортового генотипу рослини мають період господарської придатності від 10 до 15 діб. Протягом вегетативної фази розвитку рослини утворюють справжні листки на 4–5 добу після формування котиледонів. У подальшому ріст листової розетки значно посилюється. Салат листовий відзначається значим генетичним різноманіттям листової пластинки за асоціацією якісних ознак, які визначають її форму, забарвлення, консистенцією та жилкування [12]. Морфогенез та ріст листя салату листкового мають складні механізми регуляції. Крім генетики, середовище існування також може істотно впливати на зміну структури листя, його колір та жилкування. Описані і добре помітні ознаки найрозповсюдженіших сортів салату листкового дуже важливі для ідентифікації фенотипу та аналізу асоціації фенотип-генотип. У всьому світі неможливо знайти два однакових листка, але листя різних сортів салату, ймовірно, виявляють більшу схожість [26]. Вочевидь, що статистичних ознак всього листя недостатньо для докладного опису відмінностей між сортами. Різні компоненти листя виконують певні фізіологічні функції і можуть бути кількісно описані та інтерпретовані з використанням їх властивостей, що спостерігаються. Візуально лист салату листкового можна розділити на різні функціональні області, такі як черешок та жилки для механічної підтримки і транспортування поживних речовин, інші області — для фотосинтезу. Нині існуючі методи структурного фенотипування справжнього листка будь-якого виду салату посівного не забезпечують можливості чітко розрізняти його складові. Окремі компоненти справжнього листка можна визначити вручну, проте цей процес є трудомістким і забирає багато часу. Проведено кілька досліджень фенотипування листків салату листкового на основі використання їх цифрових зображень для комп'ютерної обробки результатів візуалізації структурних компонентів [26, 27]. Запропонований експериментальний підхід закладає ефективну стратегію кількісного аналізу тонкої структури та компонентів відокремленого листка салату листкового за допомогою біофізичних методів досліджень, які ґрунтуються на основі методів мультиспектральної візуалізації. Проте на даний час, дані методи аналізу знаходяться ще на стадії розробки і потребують більш досконалої систематизації отриманих даних. Подальший прогрес у вирішенні цього питання дозволить більш детально відокремити численні ознаки для класифікації і ідентифікації листя та надати більш точну обчислювальну основу для його функціонального аналізу [26]. Основна структура справжнього листка встановлюється на ранній стадії його розвитку. Органогенез листя складається з процесу формування листової пластинки, структури жилкування, форми країв і особливостей забарвлення [28].

Одним із ключових етапів селекційного процесу є добір похідних джерел, що ґрунтуються на сукупності ознак, характерних для конкретних генотипів. Особливості їх

прояву у сортових популяціях визначаються як походженням видів, так і впливом змінюваності та стабільності фізіологічних функцій рослин. Ці функції формуються у рамках складної взаємодії між популяцією та екологічним середовищем. Класифікаційні ознаки діляться на морфологічні кількісні й якісні. Якісні ознаки характеризуються чіткими альтернативними дискретними проявами, такими як високий чи низький габітус рослин, широкий або вузький лист, довгий чи округлий колосок тощо. Кількісні ознаки охоплюють усі параметри, які можна виміряти, підрахувати або зважити. Вони демонструють безперервну змінність, при якій їх значення варіюють у широкому діапазоні. Окрім цього, кількісні ознаки відрізняються за закономірностями успадкування від якісних і характеризуються високою чутливістю до впливу умов навколишнього середовища [29, 30]. У різних видів салату особлива увага приділяється якісним ознакам, що визначають фенотип справжніх листків тому, що ці ознаки є генетично стабільними та не змінюються під впливом зовнішніх факторів, на відміну від кількісних показників. Саме на основі проведених досліджень з класифікації гербарних зразків справжнього листа вдалося провести систематику салату листового [31].

Згідно з класифікацією Міжнародного союзу з охорони нових сортів рослин (UPOV, 2021) у кожного виду рослин виділяються до 50 морфолого-ідентифікаційних ознак, відповідно до яких проводиться експертиза сортів і гібридів F₁ за комплексом апробаційних ознак. З огляду на це, в Українському Інституті експертизи сортів постійно проводяться методичні розробки з удосконалення кваліфікаційної експертизи сортів салату посівного на основі рекомендацій UPOV. Результатом цієї роботи є розробка відповідної методики-класифікатору апробаційних ознак, за якими реєструються нові сорти за критеріями ВОС-тесту (відмінність, однорідність і стабільність) прояву апробаційних ознак [32]. Методика-класифікатор визначає ботаніко-класифікаційні ознаки різних видів салату посівного — стеблового (var. *angustana jirish*), головчастого (var. *capitata*), напівголовчастого (var. *acepfala* Alef.), ромен (var. *longifolia*) та листового (var. *secalina*). Методика є базою для експертного оцінювання нових сортів шляхом визначення апробаційних ознак за ВОС-тестом, що є ключовою вимогою під час проведення кваліфікаційної експертизи. Зокрема, градація асоціації якісних ознак, що визначають фенотип листової пластинки проводиться на основі визначених сортів-еталонів. Під час проведення ВОС-тесту застосовуються відповідні бали якісних ознак, потрібні для створення цифрових кодових формул сорту [32]. Бальна оцінка широко застосовується у селекційній практиці для оптимізації процедури обліку значень кількісних ознак, виражених фізичними одиницями виміру. Створення релевантних шкал класифікації фізичних значень цих ознак з присвоєнням їм відповідного балу дозволяє під час обліку охоплювати значний простір одномірних оцінок та відображати їх в балах [12, 33, 34]. Інколи застосування бальної системи оцінки є єдиною можливим заходом щодо оцінки селекційно-цінних форм рослин по визначенню розбіжностей між їх ростом і розвитком та фенотипом ознак, що відображають їх онтогенез. Відмінність між селекційно-цінними зразками рослин, у яких рівень прояву ознак виражено в балах можна оцінити за непараметричними критеріями [35]. Ці критерії можуть бути корисними під час аналізу відмінностей селекційного матеріалу, зосереджуючи увагу на взаємозв'язку ознак, що разом характеризують відповідні інтегровані властивості і впливають на прояви макроскопічної мінливості. Особливо це стосується особливостей формування вегетативної сфери або загальної життєвої форми у межах певного набору ознак, які їх визначають.

Мета дослідження — визначити особливості мутагенного впливу γ -опромінювання і біологічно-активних речовин мутагенної дії на генотипову мінливість якісних ознак листової пластинки рослин салату листового вегетативної фази розвитку та дослідити кореляційні зв'язки між асоціацією якісних ознак, що визначають фенотип справжнього листка і кількісними ознаками ліній салату листового мутантного походження.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Полюві дослідження проводилися протягом 2021–2023 років на експериментальному полі Дослідної станції «Маяк» Інституту овочівництва і баштанництва НААН (с. Бакланово Чернігівської області). Агрокліматична зона проведення досліджень — Північний Лісостеп України. Об'єктом досліджень слугували мутантні лінії салату листкового покоління М₃–М₅, створені методами фізичного і хімічного мутагенезу на основі вітчизняного сорту Шар малиновий. Для отримання мутантних форм салату проводили передпосівну обробку повітряно-сухого насіння препаратами мутагенної дії, з яких диметилсульфат (ДМС) є еталонним препаратом, а ДМУ-1 і ДМУ-5 його хімічними аналогами вітчизняного виробництва (табл. 1). Проводилася передпосівна обробка насіння водними розчинами вищевказаних препаратів (концентрації 0,1 і 0,05 % протягом 3, 6 і 18 год.). Контрольний варіант передбачав замочування насіння салату у дистильованій воді за вищевказаних експозицій. Кожен з дослідних зразків салату висівали на облікових ділянках площею 4,2 м², за норми висіву насіння 0,9 г/діл. у чотирьох кратній повторності. У 2019 році було одержане мутантне покоління М₁. Протягом 2021–2023 років за проявом кількісних і якісних ознак вивчалися мутантні зразки покоління М₃–М₅, які на той час за ступенем генетичної однорідності і стабільності спадкування фенотипових ознак відповідали лінійним генотипам.

Таблиця 1. Схема досліду з розширення генотипової мінливості салату листкового сорту Шар малиновий методами фізичного і хімічного мутагенезу

Table 1. Scheme of the experiment on expansion of genotypic variability of Shar malynovyi lettuce variety by methods of physical and chemical mutagenesis

№ вар. досліджу	Мутагенний чинник	Доза обробки насіння γ-опроміненням та експозиція дії мутагенної речовини
1.	Контроль	Без обробки
2.	γ-опромінювання	7 кР
3.		11 кР
4.		15 кР
5.	Диметилсульфат (ДМС)	3 год.
6.		6 год.
7.		18 год.
8.	ДМУ-1	3 год.
9.		6 год.
10.		18 год.
11.	ДМУ-5	3 год.
12.		6 год.
13.		18 год.

Візуальними спостереженнями за ростом і розвитком мутантних ліній було виявлено їх генетично успадковані відмінності від вихідної форми, сорту Шар малиновий, за морфолого-ідентифікаційними ознаками справжнього листка. Зокрема, було виявлено відмінності у 16 якісних ознак з 17 проаналізованих, що визначають фенотип листової пластинки. Ідентифікацію проводили у відповідності до методики-класифікатору Українського Інституту експертизи сортів рослин різних видів салату посівного [32]. Детальний перелік якісних ознак наведено в таблиці 3 розділу статті “Результати та обговорення”.

Для визначення відмінностей фенотипового різноманіття справжніх листків між мутантними лініями і вихідним сортом застосовували методи непараметричної статистики [36]. Зокрема, для статистичної обробки даних рівнів прояву якісних ознак, виражених через бальну оцінку проводили за допомогою дисперсійного аналізу Фрідмана, також, проводили розрахунки коефіцієнту конкордації Кендала (W) і коефіцієнту кореляції Спірмана (r_s). Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою пакету прикладних програм STATISTICA 12 (StatSoft ® Inc., USA).

Однією з методичних вимог використання критеріїв непараметричної статистики до досліджуваної вибірки якісних ознак є потреба у нормуванні їх величин до однієї одиниці виміру [36]. У запропонованій методиці-класифікаторі для оцінки морфолого-ідентифікаційних якісних ознак, що описують фенотип справжнього листка, використовуються різні діапазони варіювання балів: від 1 до 2; від 1 до 3; від 1 до 4; від 1 до 7; від 3 до 7; від 1 до 9. Відсутність фенотипових проявів ознаки позначалася одиничним балом. Для уніфікації використаних шкал при оцінюванні було застосовано розрахунок індексу нормованих значень. Зіставлення асоціації якісних ознак у мутантних лініях здійснювалося не за вихідними шкалами балів, а за розрахованими індексами нормованих значень.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

За дії різних мутагенних чинників створено 17 мутантних ліній, похідних від вихідної форми — сорту Шар малиновий (табл. 2).

Таблиця 2. Мутантні форми салату листового (M_1), створенні в результаті індукованого мутагенезу, 2019 р.

Table 2. Mutant forms of leaf lettuce (M_1), created as a result of induced mutagenesis, 2019.

№ з/п	Мутагенний фактор	Варіант дослід з передпосівної обробки насіння	Назва зразку, згідно з каталогом (№ кат.)
1.	Вихідна форма		Сорт Шар малиновий (к-7431)
2.	γ-промені	опромінювання дозою 11 кР	ШМ(11) (к-7426)
3.			ШМ-1(11) (к-7404(1))
4.			ШМ-2(11) (к-7404(2))
5.		опромінювання дозою 15 кР	ШМ-1(15) (к-7409(1))
6.			ШМ-2(15) (к-7409(2))
7.			ШМ-3(15) (к-7409(3))
8.			ШМ-4(15) (к-7409(4))
9.	Препарат ДМУ-5	експозиція замочування 18 год.	ШМ(18) (к-7393)
10.	Препарат ДМС (еталон)	експозиція замочування 6 год.	ШМ-1(6) (к-7419(1))
11.			ШМ-2(6) (к-7419(2))
12.			ШМ(6) (к-7390)
13.	Препарат ДМУ-1	експозиція замочування 3 год.	ШМ-1(3) (к-7411(1))
14.			ШМ-2(3) (к-7411(2))
15.			ШМ(3) (к-7382)
16.			ШМ(3) (і.в.-1) (к-7383)
17.			ШМ(3) (і.в.-2) (к-7384)
18.			ШМ(3) (і.в.-3) (к-7385)

Аналіз якісних ознак мутантних ліній, похідних від даного сорту, було проведено у 2022 році на поколінні М₄. На той час створені мутантні лінії знаходилися у розсаднику конкурсного сортовипробування після трирічного відбору на стабільність прояву кількісних ознак. У виділених мутантних ліній були виявлені морфологічні відмінності від вихідної форми за морфологією, жилкуванням, формою краю і забарвленням листової пластинки. Відповідно до проведеного аналізу 17 якісних ознак, у об'єднаній вибірки 17 ліній і вихідної форми встановлено, що 1 ознака мала 5 ступенів прояву, 7 ознак — 4 ступеню прояву, 5 ознак — 3 ступеню прояву, 2 ознаки — 3 ступеню прояву і 1 ознака — 1 ступень прояву.

Найбільшій мінливості зазнала ознака «*Форма листової пластинки*», не змінилася ознака «*Розсіченість краю листової пластинки*». Асоціація з 7 ознак, що ідентифікують морфологію листової пластинки та її жилкування, мала 23 ступеня прояву. Асоціація з 6 ознак, що ідентифікують забарвлення листової пластинки, мала 20 ступенів прояву. Асоціація з 4 ознак, що ідентифікують форму краю листової пластинки, мала 12 ступенів прояву (табл. 3).

Відмінності між мутаційними зразками проводилися за обраними критеріями шляхом порівняння середніх значень індексів нормованих значень балів якісних ознак (рангів), які були виявлені в результаті дії мутагенних чинників. Результати розрахунків надано в таблиці 4. Діаграму за результатами рангового дисперсійного аналізу Фрідмана, представлено на рис. 1. Отримані дані засвідчили наявність відмінностей між сортом Шар малиновий та мутантними лініями за фенотипом справжнього листка. Критерієм відмінності асоціації досліджуваних якісних ознак відібраних зразків салату листового є порівнювання статистичного показника «*Сума рангів (S_i)*» з критерієм $\chi^2_{\text{експ}}$ [36]. Зокрема, виконання нерівності $S_i > \chi^2_{\text{експ}}$ є підтвердженням присутності мутантних ліній, відмінних від вихідного сорту. За одержаними нашими даними $\chi^2_{\text{експ.}} = 59,69$, у той час як інтервал значень показника «*Сума рангів*» становив $S_i = 112,5 \dots 222,0$. Отже, експериментально було підтверджено істотні відмінності між сортом Шар малиновий та похідними від нього мутантними лініями за асоціацією якісних ознак (табл. 4). Розрахунок коефіцієнту конкордації Кендала ($W = 0,207$) засвідчив наявність незначної узгодженості між блоками асоційованих якісних ознак кожного дослідного зразку салату листового та наявності значної специфічності за ними. Порівняльну оцінку розбіжностей між мутантними лініями і вихідним сортом проводили, також, за допомогою статистичного показника «*Середній індекс для вибірки*», що входить у дисперсійний аналіз Фрідмана та коефіцієнту кореляції Спірмена (r_s).

Згідно з даними таблиці 4, інтервал варіювання розрахованих коефіцієнтів кореляції Спірмена між сортом і мутантними лініями становив: $r_s = -0,244 \dots 0,327$. За даним коефіцієнтом між мутантними зразками і вихідною формою спостерігалось три виду зв'язку: дуже слабкий $\{\pm 0,0 < r_s < \pm 0,1\}$; слабкий $\{\pm 0,1 < r_s < \pm 0,3\}$; помірний $\{\pm 0,3 < r_s < \pm 0,5\}$.

До групи мутантних ліній з дуже слабкою кореляцією по відношенню до вихідної форми увійшли наступні 6 ліній ($r_s = -0,07 \dots 0,069$): ШМ(11); ШМ-1(11); ШМ-4(15); ШМ-2(3); ШМ(3) (інд. відбір-2); ШМ(3) (інд. відбір-3).

До групи мутантних ліній зі слабкою кореляцією по відношенню до вихідної форми увійшли наступні 9 ліній ($r_s = -0,244 \dots 0,192$): ШМ-1(15); ШМ-2(15); ШМ(18); ШМ-2(6); М(6); ШМ-1(6); ШМ-1(3); ШМ(3); ШМ(3) (інд. відбір-1).

До групи мутантних ліній з помірною кореляцією по відношенню до вихідної форми увійшли наступні 2 лінії ($r_s = 0,30 \dots 0,327$): ШМ-2(11); ШМ-3(15).

Таблиця 3. Індекси нормованих значень балів якісних ознак, що визначають фенотип справжнього листка дослідженої вибірки зразків салату листкового, 2022 р.

Table 3. Indices of normalized values of qualitative characteristics that determine the phenotype of the true leaf of the studied sample of leaf lettuce, 2022

Якісна ознака	Вихідна форма	ШМ(11)	ШМ-1(11)	ШМ-2(11)	ШМ-1(15)	ШМ-2(15)	ШМ-3(15)	ШМ-4(15)	ШМ(18)	ШМ-1(6)	ШМ-2(6)	ШМ(6)	ШМ-1(3)	ШМ-2(3)	ШМ(3)	ШМ(3) (1в-1)	ШМ(3) (1в-2)	ШМ(3) (1в-3)
Розбіжності за морфологією листкової пластинки та жилкування																		
розсіченість краю	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
листок за формою	0,56	0,33	0,22	0,78	0,78	0,10	0,78	0,22	0,22	0,33	0,22	0,78	0,78	0,10	0,78	0,22	0,10	0,22
форма верхівки	1,0	0,67	1,0	0,67	1,0	0,67	0,67	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,33	1,0	0,67	1,0	0,67
глянсуватість з верхнього боку	0,43	1,0	0,43	0,43	1,0	0,71	0,14	0,43	0,71	0,71	0,43	0,43	1,0	0,43	0,71	0,43	0,43	0,43
пухирчастість	0,56	0,33	0,33	0,10	0,33	0,33	0,10	0,10	0,33	0,33	0,10	0,56	0,78	0,10	0,56	0,56	0,10	0,33
пухирі за розміром	0,43	0,71	0,71	0,71	0,43	0,71	0,43	0,43	0,43	0,71	1,0	1,0	0,71	0,43	0,71	0,71	0,14	0,71
жилкування	1,0	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Розбіжності за формою краю листкової пластинки																		
хвилястість краю	1,0	0,33	0,33	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,33	0,56	0,10	0,33	0,33	0,33	0,33	0,10	0,10
розсіченість краю верхівки	1,0	0,10	0,10	1,0	1,0	0,10	1,0	0,10	0,10	1,0	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	1,0	0,10	1,0
глибина розсіченості краю верхівки	0,71	0,14	0,14	0,43	0,43	0,14	0,43	0,14	0,14	0,71	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,43	0,14	0,43
ступінь розсіченості краю верхівки	0,56	0,10	0,10	0,33	0,56	0,10	0,33	0,10	0,10	0,33	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,33	0,10	0,56
Розбіжності за забарвленням листкової пластинки																		
відтінок зеленого забарвлення	0,75	1,0	0,25	0,25	0,50	0,25	1,0	0,50	0,25	0,75	0,50	0,50	0,50	0,75	0,25	0,25	0,25	0,25
інтенсивність забарвлення зовнішніх листків	0,56	0,78	0,33	0,56	0,33	0,56	0,33	0,10	0,33	0,56	0,33	0,33	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56
антоціанове забарвлення	1,0	1,0	0,10	1,0	1,0	0,10	1,0	0,10	0,10	1,0	0,10	1,0	0,10	1,0	0,10	0,10	0,10	0,10
інтенсивність антоціанового забарвлення	0,56	0,33	0,10	0,10	0,33	0,10	0,33	0,10	0,10	0,56	0,10	0,10	0,10	0,33	0,10	0,10	0,10	0,10
поширення антоціанового забарвлення	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	1,0	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
тип поширення антоціанового забарвлення	0,33	1,0	0,33	0,33	1,0	0,33	1,0	0,33	0,33	1,0	0,33	0,33	0,33	1,0	0,33	0,33	0,33	0,33

Таблиця 4. Виявлені відмінності за досліджуваними якісними ознаками між мутантними лініями і вихідною формою
 Table 4. Differences identified in the studied qualitative characteristics between mutant lines and the original form

№ з/п	Мутантна лінія	№ каталогу	Коефіцієнт кореляції Спірмена, r_s ¹	Розрахунки за дисперсійним аналізом Фрідмана ²		
				Сума рангів (S_i)	Середній ранг вибірки	Середньо квадратичне відхилення для вибірки
1.	Шар малиновий	(к-7431)	-	222,0	13,06	0,65
2.	ШМ(11)	(к-7426)	-0,068	193,0	11,35	0,53
3.	ШМ-1(11)	(к-7404(1))	-0,064	134,50	7,91	0,33
4.	ШМ-2(11)	(к-7404(2))	0,30*	162,0	9,53	0,47
5.	ШМ-1(15)	(к-7409(1))	0,171	199,0	11,71	0,58
6.	ШМ-2(15)	(к-7409(2))	-0,244	128,50	7,56	0,32
7.	ШМ-3(15)	(к-7409(3))	0,327*	171,0	10,06	0,52
8.	ШМ-4(15)	(к-7409(4))	-0,07	115,50	6,79	0,29
9.	ШМ(18)	(к-7393)	-0,172	126,0	7,41	0,32
10.	ШМ-1(6)	(к-7419(1))	0,192	230,0	13,53	0,64
11.	ШМ-2(6)	(к-7419(2))	0,094	144,0	8,47	0,36
12.	ШМ(6)	(к-7390)	0,104	162,0	9,53	0,45
13.	ШМ-1(3)	(к-7411(1))	-0,102	176,50	10,38	0,45
14.	ШМ-2(3)	(к-7411(2))	0,023	148,50	8,74	0,40
15.	ШМ(3)	(к-7382)	-0,120	164,0	9,65	0,41
16.	ШМ(3) (і.в.-1)	(к-7383)	0,146	164,0	9,65	0,42
17.	ШМ(3) (і.в.-2)	(к-7384)	-0,037	112,50	6,62	0,28
18.	ШМ(3) (і.в.-3)	(к-7385)	0,069	154,0	9,06	0,41

Примітки:

1. Достовірність значень (*) підтверджена на рівні значущості $p < 0,05$.

2. Коефіцієнт конкордації Кендала (W) дорівнював 0,207, при значенні $\chi^2_{\text{експ.}} = 59,69$, яке перевищувало $\chi^2_{\text{табл.}} = 27,59$. Таким чином, статистично достовірна значимість коефіцієнту W підтверджена на 5 %-му рівні значущості, середнє рангових кореляцій $r = 0,157$.

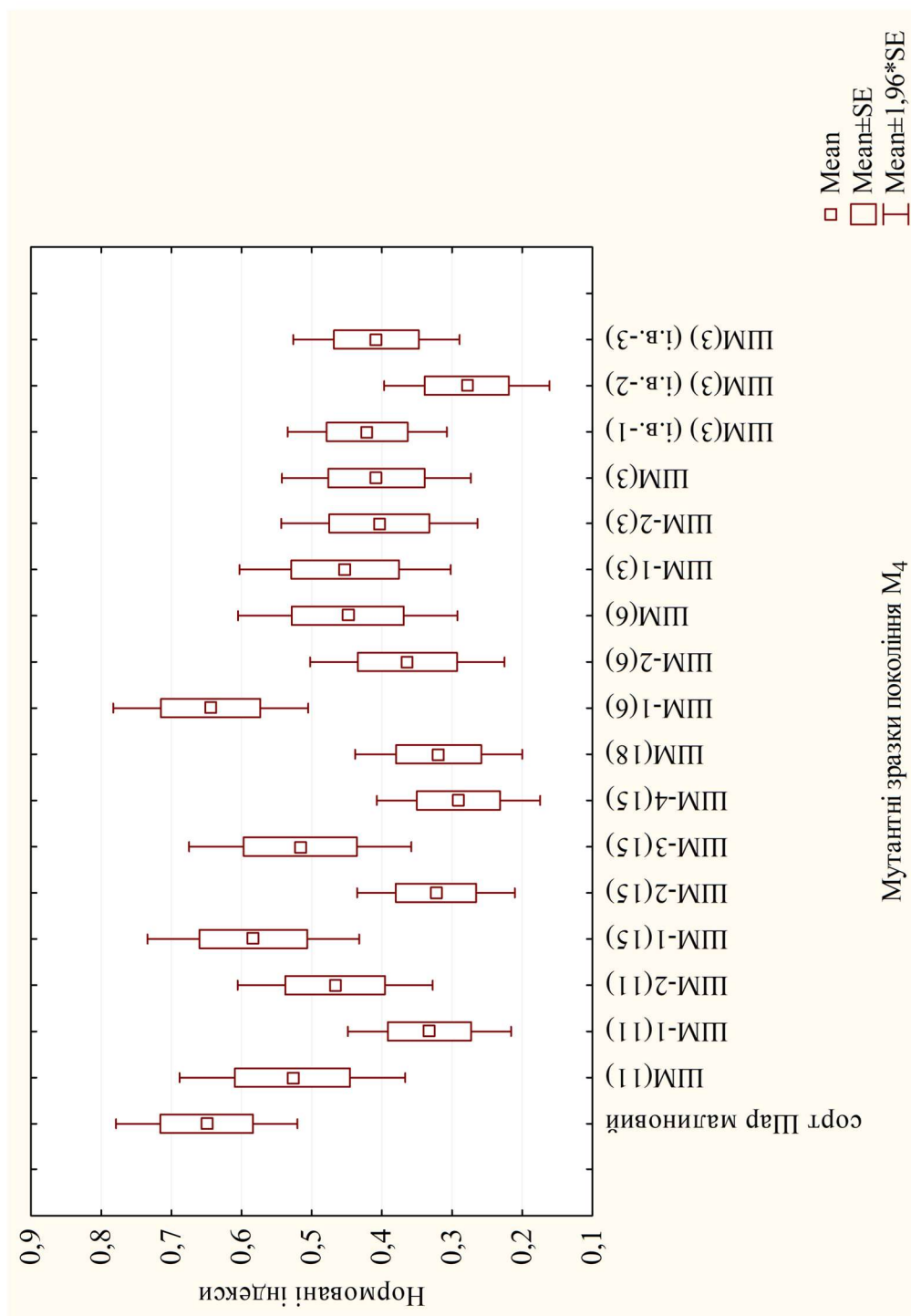


Рис. 1. Діаграма порівняльної відмінності мутантних ліній салату листкового, похідних від сорту Шар малиновий за генотиповими середніми індексами нормованих індексів, які визначають рівень мінливості асоційованих ознак, які обумовлюють морфологію листкової пластинки (покоління M₄).

Fig. 1 Diagram of comparative difference of mutant lines of lettuce derived from the Shar malinovy variety by genotypic mean indices of normalized values, which determine the level of variability of associated traits that define the morphology of the leaf blade (generation M₄).

Таблиця 5. Диференціація мутагенних чинників за непараметричними критеріями оцінки відмінності мутантних ліній, похідних від сорту салату листкового Шар малиновий за якісними ознаками, які визначають фенотип справжнього листка

Table 5. Differentiation of mutagenic factors according to non-parametric criteria for assessing differences between mutant lines derived from the Shar Malinovyi lettuce variety based on qualitative characteristics that determine the phenotype of the actual leaf

№ з/п	Мутагенний фактор	Варіант дослід з передпосівної обробки насіння	Мутантна лінія	Середній індекс для вибірки	Ліміти варіювання коефіцієнту рангової кореляції Спірмена		
					$\pm 0,0 < r_s < \pm 0,1$	$\pm 0,1 < r_s < \pm 0,3$	$\pm 0,3 < r_s < \pm 0,5$
1.		Вихідна форма – сорт Шар малиновий (к-7431)	ШМ(11) (к-7426)	0,65	-	-	-
2.			ШМ-1(11) (к-7404(1))	0,53	+		
3.			ШМ-2(11) (к-7404(2))	0,33	+		
4.			ШМ-1(15) (к-7409(1))	0,47			+
5.	γ-промені	опромінювання дозою 11 кР	ШМ-2(15) (к-7409(2))	0,58		+	
6.			ШМ-3(15) (к-7409(3))	0,32		+	
7.			ШМ-4(15) (к-7409(4))	0,52			+
8.			ШМ-1(6) (к-7419(1))	0,29	+		
9.	Препарат ДМС (еталон)	експозиція замочування 6 год.	ШМ-2(6) (к-7419(2))	0,64		+	
10.			ШМ(6) (к-7390)	0,36	+		
11.			ШМ(18) (к-7393)	0,45		+	
12.			ШМ-1(3) (к-7411(1))	0,32		+	
13.	Препарат ДМУ-1	експозиція замочування 18 год.	ШМ-2(3) (к-7411(2))	0,45		+	
14.			ШМ(3) (к-7382)	0,40	+		
15.			ШМ(3) (і.в.-1) (к-7383)	0,41		+	
16.			ШМ(3) (і.в.-2) (к-7384)	0,42		+	
17.		експозиція замочування 3 год.	ШМ(3) (і.в.-3) (к-7385)	0,28	+		
18.				0,41	+		

При цьому найбільш віддаленою за фенотипом листової пластинки була лінія ШМ-3 (інд. відбір-2) ($r_s = -0,037$), найбільш спорідненою – ШМ-3(15) ($r_s = 0,327$).

На діаграмі, яка відображає порівняльну оцінку мутантних ліній і вихідної форми за асоціацією досліджуваних якісних ознак, варіювання середніх індексів вибірки знаходилися як в межах похибки варіювання даного статистичного показника для сорту Шар малиновий, так і поза цією межею (рис. 1).

Згідно з даними діаграми, на рис. 1 і таблиці 4 виділено 6 мутантних ліній, які мали суттєві значення показника «Середній індекс для вибірки», що статистично достовірно відрізнялися від аналогічного показнику сорту Шар малиновий (0,65): ШМ-1(11) (0,33); ШМ-2(15) (0,32); ШМ-4(15) (0,29); ШМ(18) (0,32); ШМ-2(6) (0,36); ШМ(3) (інд. відбір-2) (0,28). За ранговим коефіцієнтом кореляції Спірмена дані мутантні лінії мали переважно негативні, дуже слабкої сили зв'язки із сортом Шар малиновий ($r_s = -0,244...0,094$). Винятком були лінії ШМ-2(15) ($r_s = -0,244$) і ШМ(18) ($r_s = -0,172$), які відзначилися слабкою кореляцією.

Рослини мутантних ліній салату листового покоління М₄ представлено на рис. 2.

Після визначення рівнів прояву якісних ознак було проведено кореляційний аналіз між ними та кількісними ознаками рослин вегетативної фази розвитку рослин усієї дослідженої вибірки зразків салату листового.

Розрахунки кореляцій проводилося за парного порівняння 7 селекційно-цінних кількісних ознак, що є структурними компонентами урожайності зі статистичним показником «Середній індекс для вибірки», який для кожного дослідного зразка є інтегральним критерієм асоціації якісних ознак, що формують фенотип справжнього листка (табл. 6). Розрахунок коефіцієнту кореляції проводили із залученням не тільки мутантних ліній, а й вихідного сорту салату листового Шар малиновий. Базу даних кількісних ознак було сформовано за результатами біометричних вимірювань мутантних ліній покоління М₃–М₅ і вихідного сорту, які вирощувалися у польових умовах протягом 2021–2023 років.

Таблиця 6. Коефіцієнт кореляції Спірмена r_s між ступенем прояву досліджуваної асоціації якісних ознак та рівнями прояву кількісних ознак рослин салату листового вегетативної фази розвитку

Table 6. Spearman's correlation coefficient r_s between the degree of manifestation of the studied association of qualitative characteristics and morpho-physiological indicators of the growth of leaf lettuce plants in the vegetative phase of development

Рівень прояву кількісних ознак Філогенетично споріднена група генотипів салату листового	Висота розетки рослин, см	Ширина розетки рослин, см	Ширина листка, см	Довжина листка, см	Кількість листків на одній рослині, шт.	Маса однієї рослини, г	Урожайність, т/га
Сорт Шар малиновий та похідні від нього 17 мутантних ліній	-0,192	0,206	0,483*	-0,103	-0,066	-0,253	-0,264

Примітка: * – достовірність підтверджена на рівні значущості $p < 0,05$.

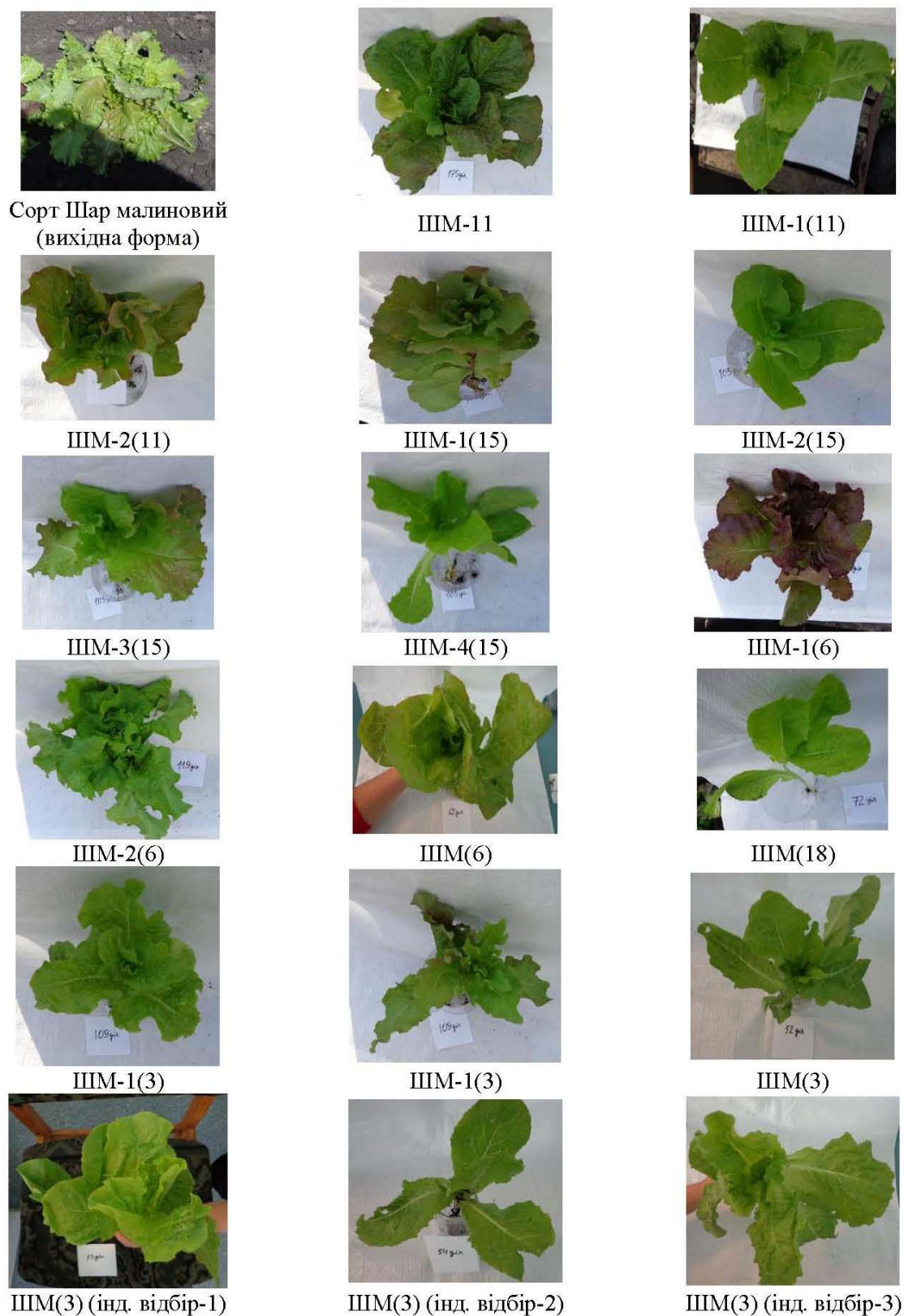


Рис. 2. Генотипове різноманіття рослин мутантних ліній салату листкового вегетативної фази розвитку, похідних від сорту Шар малиновий.

Fig. 2. Genotypic diversity of plants of mutant lines of lettuce of the vegetative phase of development derived from the Shar malynovy variety.

Підтверджено статистично достовірне значення коефіцієнту кореляції Спірмена для пари показників «Середній індекс для вибірки» та ознакою «Ширина листка» ($r_s = 0,483$) (табл. 6). Ця ознака є важливою в аспекті прогнозу потенційною продуктивності салатних рослин, оскільки є структурним компонентом урожайності листової маси під час проходження вегетативної фази розвитку рослин. Інші кореляції слід віднести до дуже слабких або слабких $\{\pm 0,0 < r_s < \pm 0,3\}$. Отже, усі виявленні мутаційні зміни асоціації якісних ознак, що визначають фенотип листової пластинки мали позитивну тенденцію до збільшення ширини листків. Цей експериментальний факт підтверджується тим, що усі 17 мутантних ліній перевищували сорт Шар малиновий за продуктивністю рослин на 3,5–45,0 %.

ВИСНОВКИ

Таким чином, в результаті випробування різних доз γ -опромінювання, трьох препаратів мутагенної дії ДМУ-1, ДМУ-5 та ДМС (еталон) підтверджено їх високу ефективність в індукції мутаційних змін в геномі салату листового, пов'язаних з морфологією листової пластинки. Серед застосованих мутагенних чинників найбільшу ефективність виявив препарат ДМУ-1 за дії якого одержано 6 мутантних ліній. За дії γ -опромінювання дозою 15 кР одержано 4 лінії. За дії γ -опромінювання дозою 11 кР і ДМС створено по 3 лінії, відповідно. За використання препарату ДМУ-5 одержано 1 лінію.

Методами непараметричної статистики проведено порівняльний аналіз розбіжностей за 17 якісними ознаками, що визначають фенотип листової пластинки між вихідною формою (сортом Шар малиновий) та 17 мутантними лініями, що від неї походять. За розрахунками коефіцієнту рангової кореляції Спірмена (r_s) спостерігалися від дуже слабкої до помірної сили кореляції ($r_s = -0,037 \dots 0,327$) між проявом досліджених якісних ознак у вихідній формі і похідних від неї 17 мутантних ліній. Відповідно до проведеної диференціації найбільш відмінними від вихідної форми виявилися 7 ліній – ШМ-2(3), ШМ(3) (інд. відбір-2), ШМ(3) (інд. відбір-3), ШМ(11) і ШМ-1(11), ШМ-4(15) і ШМ-2(6) ($r_s = -0,07 \dots 0,094$).

Встановлено, що помірної сили кореляція ($r_s = 0,483$) мала місце при порівняльному аналізі статистичного показника «Середній індекс для вибірки» та кількісної ознаки «Ширина листка» дослідженої вибірки мутантних ліній і вихідної форми. Отже, усі виявленні мутаційні зміни асоціації якісних ознак, що визначають фенотип листової пластинки, мали позитивну тенденцію до збільшення ширини листків. Цей експериментальний факт підтверджується тим, що усі 17 мутантних ліній перевищували сорт Шар малиновий за урожайністю на 3,5–45,0 %.

ПОДЯКА

Це дослідження фінансувалося в рамках виконання завдання II-го рівня 18.00.01.14.Ф «Вивчити дію індукованого мутагенезу з метою отримання мутацій для покращення генофонду малопоширених видів овочевих рослин» (№ державної реєстрації 0116U000046) ПНД НААН 18 «Овочівництво і баштанництво».

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори заперечують будь-який конфлікт інтересів.

Authors' ORCID ID

Serhii Kondratenko  <https://orcid.org/0000-0002-8859-1604>

Olga Gorobchenko  <https://orcid.org/0000-0003-1580-0679>

Zakhar Linnik  <https://orcid.org/0000-0003-0364-3522>

Svitlana Kormosh  <https://orcid.org/0000-0002-1694-8280>

Inna Mytenko  <https://orcid.org/0000-0001-8571-937X>

Oleksandr Pozniak  <https://orcid.org/0000-0002-6659-3238>

Lesia Chaban  <https://orcid.org/0000-0002-0854-3443>

REFERENCES

1. Corrêa Alves PI, Valente Gandra TK, Avila Gandra E. Microbiological analysis of lettuce (*Lactuca sativa*) from conventional and organic cultivation commercialized at fairs in Brazil. SDRP Journal of Food Science & Technology. 2018;3(2):1–8. <https://doi.org/10.25177/JFST.3.2.4>
2. Kovácsné Madar Á, Takácsné Hájos M. Agronomic evaluation of different lettuce (*Lactuca sativa* L.) varieties under unheated plastic tunnel. International Journal of Horticultural Science. 2022;28:50–6. <https://doi.org/10.31421/ijhs/28/2022/10314>
3. Medina-Lozano I, Bertolín JR, Díaz A. Nutritional value of commercial and traditional lettuce (*Lactuca sativa* L.) and wild relatives: Vitamin C and anthocyanin content. Food Chemistry. 2021;359:129864. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129864>
4. Arnold PA, Kruuk LEB, Nicotra AB. How to analyse plant phenotypic plasticity in response to a changing climate. New Phytologist. 2019;222:1235–41. <https://doi.org/10.1111/nph.15656>
5. Damerum A, Chapman MA, Taylor G. Innovative breeding technologies in lettuce for improved post-harvest quality. Postharvest Biology and Technology. 2020;168:111266. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111266>
6. Ferreira C, Lopes F, Costa R, Komora N, Ferreira V, Cruz Fernandes V, et al. Microbiological and Chemical Quality of Portuguese Lettuce – Results of a Case Study. Foods. 2020;9(9):1274. <https://doi.org/10.3390/foods9091274>
7. Acquaah G. Principles of Plant Genetics and Breeding [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2012. <https://doi.org/10.1002/9781118313718>
8. Hassan MN, Mekkiaw SA, Mahdy M, Salem KFM, Tawfik E. Recent molecular and breeding strategies in lettuce (*Lactuca* spp.). Genetic Resources and Crop Evolution. 2021;68(8):3055–79. <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01246-w>
9. Patella A, Palumbo F, Galla G, Barcaccia G. The Molecular Determination of Hybridity and Homozygosity Estimates in Breeding Populations of Lettuce (*Lactuca sativa* L.). Genes. 2019;10(11):916. <https://doi.org/10.3390/genes10110916>
10. Batista MF, De Souza LA. Flower structure in ten *Asteraceae* species: considerations about the importance of morpho-anatomical features at species and tribal level. Revista Brasileira de Botânica. 2016;40(1):265–79. <https://doi.org/10.1007/s40415-016-0312-9>
11. Han R, Truco MJ, Lavelle DO, Michelmore RW. A Composite Analysis of Flowering Time Regulation in Lettuce. Frontiers in Plant Science. 2021;12:632708. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.632708>
12. Křístková E, Doležalová I, Lebeda A, Vinter V, Novotná A. Description of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources. Horticultural Science. 2008;35(3):113–29. <https://doi.org/10.17221/4/2008-HORTSCI>
13. Mou B. Mutations in Lettuce Improvement. International Journal of Plant Genomics. 2012;2011:723518. <https://doi.org/10.1155/2011/723518>
14. Marcu D, Cristea V, Daraban L. Dose-dependent effects of gamma radiation on lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata*) seedlings. International Journal of Radiation Biology. 2012;89(3):219–23. <https://doi.org/10.3109/09553002.2013.734946>
15. Cheng J, Lu H, He X, Yang Z, Zhou J, Cen K. Enhancing growth rate of lettuce by mutating lettuce seeds with nuclear irradiation. Carbon Resources Conversion. 2018;1(1):55–60. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2018.05.001>
16. Gurdon C, Poulev A, Armas I, Satorov S, Tsai M, Raskin I. Genetic and Phytochemical Characterization of Lettuce Flavonoid Biosynthesis Mutants. Scientific Reports. 2019;9:3305. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39287-y>
17. Kondratenko SI, Mitenko IM, Krutko RV, Dul'nev PG. Adaptive potential of the gene pool of leaf lettuce, created by the method of induced mutagenesis on the basis of the domestic cultivar Velmozh. Scientific Reports of NULES of Ukraine. 2018;72(2). (in Ukrainian). <https://doi.org/10.31548/dopovidi2018.02.013>
18. Ohki S, Hatashita M. Mutation breeding by ion beam in lettuce (*Lactuca sativa* L.) using an *in vitro* regeneration system. Acta Hort. 2012;961:285–90. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.961.37>
19. Franco CH, dos Santos VHM, Silva LP, Arthur V, Silva RMG. Mutagenic potential of lettuce grown from irradiated seeds. Scientia Horticulturae. 2015;182:27–30. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.011>
20. Begum T, Dasgupta T. A comparison of the effects of physical and chemical mutagens in sesame (*Sesamum indicum* L.). Genet. Mol. Biol. 2010;33(4):761–6. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572010005000090>

21. Kodym A, Afza R, Forster BP, Ukai Y, Nakagawa H, Mba C. Methodology for physical and chemical mutagenic treatments. In: Shu QY, Forster BP, Nakagawa H. Plant mutation breeding and biotechnology [Internet]. CABI Digital Library; 2012. p. 169–80. <https://doi.org/10.1079/9781780640853.0169>
22. Kodym A, Afza R. Physical and Chemical Mutagenesis. In: Grotewold E, editor. Plant Functional Genomics. Methods in Molecular Biology™. Humana Press; 2003. V. 236. p. 189–203. <https://doi.org/10.1385/1-59259-413-1:189>
23. Saima Mir A, Maria M, Muhammad S, Mahboob Ali S. Potential of Mutation Breeding to Sustain Food Security [Internet]. Genetic Variation. IntechOpen; 2021. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94087>
24. Huo H, Henry IM, Coppoolse ER, Verhoef-Post M, Schut JW, de Rooij H, et al. Rapid identification of lettuce seed germination mutants by bulked segregant analysis and whole genome sequencing. The Plant Journal. 2016;88(3):345–60. <https://doi.org/10.1111/tpj.13267>
25. Sorel M, Svanella-Dumas L, Candresse T, Acelin G, Pitarch A, Houvenaghel MC, et al. Key Mutations in the Cylindrical Inclusion Involved in Lettuce mosaic virus Adaptation to eIF4E-Mediated Resistance in Lettuce. Molecular Plant-Microbe Interactions. 2014;27(9):1014–24. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-14-0111-R>
26. Du J, Li B, Lu X, Yang X, Guo X, Zhao C. Quantitative phenotyping and evaluation for lettuce leaves of multiple semantic components. Plant Methods. 2022;18:54. <https://doi.org/10.1186/s13007-022-00890-2>
27. Bauer A, Bostrom AG, Ball J, Applegate C, Cheng T, Laycock S, et al. Combining computer vision and deep learning to enable ultra-scale aerial phenotyping and precision agriculture: A case study of lettuce production. Horticulture Research. 2019;6:70. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0151-5>
28. Bar M, Ori N. Leaf development and morphogenesis. Development. 2014;141(22):4219–30. <https://doi.org/10.1242/dev.106195>
29. Ceccarelli S, Grando S. Evolutionary plant breeding as a response to the complexity of climate change. iScience. 2020;23(12):101815. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101815>
30. Ewing PM, Runck BC, Kono TYJ, Kantar MB. The home field advantage of modern plant breeding. PLoS ONE. 2019;14(12):e0227079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227079>
31. Guo Z, Li B, Du J, Shen F, Zhao Y, Deng Y, et al. LettuceGDB: The community database for lettuce genetics and omics. Plant Communications. 2023;4(1):100425–5. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100425>
32. Kondratenko SI, Mohylina OM, Khareba OV, Leshchuk NV, Khareba VV, Kuts OV, et al. Metodyka-klasifikator provedennia ekspertyzy sortiv salatu posivnoho (*Lactuca sativa* L.) na vidminnist, odnoridnist i stabilnist [Classification methodology expertise *Lactuca sativa* L. for the demand, odinority and stabilisation]. 2nd ed. Vinnytsia: TOV Tvory; 2019. 65 p. (in Ukrainian). Available from: https://www.sops.gov.ua/uploads/publication/2019/Salat_t.pdf
33. Seyyed H, Mousavi, Hassandokht M, Choukan R, Sepahvand N, Khosrowchali M, et al. Assessment of Qualitative and Quantitative Traits in Commercial Iranian Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Genotypes. Annals of Biological Research. 2012;3(9):4352–61. Available from: <https://www.scholarsresearchlibrary.com/articles/assessment-of-qualitative-and-quantitative-traits-in-commercial-iranian-lettuce-lactuca-sativa-l-genotypes.pdf>
34. Basnet KM, Adhikari NR, Pandey MP. Multivariate Analysis among the Nepalese and Exotic Mungbean (*Vigna Radiata* L. Wilczek) Genotypes Based on the Qualitative Parameters. Universal Journal of Agricultural Research. 2014;2(5):147–53. <https://doi.org/10.13189/ujar.2014.020502>
35. Macfarland TW, Yates JM. Introduction to Nonparametric Statistics for the Biological Sciences Using R. Cham Springer International Publishing; 2016. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-30634-6>
36. Litun PP, Kyrychenko VV, Petrenkova VP, Kolomatska VP. Systemnyi analiz v selektsii polovykh kultur. Navchalnyi posibnyk [System analysis in field crop breeding. Study guide]. Kharkiv: Yutiev Plant Production Institute of NAAS; 2009. 354 p. (in Ukrainian).

ANALYSIS OF PHENOTYPIC DIVERSITY OF TRUE LEAVES IN LETTUCE LINES (*LACTUCA SATIVA* VAR. *SECALINA* L.) CREATED BY PHYSICAL AND CHEMICAL MUTAGENESIS

S. I. Kondratenko¹ , O. A. Gorobchenko^{2,*} , Z. P. Linnik² ,
S. M. Kormosh³ , I. M. Mytenko³ , O. V. Pozniak⁴ , L. V. Chaban⁴ 

¹Department of Selection and Seed Production of Vegetables and Melons, Institute of Vegetable and Melon Growing of NAAS, 1 Institutaska str., Selektysyne village, Kharkiv district, Kharkiv region, 62478, Ukraine,

²Department of Molecular and Medical biophysics, V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine

³Laboratory of Vegetable and Spice Crops, Institute of Agrarian Resources and Regional Development of NAAS, 17 Svobody Ave., V. Bakta village, Beregov district, Zakarpattia region, 90252, Ukraine,

⁴Laboratory of Vegetable Plant Breeding and Technology, Research station “Mayak” of Institute of Vegetable and Melons Growing of NAAS, 39, Nezalezhnosti Str., Kruty village, Nizhynskyi district, Chernihivskyi region, 16645, Ukraine

*Corresponding author: gorobchenko@karazin.ua
Submitted August 8, 2025; Revised September 2, 2025;
Accepted November 10, 2025

Background: To expand the genotypic diversity of lettuce (*Lactuca sativa* var. *secalina* L.), it is advisable to use physical and chemical mutagenesis methods that allow changing beneficial traits of the original form, which can then be stabilized rapidly as a result of inbreeding. Biophysical methods of analysis based on multispectral imaging technologies for phenotypic identification and classification of the studied are not yet sufficiently improved. Therefore, it is advisable to conduct biometric measurements and morphological and identification analyses of the phenotype of mutant genotypes by scoring the levels of manifestation of quality traits.

Objectives: To determine the characteristics of the mutagenic effect of γ -radiation and biologically -active substances of mutagenic action on the genotypic variability of qualitative traits of leaf blade of lettuce plants in the vegetative phase of development and to investigate the correlation between the association of qualitative traits that determine the phenotype of the true leaf and quantitative traits of lettuce lines of mutant origin.

Materials and methods: Non-parametric statistics and criteria for comparing plant objects, methods of botanical classification of leaf lettuce, correlation analysis.

Results: The mutagenic effect of three biologically active substances (DMS (reference), DMU-1, DMU-5) and γ -rays at doses of 11 and 15 kR on the genotypic variability of leaf lettuce based on a set of qualitative characteristics was studied. A comparative analysis of the differences between the qualitative characteristics of the original form (Shar malynovyi variety) and 17 mutant lines created on its basis was carried out. As a result of testing the different mutagens, their high efficiency in inducing mutational changes in the lettuce genome associated with the leaf blade morphology was confirmed. DMU-1 showed the highest efficiency, and 6 mutant lines were obtained under its action. Under the action of γ -irradiation with a dose of 15 kR, 4 lines were obtained. Under the action of γ -irradiation with a dose of 11 kR and DMS, 3 lines were created, respectively.

Conclusions: The established correlations between the levels of qualitative and quantitative traits allow for the selection of potentially high-yielding mutant lines of leaf lettuce depending on the inherited mutational changes that determine the morphology of the real leaf. In particular, it becomes possible to select mutant genotypes based on predicting the level of manifestation of the quantitative trait "Leaf width" ($r_s = 0,483$), which is essential in predicting potential productivity.

KEY WORDS: lettuce lines; real leaves; qualitative and quantitative characteristics; chemical and physical mutagenesis; correlation patterns.

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-54-07>

УДК 577.352 + 636.09

МОДЕЛЮВАННЯ ВЗАЄМОДІЇ C₆₀ ФУЛЕРЕНУ З БІЛКОВИМИ МІШЕННЯМИ SARS-CoV-2

В. В. Гурмач¹, В. Р. Караушу², З. С. Клестова³, В. П. Берест⁴,
Ю. І. Прилуцький^{2,*}

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 12 жовтня 2025 р. Переглянута 22 листопада 2025 р.

Прийнята до друку 24 листопада 2025 р.

Актуальність: Віднайдення ефективних лікувальних засобів проти небезпечної хвороби, спричиненої SARS-CoV-2, є важливим напрямом біомедичних досліджень. Методи молекулярного докінгу та молекулярної динаміки є ключовими інструментами сучасної фармацевтичної науки, забезпечують швидкий пошук і оптимізацію противірусних сполук, дозволяють прогнозувати їхню ефективність та адаптувати терапію до нових штамів SARS-CoV-2. Фулерен C₆₀ привертає значну увагу як перспективний наноматеріал у боротьбі з SARS-CoV-2 завдяки своїй здатності утворювати стабільні комплекси з ключовими вірусними білками, такими як головна протеаза (3CLpro) та РНК-залежна РНК-полімераза (RdRp). Молекулярні моделювання та біофізичні дослідження показали, що C₆₀ може проникати крізь ліпідну оболонку вірусу та блокувати функціональну активність його білків, що відкриває можливості для створення нових противірусних препаратів. Враховуючи постійні мутації SARS-CoV-2 та обмеженість існуючих терапевтичних засобів, дослідження фулерену C₆₀ як потенційного інгібітора є актуальним напрямом нанотехнології для розробки інноваційних стратегій лікування COVID-19.

Мета роботи полягала в оцінці *in silico* здатності C₆₀ фулерену взаємодіяти з білковими мішенями 3CLpro (3-Chymotrypsin-Like protease) і RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) коронавірусу SARS-CoV-2 і, таким чином, цілеспрямовано їх блокувати, пригнічуючи функціональну активність SARS-CoV-2.

Методи: Структурні дані білків 3CLpro та RdRp коронавірусу SARS-CoV-2 було отримано з Protein Data Bank, а геометрію C₆₀ фулерену згенеровано за допомогою онлайн-сервера SwissParam. Взаємодії між C₆₀ фулереном і досліджуваними білками моделювали за допомогою алгоритму системного молекулярного докінгу (sdock+). Потенційні сайти зв'язування визначали за допомогою програмного пакета Caver. Молекулярно-динамічні розрахунки проводили у програмному

Як цитувати: Гурмач ВВ, Караушу ВР, Клестова ЗС, Берест ВП, Прилуцький ЮІ. Моделювання взаємодії C₆₀ фулерену з білковими мішенями SARS-CoV-2. Біофізичний вісник. 2025;54:100–107. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-54-07>

Citation: Hurmach VV, Karaushu VR, Klestova ZS, Berest VP, Prylutsky YuI. Modeling the interaction of C₆₀ fullerene with SARS-CoV-2 protein targets. Biophysical Bulletin. 2025;54:100–107. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-54-07>

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

середовищі Gromacs 2020. Енергетичну мінімізацію потенційних комплексів «C₆₀ фулерен – білок» виконували з використанням пакета g_mmpbsa.

Результати: Встановлено можливий механізм зв'язування C₆₀ фулерену з білковими мішенями 3CLpro та RdRp коронавірусу SARS-CoV-2. Дані молекулярного докінгу та молекулярної динаміки демонструють, що C₆₀ фулерен формує стабільні комплекси з цими білками, що може призводити до пригнічення їх функціональної активності.

Висновки: Показано, що C₆₀ фулерен здатний утворювати стабільні комплекси з білками 3CLpro і RdRp SARS-CoV-2, що потенційно знижує їхню активність і, відповідно, може впливати на загальну активність коронавірусу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: C₆₀ фулерен; коронавірус SARS-CoV-2; 3CLpro і RdRp білки; молекулярний докінг; молекулярна динаміка.

Поширення емерджентного коронавірусу SARS-CoV-2 почалося з поодиноких випадків, зафіксованих наприкінці 2019 року, і згодом набуло швидкого розповсюдження у світі. Це змусило ВООЗ оголосити глобальну пандемію COVID-19. Первинні симптоми інфекції включають лихоманку або озноб, кашель, задишку, втому, біль у м'язах або тілі, головний біль, втрату смаку або нюху, біль у горлі, нежить тощо [1]. Тяжкість перебігу цієї інфекції залежить від багатьох факторів: характеристик вірусу (приналежності до певного субтипу, варіанту), наявності специфічних клітинних рецепторів, стану організму людини (його імунологічних складових, включаючи фактори клітинної імунологічної відповіді), супутніх та хронічних захворювань, вікових параметрів, статі і т.і.

Як і будь-який вірус, SARS-CoV-2 змінюється з часом і деякі зміни впливають на його властивості, зокрема на здатність легко поширюватися та викликати тяжкість перебігу захворювання, на резистентність до терапевтичних препаратів, зниження чутливості діагностичних тестів та ефективність вакцинації тощо [2]. SARS-CoV-2 зазнав кількох мутацій з моменту своєї появи, що призвели до змін варіантів вірусу: Альфа-, Бета-, Гамма-, Дельта-, Омикрон-, Арктур-варіант і т.д. [3, 4]. На сьогоднішній день SARS-CoV-2 спричинив у світі понад 775 мільйонів підтверджених випадків захворювання, у тому числі понад 7 мільйонів смертей (WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard, 2025). Можна впевнено казати, що глобальна активність SARS-CoV-2 зростає і вакцинація наразі залишається ключовим терапевтичним заходом для запобігання важкому захворюванню і смертності від COVID-19.

SARS-CoV-2, збудник що викликав пандемію COVID-19, є членом родини Coronaviridae, геном якого представляє лінійну позитивну одноланцюгову РНК розміром 22-36 тис. нуклеотидів з 5'-кінцевою структурою і 3'-поліаденілірованим "хвостом" та типовою геномною організацією 5'-NCR-реплікази-S-E-M-N-NCR-3'. Цей вірус, представник підродини Orthocoronavirinae, має оболонкові плеоморфні або майже сферичні віріони діаметром 80-160 нм з шипо-подібними виступами на поверхні. Нуклеокапсид складається з нуклеокапсидного білка (N) і РНК, виглядає вільно намотаним, з невеликими спіральними одиницями, розподіленими по всій внутрішній поверхні віріону. Віріони складаються з трьох або чотирьох мембраноасоційованих білків: шипа (S), оболонки (E) і мембранного глікопротеїну (M). Ген реплікази складається з двох великих відкритих рамок зчитування (ORF), що перекриваються, 1a та 1b. Трансляція ORF1b програмується рибосомальним зсувом рамки і призводить до утворення поліпротеїнів pp1a та pp1ab, які у подальшому процесингуються протеїназами, що кодуються вірусом. Гени структурних білків S, E, M і N межують зі змінною кількістю аксесорних (допоміжних) білків ORFs [5].

До складу вірусу SARS-CoV-2 входять критично важливі білки 3CLpro (NSP5), 3-хімотрипсин-подібна протеаза, і RdRp (NSP12), РНК-залежна РНК-полімераза. Структура білка 3CLpro добре описана у роботі [6], де каталітична діада His41–Cys145

виступає як мішень для інгібіторів. Щодо структурної організації білка RdRp, то вона визначена за допомогою електронної кріомікроскопії [7]. Зазначимо, що білок 3CLpro відповідає за протеолітичне розщеплення вірусного поліпротеїну pp1a/pp1ab на функціональні неструктурні білки, серед яких — RdRp [8]. Білок RdRp є ключовим компонентом реплікаційного комплексу SARS-CoV-2, відповідального за синтез вірусної РНК [7]. Він функціонує у взаємодії з білками-кофакторами NSP7 та NSP8 [9].

Сучасні нанобіотехнології активно застосовують наночастинки, що відкриває нові можливості для розв'язання низки клінічних завдань, включно з тими, які постали внаслідок пандемії COVID-19 [10, 11]. У цьому контексті особливу увагу привертає C₆₀ фулерен — нанорозмірна, майже сферична, біосумісна та біодоступна молекула [12-14], якій притаманна виражена противірусна активність «специфічного» типу [15, 16]. Відомо, що хімічно модифікований C₆₀ здатний стерично блокувати ліпофільний канал протеаз вірусів HIV-1 та HIV-2 [17, 18], а також ефективно інгібувати полімеразу NS5B і протеазу NS3/4A вірусу гепатиту С [19]. Крім того, моделі *in ovo* [20] та *in vitro* [21] підтвердили протикоронавірусний потенціал водорозчинних похідних C₆₀.

Метою цієї роботи було *in silico* оцінити здатність C₆₀ фулерену взаємодіяти з білковими мішенями 3CLpro і RdRp коронавірусу SARS-CoV-2 та, відповідно, визначити його можливість цілеспрямовано пригнічувати їхню функціональну активність і активність вірусу загалом.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Структури досліджуваних білків 3CLpro (PDB ID 6M2N) і RdRp (PDB ID 7BV2) коронавірусу SARS-CoV-2 були взяті з Protein Data Bank (PDB) [22]. Для генерування топології C₆₀ фулерену використали онлайн сервер SwissParam [23].

Для дослідження взаємодії C₆₀ фулерену (вихідна гнучка молекула) з тим чи іншим білком (вихідна жорстка молекула) використано вбудований у QXP (швидкий пошук (Quick eXPlore)) алгоритм системного молекулярного докінгу (sdock+) [24, 25]. Максимальна кількість кроків розрахунку складала 300, найоптимальніший «C₆₀ фулерен–білок» комплекс, виходячи з внутрішніх скоринг-функцій QXP (контактна поверхня та відстань між ключовими амінокислотами білка і C₆₀ фулереном), відбирали для подальшого *in silico* тестування.

Розрахунки методом молекулярної динаміки (МД) виконано у програмному пакеті Gromacs 2020 [26] з силовим полем Charmm36 [27].

Потенційні ділянки для зв'язування C₆₀ фулерену визначили за допомогою «cavity computational algorithm» у програмному пакеті Caver [28]. Спочатку всі молекули води та природні ліганди було видалено зі структури білків. Потім, перед поверхневим аналізом білків-мішеней та виявленням потенційних кишень зв'язування для C₆₀ фулерену, до білків додали усі відсутні атоми гідрогену та провели корекцію протонування амідів та бічних ланцюгів відповідно до клітинного рівня pH=7.0 використавши функцію “*ingh*” наявну у Gromacs 2020. Після того як взаємодіючі системи було об'єднано, їх помістили у квадратний бокс і заповнили молекулами води (TIP3P). Мінімальна відстань між стінками боксу та найближчим атомом досліджуваної системи складала 9 Å, завдяки чому вона здатна вільно обертатися та взаємодіяти у цьому середовищі. Для імітації клітинного середовища туди додали іони Na⁺/Cl⁻ (їх концентрація у боксі складала 0,15 М). Основний етап МД симуляції тривав 200 нс.

Нарешті, мінімізацію енергії досліджуваних систем (потенційних комплексів «C₆₀ фулерен – білок») було проведено з використанням програмного пакету g_mmpbsa [29].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Припускається, що пригнічення функціональної активності коронавірусу SARS-CoV-2 може бути зумовлене молекулярним механізмом дії C_{60} фулеренів, який полягає у їхній здатності безпосередньо взаємодіяти з ключовими білками вірусу – зокрема, 3CLpro та RdRp. Ці білки є критично важливими для перебігу життєвого циклу SARS-CoV-2 [30], і їх блокування здатне порушувати вірусну реплікацію. Виходячи з такого припущення, було виконано моделювання потенційних комплексів між C_{60} фулереном та зазначеними білковими мішенями SARS-CoV-2, а також проведено оцінку їхньої стабільності у змодельованому клітинному середовищі. З цією метою застосовано методи молекулярного докінгу та молекулярної динаміки, що дозволило розрахувати, зокрема, енергетичний внесок окремих амінокислотних залишків у зв'язування кожного з білків із C_{60} фулереном.

Дизайн комплексу « C_{60} фулерен–3CLpro білок»

Результат молекулярного докінгу свідчить про здатність C_{60} фулерену інгібувати каталітичну діаду (Cys145 і His41) 3CLpro білку. C_{60} фулерен щільно заповнює кишеню зв'язування та блокує взаємодію каталітичної діади з будь-якими іншими молекулярними структурами, що узгоджується з передбаченням [6]. У цьому комплексі найбільш вираженими є стекинґ взаємодія C_{60} фулерену з His 41, Cys 145, Met 49, Met 165 та стерична взаємодія з Gln 189, Asn 142 (Рис. 1).

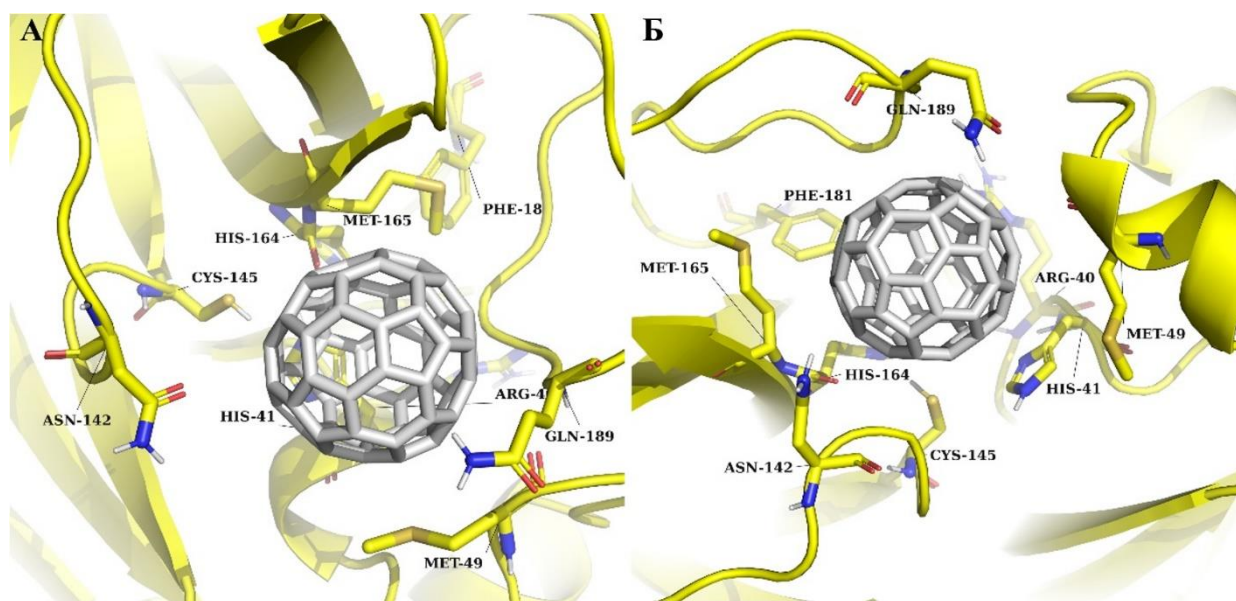


Рис. 1. Кишеня зв'язування C_{60} фулерену (сірий колір) із 3CLpro білком (жовтий колір): А — результат молекулярного докінгу; Б — результат МД.

Fig. 1. Binding pocket of C_{60} fullerene (gray color) with 3CLpro protein (yellow color): Left — molecular docking result; Right — MD result.

За результатами МД отриманий комплекс « C_{60} фулерен–3CLpro білок» є стабільним упродовж усієї траєкторії динаміки: значення Rmsd (Root mean square deviation) для комплексу знаходиться в межах 3–4 Å. Загалом, під час МД симуляції фіксували такі ключові конформаційні зміни: у кишені зв'язування C_{60} фулерен зміщується на 3.1 Å та тягне за собою Asn 142 (його зміщення становить 4 Å). Внаслідок такого зміщення Gln

189 витискається зі свого нативного положення C_{60} фулереном на відстань 2.1 Å та утворює π -катіон взаємодію з Arg 40. Щодо взаємодії з каталітичною діадою (His 41 і Cys 145) та Phe 181, C_{60} фулерен утворює з ними стекінг взаємодію, як і після молекулярного докінгу. Але, що цікаво, C_{60} фулерен змінює нативну орієнтацію каталітичної діади, внаслідок чого її цілісність порушується, що, без сумніву, негативно впливатиме на функціонування 3CLpro білка.

На наступному етапі було оцінено енергію зв'язування окремих амінокислот 3CLpro білка із C_{60} фулереном. Зокрема, енергія зв'язування для His 41 і Cys 145 є найбільшою і становить -2.6 і -2.2 кДж/моль, відповідно. Енергетика зв'язування C_{60} фулерену з амінокислотами 3CLpro білка є такою: для Met 49 — -5.1 кДж/моль, Met 165 — -7.1 кДж/моль, Leu 50 — -4.3 кДж/моль, Gly 143 — -3.9 кДж/моль, Asp 187 — -3.7 кДж/моль, Gln 189 — -4.7 кДж/моль.

На підставі результатів молекулярного докінгу та молекулярної динаміки можна зробити висновок, що фулерен C_{60} здатний формувати стійкий комплекс із протеїном 3CLpro SARS-CoV-2, що потенційно може призводити до пригнічення його функціональної активності та блокування реплікації вірусу.

Дизайн комплексу « C_{60} фулерен-RdRp білок»

Результат молекулярного докінгу свідчить про здатність C_{60} фулерену інгібувати канал синтезу РНК RdRp білка: C_{60} фулерен щільно заповнює кишеню зв'язування і утворює такі взаємодії — π -стекінг з Arg 570, Lys 578, Tyr 690 та стеричні взаємодії з Asp 497, Leu 577 (Рис. 2).

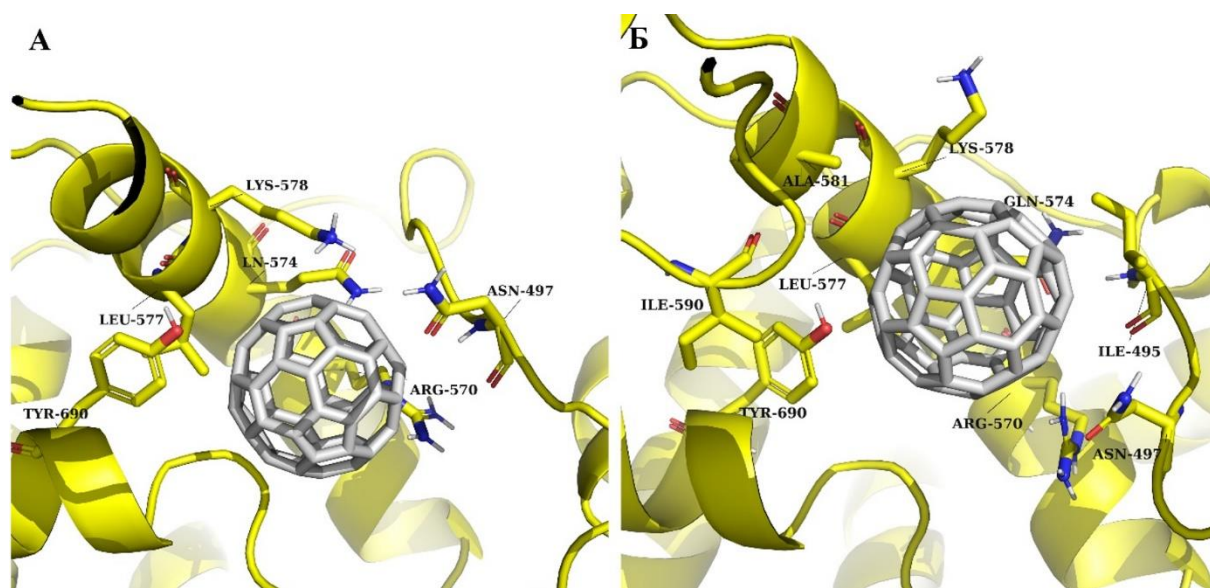


Рис. 2. Кишеня зв'язування C_{60} фулерену (сірий колір) із RdRp білком (жовтий колір): А — результат молекулярного докінгу; Б — результат МД.

Fig. 2. Binding pocket of C_{60} fullerene (gray color) with RdRp protein (yellow color): Left — molecular docking result; Right — MD result.

Відповідно до результатів МД при зв'язуванні C_{60} фулерену з RdRp білком не відбувається значних конформаційних змін: амінокислоти Ile 590, Tyr 690, Leu 577, Gln

574 практично не змінюють свого положення у просторі (їх зміщення не перевищують 0.3 Å), а зміщення Lys 578, Arg 570 не перевищують 1 Å.

Енергетика зв'язування C₆₀ фулерену з амінокислотами RdRp білка є такою: для Ile 49 — -5.2 кДж/моль, Asn 497 — -2.2 кДж/моль, Leu 557 — -6.1 кДж/моль, Lys 578 — -5.1 кДж/моль, Ala 581 — -4.1 кДж/моль, Ile 590 — -2.1 кДж/моль, Gly 591 — -2.3 кДж/моль.

Таким чином, результати молекулярного докінгу та молекулярно-динамічного моделювання свідчать про те, що фулерен C₆₀ може формувати стабільний комплекс із білком RdRp SARS-CoV-2, що потенційно здатне пригнічувати його каталізаторну активність шляхом блокування каналу синтезу вірусної РНК.

ВИСНОВКИ

Отримані результати *in silico* аналізу методами молекулярного докінгу та молекулярної динаміки свідчать, що фулерен C₆₀ здатний формувати стабільні комплекси з білками 3CLpro та RdRp коронавірусу SARS-CoV-2, що призводить до пригнічення їхньої функціональної активності й, відповідно, реплікаційних процесів коронавірусу. Це підкреслює потенційні переваги водорозчинних, біосумісних і відносно безпечних у низьких дозах похідних фулеренів C₆₀ як перспективних терапевтичних наноагентів проти SARS-CoV-2.

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

Authors' ORCID ID

В. В. Гурмач  <https://orcid.org/0000-0002-0844-1586>
 В. Р. Карауш  <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. Ochani RK, Asad A, Yasmin F, Shaikh S, Khalid H, Batra S, et al. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. *Infez Med.* 2021;29(1):20–36. Available from: https://www.infezmed.it/media/journal/Vol_29_1_2021_3.pdf
2. Lai A, Bergna A, Ventura CD, Zehender G. Genomic epidemiology and phylogenetics applied to the study of SARS-CoV-2 pandemic. *New Microbiol.* 2023;46(1):1–8. Available from: https://www.newmicrobiologica.org/PUB/allegati_pdf/2023/1/1.pdf
3. Rahman S, Hossain MJ, Nahar Z, Shahriar M, Bhuiyan MA, Islam MR. Emerging SARS-CoV-2 variants and subvariants: challenges and opportunities in the context of COVID-19 pandemic. *Environ Health Insights.* 2022;16:11786302221129396. <https://doi.org/10.1177/11786302221129396>
4. Nazmunnahar, Ahmed I, Islam MR. Risk evaluation and mitigation strategies for newly detected SARS-CoV-2 Omicron BF.7 subvariant: a brief report. *Health Sci Rep.* 2023;6(3):e1127. <https://doi.org/10.1002/hsr2.1127>
5. Woo PCY, de Groot RJ, Haagmans B, Lau SKP, Neuman BW, Perlman S, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Coronaviridae 2023. *J Gen Virol.* 2023; 104(4):001843. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001843>
6. Amorim VMF, Soares EP, Ferrari ASA, Merighi DGS, de Souza RF, Guzzo CR, et al. 3-Chymotrypsin-like Protease (3CLpro) of SARS-CoV-2: Validation as a Molecular Target, Proposal of a Novel Catalytic Mechanism, and Inhibitors in Preclinical and Clinical Trials. *Viruses.* 2024;16(6):844. <https://doi.org/10.3390/v16060844>
7. Hillen HC, Kokic G, Famung L, Dienemann C, Tegunov D, Cramer P. Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase. *Nature.* 2020;584:154–6. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2368-8>
8. Lee J, Kenward C, Worrall LJ, Vuckovic M, Gentile F, Ton A-T, et al. X-ray crystallographic characterization of the SARS-CoV-2 main protease polypeptide cleavage sites essential for viral processing and maturation. *Nat Commun.* 2022;13:5196. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32854-4>

9. Kirchdoerfer RN, Ward AB. Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors. *Nat Commun.* 2019;10:2342. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10280-3>
10. 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/nnm-2020-0117>
11. 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>
12. 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>
13. 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. *Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.* 2015;23(6):530–4. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2013.870900>
14. Halenova T, Raksha N, Savchuk O, Ostapchenko L, Prylutsky 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>
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. 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>
18. 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>
19. 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>
20. Hurmach V, Karaushu V, Klestova Z, Berest V, Prylutsky 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. Hurmach V, Karaushu V, Klestova Z, Berest V, Prylutsky Y. 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>
22. RCSB Protein Data Bank [Internet]. The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank [cited 2024 Nov 5]. Available from: <https://www.rcsb.org/>
23. 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>
24. 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>
25. 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>
26. 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>
27. 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>
28. 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):3586–8. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty386>
29. Kumari R. g_mmpbsa [Internet]. Available from: https://rashmikumari.github.io/g_mmpbsa/
30. Wua C, Liu Y, Yang Y. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm Sin B.* 2020;10:766–88. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.02.008>
31. Prylutska SV, Grebinyk AG, Lynchak OV, Byelinska IV, Cherepanov VV, Tauscher E, et al. In vitro and in vivo toxicity of pristine C₆₀ fullerene aqueous colloid solution. *Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.* 2019;27(9):715–28. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2019.1634055>

MODELING THE INTERACTION OF C₆₀ FULLERENE WITH SARS-CoV-2 PROTEIN TARGETSV. V. Hurmach¹, V. R. Karaushu², Z. S. Klestova³, V. P. Berest⁴, Yu. I. Prylutsky^{2,*}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, Ukrainee-mail: prylut@ukr.net

Submitted October 12, 2025; Revised November 22, 2025;

Accepted November 24, 2025

Background: The discovery of effective therapeutics against the dangerous disease caused by SARS-CoV-2 is an important direction of biomedical research. Molecular docking and molecular dynamics methods are key tools of modern pharmaceutical science, providing rapid search and optimization of antiviral compounds, allowing to predict their effectiveness and adapt therapy to new strains of SARS-CoV-2. Fullerene C₆₀ attracts considerable attention as a promising nanomaterial in the fight against SARS-CoV-2 due to its ability to form stable complexes with key viral proteins, such as the main protease (3CLpro) and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). Molecular modeling and biophysical studies have shown that C₆₀ can penetrate the lipid envelope of the virus and block the functional activity of its proteins, which opens up opportunities for the creation of new antiviral drugs. Given the constant mutations of SARS-CoV-2 and the limitations of existing therapeutics, the study of C₆₀ fullerene as a potential inhibitor is a relevant direction of nanotechnology for the development of innovative strategies for the treatment of COVID-19.

Aim of the work was to assess in silico the ability of C₆₀ fullerene to interact with the protein targets 3CLpro (3-Chymotrypsin-Like protease) and RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) of the SARS-CoV-2 coronavirus and, thus, to specifically block them, inhibiting the functional activity of SARS-CoV-2.

Methods: Structural data of the 3CLpro and RdRp proteins of the SARS-CoV-2 coronavirus were obtained from the Protein Data Bank, and the geometry of C₆₀ fullerene was generated using the online server SwissParam. Interactions between C₆₀ fullerene and the studied proteins were modeled using the system molecular docking algorithm (sdock+). Potential binding sites were determined using the Caver software package. Molecular dynamics calculations were performed in the Gromacs 2020 software environment. Energy minimization of potential C₆₀ fullerene — protein complexes was performed using the g_mmpbsa software.

Results: Putative mechanism of binding of C₆₀ fullerene to the protein targets 3CLpro and RdRp of the SARS-CoV-2 coronavirus was established. Molecular docking and molecular dynamics data demonstrate that C₆₀ fullerene forms stable complexes with these proteins, which can lead to inhibition of their functional activity.

Conclusions: It is shown that C₆₀ fullerene is able to form stable complexes with the 3CLpro and RdRp proteins of SARS-CoV-2, which potentially reduces their activity and, accordingly, can affect the overall activity of the coronavirus.

KEY WORDS: C₆₀ fullerene; SARS-CoV-2 coronavirus; 3CLpro and RdRp proteins, molecular docking, molecular dynamics.

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-54-08>

УДК 577.3

ТИЖДЕНЬ БІОФІЗИКИ В УКРАЇНІ: ОНЛАЙН ЗУСТРІЧ ХАРКІВСЬКОГО ВІДДІЛЕННЯ УКРАЇНСЬКОГО БІОФІЗИЧНОГО ТОВАРИСТВА

24 березня 2025 року в рамках щорічного вже десятого «Тижня біофізики» організованого Американським Біофізичним товариством [1] у Харківському національному університеті імені В. Н. Каразіна відбулася подія «Біофізичний тиждень в Україні: досвід через кордони» [2], яка об'єднала дослідників, студентів та фахівців задля обговорення сучасних досягнень у галузі біофізики. Захід став платформою для обміну досвідом, здобутками та поглядами між українськими біофізиками, які працюють як в Україні, так і за кордоном, а також сприяв налагодженню співпраці, обговоренню передових досліджень і просуванню ролі біофізики у вирішенні глобальних наукових та освітніх викликів.

У програмі заходу було представлено доповіді випускників кафедри біофізики Каразінського університету кількох поколінь (Рис. 1), які охоплювали найрізноманітніші теми. На початку заходу з вітальними словами виступили завідувач кафедри молекулярної і медичної біофізики Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна доктор фізико-математичних наук, професор Берест Володимир Петрович та Голова Українського біофізичного товариства [3], доктор біологічних наук, професор, професор кафедри біофізики та нейробіології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка Мартинюк Віктор Семенович. Починаючи зустріч [4] професор Берест Володимир Петрович зазначив, що проведення таких заходів допомагає налагодженню зав'язків Українського біофізичного товариства з колегами в Сполучених Штатах, дозволяє підтримати українську біофізичну спільноту, розповісти про можливості розвитку, побудови кар'єри вченого, педагога, дослідника або підприємця на прикладі випускників кафедри біофізики, яка існує в Каразінському університеті вже майже 50 років. Професор Мартинюк Віктор Семенович привітав учасників з подією, відзначив, що біофізична наука існує в Україні давно і є одним з фундаментів біологічної науки, торкнувся питання проблем і викликів, які стоять перед сучасними студентами у вивченні біофізики, зазначив, що попри важкі умови війни є потенціал для розвитку біофізики, у тому числі в рамках заходів Українського біофізичного товариства.

З доповідями виступили доктор фізико-математичних наук, професор Шестопалова Ганна Вікторівна, завідувачка відділу біологічної фізики Інституту радіофізики та

Як цитувати: Берест ВП, Горобченко ОО. Тиждень біофізики в Україні: онлайн зустріч Харківського відділення Українського біофізичного товариства. Біофізичний вісник. 2025;54:108–111. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-54-08>

In cites: Berest VP, Gorobchenko OO. Biophysics week in Ukraine: online meeting of the Kharkiv branch of the Ukrainian biophysical society. Biophysical Bulletin. 2025;54:108–111. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-54-08>

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

електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України (Україна); доктор фізико-математичних наук, старший науковий співробітник, Влада Анатоліївна Пашинська, старший науковий співробітник Фізико-технічного інституту низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України (Україна); Dr. Sci. Ludmilla Morozova-Roche, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Umeå University, Umeå (Sweden); кандидат біологічних наук, доцент Шейкіна Надія Валеріївна, доцент кафедри фундаментальних та суспільно-гуманітарних наук Національного фармацевтичного університету (Україна); Adjunct Associate Professor, Ph.D. Valeriya Gritsenko, West Virginia University, Department of Chemical and Biomedical Engineering & Department of Mechanical, Materials and Aerospace Engineering (USA); доктор біологічних наук, професор, академік НААН України Безуглий Микола Дмитрович, завідувач кафедри біотехнології Державного біотехнологічного університету (Україна); Research Fellow, Ph.D. Galina Prokopchuk, Laboratory of Molecular Biology of Protists, Institute of Parasitology Biology Centre CAS & Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science, University of South Bohemia (Czech Republic); Postdoc, Ph.D. Iuliia Iermak, Structural Membrane Biology Laboratory, TU Dresden (Germany); Associate Professor, Ph.D. Sergiy Yakovenko, West Virginia University, School of Medicine (USA); доктор фізико-математичних наук, старший науковий співробітник Косевич Марина Вадимівна, провідний науковий співробітник Фізико-технічного інституту низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України (Україна), головний редактор журналу «Біофізичний вісник»; Reseacher, Ph.D. Polina Pisklova, Institute of Physics, University of Rostock (Germany); Experimental Research Officer, Ph.D. Alexandra Solovyova, Institute for Cell and Molecular Biosciences, The Medical School University of Newcastle (UK); Senior Lecturer, Ph.D. Andrei Tarasov, Ulster University, Coleraine (UK).

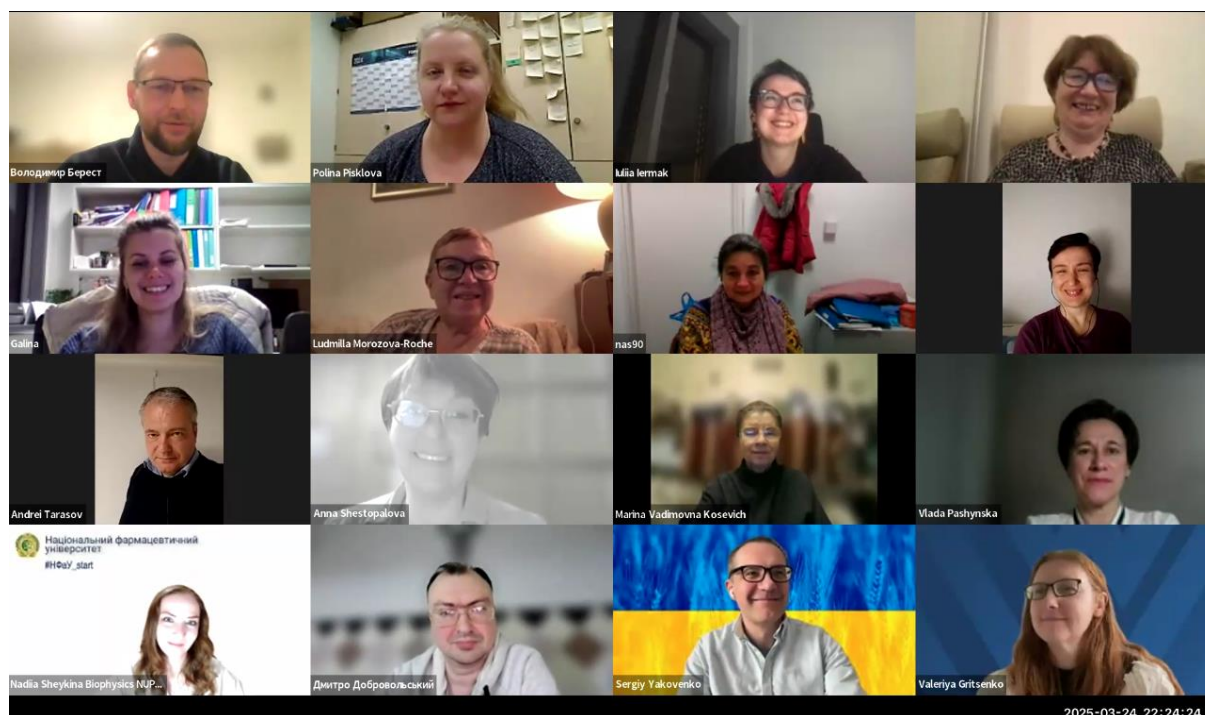


Рис. 1. Учасники Zoom зустрічі «Біофізичний тиждень в Україні: досвід через кордони» в рамках десятого «Тижня біофізики», організованого Американським Біофізичним товариством на базі Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Fig. 1. Participants of the Zoom meeting “Biophysical Week in Ukraine: Experience Across Borders” as part of the tenth “Biophysics Week” event organized by the American Biophysical Society at V. N. Karazin Kharkiv National University.

Професор Шестопалова Ганна Вікторівна розповіла про історію відділу біологічної фізики Інституту радіофізики та електроніки Академії наук України, про випускників кафедри кількох поколінь, які працюють в цьому відділі, про їх наукові здобутки і досягнення, згадала про видатні школи фізики і біології в Харкові, що створили можливості для проведення біологічних досліджень з використанням фізичних і радіофізичних методів [5]. Розповіді про свій науковий шлях та темі вивчення міжмолекулярних взаємодій лікарських сполук з біомолекулами та супутніми агентами на шляху направлено пошуку нових ліків та ефективних схем лікування присвятила свою доповідь доктор фіз.-мат. наук Пашинська Влада Анатоліївна [6]. У доповіді «Life in biophysics across Europe: from protein folding to amyloid diseases» [7] Dr. Sci. Людмила Морозова-Рош розповіла про своє наукове життя у біофізиці, дослідження механізмів самоасоціації білків в амілоїдні олігомери та фібрили, цитотоксичності неправильно згорнутих білкових комплексів, можливості використання амілоїдів як нових наноматеріалів у нанобіотехнологіях. Доцент Шейкіна Надія Валеріївна розповіла про молекулярне моделювання як спосіб пошуку стабільних таутомерів та найкращого розчинника для хімічного синтезу [8], зазначила важливість біофізики для фармацевтичної галузі. Ph.D. Валерія Гриценко присвятила свою доповідь темі біотехнологій і тому, яку роль навчання на кафедрі біофізики Каразінського університету зіграло в її науковій кар'єрі [9]. Академік НААН України Безуглий Микола Дмитрович розповів про свій науковий шлях, роботу на керівних посадах в уряді, відзначив важливу роль математичних методів у створенні біофізичних моделей, зокрема створенні загальної теорії кріопшкодження і кріозахисту яйцеклітини ембріонів ссавців. Темі складної будови найпростіших організмів була присвячена доповідь Ph.D. Галини Прокопчук, в якій вона розповіла про свою наукову роботу з вивчення одноклітинних. Про свій шлях до структурної біології розповіла Ph.D. Юлія Єрмак [10], надала свої поради щодо курсів та літніх шкіл, до яких можна долучитись молодим вченим і отримати натхнення для своєї подальшої роботи або навчання. Доповідь на тему «Порушені нейронні обчислення» зробив Ph.D. Сергій Яковенко [11], в якій він зазначив важливість вивчення того, як відбується контроль руху людиною, що пов'язано не тільки з м'язами, нервовою системою, а ще додатково з механічною системою; про можливості використання математичного моделювання для симуляції цього руху та застосування цього в медичній допомозі людям з порушеннями рухового апарату, їх реабілітації та при протезуванні. Д-р фіз.-мат. наук Косевич Марина Вадимівна розповіла про успішні наукові кар'єри другого випуску 1981 року на той час кафедри молекулярної та прикладної біофізики, та про створення журналу «Біофізичний вісник» і його роль у поширенні біофізичних знань [12]. Наймолодша учасниця зустрічі, випускниця кафедри молекулярної і медичної біофізики Каразінського університету Ph.D. Поліна Пісклова поділилась своїм науковим шляхом. У доповіді: «Від магістра біофізики до докторки філософії крізь органічні люмінесцентні сполуки та наночастинки» [13], вона розповіла про виклики і можливості на науковому шляху сучасного молодого науковця. Ph.D. Олександра Соловійова розповіла про свою наукову кар'єру, дослідження температурних переходів білків та мембран, занурення у методи фармакокінетики, структурної біології, про застосування методів седиментації та мас-спектрометрії для вивчення інтактних білків. Ph.D. Андрій Тарасов розповів про свій науковий шлях після закінчення кафедри біофізики Каразінського університету і власні дослідження клітинного сигналіngu.

Під час зустрічі були розглянуті проблеми вивчення білкового фолдингу та місфолдингу, наноструктурованих платформ для адресної доставки лікарських засобів, мембранної біофізики, нейронауки та біомедичних застосувань інтерфейсів «людина-машина». Учасники брали активну участь в інтерактивних обговореннях, ділилися

своїми науковими проєктами та ідеями для міжнародної співпраці. Онлайн-формат події (Рис. 1) дав змогу випускникам поділитися професійним досвідом, науковими досягненнями та викликами, з якими стикається сучасна біофізика. Голова Українського біофізичного товариства підсумував зібрані ідеї щодо ефективної діяльності товариства та активної міжнародної співпраці [4].

Однією з ключових частин події стала панельна дискусія про майбутнє біофізики в Україні, під час якої особливу увагу було приділено міждисциплінарності, глобальній мобільності та підтримці молодих дослідників. Захід зміцнив зв'язки всередині біофізичної спільноти та надихнув студентів долучатися до наукової діяльності в цій галузі.

Ми щиро вдячні Biophysical Society [1] за підтримку цієї ініціативи та сподіваємося на подальшу співпрацю задля популяризації біофізики у світі.

REFERENCES

1. Biophysical Society. Biophysical Society [Internet]. Bethesda (MD): Biophysical Society; c2025. Available from: <https://www.biophysics.org/> Accessed 2025 Nov 24.
2. Biophysical Society. Affiliate Events — Biophysics Week [Internet]. Bethesda (MD): Biophysical Society; c2025. Available from: <https://www.biophysics.org/outreach/biophysics-week/affiliate-events> Accessed 2025 Nov 24.
3. Ukrainian Biophysical Society. Main page [Internet]. Kyiv: Ukrainian Biophysical Society; c2025. Available from: <https://ubpht.knu.ua/Main%20Page.html> Accessed 2025 Nov 24.
4. Biophysics Karazin University. Welcome speech of Volodymyr Berest for Biophysics Week 2025 [video on the Internet]. 2025 May 07. Available from: <https://youtu.be/gsmU30bbPKY?si=iJtMDFq3FZ6pZ0XB>
5. Biophysics Karazin University. Ganna Shestopalova “Department of Biological Physics of the O. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of the National Academy of Sciences of Ukraine — graduates of several generations of the biophysics department” [video on the Internet]. 2025 May 21. Available from: <https://youtu.be/Chy0b8R8K1c?si=lt11bWQI8zLz42y7>
6. Biophysics Karazin University. Report by Vlada Pashynska at an online meeting for Biophysics Week 2025 [video on the Internet]. 2025 May 08. Available from: https://youtu.be/5bAxx2d-W_o?si=Vht5C4vw33nFpHVR
7. Biophysics Karazin University. Ludmilla Morozova-Roche “Life in biophysics across Europe...” Q&A Biophysics Week 2025, [video on the Internet]. 2025 May 13. Available from: <https://youtu.be/Uk6vtzwq0e0?si=OcvmpFfa5qLKm4e1h>
8. Biophysics Karazin University. Nadiya Sheykina “Molecular modeling as a method for finding stable tautomers...” [video on the Internet]. 2025 May 14. Available from: <https://youtu.be/8adXIHq1r5A?si=sOaCkQr3s9nbzq9J>
9. Biophysics Karazin University. Valeriya Gritsenko, “How studying at our Department of Biophysics kick-started my scientific career” [video on the Internet]. 2025 May 15. Available from: <https://youtu.be/L0Z991by6J4?si=ZCCL8KKo8tNOzG9K>
10. Biophysics Karazin University. Iuliia Iermak “The path to structural biology” [video on the Internet]. 2025 June 02. Available from: <https://youtu.be/WL6nxiXQfQY?si=ZzC-rc5ot8-hhjt>
11. Biophysics Karazin University. Sergiy Yakovenko, “Broken neural computations”, доповідь в межах Biophysics Week 2025. [video on the Internet]. 2025 October 30. Available from: <https://youtu.be/PI3tdeBLtME?si=Ns3Hf4wpHRPSYkGW>
12. Biophysics Karazin University. Marina Kosevich, “Impact of “Biophysical Bulletin” journal in dissemination of biophysical knowledge” [video on the Internet]. 2025 November 04. Available from: <https://youtu.be/bUzVzp7JqtM?si=DyhsnzN fd6mSfUz>
13. Biophysics Karazin University. Polina Pisklova “From Master of Biophysics to Doctor of Philosophy through organic luminescent compounds” [video on the Internet]. 2025 November 27. Available from: <https://youtu.be/Cxf F2LE8FY?si=u lhIVCFcJL6fkAL>

В. П. Берест, О. О. Горобченко

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

Volodymyr Berest  <https://orcid.org/0000-0001-7779-154X>

Olga Gorobchenko  <https://orcid.org/0000-0003-1580-0679>

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. 54

Збірник наукових праць

Укр. та англ. мовами.

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

Підписано до друку 26.11.2025. Формат 60×84 1/8.
Папір офсетний. Друк цифровий.
Ум. друк. арк. 9,47. Обл.-вид. арк. 11,01. 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