

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

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

Біофізичний Вісник

Випуск 55

Заснований 1998 р.

Харків 2026

Біофізичний вісник публікує наукові статті, короткі повідомлення та огляди, які містять оригінальні результати розв'язання фізико-математичних та інженерно-технічних проблем, що відносяться до біологічних систем різного рівня організації, методами експериментальної і теоретичної фізики, математичного та комп'ютерного моделювання. УДК 577. Засновник журналу Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна. Рік заснування 1998. Періодичність виходу 2 рази на рік. Ідентифікатор медіа у Реєстрі суб'єктів у сфері медіа: **R30-04481** (Рішення № 1538 від 09.05.2024 р. Національної ради України з питань телебачення і радіомовлення. Протокол № 15).

ISSN 2075-3829 (Online)

ISSN 2075-3810 (Print)

Біофізичний вісник є фаховим виданням України категорії «А» у галузях наук: 10 Природничі науки за спеціальностями 104 Фізика та астрономія, 105 Прикладна фізика та наноматеріали; 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія; 16 Хімічна та біоінженерія за спеціальністю 163 Біомедична інженерія (наказ Міністерства освіти і науки України № 220 від 21.02.2024).

Всі статті проходять внутрішнє та зовнішнє подвійне сліпе рецензування.

Номер затверджено до друку рішенням Вченої ради Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (протокол № 9 від 25.05.2026).

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

Domapov 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, доцент, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Київ, Україна

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

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

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

Степаньян С. Г., д.ф.-м.н., с.н.с., 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, 2026

© Хунг Дук Нгуєн, модель молекулярного докінгу CPD1 з білком 6GL8 на першій сторінці обкладинки, 2026

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

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

Biophysical Bulletin

Issue 55

Founded in 1998

Kharkiv 2026

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

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

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

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

Approved for publication by the Academic Council of V. N. Karazin Kharkiv National University (May 25, 2026, Protocol No. 9).

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., Universitat Leipzig, Germany

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

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

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

O. I. Gordienko, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Prof., 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 Quimica, 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, 2026

© Hung Duc Nguyen, molecular docking model of CPD1 with 6GL8 protein on the first page of the cover, 2026

ЗМІСТ

EDITORIAL

- V. A. Karachevtsev, M. V. Kosevich, G. I. Dovbeshko**
9th International conference “Nanobiophysics: fundamental and applied aspects” 9–13

МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

- Олександр Росляков, Сергій Єрмоленко, Олександр Пересунько**
Візуалізація та морфометрія змін біотканин шийки матки на основі нормалізованих спектральних індексів 14–35

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

- Victor Martynyuk, Yuliya Tseyslyer, Olena Gromozova, Igor Hretskyi, Yurii Penchuk, Liubov Shynkarenko Sichel, Tetyana Falaleeva**
Bacterial lysate of *Lactobacillus rhamnosus* DV suppresses bioluminescence of photobacterium phosphoreum 36–43

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

- Н. М. Моїсєєва, В. Г. Мирний, Ю. С. Ахатова, О. Л. Горіна**
Регуляторна дія синтетичного нейропептида опіоїдної дії на білковий гомеостаз в умовах холодового стресу 44–52

МАТЕРІАЛИ ДЛЯ БІОМЕДИЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ

- N. Ia. Holub, H. M. Klepach, O. G. Stasyk, I. D. Stolyarchuk, O. V. Kuzyk, V. O. Los, A. I. Stolyarchuk**
CDTE quantum dots–albumin bionanocomplex: genotoxic potential and bioimaging application in a *Drosophila melanogaster* model 53–64

МЕДИЧНА ФІЗИКА

- D. M. Nozdrenko, O. V. Rizun, M. Yu. Kuznietsova, N. G. Raksha, T. I. Halenova, O. V. Lynchak, V. P. Berest, Yu. I. Prylutsky**
Biomechanical and biochemical characteristics of *musculus soleus* contraction in obese rats 65–75

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА**Hung Duc Nguyen**Computational modeling of selected phytochemicals from *Reevesia formosana*: mechanistic insights into their potential against lung cancer

76–94

О. Ю. Лиманська, О. В. Білойван, О. К. Балак, О. П. Лиманський

3D моделі білків та консервативних G-квадруплексів в геномі цирковірусу свині

95–
116**БІОМЕДИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ****V. D. Koniukhov, O. M. Morgun, K. E. Nemchenko**

Improving the efficiency of spine region segmentation using an ensemble of pre-trained neural networks

117–
129**ХРОНІКА****В. С. Мартинюк**

Біофізичний тиждень 2026. Біофізика в Україні: енергія і воля людей в науці і освіті в умовах війни

130–
135

CONTENTS

EDITORIAL

- V. A. Karachevtsev, M. V. Kosevich, G. I. Dovbeshko**
9th International conference “Nanobiophysics: fundamental and applied aspects” 9–13

METHODS OF BIOPHYSICAL INVESTIGATIONS

- Olexandr Roslyakov, Serhiy Yermolenko, Oleksandr Peresunko**
Visualization and morphometrics of changes in cervical biotissues based on normalized spectral indices 14–35

BIOPHYSICS OF COMPLEX SYSTEMS

- Victor Martynyuk, Yuliya Tseyslyer, Olena Gromozova, Igor Hretskyi, Yurii Penchuk, Liubov Shynkarenko Sichel, Tetyana Falaleeva**
Bacterial lysate of *Lactobacillus rhamnosus* DV suppresses bioluminescence of *Photobacterium phosphoreum* 36–43

ACTION OF PHYSICAL AGENTS ON BIOLOGICAL OBJECTS

- N. M. Moisieieva, V. H. Myrnyi, Y. S. Akhatova, O. L. Horina**
Regulatory effect of a synthetic opioid neuropeptid on protein homeostasis under cold stress conditions 44–52

MATERIALS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

- N. Ia. Holub, H. M. Klepach, O. G. Stasyk, I. D. Stolyarchuk, O. V. Kuzyk, V. O. Los, A. I. Stolyarchuk**
CDTE quantum dots–albumin bionanocomplex: genotoxic potential and bioimaging application in a *Drosophila melanogaster* model 53–64

MEDICAL PHYSICS

- D. M. Nozdrenko, O. V. Rizun, M. Yu. Kuznietsova, N. G. Raksha, T. I. Halenova, O. V. Lynchak, V. P. Berest, Yu. I. Prylutskyi**
Biomechanical and biochemical characteristics of *musculus soleus* contraction in obese rats 65–75

MOLECULAR BIOPHYSICS**Hung Duc Nguyen**Computational modeling of selected phytochemicals from *Reevesia formosana*: mechanistic insights into their potential against lung cancer

76–94

O. Yu. Limanskaya, O. V. Biloivan, O. K. Balak, A. P. Limanskii

3D models of proteins and conservative G-quadruplexes in the genome of porcine circovirus

95–
116**BIOMEDICAL ENGINEERING****V. D. Koniukhov, O. M. Morgun, K. E. Nemchenko**

Improving the efficiency of spine region segmentation using an ensemble of pre-trained neural networks

117–
129**CHRONICLE****V. S. Martynyuk**

Biophysics Week 2026. Biophysics in Ukraine: human energy and willpower in science and education during the wartime

130–
135



EDITORIAL

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-01>

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

9th International conference “NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects” NBP-2025 took place on October 6-9, 2025, in Kharkiv, Ukraine, in online format, being organized by B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine (ILTPE NASU) and the Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine (IP NASU). The “NanoBioPhysics” conference series was jointly launched in 2009 by the ILTPE NASU and the IP NASU. Previous conferences were held biennially in Kharkiv and Kyiv, alternating between the two cities.

Although the security conditions in 2025 did not permit face-to-face meetings, the conference brought together more than 100 participants from 13 countries (Photo 1): Ukraine, the Czech Republic, Estonia, Italy, France, Germany, Lithuania, Poland, the Slovak Republic, Spain, Sweden, the UK, and the USA.

A total of 93 keynote, oral, and poster presentations were made. The Book of Abstracts of the NBP-2025 contributions was published [1].

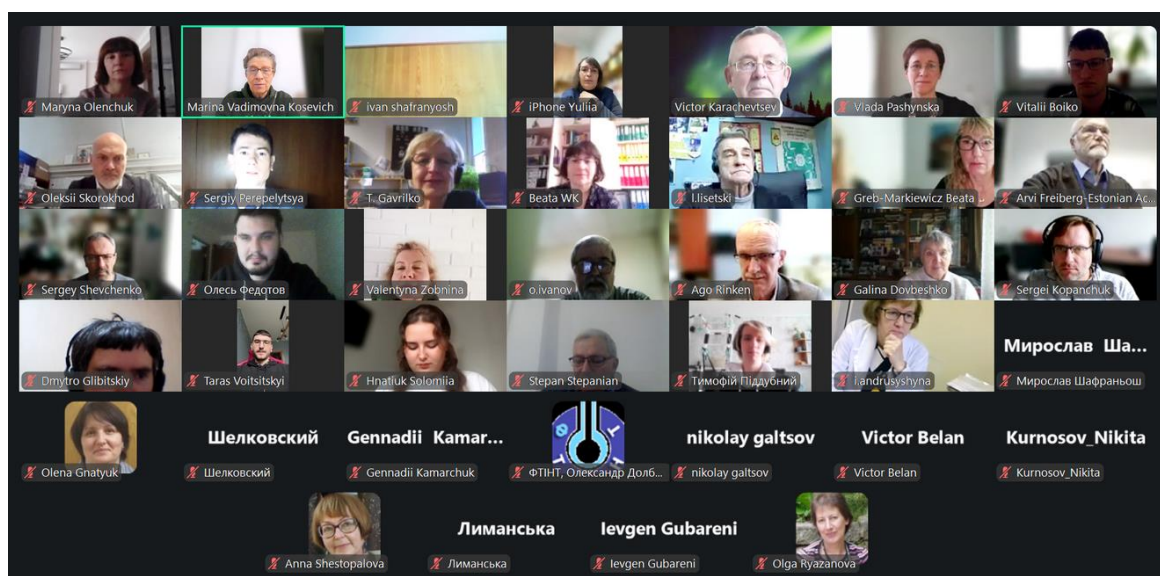


Photo 1. Screenshot of the online Zoom session held on 06.10.2025, Participants of the 9th International Conference “NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects”, Kharkiv, Ukraine.

To discuss the urgent problems and new results achieved in the scientific field combining biophysics and nanotechnology, the following sessions were organized:

- Nanobiohybrids formed by 1-D or 2-D nanomaterials with bioobjects;
- Biomolecules on nanoparticles and nanostructured surfaces;
- Physical aspects of biomolecular nanosystems;

Citation: Karachevtsev VA, Kosevich MV, Dovbeshko GI. 9th International conference “Nanobiophysics: fundamental and applied aspects”. Biophysical Bulletin. 2026;55:9–13. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-01>

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

- Theoretical calculations and computer modeling of nanobiosystems;
- Applied aspects of nanobiophysics.

Given the online format, in addition to plenary lectures and oral talks, a special poster session was organized, allowing participants to present their posters online, accompanied by short five-minute explanations. Special attention was paid to the discussion of the works of young scientists and postgraduate students.

Urgent subjects of basic nanobiophysical research, which touched upon a variety of practically essential issues, were covered in several plenary lectures. Professor **Freiberg A.** (*Tartu, Republic of Estonia*) lectured on strategies for capturing complete solar energy in photosynthesis—a path toward bioinspired energy technologies capable of harnessing the full breadth of solar radiation. Professor **Wielgus-Kutrowska B.** (*Warsaw, Republic of Poland*) talked about the biophysics of green fluorescent protein employed in designing optimized fluorescent tools for use in biotechnology and bioimaging. Professor **Shestopalova A. V.** (*Kharkiv, Ukraine*) presented general facts and research findings on the evolution of SARS-CoV-2 from 2021 to 2025, which form the basis for the development of potential antiviral drugs against SARS.

Chairman of the NBP-2025 conference, corresponding member of the NAS of Ukraine, Professor **Karachevtsev V. A.** (*Kharkiv, Ukraine*) had summarized the results of the development of the new scientific field of nanobiophysics in the Department of molecular biophysics of the ILTPE NASU, which he had headed for 25 years, in his overview “Nanobiophysics at the B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine: a historical review”. The key stages in the emergence and advancement of the new field of nanobiophysics are outlined, along with scientific achievements in this area, reflected in more than 100 publications in international journals and two monographs. The scientific team of the Department had presented recent results of the studies of interactions of biomolecules, biologically active compounds and drugs with a wide range of nanomaterials — carbon-based nanotubes, fullerenes, graphene; metal oxides; noble metal clusters; transition metal dichalcogenides, MoS₂ in particular — aimed at nanotechnological developments. Dr. **Stepanian S. G.** (who has headed the Department of molecular biophysics since 2025) presented the results of computer modeling and DFT quantum-chemical studies of the structures, stabilities, and spectral parameters of ternary complexes of MoS₂ with the uracil nitrogen base and noble-metal clusters. Dr. **Kosevich M. V.** presented a novel idea on the possibilities of participation of MoS₂ mineral in prebiological chemical evolution, which was based on the results of mass spectrometric detection of products from the chemical transformations of biomolecules at the MoS₂ surface. Dr. **Pashynska V. A.** described the prospects for drug-delivery applications of 2D MoS₂ nanohybrids with anticancer drugs, which were characterized both experimentally and theoretically. Dr. **Kurnosov N. V.** described MoS₂ quantum dots exfoliated by applying nucleotides. In a series of poster presentations, the results of the detailed study of nanohybrids of 2D nanomaterials based on MoS₂ with various biomolecules and biologically active compounds were presented: with native DNA by Dr. **Usenko E. L.** and Dr. **Glamazda A. Yu.**, with C₆₀ fullerene by Dr. **Shelkovsky V. S.**, with polyethylene glycol organic polymer by Dr. **Zobnina V. G.**, with amino acids and thiols by **Boryak O. A.**, with tegafur drug by **Piddubnyi T.**; interactions of DNA with porphyrin by Dr. **Ryazanova O. A.** Among useful practical applications, a new area is the production of nanomaterials by nanospinning, which was described in the talk of Professor **Karachevtsev V. A.** “PMMA:PVP blended nanofibers loaded with antibiotic levofloxacin for antibacterial application” and the poster of Dr. **Plokhotnichenko A. M.** “Fabrication and characterization

of electrospun PMMA nanofibers loaded with levofloxacin or chloramphenicol”. Low-temperature studies were presented in the poster of Dr. **Ivanov A. Yu.** (*Kharkiv, Ukraine; Wroclaw, Poland*) “The distinctive features of the infrared vibrational spectra of 2'-deoxyadenosine and adenosine molecules isolated in Ar matrices”.

The achievements of the IP NASU Department of physics of biological systems, headed by Professor **Dovbeshko G. I.** (*Kyiv, Ukraine*), were presented in the lectures of the scientists of the Department and partners of their extended scientific cooperation. Dr. **Gnatyuk O. P.** touched on the vital topic of the mechanical properties of the membrane of circulating metastatic tumor cells as a diagnostic marker. **Monastyrskiy G. P.** showed the results of high-resolution SEM microscopy for studying liposomes and model circulating tumour cells incubated with MoS₂ and WS₂ nanoparticles. Dr. **Gubareni Ie. V.** described the partial least squares analysis of ATR-FTIR spectra for intraoperative characterization and rapid biochemical profiling of brain tumors. Professor **Borisova T. O.** warned about the synergistic threat to the nervous system from combined exposure to copper and particulate matter from wood smoke. Dr. **Boiko V. V.** (*Kyiv, Ukraine; Besançon, France*) reported on interactions between bovine serum albumin and persistent luminescent nanoparticles, as well as the correlation between optical parameters and structural changes in the BSA protein on the charged nanoparticle surface.

The theoretical session began with an invited lecture by Professor **Perepelytsya S. M.** (*Kyiv, Ukraine*), devoted to theoretical studies of DNA and the elucidation of the role of counterions in DNA-nanomaterials. Dr. **Osokin Y. S.** (*Kyiv, Ukraine*) reported on the elucidation of the stability of Ag⁺ ion complexes with nitrogenous bases of the DNA molecule. Several reports enlighten novel trends in theoretical investigations attracting opportunities provided by the artificial intelligence, machine learning, and neural networks: “Accurate machine learning approach to protein-ligand docking” by Dr. **Voitsitskiy T. V.** (*Kyiv, Ukraine; London, UK*); “FTIR spectroscopy based identification of spectral biomarkers associates with biological age using machine learning” by Dr. **Kot O.** (*Kyiv, Ukraine*); “A physically interpretable neural network model for determining the energy of biomolecules based on their structure” by Dr. **Terets A. D.** (*Kyiv, Ukraine*).

The subjects of a number of presentations evidenced the breadth and diversity of phenomena that involve processes at the nanoscale level. Dr. **Krasnokutski S. A.** (*Heidelberg, Germany*) addressed an exciting topic, “From chaos to the first stored information and origin of life,” in which he described experiments on the low-temperature condensation of atomic gases in the interstellar medium on cosmic dust particles, resulting in peptide formation, which may contribute to prebiotic chemistry. Professor **Skorokhod O.** (*Turin, Italy*) discussed a possible mechanism of action of the antimalarial agent artemisinin by disrupting the formation of hemozoin nanocrystals. Professor **Berest V. P.** (*Kharkiv, Ukraine*) described mechanisms of microvesiculation in red blood cells and bacteria. Dr. **Tkachenko A. S.** (*Kharkiv, Ukraine*) reported the investigations on the role of Mn₃O₄ nanocrystal in the induction of eryptosis of red blood cells mediated by oxidative stress.

Some more talks enlightened studies aimed at elaboration of useful applications of various inorganic nanomaterials. Professor **Gluchowski P.** (*Wroclaw, Republic of Poland*) described the biological and mechanical properties of the composites containing graphene flakes obtained from mineral graphite. Dr. **Kujawa D.** (*Wroclaw, Republic of Poland*) talked about a rapid, green, and cost-effective synthesis of pH- and hydroxyl group sensitive carbon dots for sensing applications. Professor **Strzhemechny Y. M.** (*Fort Worth, USA*) lectured about surface and interface effects in the antibacterial activity of nano- and microscale oxides of zinc and gallium. Dr. **Brannon J. H.** (*Fort Worth, USA*) discussed tuning the antibacterial activity of ZnO microcrystals by modifying surface defects via Fe-doping. Dr. **Sharma P.**

(Fort Worth, USA) talked about the application of NIR-reduced graphene quantum dots for biosensing of neurotransmitters/hormones.

Nanotechnology-related studies conducted at the Institute for Scintillation Materials of the STC “Institute for Single Crystals” (Kharkiv, Ukraine) were demonstrated by Professor **Lisetski L. N.** in his presentation devoted to hybrid poly(n-isopropylacrylamide) hydrogels physically cross-linked by acid-activated laponite®, by Dr. **Vashchenko O. V.** in her presentation on the impact of substituents on thermal recyclization of 2-iminocoumarins, and by Dr. **Vashchenko P. V.** in his presentation on supramolecular arrangement and potential biomedical application of nematic liquid crystals doped with resorcinol.

A special event within the framework of NBP-2025 was the round table on the topic “History of Biophysics in Kharkiv”, dedicated to the commemoration of outstanding scientists who formed the scientific school of molecular biophysics in the second half of the 20th century, which received recognition in Ukraine and abroad. Memories of them were shared by their students and followers, as well as employees of biophysical departments in scientific institutions, many of whom are graduates of the Department of Molecular and Medical Biophysics at V. N. Karazin Kharkiv National University. Professor **Berest V. P.**, head of the Department of Molecular and Medical Biophysics of V. N. Karazin Kharkiv National University, presented the history of the creation and development of the Department, and the contribution of the Department to the training of specialists for academic and medical institutions. Professor **Shestopalova G. V.**, head of the Department of biological physics of the O. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of the NAS of Ukraine, spoke about the creative path of Professor Maleev V. Ya. — the founder of the Department. Dr. **Kosevich M. V.**, leading research fellow of the Department of molecular biophysics of the IITPE NASU, shed light on the prominent role of the founder of the ILTPE, Academician of the NAS of Ukraine Verkin B. I., in the initiation and development of physical research on the physical properties of nucleic acids at the ILTPE. One more report was about the creative path of Professor Blagoi Yu. P. — the founder of the Department of molecular biophysics of ILTPE and its head until 2000. Professor **Lysetsky L. M.** highlighted the role of Corresponding Member of the NAS of Ukraine, Professor Malyukin Y. V., in the development of biophysical research at the Institute of Scintillation Materials of the NAS of Ukraine. The names and creative contributions of many more coworkers from the named biophysical teams who had advanced expertise in biophysics were memorialized in the reports. Next, the roundtable participants shared their personal memories of the development of biophysical research in the scientific and educational institutions of the city of Kharkiv and their creative connections with specialists in this field across Ukraine.

In general, the conference's thematic sections were accompanied by lively discussion and the renewal of existing and the establishment of new scientific contacts with colleagues from Ukraine, the European Union, and the USA.

The next conference of the series is expected to be organized in autumn 2027 in Kyiv.

Conflict of interests: The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

1. 9th International conference “Nanobiophysics: fundamental and applied aspects” (6–9 October 2025, Kharkiv): Conference program and book of abstracts. Editor V. A. Karachevtsev. Kharkiv: FOP Brovin O. V., 2025. 122 p. ISBN 978-617-8587-15-14

V. A. Karachevtsev¹, M. V. Kosevich¹, G. I. Dovbeshko²

¹ B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, 47 Nauky avenue, 61103, Kharkiv, Ukraine;

² Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine, 46 Nauky avenue, 03028, Kyiv, Ukraine

V. A. Karachevtsev  <https://orcid.org/0000-0003-4580-6465>M. V. Kosevich  <https://orcid.org/0000-0003-0257-4588>G. I. Dovbeshko  <https://orcid.org/0000-0002-7701-0106>

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

V. A. Karachevtsev¹ , M. V. Kosevich¹ , G. I. Dovbeshko² ¹ B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine,
47 Nauky avenue, 61103, Kharkiv, Ukraine;² Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine, 46 Nauky avenue, 03028, Kyiv, Ukraine
e-mail: mvkosevich@gmail.com

9th International conference “NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects” – NBP-2025 took place on October 6-9, 2025 in Kharkiv, Ukraine, in online format, being organized by B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine and the Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine. Previous conferences of the “NanoBioPhysics” series, launched in 2009, were organized on a biennial basis in Kharkiv and Kyiv in rotation. The conference brought together more than 100 participants from 13 countries: Ukraine, the Czech Republic, Estonia, Italy, France, Germany, Lithuania, Poland, the Slovak Republic, Spain, Sweden, the UK, and the USA. A total of 93 keynote, oral, and poster presentations were made. The goal of the conference was to discuss the urgent problems and new results achieved in the scientific field combining biophysics and nanotechnology, embracing nanobiohybrids formed by 1-D or 2-D nanomaterials with bioobjects, properties of biomolecules on nanoparticles and nanostructured surfaces, physical aspects of biomolecular nanosystems, theoretical calculations, computer modeling, and applied aspects of nanobiosystems. A special event within the framework of NBP-2025 was the round table on the topic “History of Biophysics in Kharkiv”, dedicated to the commemoration of outstanding scientists who formed the scientific school of molecular biophysics in the second half of the 20th century, which received recognition in Ukraine and abroad. Memories of them were shared by their students and followers, as well as employees of the biophysical departments of scientific institutions in Kharkiv. A book of abstracts based on NBP-2025 materials has been published.

KEY WORDS: nanobiophysics; biomolecular nanosystems; bionanomaterials; bionanocomposites; nanostructured surfaces; intermolecular interactions; computer simulation.

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

В. А. Карачевцев¹ , М. В. Косевич¹ , Г. І. Довбешко² ¹ Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б. І. Веркіна Національної академії наук України,
просп. Науки 47, 61103, Харків, Україна;² Інститут фізики Національної академії наук України, просп. Науки 46, 03028, Київ, Україна
e-mail: mvkosevich@gmail.com

9-та Міжнародна конференція «НАНОБІОФІЗИКА: фундаментальні та прикладні аспекти» NBP-2025 відбулася 6–9 жовтня 2025 року в Харкові, Україна, в онлайн-форматі, організована Інститутом фізики низьких температур та техніки ім. Б. Веркіна Національної академії наук України та Інститутом фізики Національної академії наук України. Попередні конференції серії «НаноБіоФізика», започаткованої у 2009 році, проводилися раз на два роки по черзі в Харкові та Києві. Конференція зібрала понад 100 учасників з 13 країн: України, Чехії, Естонії, Італії, Франції, Німеччини, Литви, Польщі, Словаччини, Іспанії, Швеції, Великої Британії, США. Було зроблено 93 пленарні, усні та постерні доповіді. Метою конференції було обговорення актуальних проблем та нових результатів, досягнутих у науковій галузі, що поєднує біофізику та нанотехнології, охоплюючи нанобіогібриди, утворені 1-D або 2-D наноматеріалами з біооб'єктами, властивості біомолекул на наночастинках та наноструктурованих поверхнях, фізичні аспекти біомолекулярних наносистем, теоретичні розрахунки, комп'ютерне моделювання та прикладні аспекти нанобіосистем. Особливою подією в рамках NBP-2025 став круглий стіл на тему «Історія біофізики в Харкові», присвячений вшануванню видатних вчених, які сформували наукову школу молекулярної біофізики у другій половині 20 століття та отримали визнання в Україні та за кордоном. Спогадами про них поділилися їхні учні та послідовники, співробітники біофізичних кафедр та відділів наукових установ Харкова. Було опубліковано збірник тез за матеріалами NBP-2025.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нанобіофізика; біомолекулярні наносистеми; біонаноматеріали; біонанокompозити; наноструктуровані поверхні; міжмолекулярні взаємодії; комп'ютерне моделювання.

ВІЗУАЛІЗАЦІЯ ТА МОРФОМЕТРІЯ ЗМІН БІОТКАНИН ШИЙКИ МАТКИ НА ОСНОВІ НОРМАЛІЗОВАНИХ СПЕКТРАЛЬНИХ ІНДЕКСІВ

Олександр Росляков¹, Сергій Єрмоленко^{1,*}, Олександр Пересунько²

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

² Кафедра онкології та радіології, Буковинський державний медичний університет, вул. Театральна, 2, м. Чернівці, 58002, Україна

*Автор для листування: s.yermolenko@chnu.edu.ua

Надійшла до редакції 18 липня 2025 р. Переглянута 8 січня 2026 р.

Прийнята до друку 10 лютого 2026 р. Опублікована 25 червня 2026 р.

Актуальність. Сучасна візуальна діагностика передракових та злоякісних уражень шийки матки потребує підвищення об'єктивності та точності шляхом використання фізично обґрунтованих оптико-спектральних методів. Формування кількісної спектральної характеристики структурних змін у біотканині відкриває нові можливості для диференційної оцінки стадії патології та побудови шкал морфо-спектрального скринінгу.

Мета роботи — розробити метод спектральної візуалізації та аналізу морфо-оптичних змін біотканини шийки матки на основі нормалізованих спектральних індексів (NSI) з використанням компактного оптичного модуля та визначити ключові кількісні показники, чутливі до стадій онкопроцесу.

Матеріали та методи. Для реєстрації спектрального відбивання використано діагностичний модуль із монохромною CMOS-камерою та кільцевою LED-системою освітлення (450, 550, 630, 820 нм), доповненою поляризаційними фільтрами. Обробка NSI-мап проводилась шляхом розрахунків NSI-індексів та їх статистичних параметрів для 62 зображень шийки матки пацієнток основних груп патологій з наступною морфологічною верифікацією.

Результати. Індекс NSI_{630/820} виявився найбільш чутливим до змін тканинної щільності та васкуляризації, — його середнє значення зростало від 1,303 при запаленні до 1,528 у випадку аденокарциноми. Підвищення асиметрії та ексцесу у профілях NSI_{530/820} у разі переходу від CIN до карциноми вказує на ймовірне утворення ділянок з підвищеною оптичною неоднорідністю. Зниження ентропії для аденокарциноми узгоджується зі зменшенням текстурної складності тканини при малігнізації. Сформовано структуровану класифікацію інтервалів значень основних морфо-оптичних характеристик, що відображає їх зміни у межах патологічного процесу.

Висновки. Методика спектрально-нормалізованої візуалізації на основі індексів NSI дозволила кількісно відобразити морфологічні зміни біотканини шийки матки. Встановлено індикатори змін у спектральній структурі відбитого оптичного сигналу, що корелюють із типом патології, і доведено ефективність запропонованого підходу для оптико-фізичної диференціації стадій малігнізації.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: спектральна візуалізація; NSI-мапи; нормалізований спектральний індекс; оптико-морфологічні зміни; шийка матки; асиметрія; ексцес.

Як цитувати: Росляков О, Єрмоленко С, Пересунько О. Візуалізація та морфометрія змін біотканин шийки матки на основі нормалізованих спектральних індексів. Біофізичний вісник. 2026;55:14–35. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-02>

Citation: Roslyakov O, Yermolenko S, Peresunko O. Visualization and morphometrics of changes in cervical biotissues based on normalized spectral indices. Biophysical Bulletin. 2026;55:14–35. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-02> (in Ukrainian)

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

Пошук достовірних, об'єктивних та кількісно контрольованих методів виявлення патологічних змін епітелію шийки матки з урахуванням його структури та функції є нагальною потребою сучасної онкогінекології. Стандартні підходи діагностики, зокрема кольпоскопія у відбитому світлі, базуються на візуальному спостереженні кольорових змін після обробки оцтовою кислотою та йодом, при цьому використовують суб'єктивну лікарську оцінку досліджуваних змін без кількісної прив'язки до оптичних параметрів біотканин. У клінічній практиці такий підхід обмежений як низькою чутливістю до ранньої стадії атиpii, так і відтворюваністю діагностичних висновків [1, 2]. Невизначеність у інтерпретації спостерігається особливо часто в умовах запалення, рубцевих змін чи атрофії, при яких змінюється текстура епітелію і ступінь поглинання світла [3]. Залишається відкритим питання кількісної верифікації зон патології, особливо на етапі переходу між нормою, дисплазією та передраком [4].

Біопсія як інвазивний метод підтвердження діагнозу є обмеженою з точки зору масового застосування та не забезпечує безперервного візуального контролю. Існуючі сучасні флуоресцентні, спектроскопічні та поляризаційні методи мають результуючу високу специфічність, проте вимагають складного вартісного лабораторного устаткування [5, 6].

Однією з основних проблем у практичній онкодіагностиці є відсутність спектрального контролю у пристроях візуалізації. Переважно використовуються камери RGB-типу з широкосмуговим джерелом білого світла (LED, галогенова лампа), які мають невідому та нестабільну спектральну характеристику. Колірні ознаки такого зображення, які можуть мати вагомий вплив на діагностичний висновок лікаря, залежать не від оптичного відгуку характеристик біотканини, а від параметрів сенсора, динаміки експозиції та алгоритмів обробки сигналу в камері [7]. Це створює фізичну невизначеність у відбитому сигналі і складність його використання для кількісного аналізу, при цьому обмежуючи можливість реєстрації слабо виражених спектральних маркерів, які можуть бути ранніми індикаторами морфофункціональних змін (дисплазії чи гіперплазії) [8].

Класичні оптичні підходи, що використовуються в кольпоскопії, також не враховують структурно-функціональну неоднорідність тканинного відгуку в різних ділянках епітелію. Разом із патологічними змінами, які супроводжуються локальними змінами у поглинанні, розсіюванні та анізотропії біотканин, сформований камерою RGB-сигнал не має спектрального розщеплення, яке необхідне для виявлення цих змін [9]. Крім того, через автоекспозицію, яка властива стандартним камерам, сигнал від нормальних та патологічних ділянок часто виявляється некоректно нормалізованим, що викликає похибки у сприйнятті та виключає порівняння між пацієнтками або між зонами одного об'єкту дослідження [10]. Окрему проблему становить зусилля підвищити точність за рахунок автоматизованої обробки RGB-зображень методами комп'ютерного зору. Відсутність фізичного контролю за умовами освітлення, спектром джерела світла та його поляризацією обмежує знаходження уніфікованих ознак для навчання алгоритмів сегментації та класифікації [11]. У [12] було доведено, що спектральні зміни в діапазоні 405–870 нм добре корелюють з морфологічними змінами при лейкоплакії, койлоцитарних ураженнях, гіперплазії та дисплазії.

Тому, виникає потреба у розробці методу, який дозволив би розкласти сигнал на спектральні компоненти з точною прив'язкою до певних спектральних смуг, реалізувати нормалізацію сигналу до фіксованої опорної довжини хвилі та забезпечити кількісну оцінку параметрів біотканин — як основу для подальшої статистичної та морфометричної обробки. Нами запропоновано оптико-фізичний метод спектрального картування, з використанням нормалізованого спектрального індексу (NSI), що

формалізує співвідношення інтенсивностей у вузькоспектральних каналах на стабільну референтну довжину хвилі. Ми передбачаємо, що такий підхід дозволив би усунути залежність сигналу від зовнішніх чинників (яскравість, флуктуації джерела) і виділити реальні спектральні контрасти, зумовлені морфо-структурною неоднорідністю епітелію.

Метою дослідження є розроблення та експериментальна апробація спектрально-селективного методу візуалізації шийки матки з використанням нормалізованого спектрального індексу (NSI), що забезпечує кількісну реєстрацію локальних змін відбитого сигналу. Очікується, що спектральна неоднорідність, зареєстрована через NSI-мапи, відображає морфологічні зміни епітелію, властиві для атипії, гіперплазії та передракових станів. Розрахунок статистичних параметрів NSI (середнє значення, коефіцієнт варіації, асиметрія, ексцес, ентропія) може сформувати критерії визначення порогових значень для диференціації тканин з різним ступенем структурних перетворень. Для експериментальної реалізації пропонуваного методу у роботі описано розроблений та технічно реалізований компактний спектрально-діагностичний модуль, що об'єднує монохромну камеру з кільцевим вузькоспектральним LED-освітленням і системою поляризаційного фільтрування.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Оптико-електронний модуль

Для реалізації спектрального зондування нами був створений спеціалізований оптико-електронний модуль, що поєднує LED-освітлювач із фіксованими довжинами хвиль та чорно-білу CMOS-камеру високої чутливості. Освітлювач містить шість пар світлодіодів вузького спектрального профілю: 405, 450, 530, 630, 820 та 870 нм. Як стабільну референтну довжину хвилі для нормалізації відбитого сигналу обрано 820 нм, що розміщується в інфрачервоній ділянці, де розсіювання мінімальне і переважає оптична реакція до глибинної структури біотканини. До складу освітлювального адаптера додано світлодіод білого світла для формування інтегрального зображення з широким спектральним інтервалом, що забезпечує орієнтацію на топографічній картині, просторове узгодження спектральних даних і стабільність експозиції для монохромної камери.

Реєстрація зображення проводилась камерою Basler Ace (чорно-білою, без ІЧ-фільтра), яка дає змогу уникнути спотворень, пов'язаних із вбудованою фільтрацією. Важливою складовою оптичної системи є використання схрещених станів поляризації: лінійні поляризатори встановлені перед джерелами освітлення та перед об'єктивом і орієнтовані ортогонально, що дозволяє суттєво знизити поверхневе дзеркальне відбивання та візуалізувати дифузно-відбиту складову сигналу, яка включає інформацію про мікроструктуру біотканини. Керування послідовним включенням LED-каналів здійснюється за допомогою контролера Arduino Uno, запрограмованого на покрокову зміну джерела з часовою затримкою, яка синхронізована із циклом зчитування камери. Цикл роботи включає активацію кожного із шести світлодіодів, паузу стабілізації світлового потоку, ініціацію зчитування кадру та вимкнення перед переходом до наступного каналу. Алгоритм дозволяє одержувати повний набір спектральних зображень менш, ніж за 3 секунди, з чіткою прив'язкою кожного зображення до відповідної довжини хвилі.

На рисунку 1 подано модельний вигляд зібраної системи, що включає освітлювач та адаптер для фіксації на камеру Basler.



Рис. 1. Прототип спектрального модуля з CMOS-камерою Basler Ace та LED-освітлювачем.

Fig. 1. Prototype of spectral module with Basler Ace CMOS camera and LED illuminator.

Підбір LED-каналів у системі спектрального освітлення (405, 450, 530, 630, 820 та 870 нм) здійснювався на основі принципу спектрально-залежного зондування оптичної відповіді біотканини на різних глибинах, з урахуванням характерного спектру поглинання та розсіювання епітеліальних і субепітеліальних шарів шийки матки. Кожна з зондуючих довжин хвиль виконує свою специфічну діагностичну задачу, яка зумовлена оптичними особливостями взаємодії світла з біотканиною. Так, довжина хвилі 405 нм призначена для збудження ендogenous флуоресценції молекул NADH та порфіринів, при цьому має високу поверхневу чутливість до змін у метаболічно активному епітелії, зміненому при дисплазії. Канал 450 нм забезпечує проникнення на середню глибину та дає змогу оцінювати зміни у метаболічному профілі тканини, зокрема у вмісті FAD і β -каротину. Довжина хвилі 530 нм є індикатором оптичної щільності та розсіювання і відображає структурні та функціональні відмінності між нормальним і патологічно зміненим епітелієм (враховуючи гемоглобін-залежне поглинання). Канал 630 нм дозволяє аналізувати зміни в мікросудинному руслі та капілярній мережі, що типово проявляються при запальних та неопластичних процесах. Інфрачервоний канал 820 нм, який характеризується мінімальним поглинанням у біологічних тканинах та стабільністю сигналу, був обраний як референтний — для нормалізації спектральних показників у NSI-моделі, оскільки він практично не реагує на зміни в поверхневих структурах [13–25].

Далі наведена таблиця 1 з оптико-фізично обґрунтованим описом підбору LED-каналів при спектральному зондуванні епітелію шийки матки, яка доповнена даними відповідної спектральної відповіді біотканин, біохімічних мішеней та морфо-функціональних характеристик із діагностичним значенням. Обґрунтування вибору кожного каналу базується на оптико-фізичній взаємодії випромінювання різного спектрального діапазону з біологічною тканиною та урахуванням глибини проникнення, їх профілю поглинання/розсіювання та особливих молекулярних змін при патологічних станах [13–25].

У даному дослідженні довжини хвиль 405 нм та 870 нм не використовувалися як активні канали освітлення, оскільки їх застосування передбачено на наступних етапах дослідницької роботи для розширення спектрального аналізу та вивчення додаткових біомаркерів.

Таблиця 1. LED-канали спектрального зондування та їх діагностичне значення в гінекологічній оптиці.

Table 1. LED spectral sensing channels and their diagnostic value in gynecological optics.

Довжина хвилі (нм)	Біофізичне призначення та механізм	Мішень / спектральна чутливість	Морфо-функціональні особливості	Джерела
405	Збудження флуоресценції NADH і порфіринів	NADH, порфірини	Переважно поверхнєве зондування; виявлення змін у клітинному метаболізмі на ранніх стадіях дисплазії [15, 17, 21, 22]	[15–17, 21, 22]
450	Флуоресцентна відповідь FAD; підвищене поглинання диспластичним епітелієм	FAD, β -каротин	Середня глибина проникнення; діагностика метаболічного зсуву та структурної деградації [16, 18]	[16, 17, 18, 22]
530	Високе розсіювання, гемоглобін-залежне поглинання	Оксигемоглобін/ дезоксигемоглобін	Виявлення змін у капілярному руслі; диференціація нормального й атипового епітелію [14, 18, 19, 23]	[14, 18, 19, 23]
630	Оптимальне зондування судинної архітектури	Судини, гемоглобін	Показник ангиогенезу та неоваскуляризації при неоплазіях, чутливий до запальних змін [13, 18, 24]	[13, 18, 24]
820 (референтна)	Мінімальне поглинання; стабільність сигналу	Відсутність специфічних хромофорів	Глибинне проникнення, контроль фонові інтенсивності; обрано як нормалізаційна база (NSI) [14, 20]	[14, 20]
870	Поглиблене проникнення; диференціація фіброзних структур	Колаген, фіброзні тканини	Чутливий до щільних стромальних зон, характерних для хронічного фіброзу або інвазивного росту [14, 20, 25]	[14, 20, 25]

Підбір та підготовка пацієнток для in vivo дослідження

Для експериментальної апробації спектрально-селективного методу оптичної діагностики шийки матки було проведено in vivo дослідження на добровільно погоджених пацієнтках, які проходили профілактичний (діагностичний) огляд у рамках клінічної кольпоскопії на базі гінекологічного відділення Чернівецької обласної клінічної лікарні під наглядом фахівців кафедри онкології та радіології Буковинського державного медичного університету. Критерії їх включення передбачали наявність морфологічно підтверджених змін епітелію (за результатами цитології та гістології) у межах таких основних патологічних груп: хронічне неспецифічне запалення, диспластичні процеси (CIN I–II), ознаки ранньої неоплазії (включаючи легку карциномоїдну атипію), а також встановлені форми злоякісних уражень — плоскоклітинний рак та аденокарцинома шийки матки. Усі дослідження проводилися до будь-якого втручання та оброблення шийки матки.

Пацієнтки з морфологічно неушкодженим цервікальним епітелієм і негативними цитологічними тестами були включені до контрольної групи, що дозволило забезпечити об'єктивне тло для зіставлення оптичних характеристик з патологічними станами. У цілому до дослідження було включено 62 пацієнтки, у тому числі:

- 14 — із нормальним цитоморфологічним профілем;
- 16 — із діагностованими ознаками запального процесу;
- 13 — із цитологічно підтвердженими проявами дисплазії;
- 11 — із ознаками початкової неоплазії, без інвазивного росту;
- 8 — із ознаками злоякісних уражень (плоскоклітинної карциноми та аденокарциноми).

Для забезпечення топографічного диференційованого аналізу поверхні шийки матки для кожного зразка було визначено 2–5 зон з вираженими відмінностями в оптичних характеристиках і морфологічній структурі, що відповідали зонам структурної неоднорідності, які характерні для певної нозології (судинні аномалії, зони ектопії). Зазначені ділянки були оптично локалізовані та просторово ізольовані для подальшого аналізу, в результаті чого сформовано 156 ділянок спектрального аналізу з відповідними картами для подальшого статистичного опрацювання. Проведення досліджень відбувалося в амбулаторних умовах, з дотриманням стандартного протоколу: після попереднього очищення поверхні шийки матки від слизу, без застосування барвників та реагентів, за умови фіксації пацієнтки у гінекологічному кріслі з повністю видимою зоною змін у зображенні. Дослідження не перешкоджало звичайному кольпоскопічному огляду і не змінювало порядок роботи лікаря.

Аналітичне обґрунтування NSI-індексу

З метою кількісної оцінки спектральних характеристик оптичного відгуку тканин шийки матки на різних довжинах хвиль нами було введено нормалізований спектральний індекс (NSI), що використовує нормалізацію (відношення) сигналу у певному спектральному діапазоні до фіксованої референтної довжини хвилі. Такий підхід дозволяє усунути вплив фонових енергетичних змін, флуктуацій інтенсивності джерела, геометрії освітлення поверхні біотканини. Як було зазначено вище, нормалізацію проводили за фіксованою довжиною хвилі 820 нм, а індекс NSI розраховували окремо для кожної довжини хвилі, що входила до актуального набору спектральних смуг, а саме $\lambda = 450 (\pm 10)$, $530 (\pm 10)$, $630 (\pm 10)$ нм.

Нормалізований спектральний індекс (NSI), який є аналітичним параметром і широко використовується для опису відносного спектрального контрасту між двома довжинами хвиль [13–14, 26–27], описується формулою (1):

$$NSI = \frac{R(\lambda_1) - R(\lambda_2)}{R(\lambda_1) + R(\lambda_2)}, \quad (1)$$

де $R(\lambda_1)$ — значення коефіцієнта спектрального відбиття об'єкта, визначене на довжині хвилі λ_1 ; $R(\lambda_2)$ — значення коефіцієнта спектрального відбиття об'єкта, визначене на довжині хвилі λ_2 .

Співвідношення (1) інтерпретується як окремий випадок симетризованої різницевої функції, що дозволяє формувати нормалізований індекс інтенсивності, який нечутливий до фонових шумів та змін параметрів експозиції. Такий підхід вперше був застосований у дистанційному зондуванні для оцінки вегетаційного покриття (NDVI) [26] та пізніше був адаптований для спектроскопії біотканин і медичної візуалізації [27].

В оптико-біофізичному сенсі NSI дозволяє ідентифікувати зони спектра з максимальною статистичною дисперсією параметрів, що корелює з морфо-функціональними змінами у біотканині. У випадку шийки матки зміна індексу між, наприклад, 530 та 820 нм вказує на трансформацію у мікросудинному руслі та вмісті гемокромних компонентів. Аналогічні індекси були апробовані для картографування злоякісних змін у дерматології, гастроентерології, офтальмології, зокрема при оцінці меланоми, дисплазій епітелію, інтраепітеліальних неоплазій [28–30]. NSI є чутливим до навіть незначних змін у спектральному поглинанні чи розсіюванні, що робить його ключовим параметром у неінвазивних оптичних методах діагностики [15].

Так, для обраної зони дослідження, для якої $R(\lambda)$ — інтенсивність відбитого сигналу у відповідному каналі (після корекції поляризаційного фону та фонового шуму), NSI для кожної робочої довжини хвилі визначається як:

$$NSI(\lambda_i) = \frac{R(\lambda_i) - R(\lambda_{ref})}{R(\lambda_i) + R(\lambda_{ref})}, \quad \lambda_{ref} = 820 \text{ нм}, \quad (2)$$

де $R(\lambda_i)$ — інтенсивність відбивання в активному каналі (450, 530 чи 630 нм), $R(820 \text{ нм})$ — інтенсивність у референтному каналі, $NSI(\lambda_i) \in (-1, 1)$ — нормалізоване значення індексу спектральної різниці, чутливе до змін морфології та оптичної щільності тканини.

Аналіз спектральних індексів (NSI) з оптичної точки зору дозволяє виділити діагностично чутливі довжини хвиль, кожна з яких відображає специфічні зміни у тканинній структурі та у її біохімічному складі. Так, індекс NSI_{450} відображає зміни абсорбційно-розсіювальних властивостей у синій ділянці спектру, що корелюють із вмістом флавопротеїнів, зокрема FAD, концентрація яких змінюється при хронічному запаленні та на ранніх етапах дисплазії. Індекс NSI_{530} чутливий до оксиметричних характеристик тканини, тому що зелене світло поглинається залежно від співвідношення оксигемоглобіну та дезоксигемоглобіну; при диспластичних змінах цей баланс зсувається, що зумовлює характерну спектральну відповідь. Найвищу чутливість до мікросудинних трансформацій відображає індекс NSI_{630} , який реєструє посилене поглинання, пов'язане з неоангіогенезом та порушенням судинної архітектури, який є типовим для передракових змін епітелію (CIN II–III).

Застосування даного формалізму дає змогу побудувати просторові NSI-мапи для кожної з трьох робочих довжин хвиль та провести розрахунок їх статистичних характеристик, що виявляють ступінь морфо-структурної дезорганізації епітелію у кожній зоні дослідження. На відміну від абсолютних значень відбивання, NSI зберігає інваріантність до енергетичних флуктуацій у адаптері освітлення та дає порівнювані кількісні величини, що мають біофізичне підґрунтя.

Оптико-анатомічна модель тканини та взаємозв'язок із параметрами NSI

Для коректної інтерпретації спектральних індексів, отриманих у результаті зондування біотканини, необхідним етапом є аналітичне моделювання процесів оптичної взаємодії випромінювання з мікроструктурною організацією біотканин. При переході від

морфологічно інтактного стану (умовно нормального) до патологічно зміненого — зокрема при хронічному запаленні, дисплазії та малігнізації — відбувається системна зміна параметрів, що визначають характеристики випромінювання у середовищі: зростає коефіцієнт поглинання (μ_a) внаслідок підвищення концентрації ендogenous хромофорів (гемоглобінів, NADH, флавінів), зростає коефіцієнт розсіювання (μ_s) через ущільнення клітинних елементів, змінюється ступінь анізотропії (g), зумовлена дезорганізацією фібрилярних структур [13, 14, 15–16, 31].

Ці зміни призводять до перетворення спектрального відгуку тканини в різних оптичних діапазонах. Зокрема, у коротко- та середньохвильовій частині спектра реєструється зменшення відбитого сигналу, пов'язане з переважаючим впливом μ_a , тоді як у довгохвильовій зоні проявляється вклад μ_s та глибших стромальних змін. Для математичного відображення цих ефектів доцільним є використання нормалізованого спектрального індексу $NSI(\lambda)$, який можна розрахувати як відношення інтенсивності відбитого сигналу при досліджуваній довжині хвилі до сигналу на референтному рівні ($\lambda = 820$ нм), що не підпадає під вплив основних хромофорів [26, 29].

Аналітично цей підхід базується на модифікованій експоненційній моделі затухання світла в біотканині (закон Бугера–Ламберта–Бера), у якій враховується ефективний коефіцієнт загасання:

$$\mu_{\text{eff}}(\lambda) = \sqrt{3 \cdot \mu_a(\lambda) \cdot (\mu_a(\lambda) + \mu_s(\lambda)(1 - g(\lambda)))}, \quad (3)$$

де $\mu_a(\lambda)$ — коефіцієнт поглинання, $\mu_s(\lambda)$ — коефіцієнт розсіювання, $g(\lambda)$ — фактор анізотропії.

Відповідно, нормалізований спектральний індекс $NSI(\lambda)$ визначається як:

$$NSI(\lambda) = \frac{\exp(-\mu_{\text{eff}}(\lambda) \cdot d) - \exp(-\mu_{\text{ref}}(\lambda) \cdot d)}{\exp(-\mu_{\text{eff}}(\lambda) \cdot d) + \exp(-\mu_{\text{ref}}(\lambda) \cdot d)}, \quad (4)$$

де $\mu_{\text{eff}}(\lambda)$ — ефективний коефіцієнт ослаблення випромінювання в епітеліальному шарі при довжині хвилі λ ; $\mu_{\text{ref}}(\lambda)$ — референтний коефіцієнт ослаблення випромінювання, що відповідає еталонному (нормальному) стану тканини; d — ефективна товщина епітеліального шару [26, 27].

Згідно формули (4) з метою оцінки контрасту оптичної відповіді між досліджуваною довжиною хвилі та референтною смугою [30, 15] нами було розраховані профілі $NSI(\lambda)$ при $\lambda = 450, 530, 630$ нм, які наведені у таблиці 2 та проілюстровані графіками на рис. 2.

Таблиця 2. Розраховані значення нормалізованого спектрального індексу $NSI(\lambda)$ для трьох морфологічних станів тканини шийки матки

Table 2. Calculated values of the normalized spectral index $NSI(\lambda)$ for three morphological states of cervical tissue

λ (нм)	NSI — Норм	NSI — Запалення	NSI — Дисплазія
450	-0.58 ± 0.03	-0.62 ± 0.03	-0.71 ± 0.04
530	-0.38 ± 0.02	-0.42 ± 0.02	-0.50 ± 0.03
630	-0.24 ± 0.01	-0.31 ± 0.02	-0.39 ± 0.02

Похибка розрахунку $NSI(\lambda)$ оцінювалася методом поширення похибок спектральних коефіцієнтів відбиття $R(\lambda_1)$ та $R(\lambda_2)$ і не перевищувала кількох відсотків від значення індексу для всіх досліджуваних морфологічних станів.

Отримані графіки нормалізованого спектрального індексу $NSI(\lambda)$ відображають послідовне зниження значень індексу із переходом від морфологічної норми до патологічно змінених станів — запалення та дисплазії. У всьому спектральному

діапазоні 450–630 нм фіксуються від’ємні значення NSI, що пов’язано з нижчою інтенсивністю відбитого сигналу порівняно з інфрачервоним референтним каналом (820 нм). Така поведінка відповідає оптико-фізичним ефектам взаємодії: у короткохвильовій зоні (450–630 нм) поглинання і розсіювання біотканини є значно вищими, особливо при структурній дезорганізації, збільшеній кількості хромофорів та зниженого ступеня анізотропії. Найбільше зниження NSI спостерігається на довжині хвилі 450 нм — це відповідає зоні флавопротеїнової чутливості, вказує на метаболічний зсув при диспластичних трансформаціях. У червоному діапазоні (630 нм) індекс значно спадає, що вказує на участь судинної складової та зростання оптичної щільності мікросудинної мережі.

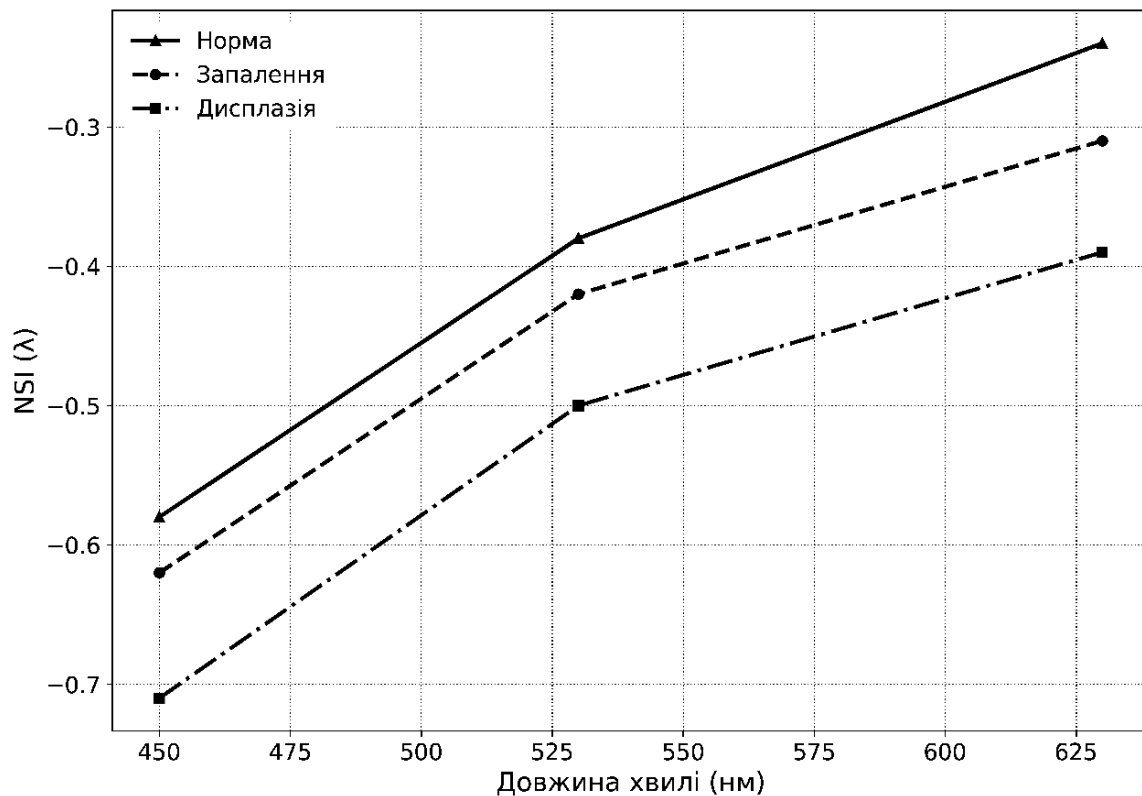


Рис. 2. Графік профілю NSI(λ) при λ = 450, 530, 630 нм для трьох морфологічних станів тканини шийки матки.

Fig. 2. Graph of NSI(λ) profile at λ = 450, 530, 630 nm for three morphological states of cervical tissue.

Зв'язок між аналітичними розрахунками та наступним експериментальним підтвердженням є важливим з точки зору практичної цінності введеного індексу NSI. Аналітична модель, що враховує фундаментальні оптичні параметри біотканин — зокрема коефіцієнти поглинання (μ_a), розсіювання (μ_s) та параметр анізотропії g — виявила високу чутливість NSI до змін у мікроструктурі тканини. Моделювання показало, що при відносно незначних зсувах у спектральних залежностях $\mu_a(\lambda)$ та змінений дисперсії $\mu_s(\lambda)$ внаслідок клітинної та позаклітинної перебудови при патологічних процесах, спостерігається зменшення NSI(λ) у всьому діапазоні аналізованих довжин хвиль. Це зниження пов'язане з морфо-функціональними змінами, такими як підвищена васкуляризація, деградація міжклітинного матриксу та порушення пошарової організації епітелію. Зазначимо, що виявлена аналітична чутливість NSI не є абстрактною властивістю моделі, а має безпосередню відповідність у реальних гістологічних змінах біотканин. Тому наступним логічним етапом стало проведення

експериментальної перевірки на зразках шийки матки пацієнток у різних морфологічних станах.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Візуалізація NSI-map

Для одержання спектральних індексів відбивання (NSI) зображення від пацієнток реєструвалися в однакових контрольованих експозиційних умовах. Геометрія освітлення та спостереження залишалася сталою — відстань до об'єкта, кут освітлення та параметри оптичного фокусування не змінювались протягом усієї серії досліджень.

Світлодіоди із довжинами хвиль 450, 550, 630 та 820 нм активувались імпульсно у синхронізованій послідовності, узгодженій із тригерною системою управління камери Basler. Для кожного каналу підбиралась індивідуальна експозиція з урахуванням спектральної потужності випромінювача та чутливості сенсора. Камера працювала у фіксованому режимі з постійними параметрами підсилення та швидкості зчитування, що дозволило забезпечити однорідність реєстраційного процесу.

Обробка мультиспектрального зображення здійснюється у послідовності, що забезпечує побудову нормалізованих спектральних індексів (NSI) та подальший аналіз просторово розподілених оптичних характеристик тканини. На першому етапі завантажуються окремі зображення (у типі *grayscale*), отримані при послідовному світлодіодному освітленні на довжинах хвиль 450, 550, 630 та 820 нм. Проводиться візуальна перевірка коректності структури даних. Далі виконується геометричне суміщення каналів для усунення можливих зміщень, після чого здійснюється усунення поверхневих паразитних відблисків — пересвітлені ділянки ідентифікуються та локально згладжуються. Для кожної довжини хвилі розраховується відношення до інтенсивності референтного каналу (820 нм) — формуються індексні карти $NSI_{450/820}$, $NSI_{550/820}$, $NSI_{630/820}$. Після побудови цих карт виділяється ділянка тканини шийки матки — як основна зона аналізу (зона інтересу). На основі отриманої маски усі індексні зображення обмежуються дослідною областю. Завершальним етапом є обчислення статистичних параметрів для кожної з трьох NSI-карт: середнє значення, коефіцієнт варіації, асиметрія, ексцес, а також ентропія як показник локальної складності структури. Визначимо статистичні параметри як: середнє значення (μ) — середнє арифметичне значень NSI у межах аналізованої зони, що характеризує інтегральний рівень спектрального контрасту тканини; коефіцієнт варіації (CV) — відношення стандартного відхилення до середнього, яке відображає нормалізовану просторову неоднорідність оптичних властивостей; асиметрія (Sk) — нормалізований показник третього центрального моменту розподілу, що описує форму та напрям зміщення значень NSI відносно середнього; ексцес (Ku) — нормалізований показник четвертого центрального моменту, який характеризує концентрацію значень навколо середнього та чутливість до локальних оптично контрастних змін; ентропія (H) — інформаційно-статистичний показник, що визначається з імовірнісного розподілу значень NSI та відображає просторову складність і ступінь структурної організації спектрально-оптичних неоднорідностей у межах досліджуваної зони. Вказані характеристики формують числовий опис спектрально-просторових змін оптичної густини в межах проаналізованої зони.

Оскільки окремі зображення сформовані у *grayscale*, наступні результати побудови нормалізованих спектральних індексів (NSI) ми представили у вигляді псевдокольорового зображення (у кольоровій шкалі NSI-значень «jet») для чотирьох типів пацієнток: ектопія циліндричного епітелію (без запалення), цервікальна

інтраепітеліальна неоплазія I ступеня, інвазивний плоскоклітинний рак та аденокарцинома. Для позначення відповідних візуалізованих мап індексу використовується термін «NSI-мапа», як загальноприйняте позначення нормалізованого відображення [26].

На рисунку 3 наведено приклад NSI-мап нормалізованого спектрального індексу NSI для пацієнтки з ектопією циліндричного епітелію (без запалення). Далі були розраховані статистичні параметри для кожної з трьох NSI-карт, які наведені у табл. 3.

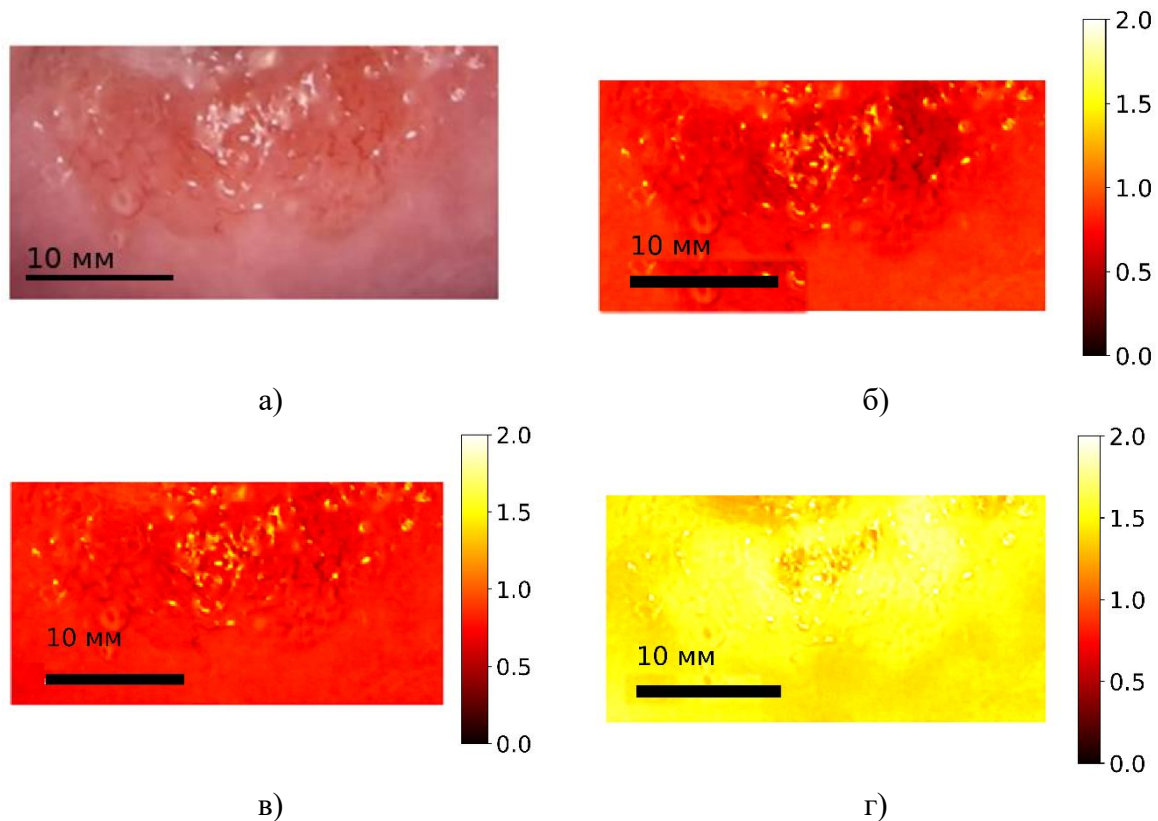


Рис. 3. NSI-мапи для пацієнтки з ектопією циліндричного епітелію (без запалення): а) кольпоскопічне зображення, б) $NSI_{450/820}$, в) $NSI_{550/820}$, г) $NSI_{630/820}$.

Fig. 3. NSI maps for a patient with ectopia of the cylindrical epithelium (without inflammation): a) colposcopic image, b) $NSI_{450/820}$, c) $NSI_{550/820}$, d) $NSI_{630/820}$.

Таблиця 3. Статистичні параметри NSI-карт для пацієнтки з ектопією циліндричного епітелію (без запалення)

Table 3. Statistical parameters of NSI maps for a patient with ectopia of the cylindrical epithelium (without inflammation)

Індекс	Середнє (μ)	Коефіцієнт варіації (CV)	Асиметрія (Sk)	Ексцес (Ku)	Ентропія (H)
$NSI_{450/820}$	0,795	0,106	0,133	0,714	4,05
$NSI_{550/820}$	0,791	0,085	0,107	2,977	4,00
$NSI_{630/820}$	1,512	0,098	0,065	0,778	4,35

Проведемо оцінку статистичних параметрів NSI-карт, зазначивши, що:

- середнє значення для $NSI_{630/820}$ становить 1,51, що суттєво перевищує аналогічні показники інших каналів. Це свідчить про виражене відбивання червоного світла — спектральної ділянки, чутливої до змін у судинній мережі та щільності тканини. Такий профіль є типовим для щільно організованого епітелію, можливо з елементами гіперкератинізації.
- коефіцієнт варіації є низьким у всіх каналах ($\sim 0,09\text{--}0,13$), що вказує на загальну просторову однорідність. Проте канал 450/820 демонструє дещо підвищену варіабельність, що може бути пов'язано з локальною деструкцією або активністю флуоресцентних компонентів NADH/FAD у поверхневих шарах.
- асиметрія позитивна в усіх випадках, що свідчить про зсув розподілу ND у бік вищих значень, що відповідає появі візуально яскравіших зон — осередків із підвищеною оптичною щільністю, характерних для початкових патологічних перебудов.
- ексцес найбільший у каналі 550/820 ($\sim 2,97$), що свідчить про загострений профіль розподілу — наявність чітко локалізованих ділянок з оптичною контрастністю, характерною для прикордонних змін між нормальною та атиповою тканиною. Інші канали демонструють згладжені розподіли, що притаманні більш рівномірним або дифузним змінам.
- ентропія досягає максимуму для $NSI_{630/820}$ ($\sim 4,35$), що вказує на високу текстурну складність, втрату впорядкованості та зростання спектральної гетерогенності — характерну ознаку початкової патологічної перебудови епітелію.

Таким чином, підвищене середнє значення $NSI_{630/820}$, разом із високою ентропією та ознаками нестабільного розподілу, вказують на наявність морфологічних змін багатошарового плоского епітелію (ектопію), що було підтверджено наступним гістологічним дослідженням для даної пацієнтки.

З метою проведення порівняльного аналізу спектрально-статистичних характеристик досліджуваних морфологічних станів тканини нами було сформовано таблицю для контрольної групи пацієнток (умовна норма), у якій приведені розраховані основні статистичні параметри NSI-карт (табл. 4).

Таблиця 4. Статистичні параметри NSI-карт для контрольної групи пацієнток (умовна норма)

Table 4. Statistical parameters of NSI maps for the control group of patients (conditional normal)

Індекс	Середнє (μ)	Коефіцієнт варіації (CV)	Асиметрія (Sk)	Ексцес (Ku)	Ентропія (H)
$NSI_{450/820}$	0,812	0,082	0,060	0,550	4,12
$NSI_{550/820}$	0,804	0,074	0,050	1,950	4,06
$NSI_{630/820}$	1,495	0,086	0,040	0,650	4,27

На рисунку 4 наведено приклад NSI-мап для пацієнтки з цервікальною інтраепітеліальною неоплазією I ступеня.

Наведені далі у таблиці 5 представляють розраховані статистичні параметри для кожної з трьох NSI-мап для пацієнтки з цервікальною інтраепітеліальною неоплазією I ступеня.

Було виконано оцінку трьох нормалізованих індексів $NSI_{450/820}$, $NSI_{550/820}$ та $NSI_{630/820}$ за одержаними статистичними характеристиками, що відображають просторово-структурну організацію та оптичну неоднорідність досліджуваної ділянки для пацієнтки з цервікальною інтраепітеліальною неоплазією I ступеня:

- $NSI_{550/820}$ демонструє підвищене середнє значення (0,783), що відповідає активній судинній реакції, зумовленій наявністю оксигемоглобіну. Значне позитивне значення

асиметрії (1,884) у поєднанні з високим ексцесом (8,931) вказує на локальні зони з інтенсивною васкулярною відповіддю. Помірна ентропія (3,834) свідчить про збереження загальної текстурної впорядкованості тканини.

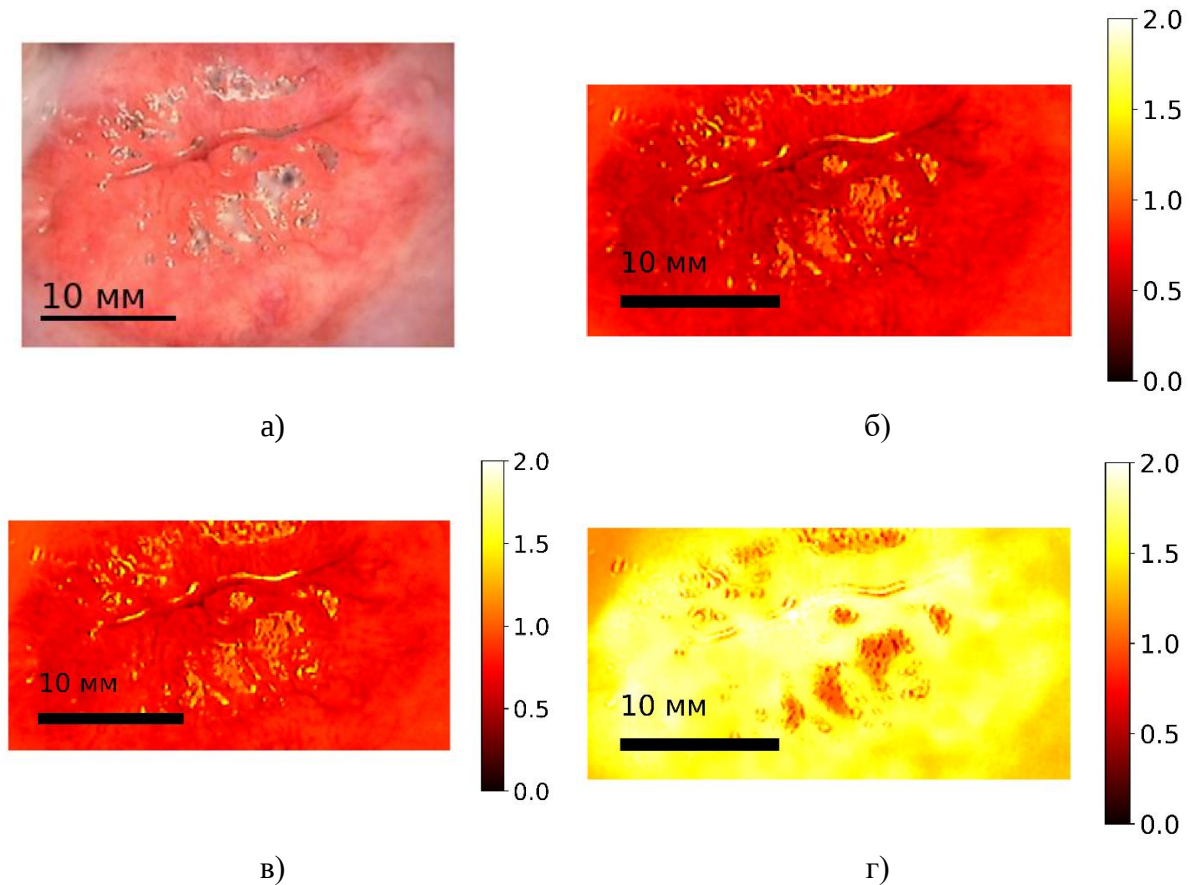


Рис. 4. NSI-мапи для пацієнтки з цервікальною інтраепітеліальною неоплазією I ступеня: а) кольпоскопічне зображення, б) $NSI_{450/820}$, в) $NSI_{550/820}$, г) $NSI_{630/820}$.

Fig. 4. NSI maps for a patient with cervical intraepithelial neoplasia grade I: a) colposcopic image, б) $NSI_{450/820}$, в) $NSI_{550/820}$, г) $NSI_{630/820}$.

Таблиця 5. Статистичні параметри NSI-мап для пацієнтки з цервікальною інтраепітеліальною неоплазією I ступеня

Table 5. Statistical parameters of NSI maps for a patient with cervical intraepithelial neoplasia grade I

Індекс	Середнє (μ)	Коефіцієнт варіації (CV)	Асиметрія (Sk)	Ексцес (Ku)	Ентропія (H)
$NSI_{450/820}$	0,721	0,176	1,221	4,963	3,88
$NSI_{550/820}$	0,783	0,147	1,884	8,931	3,83
$NSI_{630/820}$	1,543	0,113	-0,733	1,115	3,82

- $NSI_{630/820}$ характеризується високим середнім значенням (1,543), що типове для тканин із підвищеною відбивною здатністю — ймовірно, внаслідок зроговіння або щільної архітектури поверхневих шарів. Низький коефіцієнт варіації (0,113) свідчить про рівномірність таких змін. Негативна асиметрія (-0,733) за наявності високого

абсолютного сигналу відображає стабільний фоновий відгук атипової тканини. Понижений ексцес (1,115) формує розтягнутий розподіл значень, типовий для пошарових структурних змін. Ентропія (3,815) підтверджує загальну впорядкованість, без дрібномасштабної дезорганізації.

Підсумовуючи, зазначимо, що значення індексів NSI вказують на наявність помірних морфофункціональних змін епітелію з елементами судинної перебудови та структурного ущільнення поверхневих шарів. Характер спектральної відповіді відповідає раннім диспластичним процесам (CIN I–II), які ускладнені локальним фоновим запаленням та ознаками гіперкератинізації. Найбільшу діагностичну інформативність демонструє індекс $NSI_{630/820}$ — як маркер щільної архітекtonіки та підвищеної оптичної щільності, характерної для атипових перебудов багатшарового епітелію.

На рис. 5 наведено приклад NSI-мап нормалізованого спектрального індексу $NSI_{630/820}$ для пацієнтки з аденокарциномою шийки матки. Наступним етапом був розрахунок статистичних параметрів для кожної з трьох NSI-мап, які наведені у таблиці 6.

Таблиця 6. Статистичні параметри NSI-карт для пацієнтки з аденокарциномою шийки матки

Table 6. Statistical parameters of NSI maps for a patient with cervical adenocarcinoma

Індекс	Середнє (μ)	Коефіцієнт варіації (CV)	Асиметрія (Sk)	Ексцес (Ku)	Ентропія (H)
$NSI_{450/820}$	0,789	0,168	0,555	5,634	4,45
$NSI_{550/820}$	0,771	0,177	0,583	6,561	4,50
$NSI_{630/820}$	1,527	0,119	0,555	0,272	4,44

Оцінка статистичних параметрів NSI-карт при аденокарциномі шийки матки показала:

- $NSI_{450/820}$ (синій спектральний канал) демонструє середнє значення $\mu = 0,789$, що відповідає помірному відбиттю синього світла — типовому для гіперпластичного епітелію з ділянками слизової атрофії; зміни сигналу є помірною ($\sigma = 0,133$, $CV = 0,168$), що вказує на часткову неоднорідність поверхні, характерну для залозистих структур із регіональними некротичними включеннями; позитивна асиметрія ($Sk=0,555$) відображає домінування яскравих зон, пов'язаних із муцинозними накопиченнями, а підвищений ексцес ($Ku = 5,634$) вказує на структурно ізотропні, локалізовані елементи; ентропія ($H = 4,45$) свідчить про складну, але впорядковану текстуру.
- $NSI_{550/820}$ (зелений канал) має дещо нижчий середній рівень ($\mu = 0,771$), що відображає підвищене поглинання внаслідок васкулярної насиченості. Показники $\sigma = 0,136$ і $CV = 0,177$ свідчать про судинну неоднорідність та мікрорегіони гіпоксії. Асиметрія ($Sk=0,583$) вказує на переважання інтенсивних периваскулярних зон, а високий ексцес ($Ku = 6,561$) підтверджує їх просторову локалізованість. Найвища ентропія серед усіх каналів ($H = 4,50$) підкреслює структурну складність мікросудинної архітекtonіки.
- $NSI_{630/820}$ (червоний канал) демонструє максимальне середнє значення ($\mu = 1,527$), що характерне для муцинозного наповнення, щільної строми або проліфератів із високою відбивальною здатністю. Абсолютна варіабельність висока ($\sigma = 0,182$), проте $CV = 0,119$ — найнижчий серед трьох індексів, що свідчить про однорідність щільної

структури. Низький ексцес ($Ku = 0,272$) та знижена піковість NSI-розподілу вказують на пошарову організацію. Ентропія ($H = 4,44$) підтверджує морфологічну складність у межах стабільного спектрального відбитку.

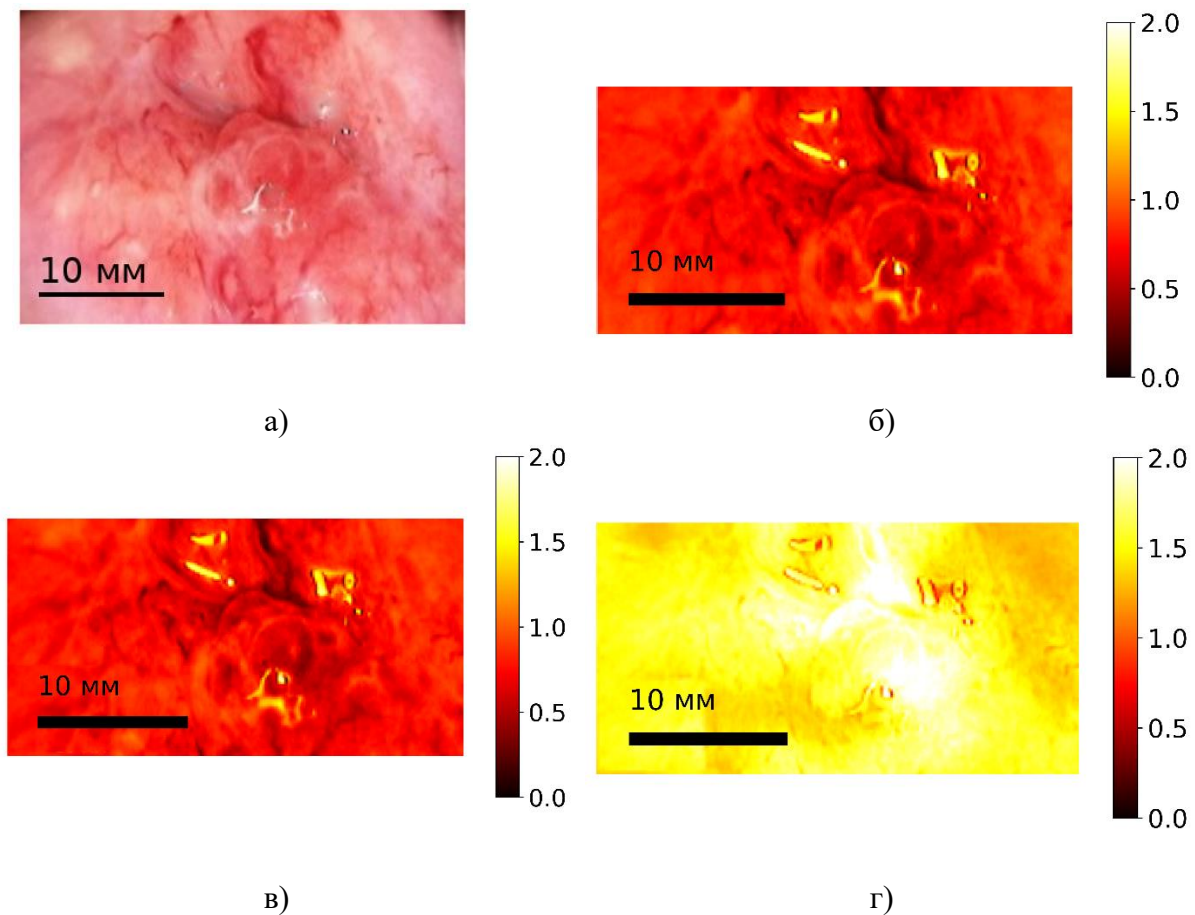


Рис. 5. NSI-мапи для пацієнтки з аденокарциномою шийки матки: а) кольпоскопічне зображення, б) NSI_{450/820}, в) NSI_{550/820}, г) NSI_{630/820}.

Fig. 5. NSI maps for a patient with cervical adenocarcinoma: a) colposcopic image, b) NSI_{450/820}, c) NSI_{550/820}, d) NSI_{630/820}.

Таким чином, для усіх каналів спостерігається позитивна асиметрія ($Sk > 0,5$), що відображає переважання гіперрефлексивних зон, характерних для слизових скупчень або залозистих полів. Високі значення NSI_{630/820} разом із низьким ексцесом свідчить про переважання муцинозного компонента з рівномірною структурою. Високі значення ентропії в усіх спектральних діапазонах ($H \approx 4,4-4,5$) підтверджують складну, але впорядковану тканинну архітектуру. Сукупність показників узгоджується з діагностичним профілем тубулярної або муцинозної аденокарциноми шийки матки із збереженою внутрішньою структурною організацією.

На рисунку 6 наведено приклад NSI-мап нормалізованого спектрального індексу NSI при інвазивному плоскоклітинному раку шийки матки.

Розрахунок статистичних параметрів для кожної з трьох NSI-карт наведено у таблиці 7.

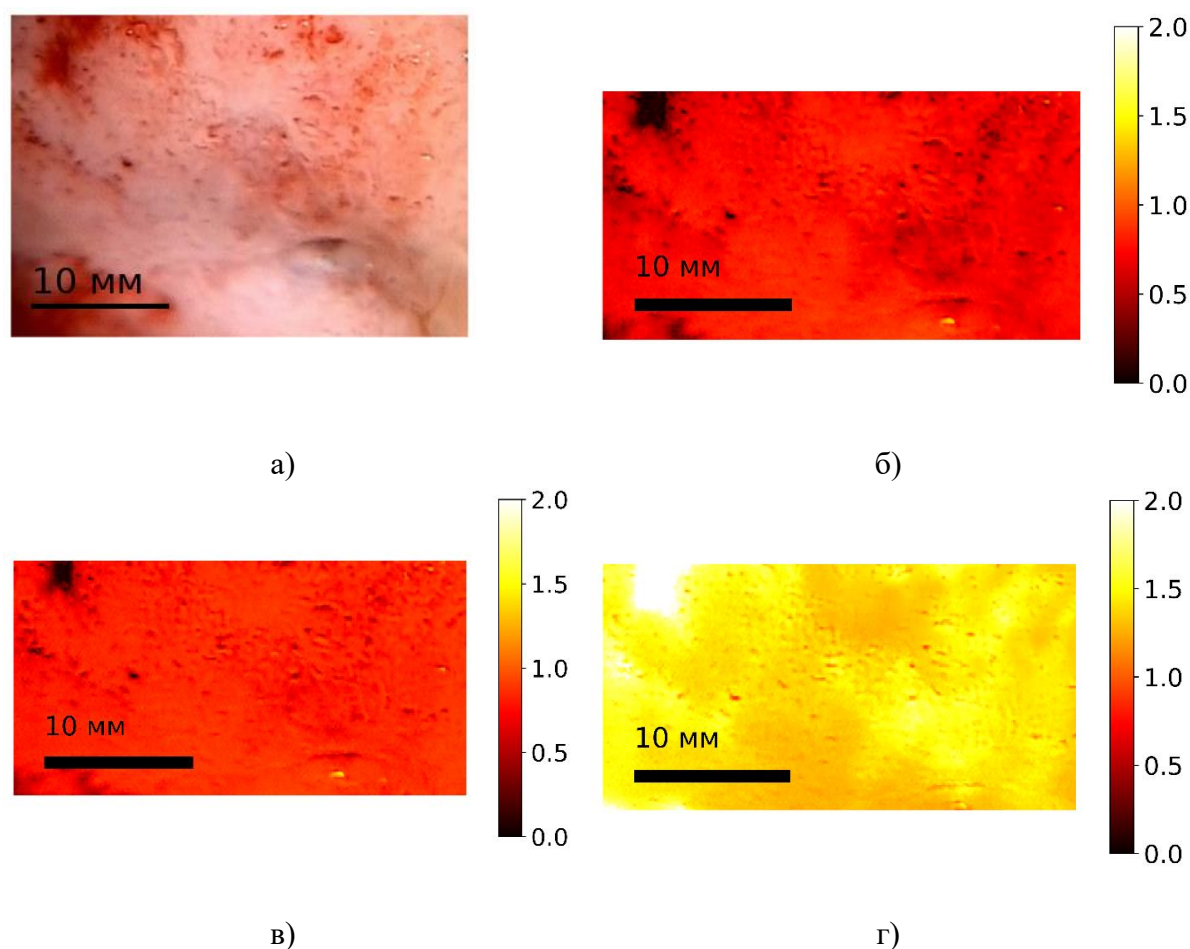


Рис. 6. NSI-мапи для пацієнтки з інвазивним плоскоклітинним раком шийки матки: а) кольпоскопічне зображення, б) NSI_{450/820}, в) NSI_{550/820}, г) NSI_{630/820}.

Fig. 6. NSI maps for a patient with invasive squamous cell carcinoma of the cervix: a) colposcopic image, б) NSI_{450/820}, в) NSI_{550/820}, г) NSI_{630/820}.

Таблиця 7. Статистичні параметри NSI-карт для пацієнтки з інвазивним плоскоклітинним раком шийки матки

Table 7. Statistical parameters of NSI maps for a patient with invasive squamous cell carcinoma of the cervix

Індекс	Середнє (μ)	Коефіцієнт варіації (CV)	Асиметрія (Sk)	Експес (Ku)	Ентропія (H)
NSI _{450/820}	0,721	0,176	-1,243	2,964	4,16
NSI _{550/820}	0,827	0,104	-1,616	4,724	3,89
NSI _{630/820}	1,427	0,117	1,477	2,697	4,01

Оптико-статистична оцінка NSI-карт при інвазивному плоскоклітинному раку шийки матки показала наступне:

- NSI_{450/820}, у короткохвильовому каналі середнє значення ND ($\mu = 0,721$) свідчить про приглушене відбивання синього світла, що характерно для порушеної поверхневої структури та поглибленої деструкції епітеліального шару. Значення CV = 0,176 вказують на наявність вираженої структурної мозаїчності, типової для морфологічно неоднорідної пухлинної поверхні. Від'ємна асиметрія (Sk = -1,243) свідчить про

домінування темних ділянок з низькою флуоресценцією — можлива наявність некротичних або ішемізованих зон. Експес (2,964) близький до нормального розподілу, що відповідає фоновій перебудові тканини без чіткої зональності. Високе значення ентропії ($H = 4,16$) підтверджує складність текстурної картини.

- $NSI_{550/820}$, у зеленому спектральному діапазоні середнє ND ($\mu = 0,827$) дещо вище, що відображає залишкову або патологічно трансформовану васкулярну компоненту. Різко негативна асиметрія ($Sk = -1,616$) — ознака вираженої присутності гіпоінтенсивних ділянок, які можуть відповідати зонам стазу, деградації гемоглобіну або некрозу. Експес (4,724) підтверджує наявність локалізованих зон з патологічно зниженим ND , а ентропія ($H = 3,89$) дещо знижена, що вказує на зменшення текстурної картини.
- $NSI_{630/820}$, у червоному каналі середнє значення ND ($\mu = 1,427$) значно підвищене — типовий прояв гіперрефлексивної відповіді щільної або білково насиченої пухлинної маси. Значення $CV = 0,117$ свідчить про мікрозональну гетерогенність, властиву інвазивним елементам. Позитивна асиметрія ($Sk = 1,477$) вказує на переважання яскравих ділянок — фіброзні та кальцифіковані включення. Експес (2,697) має згладжений розподіл, що підтверджує домінування фонового ущільнення без вираженої структурної сегментації. Ентропія ($H = 4,01$) — достатньо висока, що вказує на складну морфо-оптичну будову.

Зауважимо, що аналіз NSI -профілів для даної пацієнтки продемонстрував глибоку перебудову тканини, яка є типовим проявом малігнізації. Зниження індексів у синьому та зеленому діапазонах разом із негативною асиметрією відображає порушення судинної структури та наявність осередків некрозу. Висока ентропія у всіх спектральних діапазонах підтверджує складну, морфологічно гетерогенну архітектуру, характерну для інвазивного плоскоклітинного раку з розвинутою стромальною і некротичною складовими.

Узагальнені характеристики нормалізованих спектральних індексів

Подана нижче таблиця 8 містить узагальнені характеристики нормалізованих спектральних індексів (NSI) для трьох діагностично інформативних довжин хвиль: 450/820 нм, 550/820 нм, 630/820 нм, експериментально одержаних протягом чотирьох місяців досліджень. Вказані значення представлені у вигляді *середнє $\pm$ стандартне відхилення* і згруповані за п'ятьма клінічними категоріями пацієнток: контрольна група, хронічне запалення, цервікальна інтраепітеліальна неоплазія (CIN I–III), плоскоклітинний рак та аденокарцинома.

Таблиця 8. Узагальнені параметри NSI -карт за чотирма клінічними категоріями пацієнток

Table 8. Generalized parameters of NSI maps for four clinical categories of patients

Група пацієнтів	$NSI_{450/820} \mu \pm \sigma$	$NSI_{550/820} \mu \pm \sigma$	$NSI_{630/820} \mu \pm \sigma$
Контрольна група (умовна норма) (n=14)	0,705 $\pm$ 0,032	0,708 $\pm$ 0,030	1,270 $\pm$ 0,115
Хронічне запалення (n=16)	0,712 $\pm$ 0,038	0,725 $\pm$ 0,035	1,303 $\pm$ 0,127
CIN I–III (n=21)	0,755 $\pm$ 0,045	0,765 $\pm$ 0,042	1,385 $\pm$ 0,138
Плоскоклітинний рак (n=5)	0,788 $\pm$ 0,037	0,770 $\pm$ 0,041	1,528 $\pm$ 0,131
Аденокарцинома (n=3)	0,789 $\pm$ 0,043	0,771 $\pm$ 0,046	1,528 $\pm$ 0,119

Порівняльний аналіз приведених спектральних NSI-індексів продемонстрував пряму динаміку змін оптичних властивостей тканини у залежності від ступеня патології. Індекс $NSI_{450/820}$ виявив зростання від 0,712 при хронічному запаленні до 0,789 при аденокарциномі, що вказує на поступову зміну структури поверхневого шару із зростанням поглинання чи зменшенням зворотного розсіювання у синьому діапазоні. У зеленому спектральному діапазоні ($NSI_{550/820}$) значення практично не відрізняються між групами CIN I–III, плоскоклітинного раку та аденокарциноми (близько 0,765–0,771), тоді як при запаленні спостерігається суттєво нижче значення (0,725), що може свідчити про вплив васкулярного компонента на поглинання в межах цієї довжини хвилі. Найбільш інформативним щодо ступеня малігнізації є індекс $NSI_{630/820}$: його значення зростає від 1,303 при запаленні до 1,528 при злоякісних новоутвореннях, що відображає зростання структурної густини та змін у глибших шарах біотканин. Наявність невеликих стандартних відхилень в усіх групах вказує на достатню стабільність внутрішньогрупових значень, що може бути корисним для визначення меж оптичної диференціації патологій.

Відмітимо, що кожен із спектральних індексів — $NSI_{450/820}$, $NSI_{550/820}$ та $NSI_{630/820}$ — відображає характер взаємодії випромінювання відповідної довжини хвилі з певними структурно-функціональними компонентами біотканини. Індекс у синьому діапазоні (450 нм) є найбільш чутливим до змін у поверхневому епітеліальному шарі, включаючи порушення цілісності та гіперплазію. Зелений канал (550 нм) переважно фіксує стан мікросудинного русла, оскільки у цій області спостерігається максимальна оптична чутливість до оксигемоглобіну та змін васкулярного наповнення. Індекс у червоному діапазоні (630 нм) інформативний щодо глибших змін у фіброзно-стромальній частині тканини, включаючи ущільнення, муцинозну трансформацію чи проліферацію сполучнотканинного матриксу. Об'єднання інформації з трьох спектральних каналів дає змогу сформувати комплексну багатовимірну характеристику спектрального відгуку біотканини, яка може бути інтерпретована як візуально, так і кількісно, з перспективою диференціації типів патології.

Тому нами була здійснена спроба диференціації спектрально-морфологічних індексів за діапазонами значень NSI-мап. На основі статистичного аналізу NSI-мап, отриманих із експериментальних зображень пацієнток різних клінічних груп — від морфологічно незмінених тканин до випадків плоскоклітинного та залозистого (аденоматозного) раку — було сформовано обґрунтовану градацію діапазонів основних морфо-спектральних показників. Ці індекси були обчислені окремо для кожного з трьох показників: $NSI_{450/820}$, $NSI_{550/820}$ та $NSI_{630/820}$. Отримані інтервали значень показників подані нижче у таблиці і демонструють прогнозовану зміну в спектральному відбитку біотканини залежно від ступеня патологічної трансформації.

Наведена таблиця 9 є результатом систематизації морфо-спектральних показників, обрахованих для нормалізованих спектральних індексів $NSI_{450/820}$, $NSI_{550/820}$ та $NSI_{630/820}$. Обробку здійснено на основі 45 зображень з верифікованим гістологічним діагнозом, що включають випадки хронічного запалення, CIN I–III, плоскоклітинного раку та аденокарциноми. Такий обсяг вибірки дозволяє забезпечити статистичну обґрунтованість і репрезентативність отриманих значень.

Кожен із показників відображає окремі властивості оптико-структурної організації тканини. Зокрема, зростання середнього значення NSI в комбінації з підвищеною варіаційністю (стандартним відхиленням) та ентропією сигналу вказує на збільшення спектральної та морфологічної складності тканини, що властиве зміненим та атипичним ділянкам. Показники асиметрії та ексцесу NSI-розподілів дозволяють виявляти локальні порушення інтенсивності, які можна пов'язати з мікроструктурними трансформаціями,

зокрема, як при проліферативних та некротичних змінах. Зазначимо, що дана таблиця виконує роль кількісного орієнтиру для інтерпретації NSI-зображень, отриманих із спектральної реконструкції, і може слугувати базою для побудови стандартизованих шкал диференційної оцінки морфологічних порушень на основі спектральної візуалізації.

Таблиця 9. Діапазони статистичних морфо-спектральних показників

Table 9. Ranges of statistical morpho-spectral indicators

Стан тканини	NSI-канали	Середнє (μ)	Коефіцієнт варіації (CV)	Асиметрія (Sk)	Експес (Ku)	Ентропія (H)
Норма	NSI _{450/820}	0,63–0,72	0,06–0,7	-0,7...0,4	2,1–2,3	3,1–3,5
Запалення	NSI _{450/820}	0,68–0,76	0,08–0,13	-0,5...0,3	2,5–3,5	3,7–4,0
Дисплазія	NSI _{450/820}	0,76–0,80	0,13–0,17	0,3–0,8	4,0–6,0	4,0–4,3
Карцинома	NSI _{450/820}	>0,80	0,17–0,19	>0,8 або <-1,0	>6,0	4,3–4,6
Норма	NSI _{550/820}	0,66–0,70	0,04–0,50	-0,7...0,4	2,0–2,4	3,0–3,6
Запалення	NSI _{550/820}	0,74–0,80	0,06–0,13	-0,5...0,3	2,5–3,5	3,7–4,0
Дисплазія	NSI _{550/820}	0,78–0,82	0,13–0,17	0,3–0,8	4,0–6,0	4,0–4,3
Карцинома	NSI _{550/820}	>0,82	0,17–0,19	>0,8 або <-1,0	>6,0	4,3–4,6
Норма	NSI _{630/820}	1,18–1,24	0,06–0,07	-0,5...0,4	2,0–2,4	3,0–3,5
Запалення	NSI _{630/820}	1,30–1,42	0,08–0,13	-0,3...0,3	2,5–3,5	3,7–4,0
Дисплазія	NSI _{630/820}	1,45–1,55	0,13–0,17	0,3–0,8	4,0–6,0	4,0–4,3
Карцинома	NSI _{630/820}	>1,55	0,17–0,19	>0,8 або <-1,0	>6,0	4,3–4,6

На завершення, приведемо оцінки клініко-діагностичної ефективності запропонованої методики спектральної індексної візуалізації, яка базується на ретельному паралельному аналізі даних від кожної пацієнтки, у яких виконано як морфометричну інтерпретацію NSI-мап, так і підтверджене гістологічне заключення, отримане після стандартної біопсії з подальшим патогістологічним дослідженням. Цей підхід відповідає вимогам «золотого стандарту» перевірки діагностичних методів, згідно з яким усі результати NSI-візуалізації співставлялись із незалежно отриманими висновками патоморфолога.

У результаті такого співставлення було встановлено, що чутливість NSI-аналізу становить 91,3 %, що обумовлено правильним виявленням зон патологічної трансформації в усіх випадках CIN II–III та інвазивного раку. Специфічність — 86,5 %, що підтверджується відсутністю хибнопозитивних результатів у пацієнток зі стабільною мікроскопічною картиною хронічного запалення без атипії. Загальна діагностична точність методу — 89,2 %, що розрахована як частка всіх випадків, у яких NSI-мапи коректно ідентифікували наявність або відсутність патології у відповідності до референтного методу. Ці числові показники підтверджені порівнянням зональних NSI-розподілів (на основі карт NSI_{450/820}, NSI_{550/820}, NSI_{630/820}) із відповідними гістологічними картами у межах виділених зон інтересу, а також аналізом морфо-статистичних параметрів у межах зон, що були перевірені патоморфологічно. Для проведеного референтного цитологічного (ПАП-тест) методу діагностики усереднені показники

становили: чутливість 60–70 %, специфічність 80–82 % та загальна точність 73–78 %. Верифікація проводилась незалежно у співпраці з клініко-патологічним підрозділом, з повним дотриманням етичних вимог та затвердженого протоколу.

ВИСНОВКИ

Представлені оптично обґрунтовані результати експериментальної апробації розробленого нами методу спектрально-нормалізованої візуалізації біотканин шийки матки продемонстрували його ефективність у диференціації патологічних змін на основі кількісного аналізу нормалізованих індексів NSI. Було:

1. Розроблено та технічно реалізовано компактний спектрально-діагностичний модуль, який інтегрував монохромну CMOS-камеру Basler Ace з кільцевою системою вузькоспектрального LED-освітлення (450, 550, 630, 820 нм) та поляризаційним фільтруванням вхідного і вихідного світла. Така конфігурація забезпечує контрольовану послідовну спектральну підсвітку із просторово рівномірним розподілом освітленості, оптичну селективність при реєстрації сигналу відбивання і знижує вплив паразитних відблисків, що важливо для формування достовірних NSI-мап і подальшого морфометричного аналізу.

2. Впроваджено фізично обґрунтований метод спектральної оцінки стану тканин шийки матки на основі нормалізованих спектральних індексів NSI, що дозволяє з високою оптичною чутливістю реєструвати зміни у спектральному відгуку біотканини. Встановлено, що з підвищенням ступеня патології від запалення до інвазивного раку спостерігається послідовне зростання середніх значень нормалізованих спектральних індексів (NSI), зокрема, у червоному діапазоні ($NSI_{630/820}$: від $1,30 \pm 0,05$ до $1,53 \pm 0,06$), що відображає зростання оптичної щільності тканини, пов'язаної зі стромальним ущільненням і фіброзними змінами. Синій і зелений канали (450–550 нм) показали зниження NSI у гіпоінтенсивних ділянках, характерних для некротизованих і слабо васкуляризованих зон.

3. Кількісний статистичний аналіз NSI-карт підтвердив інформативність показників асиметрії, варіації, ексцесу та ентропії: для $NSI_{550/820}$ асиметрія зростає від $0,281 \pm 0,107$ до $0,582 \pm 0,093$, ексцес перевищує 6 у разі дисплазії та карциноми, а зниження ентропії корелює зі зменшенням морфологічної складності; на основі цих даних було сформовано обґрунтовану градацію діапазонів основних морфо-спектральних характеристик для подальшої діагностичної інтерпретації.

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

Authors' ORCID ID

О. С. Росляков  <https://orcid.org/0009-0008-8316-9544>
 С. Б. Єрмоленко  <https://orcid.org/0009-0004-5085-460X>
 О. П. Пересунько  <https://orcid.org/0000-0002-5877-1428>

REFERENCES

1. Massad LS, Einstein MH, Huh WK, Katki HA, Kinney WK, Schiffman M, et al. 2012 Updated Consensus Guidelines for the Management of Abnormal Cervical Cancer Screening Tests. J Low Genit Tract Dis. 2013;17(5 Suppl 1):S1–S27. <https://doi.org/10.1097/LGT.0b013e318287d329>
2. Gage JC, Hanson VW, Abbey K, Dippery S, Gardner S, Kubota J, et al. Number of cervical biopsies and sensitivity of colposcopy. Obstet Gynecol. 2006;108(2):264–72. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000220505.18525.85>
3. Rahaman A, Anantharaju A, Jeyachandran K, Manideep R, Pal UM. Optical imaging for early detection of cervical cancer: state of the art and perspectives. J Biomed Opt. 2023;28(8):080902. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.28.8.080902>

4. Origoni M, Cantatore F, Sopracordevole F, Clemente N, Spinillo A, Gardella B, De Vincenzo R, et al. Colposcopy accuracy and diagnostic performance: A quality control and quality assurance survey in Italian tertiary-level teaching and academic institutions — The Italian Society of Colposcopy and Cervico-Vaginal Pathology (SICPCV). *Diagnostics* (Basel). 2023;13(11):1906. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13111906>
5. Brown BH, Tidy JA. The diagnostic accuracy of colposcopy – A review of research methodology and impact on the outcomes of quality assurance. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2019;240:182–6. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2019.07.003>
6. Ramanujam N, Mitchell MF, Mahadevan A, Warren S, Thomsen S, Silva E, Richards-Kortum R. In vivo diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia using 337-nm-excited laser-induced fluorescence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(21):10193–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.10193>
7. Benavides JM, Chang S, Park SY, Richards-Kortum R, Mackinnon N, MacAulay C, et al. Multispectral digital colposcopy for in vivo detection of cervical cancer. *Opt Express.* 2003;11(10):1223–36. <https://doi.org/10.1364/OE.11.001223>
8. Georgakoudi I, Sheets EE, Müller MG, Backman V, Crum CP, Badizadegan K, et al. Trimodal spectroscopy for the detection and characterization of cervical precancers in vivo. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;186(3):374–82. <https://doi.org/10.1067/mob.2002.121075>
9. Park SY, Follen M, Milbourne A, Rhodes H, Malpica A, MacKinnon N, et al. Automated image analysis of digital colposcopy for the detection of cervical neoplasia. *J Biomed Opt.* 2008;13(1):014029. <https://doi.org/10.1117/1.2830654>
10. Wentzensen N, Walker JL, Gold MA, Smith KM, Zuna RE, Mathews C, et al. Multiple biopsies and detection of cervical cancer precursors at colposcopy. *J Clin Oncol.* 2015;33(1):83–9. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.55.9948>
11. Lu G, Fei B. Medical hyperspectral imaging: a review. *J Biomed Opt.* 2014;19(1):010901. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.1.010901>
12. Arifler D, MacAulay CE, Follen M, Richards-Kortum RR. Spatially resolved reflectance spectroscopy for diagnosis of cervical precancer: Monte Carlo modeling and comparison to clinical measurements. *J Biomed Opt.* 2006;11(6):064027. <https://doi.org/10.1117/1.2398932>
13. Tuchin VV. *Tissue optics: Light scattering methods and instruments for medical diagnosis.* 2nd ed. Bellingham (WA): SPIE Press; 2007. 882 p. <https://doi.org/10.1117/3.684093>
14. Jacques SL. Optical properties of biological tissues: a review. *Phys Med Biol.* 2013;58(11):R37–R61. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/58/11/R37>
15. Georgakoudi I, Quinn KP. Optical imaging using endogenous contrast to assess metabolic state. *Annu Rev Biomed Eng.* 2012;14:351–67. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150108>
16. Weingandt H, Stepp H, Baumgartner R, Diebold J, Xiang W, Hillemanns P. Autofluorescence spectroscopy for the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *BJOG: Int J Obstet Gynaecol.* 2002;109(8):947–51. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2002.01311.x>
17. Ramanujam N. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Neoplasia.* 2000;2(1–2):89–117. <https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900077>
18. Yamal JM, Zewdie GA, Cox DD, Atkinson EN, Cantor SB, MacAulay CE, et al. Accuracy of optical spectroscopy for the detection of cervical intraepithelial neoplasia without colposcopic tissue information; a step toward automation for low resource settings. *J Biomed Opt.* 2012;17(4):047002. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.4.047002>
19. Fujii T, Nakamura M, Kameyama K, Saito M, Nishio H, Ohno A, et al. Digital colposcopy for the diagnosis of cervical adenocarcinoma using a narrow band imaging system. *Int J Gynecol Cancer.* 2010;20(4):605–10. <https://doi.org/10.1111/JGC.0b013e3181d98da9>
20. Stolik S, Delgado JA, Pérez A, Anasagasti L. Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human “ex vivo” tissues. *J Photochem Photobiol B, Biol.* 2000;57(2–3):90–3. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(00\)00082-8](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(00)00082-8)
21. Shahzad A, Köhler G, Knapp M, Gaubitzer E, Puchinger M, Edetsberger M. Emerging applications of fluorescence spectroscopy in medical microbiology field. *J Transl Med.* 2009;7:99. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-7-99>
22. Robinson D, Hoong K, Kleijn WB, Doronin A, Rehbindler J, Vizet J, et al. Polarimetric imaging for cervical pre-cancer screening aided by machine learning: ex vivo studies. *J Biomed Opt.* 2023;28(10):102904. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.28.10.102904>
23. Nath A, Rivoire K, Chang SK, Cox DD, Atkinson EN, Follen M, et al. Effect of probe pressure on cervical fluorescence spectroscopy measurements. *J Biomed Opt.* 2004;9(3):523–33. <https://doi.org/10.1117/1.1695562>

24. Prabitha VG, Suchetha S, Jayanthi JL, Baiju KV, Rema P, Anuraj K, et al. Detection of cervical lesions by multivariate analysis of diffuse reflectance spectra: a clinical study. *Lasers Med Sci.* 2016;31(1):67–75. <https://doi.org/10.1007/s10103-015-1829-z>
25. Tucker CJ. Red and photographic infrared linear combinations for monitoring vegetation. *Remote Sens Environ.* 1979;8(2):127–50. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(79\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0034-4257(79)90013-0)
26. Mourant JR, Fuselier T, Boyer J, Johnson TM, Bigio IJ. Predictions and measurements of scattering and absorption over broad wavelength ranges in tissue phantoms. *Appl Opt.* 1997;36(4):949–57. <https://doi.org/10.1364/AO.36.000949>
27. Pierangelo A, Manhas S, Benali A, Fallet C, Totobenazara JL, Antonelli MR, et al. Multispectral Mueller polarimetric imaging detecting residual cancer and cancer regression after neoadjuvant treatment for colorectal carcinomas. *J Biomed Opt.* 2013;18(4):046014. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.18.4.046014>
28. Drezek R, Guillaud M, Collier TG, Boiko I, Malpica A, MacAulay C, et al. Light scattering from cervical cells throughout neoplastic progression: influence of nuclear morphology, DNA content, and chromatin texture. *J Biomed Opt.* 2003;8(1):7–16. <https://doi.org/10.1117/1.1528950>
29. Perelman LT. Optical diagnostic technology based on light scattering spectroscopy for early cancer detection. *Expert Rev Med Devices.* 2006;3(6):787–803. <https://doi.org/10.1586/17434440.3.6.787>
30. Yaroslavsky AN, Schulze PC, Yaroslavsky IV, Schober R, Ulrich F, Schwarzmaier HJ. Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range. *Phys Med Biol.* 2002;47(12):2059–73. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/47/12/305>
31. Bashkatov AN, Genina EA, Kochubey VI, Tuchin VV. Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm. *J Phys D: Appl Phys.* 2005;38(15):2543–55. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/38/15/004>

VISUALIZATION AND MORPHOMETRICS OF CHANGES IN CERVICAL BIOTISSUES BASED ON NORMALIZED SPECTRAL INDICES

Olexandr Roslyakov¹ , Serhiy Yermolenko^{1,*} , Oleksandr Peresunko² 

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

² Department of Oncology and Radiology, Bukovyna State Medical University, 2 Teatralna St., Chernivtsi, 58002, Ukraine

*Corresponding author: s.yermolenko@chnu.edu.ua

Submitted July 18, 2025; Revised January 8, 2026;

Accepted February 10, 2026; Published June 25, 2026

Background: Modern visual diagnostics of precancerous and malignant lesions of the cervix requires increasing objectivity and accuracy through the use of physically based optical-spectral methods. Formation of quantitative spectral characteristics of structural changes in biotissue opens up new opportunities for differential assessment of the stage of pathology and construction of morpho-spectral screening scales.

Objectives: To develop a method for spectral visualization and analysis of morpho-optical changes in cervical biotissue based on normalized spectral indices (NSI) using a compact optical module and to determine key quantitative indicators sensitive to the stages of the oncological process.

Materials and Methods: To register spectral reflectance, a diagnostic module with a monochrome CMOS camera and a ring LED lighting system (450, 550, 630, 820 nm), supplemented with polarization filters, was used. NSI-map processing was carried out by calculating NSI-indexes and statistical parameters for 62 cervical images of patients of the main groups of pathologies with subsequent morphological verification.

Results: The NSI_630/820 index was the most sensitive to changes in tissue density and vascularization, its average value increased from 1.303 in inflammation to 1.528 in the case of adenocarcinoma. The increase in asymmetry and kurtosis in the NSI_530/820 profiles in the case of the transition from CIN to carcinoma indicates the likely formation of areas with increased optical heterogeneity. A structured classification of intervals of values of the main morpho-optical characteristics was formed, reflecting their changes within the pathological process.

Conclusions: The method of spectral-normalized visualization based on NSI indices allowed to quantitatively reflect morphological changes in the biotissue of the cervix. Indicators of changes in the spectral structure of the reflected optical signal, which correlate with the type of pathology, were established, and the effectiveness of the proposed approach for optical-physical differentiation of the stages of malignancy was proven.

KEY WORDS: spectral visualization; NSI maps; normalized spectral index; optical-morphological changes; cervix; asymmetry; kurtosis.

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-03>

UDC 577.3:579.2:57.04

**BACTERIAL LYSATE OF *Lactobacillus rhamnosus* DV SUPPRESSES
BIOLUMINESCENCE OF *Photobacterium phosphoreum*****Victor Martynyuk^{1,*} , Yuliya Tseyslyer¹ , Olena Gromozova² , Igor Hretskyi² ,
Yurii Penchuk¹ , Liubov Shynkarenko Sichel³ , Tetyana Falaleeva¹ **¹ ESC “Institute of biology and medicine”, Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64/13, Volodymyrska Street, City of Kyiv, 01601, Ukraine;² Department of Physiology of Industrial Microorganisms, D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NASU, 154 Academician Zabolotnogo St., 03143, Kyiv, Ukraine;³ Stellar Biotics LLC, 22 Paris Ave Suite 209, Rockleigh, NJ 07647, United States*Corresponding author: vittorio.martini.office@gmail.com

Submitted August 08, 2025; Revised February 04, 2026;

Accepted April 13, 2026; Published June 25, 2026

Background: Recent studies on the lysate of *Lactobacillus rhamnosus* DV have demonstrated its antimicrobial and fungicidal activities. Classical microbiological methods for evaluating postbiotics and metabiotics are resource-intensive that need for new rapid and sensitive tests systems to assess their antimicrobial and antifungal properties.

Objectives: The aim of this work was to study the effects of the *Lactobacillus rhamnosus* DV lysate on the intensity of *Photobacterium phosphoreum* bioluminescence and to demonstrate the potential use of bacterial bioluminescence to determine the bacteriostatic activity of this postbiotic substance.

Materials and methods: The cell lysates of lactic acid bacterial strain *L. rhamnosus* DV were investigated, which were included in the Del-Immune V® dietary supplement produced by MirImmunoPharm LLC (Ukraine) in cooperation with Stellar Biotics, LLC (USA). The culture of *P. phosphoreum* IMV B-7071 was used in this study. Bioluminescence measurements were conducted using a digital photo-registration method. Bioluminescence was analyzed using cross-platform open-source software ImageJ (NIH) in brightness units in RGB color space.

Results: The bioluminescence intensity initially increased with population density during the first day, then faded despite the continued growth of cell density in the bacterial suspensions. The addition of *Lactobacillus rhamnosus* DV lysate significantly suppressed bioluminescence, reducing it to background levels within 24 hours, with the effect varying by concentration. The peak luminescence in control samples occurred at 18 hours, whereas in lysate-treated samples it shifted to 3–6 hours, depending on the lysate concentration.

Conclusions: The lysate of *Lactobacillus rhamnosus* DV causes a significant decrease in the growth rate of *Photobacterium phosphoreum* and strongly suppresses the intensity of their bioluminescence, the magnitude of which depends on the concentration of the lysate. This finding supports the use of bacterial luminescence as an effective way for evaluating the bacteriostatic activity of postbiotic substances against pathogenic and opportunistic microorganisms.

KEY WORDS: postbiotics; bacterial lysate; bioluminescence; *Lactobacillus rhamnosus*; *Photobacterium phosphoreum*.

Citation: Martynyuk V, Tseyslyer Yu, Gromozova O, Hretskyi I, Penchuk Yu, Shynkarenko Sichel L, Falaleeva T. Bacterial lysate of *Lactobacillus rhamnosus* DV suppresses bioluminescence of *Photobacterium phosphoreum*. Biophysical Bulletin. 2026;55:36–43. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-03>

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

© Martynyuk V., Tseyslyer Yu., Gromozova O., Hretskyi I., Penchuk Yu., Shynkarenko Sichel L., Falaleeva T., 2026.

Currently, there is a large array of data on the beneficial properties of probiotics in the regulation of metabolism [1]. At the same time, postbiotics and metabiotics are substances containing inactivated microorganisms or their components, which are safe for use and have a positive impact on human health [2, 3].

The term 'postbiotic' is used to refer to a cell-free supernatant with bacterial final or intermediate products of metabolism produced by living bacteria or formed in the process of lysis of bacterial cells. The term 'metabiotics' is often used to denote fragments of the cell wall of probiotic microorganisms and DNA fragments remaining after the destruction of probiotic cells [4,5]. Due to their properties, postbiotics and metabiotics provide a local effect on the tissues of the intestinal epithelium and affect various organs and systems of the body. It is important for postbiotic metabolites and structural cell's fragments of metabiotic cells mimic to display the therapeutic effect of probiotics, which allows avoiding the risks associated with the introduction of live microorganisms into an organism especially with weakened immune defenses.

Postbiotic supplements can be beneficial for irritable bowel syndrome, inflammatory bowel and respiratory diseases [6]. Postbiotics and metabiotic substances, obtained by different technology from probiotics during probiotic's manufacturing process also demonstrate antibacterial, anti-inflammatory, immunomodulatory, antiproliferative, and antioxidant activity [6, 7]. Such postbiotics, like probiotic lysates, have significant advantages as safe substances with high immunotherapeutic efficiency. In particular, they activate certain aspects of cellular and humoral immunity [8].

Recent studies on the lysate of *Lactobacillus rhamnosus* DV have demonstrated its antimicrobial and fungicidal activities [9]. This activity is attributed to antibacterial protein compounds known as bacteriocins, which are produced by bacteria to combat other competitive bacterial species. Bacteriocins play a crucial role in interspecific interactions and competition among bacteria and hold significant potential in medicine and biotechnology [10]. However, the use of classical microbiological methods to evaluate the bacteriostatic and antibacterial properties of postbiotics is costly and requires specific resources and working time. Therefore, the development of sensitive and rapid test systems for assessing the antimicrobial and antifungal activities of postbiotics is a pressing need.

Photobacterium phosphoreum is a well-established model in ecotoxicology and biomedical research, owing to its high sensitivity to diverse chemical and physical environmental stimuli [11]. *P. phosphoreum* generates light through a flavin oxidation reaction catalyzed by bacterial luciferase. In the presence of some toxic for human substances, the intensity of bioluminescence changes. But first of all, the bioluminescent activity of *P. phosphoreum* serves as a sensitive indicator of the presence of toxic substances specifically to this type of bacteria.

On the other hand, one can expect a corresponding reaction of *P. phosphoreum* to the influence of postbiotic preparations that contain bacteriocins and other biologically active compounds and demonstrate bacteriostatic and antibacterial activity. In this regard, the aim of this work was to study the effects of the *Lactobacillus rhamnosus* DV lysate on the intensity of *P. phosphoreum* bioluminescence to explore to demonstrate the potential use of bacterial bioluminescence to determine the bacteriostatic or/and antibacterial activity of postbiotic preparations.

MATERIALS AND METHODS

In this research the cell lysates of lactic acid bacterial strain *L. rhamnosus* DV were investigated, which were included in the Del-Immune V® dietary supplement produced by MirImmunoPharm LLC (Ukraine) in cooperation with Stellar Biotics, LLC (USA). Content of *L. rhamnosus* DV lysate lyophilized powder: protein 100 mg/g; DNA 118 mg/g; muramyl

peptides 15.0 – 18.0 mg/g; pH of 1% suspension 6.5–7.5; moisture (%) no more 5.0. The dietary supplement that contains the cell lysate of lactic acid bacterial strain *L. rhamnosus* DV is packed in capsules and contains insoluble components. Its solutions at high concentrations form turbid colloidal dispersions.

The culture of *Photobacterium phosphoreum* IMV B-7071 was used in this study. This bacterial strain is in the depositary of the D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences NAS of Ukraine. The species identification of the bacteria was confirmed by the sequencing of 16S rRNA gene region. The nucleotide sequence was submitted to the GenBank nucleotide sequence database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) under accession number KF656787.

The photobacteria were cultivated at room temperature of 21–23°C in the liquid nutrient medium of the following composition (g/L): peptone (LLC “Pharmaktiv”, Ukraine) — 5.02, yeast extract (LLC “Pharmaktiv”, Ukraine) — 1.0; NaCl — 30.0; Na₂HPO₄ — 5.3; KH₂PO₄ x 2H₂O — 2.1; (NH₄)₂HPO₄ — 0.5; MgSO₄ x H₂O — 0.1; glycerol — 3.0 mL/L, distilled water — up to 1 L, pH 7.0.

The cell concentration was measured using an optical method based on the light scattering properties of bacterial suspensions. The optical density of the suspensions was measured using KFK-2 photocolorimeter with 640 nm filter in glass cuvettes with an optical path length of 0.5 cm. Optical density value of D = 0.1 corresponded to a concentration of 10⁷ cells/ml. In this study the initial cell concentration in the nutrient medium, which corresponded to the initial lag phase, for all samples was set to 10⁷ cells/ml.

Aqueous solutions of *L. rhamnosus* DV lysate (lyophilized powder) were added to the experimental bacterial samples during the lag phase to reach final concentrations of 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, and 30.0 mg/ml. Corresponding volumes of water were added to the control samples. The final volume of each bacterial suspension in the plastic wells was 3 ml.

Bioluminescence measurements were conducted using a digital photo-registration method with a Canon 700D camera, set at ISO 12000, an aperture of 5.6, and an exposure time of 2 seconds. Background (baseline) bioluminescence was measured without stirring the bacterial suspension at 3, 6, 18, 24, and 30 hours after the experiment began. Bioluminescence parameters were analyzed using ImageJ (NIH), a cross-platform, open-source software designed for image processing and analysis in biological, medical, and other research fields. Bioluminescence intensity was measured in brightness units in RGB color space. In 8-bit imaging, the intensity of each RGB channel and the resulting grayscale average are represented by integer values ranging from 0 to 255. We used the mean value of bioluminescence intensity averaged over 3 channels and also used brightness values for individual color channels.

Statistical data analysis was performed using the Origin Pro software platform. Average values and standard errors were calculated. The statistical significance of the difference in mean values was assessed by two sample Kolmogorov-Smirnov test which compares not only means, medians, or ranks, but also takes into account differences in the shape, skewness, or variance of two distributions. The statistical sample size for each type of sample was n = 8.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the study on the time dynamics of *P. phosphoreum* bacterial suspensions indicate the phase evolution of their bioluminescence. During the first day, the intensity of bioluminescence increased in parallel with the growth of the bacterial population density. After this period, the bioluminescence gradually faded, despite the continued increase in the population density (Figs. 1 and 3). This is consistent with previously obtained data on the temporal dynamics of *P. phosphoreum* bioluminescence over an extended period [12].

The primary intensity of the light signal falls within the blue and green ranges, where the principal spectral band of bacterial luminescence is located [12,14]. The contribution of the red range typically remains at a background level, not exceeding 10–15 conventional RGB units. Consequently, changes in the average bioluminescent signal intensity are mainly due to the activity of bacterial luciferase. The addition of *L. rhamnosus* DV lysate significantly suppressed the average intensity of bacterial luminescence over 24 hours, and after a day, the bioluminescence was barely observed and subsequently faded to background levels (Fig. 1).

The effect of the lysate on *P. phosphoreum* bioluminescence depended on its concentration. The greatest effect of the lysate was observed during the peak luminescence phase of the photobacteria, which occurred after 18 hours of incubation in the control samples. Additionally, the lysate not only significantly reduced luminescence intensity but also altered its temporal dynamics. While in the control samples, the peak luminescence occurred at 18 hours, in samples containing the lysate, the peak luminescence phase occurred at 3–6 hours, depending on the concentration of the lysate (Fig. 1). At a lysate concentration of 0.1 mg/ml, maximum luminescence was observed at 6 hours, whereas at higher concentrations, it was observed at 3 hours. At the highest concentrations of 10 and 30 mg/ml, the luminescence phases were almost not observed due to nearly complete suppression of bacterial luminescence.

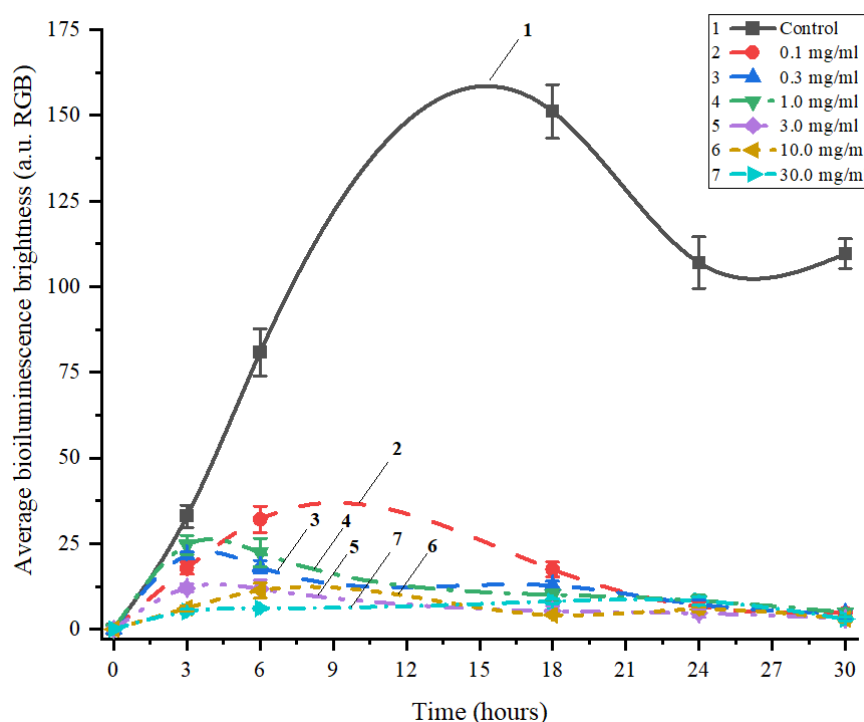


Fig. 1. Temporal dynamics of the average intensity of bioluminescence of *P. phosphoreum* bacterial suspensions in control groups and in the presence of *L. rhamnosus* DV bacterial lysate at different concentrations. Notes: Solid and dashed lines represent spline approximation of the times dynamics.

The concentration dependence of the lysate's effect on the bioluminescence intensity of *P. phosphoreum* is clearly illustrated in Fig. 2. According to the data presented in the figure, the lysate significantly suppresses the bioluminescence intensity of photobacteria by 4–5 times even at low concentrations. The concentration dependence of the lysate's effect on photobacteria luminescence has an exponential character and is well linearized when the concentration axis is logarithmically scaled (Fig. 2). This dependence is described by the equation

$I = 14.63 - 2.89 \ln[C]$. The model demonstrates the high biological activity of the lysate in

suppressing bioluminescence, which, according to theoretical calculations, can be detected at concentrations as low as 10^{-5} – 10^{-4} mg/ml.

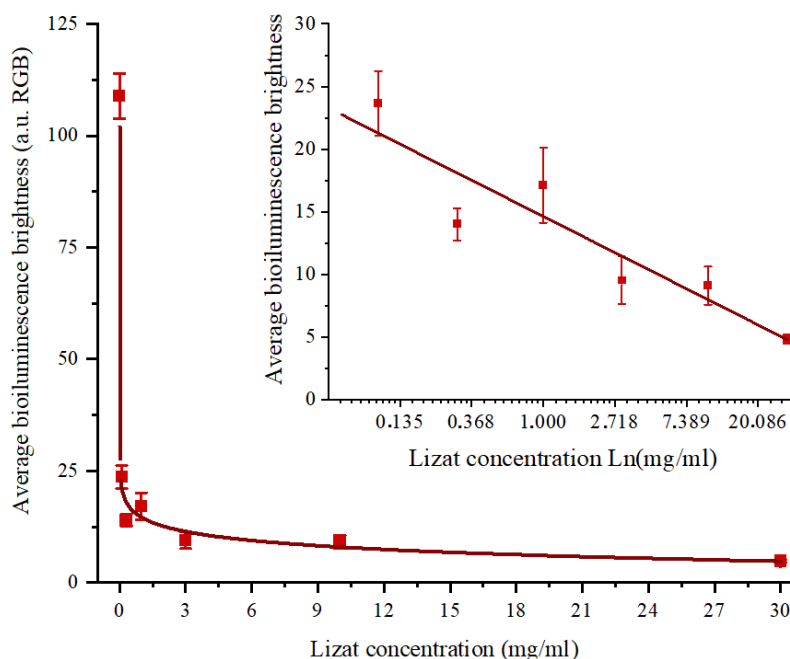


Fig. 2. Dependence of the average bioluminescence intensity of *P. phosphoreum* on the concentration of *L. rhamnosus* DV lysate during the peak luminescence phase of the control samples.

Notes: The solid line represents the logarithmic approximation of the concentration dependence. The inset graph shows the result of the logarithmic linearization of the concentration dependence.

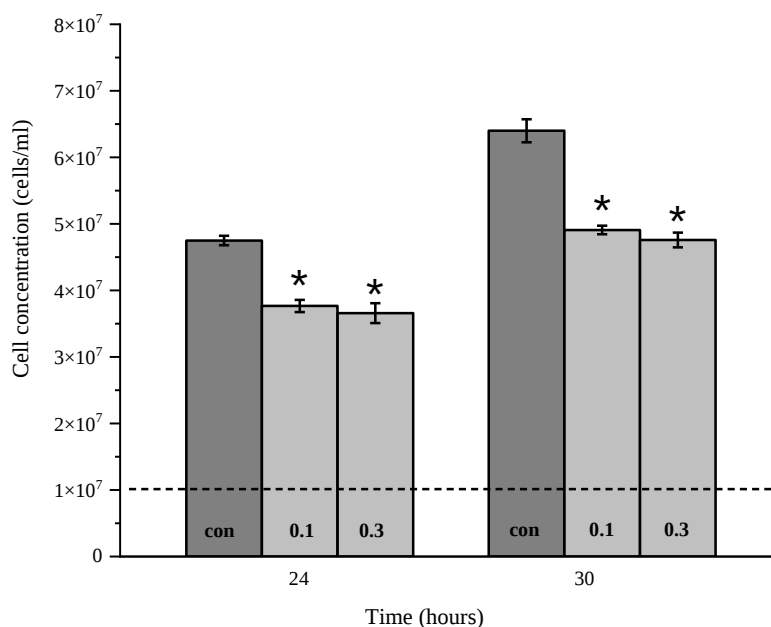


Fig. 3. Effect of *L. rhamnosus* DV bacterial lysate at concentrations of 0.1 and 0.3 mg/ml on the density of *P. phosphoreum* bacterial population after 24 and 30 hours of development.

Notes: con — контроль; * — $P < 0.01$ compared to control samples. The dashed line indicates the initial cell concentration level in bacterial suspensions for all samples. In samples with higher concentrations of lysate, it is not possible to measure cell concentration using optical methods based on light scattering due to the high turbidity of the lysate at these concentrations.

The high inhibitory activity of the lysate on the bioluminescence of *P. phosphoreum* raises questions regarding the underlying mechanism of this phenomenon and its impact on cell density. Is the reduction in bacterial bioluminescence intensity a result of inhibited population growth, or does the lysate interfere with metabolic pathways associated with the bacterial luciferase system?

Figure 3 presents the results of the study on the effect of *L. rhamnosus* DV lysate at concentrations of 0.1 and 0.3 mg/ml on the density of the *P. phosphoreum* bacterial population after 24 and 30 hours of development. The lysate at these low concentrations reduced bacterial density by approximately 25%, indicating a bacteriostatic effect through the suppression of not only metabolism but also bacterial reproduction. Nevertheless, the lysate suppressed bioluminescence intensity by 75–80%, suggesting that the bacterial luciferase system is highly susceptible to the lysate's inhibitory action, beyond its general bacteriostatic effect.

This sensitivity is likely related to the specific structural and functional organization of the bioluminescent system in photobacteria. Bacterial bioluminescence is mediated by a reaction catalyzed by luciferase (a flavin-dependent monooxygenase), which requires reduced flavin mononucleotide (FMNH₂), O₂, and a long-chain fatty aldehyde (RCHO). The reaction products are oxidized flavin mononucleotide (FMN), the corresponding fatty acid (RCOOH), H₂O, and visible light [13]. This process is controlled by the lux A, B, C, D, E operons. It was found that the structural genes lux A, B encode luciferase, and lux C, D, E encode aldehyde synthesis. This part of the complex is the same for all studied bacteria [14]. The role of luminescence in microbial physiology remains poorly understood. However, its involvement in aquatic organism protection, intercellular communication, and stress response mechanisms has been widely discussed in the literature [15, 16]. Thus, the bioluminescence of photobacteria is a highly energy-consuming process that sensitive to any changes in the energy supply to the cells. This process is inhibited under adverse conditions caused by various environmental stressors or toxic agents affecting this species. Based on this fact and literature data array, we assume the main factor causing the suppression of bioluminescence and reproduction of *P. phosphoreum* are bacteriocins together with other biologically active components contained in the lysate.

CONCLUSIONS

L. rhamnosus DV lysate causes a moderate decrease in the growth rate of *P. phosphoreum* while strongly suppressing its bioluminescence intensity in a dose-dependent manner. The effectiveness of the lysate follows an exponential pattern, suggesting threshold effects at concentrations as low as 10⁻⁶–10⁻⁴ mg/ml. These findings substantiate the feasibility of using bioluminescence assays to evaluate the antimicrobial potential of postbiotic preparations. Furthermore, they provide a foundation for novel applications of bioluminescent bacteria in medicine and biotechnology, specifically for developing standardized methods to assess the activity of biotechnological products against pathogenic and opportunistic microorganisms.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

Authors' ORCID ID

Victor Martyniuk  <https://orcid.org/0000-0002-5311-3565>

Yuliya Tseyslyer  <https://orcid.org/0000-0001-7689-9620>

Olena Gromozova  <https://www.orcid.org/0000-0002-5161-7727>

Igor Hretskyi  <https://www.orcid.org/0000-0001-8646-0574>

Yurii Penchuk  <https://www.orcid.org/0000-0001-5646-7003>

Liubov Shinkarenko Sichel  <https://orcid.org/0000-0002-1683-9703>

Tetyana Falaleeva  <https://orcid.org/0000-0002-4415-9676>

REFERENCES

1. Inchingolo F, Inchingolo A, Malcang G, De Leonardis N, Sardano S, Pezzolla C, et al. The benefits of probiotics on oral health: systematic review of the literature. *Pharmaceuticals*. 2023;16(9):1313. <https://doi.org/10.3390/ph16091313>
2. Ma L, Tu H, Chen T. Postbiotics in human health: a narrative review. *Nutrients*. 2023;15(2):291. <https://doi.org/10.3390/nu15020291>
3. Sharafi H, Divsalar E, Rezaei Z, Liu S-Q, Moradi M. The potential of postbiotics as a novel approach in food packaging and biopreservation: a systematic review of the latest developments. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2024;64(33):12524–54. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2253909>
4. Oberg TS, Steele JL, Ingham SC, Smeianov VV, Briczinski EP, Abdalla A, et al. Intrinsic and inducible resistance to hydrogen peroxide in *Bifidobacterium* species. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2011;38(12):1947–53. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-0983-y>
5. Cicienia A, Scirocco A, Carabotti M, Pallotta L, Marignani M, Severi C, et al. Postbiotic activities of lactobacilli-derived factors. *J Clin Gastroenterol*. 2014;48(1):18–22. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000231>
6. Thorakkattu P, Khanashyam AC, Shah K, Babu KS, Mundanat AS, Deliephan F, et al. Postbiotics: current trends in food and pharmaceutical industry. *Foods*. 2022;11(19):3094. <https://doi.org/10.3390/foods11193094>
7. Cuevas-González PF, Liceaga AM, Aguilar-Toalá JE. Postbiotics and paraprobiotics: from concepts to applications. *Food Res Int*. 2020;136:109502. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109502>
8. Sichel L, Timoshok N, Pidgorsky VS. Study of interferonogenous activity of the new probiotic formulation del-immune V®. *J Probiotics Heal*. 2013;1(1):1–6. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000107>
9. Penchuk Y, Savyska M, Kobylak N, Ostapchenko D, Kolodiy I, Onysenko S, et al. Antimicrobial activity of dietary supplements based on bacterial lysate of *Lactobacillus rhamnosus* DV. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13:1211952. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1211952>
10. Benítez-Chao DF, León-Buitimea A, Lerma-Escalera JA, Morones-Ramírez JR. Bacteriocins: an overview of antimicrobial, toxicity, and biosafety assessment by in vivo models. *Front Microbiol*. 2021;12:630695. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630695>
11. Steinberg SM, Poziomek EJ, Engelmann WH, Rogers KR. A review of environmental applications of bioluminescence measurements. *Chemosphere*. 1995;30(11):2155–97. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(95\)00087-O](https://doi.org/10.1016/0045-6535(95)00087-O)
12. Gromozova OM, Martynyuk VS, Artemenko OY, Hretskyi IO, Mulec J, Tseyslyer YV. Features of bioluminescence dynamics of *Photobacterium phosphoreum* IMV B-7071. *Mikrobiol Z*. 2024;86(4):3–18. <https://doi.org/10.15407/microbiolj86.04.003>
13. Zhang K, Liu M, Song X, Wang D. Application of luminescent bacteria bioassay in the detection of pollutants in soil. *Sustainability*. 2023;15(9):7351. <https://doi.org/10.3390/su15097351>
14. Brodl E, Winkler A, Macheroux P. Molecular mechanisms of bacterial bioluminescence. *Comput Struct Biotechnol J*. 2018;16:551–64. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.11.003>
15. Lee J. Perspectives on bioluminescence mechanisms. *Photochem Photobiol*. 2017;93(2):389–404. <https://doi.org/10.1111/php.12650>
16. Li Y, He X, Zhu W, Li H, Wang W. Bacterial bioluminescence assay for bioanalysis and bioimaging. *Anal Bioanal Chem*. 2022;414:75–83. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03695-9>

ВПЛИВ БАКТЕРІАЛЬНОГО ЛІЗАТУ *Lactobacillus rhamnosus* DV НА БІОЛЮМІНЕСЦЕНЦІЮ *Photobacterium phosphoreum*

Віктор Мартинюк^{1,*}, Юлія Цейслер¹, Олена Громозова², Ігор Грецький²,

Юрій Пенчук¹, Любов Шинкаренко Січел³, Тетяна Фалалєєва¹

¹ ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, місто Київ, 01601, Україна;

² Відділ фізіології промислових мікроорганізмів, Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного, вул. Академіка Заболотного, 154, 03143, Київ, Україна;

³ Stellar Biotics LLC, 22 Paris Ave Suite 209, Rockleigh, NJ 07647, United States

*e-mail: vittorio.martini.office@gmail.com

Надійшла до редакції 08 серпня 2025 р. Переглянута 04 лютого 2026 р.

Прийнята до друку 13 квітня 2026 р. Опублікована 25 червня 2026 р.

Актуальність: Нещодавні дослідження лізату *Lactobacillus rhamnosus* DV продемонстрували його антимікробну та фунгіцидну активність. Класичні мікробіологічні методи оцінки постбіотиків та метабіотиків є ресурсоємними та потребують нових швидких та чутливих тест-систем для оцінки їхніх антимікробних та протигрибкових властивостей.

Мета: Метою цієї роботи було вивчити вплив лізату *Lactobacillus rhamnosus* DV на інтенсивність біоломінесценції *Photobacterium phosphoreum* і продемонструвати потенційну можливість використання бактеріальної біоломінесценції для визначення бактеріостатичної активності постбіотичних препаратів.

Матеріали та методи: Досліджено клітинні лізати штаму молочнокислих бактерій *L. rhamnosus* DV, що входять до складу харчової добавки Del-Immune V® виробництва ТОВ «МірімуноФарм» (Україна) у співпраці зі Stellar Biotics, LLC (США). У цьому дослідженні використано культуру *P. phosphoreum* IMV B-7071. Вимірювання біоломінесценції проводили методом цифрової фотореєстрації. Біоломінесценцію аналізували за допомогою кросплатформного програмного забезпечення з відкритим кодом ImageJ (NIH) в одиницях яскравості в колірному просторі RGB.

Результати: Інтенсивність біоломінесценції спочатку зростала зі збільшенням щільності популяції протягом першого дня, а потім зменшувалась, незважаючи на подальше зростання щільності клітин у бактеріальних суспензіях. Додавання лізату значно пригнічувало біоломінесценцію, знижуючи її до фонового рівня упродовж 24 годин, причому ефект змінювався залежно від концентрації. Пік люмінесценції в контрольних зразках спостерігався через 18 годин, тоді як у зразках, оброблених лізатом, він зміщувався до 3–6 годин залежно від концентрації лізату.

Висновки: Лізат *Lactobacillus rhamnosus* DV викликає значне зниження швидкості росту *Photobacterium phosphoreum* та сильно пригнічує інтенсивність їхньої біоломінесценції, величина якої залежить від концентрації лізату. Цей факт підтверджує ідею використання бактеріальної люмінесценції як ефективного способу оцінки бактеріостатичної активності постбіотичних речовин проти патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: постбіотики; бактеріальний лізат; біоломінесценція; *Lactobacillus rhamnosus*; *Photobacterium phosphoreum*.

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-04>

УДК 615.24:577.112:612

РЕГУЛЯТОРНА ДІЯ СИНТЕТИЧНОГО НЕЙРОПЕПТИДА ОПОЇДНОЇ ДІЇ НА БІЛКОВИЙ ГОМЕОСТАЗ В УМОВАХ ХОЛОДОВОГО СТРЕСУ

Н. М. Моїсєєва , В. Г. Мирний , Ю. С. Ахатова , О. Л. Горіна 

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

e-mail: ukrainanataliy@gmail.com

Надійшла до редакції 28 серпня 2025 р. Переглянута 21 квітня 2026 р.

Прийнята до друку 29 квітня 2026 р. Опублікована 25 червня 2026 р.

Актуальність. Нейропептиди опіоїдної природи здатні регулювати метаболічні процеси через активацію специфічних опіоїдних рецепторів, особливо в умовах стресу. Однак механізми їх впливу на білковий обмін за умов хронічного холодового стресу (ХХС) залишаються малодослідженими. З огляду на важливість підтримання білкового гомеостазу в екстремальних умовах, дослідження ролі нейропептидів у корекції білкового профілю набуває практичного значення для створення нових підходів до фармакологічної адаптації.

Мета роботи: дослідити зміни показників білкового обміну в сироватці крові морських свинок під впливом ХХС, оцінити протекторну дію даларгіну та встановити роль опіоїдної системи в регуляції цих процесів.

Матеріали і методи. У дослідженні використовували морських свинок, яких утримували в умовах ХХС. Зміни білкового обміну оцінювали за вмістом загального білка, альбуміну та глобулінів у сироватці крові, застосовуючи стандартні біохімічні методики. У якості коригуючого засобу використовували синтетичний аналог лей-енкефаліну (даларгін), який вводили у дозі 100 мкг/кг підшкірно за 30 хв до моделювання ХХС.

Результати. У тварин, які зазнавали ХХС, спостерігалось статистично значуще зниження вмісту альбуміну і збільшення глобулінів відносно інтактних значень, що призводило до порушення альбумін-глобулінового коефіцієнта та свідчило про дисбаланс білкового метаболізму. Введення даларгіну сприяло нормалізації альбумін-глобулінового коефіцієнта шляхом відновлення вмісту глобулінів та альбуміну в крові піддослідних тварин, що свідчить про стабілізацію білкового гомеостазу і протекторну дію даларгіну в умовах ХХС. Крім того, введення даларгіну зменшувало накопичення маловисхідного діальдегіду (МДА) в умовах холодового стресу, демонструючи антиоксидантний та цитопротекторний ефект і забезпечуючи підтримку структурної та функціональної цілісності тканин.

Висновки. Результати дослідження свідчать, що даларгін є перспективним засобом для фармакологічної корекції метаболічних порушень, зумовлених ХХС, оскільки він зменшує накопичення МДА, демонструючи антиоксидантний та цитопротекторний ефект, та підкреслюють важливу роль опіоїдної нейропептидної системи в регуляції білкового обміну й підтримці структурної цілісності тканин за дії екстремальних факторів.

Як цитувати: Моїсєєва НМ, Мирний ВГ, Ахатова ЮС, Горіна ОЛ. Регуляторна дія синтетичного нейропептида опіоїдної дії на білковий гомеостаз в умовах холодового стресу. Біофізичний вісник. 2026;55:44–52. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-04>

Citation: Moisieieva NM, Myrnyi VH, Akhatova YS, Horina OL. Regulatory effect of a synthetic opioid neuropeptid on protein homeostasis under cold stress conditions. Biophysical Bulletin. 2026;55:44–52. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-04> (in Ukrainian)

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

КЛЮЧОВІ СЛОВА: кріобіологія; низькі температури; гіпотермія; холодова адаптація; даларгін; опіоїдні рецептори; білковий обмін; гомойтермні тварини, альбуміни; глобуліни; стрес.

Низькі температури навколишнього середовища є одним із найбільш потужних природних стресорів, здатних істотно модифікувати функціональний стан організму. Хронічний вплив холоду, як форма тривалого та мультифакторного стресу, ініціює каскад адаптаційно-компенсаторних реакцій, спрямованих на підтримання термогомеостазу, проте за умов пролонгованої дії може призводити до системних порушень гомеостазу. Зокрема, хронічний холодострес (ХХС) асоціюється з дисрегуляцією енергетичного метаболізму, ослабленням антиоксидантної системи та зниженням функціональної активності клітин [1–5]. Одним із найбільш чутливих до дії стресорів компонентів гомеостатичної регуляції є білковий обмін, що інтегрує функціональний стан печінки, імунної системи та нейроендокринної регуляції [6–8]. Дані попередніх досліджень [9–15] свідчать, що холодострес (ХС) суттєво порушує метаболізм білків, біохімічні показники крові, спричиняючи зниження функціональної активності гепатоцитів, розвиток білково-енергетичного дефіциту та активацію компенсаторних адаптаційних механізмів.

У зв'язку з цим постає потреба в пошуку ефективних засобів фармакологічної корекції зазначених порушень. Перспективними вважаються нейропептиди, здатні опосередковано регулювати метаболізм через вплив опіоїдної системи. Опіоїдна система є важливою ланкою ендогенних механізмів адаптації до стресу, зокрема бере участь у регуляції нейроендокринних і метаболічних процесів за дії низьких температур. Відомо, що опіоїдні пептиди залучені до формування адаптаційних реакцій у гібернуючих тварин, де вони модулюють обмін речовин і сприяють зниженню енергетичних витрат, що детальніше розглядається у наших попередніх роботах [4, 5]. Це дозволяє розглядати їх як універсальні регулятори відповіді на холодострес.

З огляду на це, як модельні сполуки доцільно використовувати синтетичні аналоги ендогенних опіоїдних пептидів. Одним із таких є даларгін — синтетичний аналог лей-енкефаліну, який проявляє антиоксидантні, протизапальні та антиапоптотичні ефекти, підтверджені в експериментальних моделях стресу [4, 5, 16]. Проте механізми його впливу на білковий обмін за умов ХХС залишаються недостатньо вивченими. Таким чином, дослідження впливу ХХС на показники білкового обміну, а також оцінка коригуючого потенціалу даларгіну, є актуальними як з точки зору фундаментальної фізіології адаптації, так і для розробки ефективних засобів фармакологічної корекції стрес-індукованих порушень обміну речовин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проведено на статевозрілих самцях морських свинок лінії Dunkin-Hartley віком 5–6 місяців із середньою вагою 600–800 г. Тварини утримувались у стандартних умовах віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Всі маніпуляції з тваринами проводились відповідно до правил і рекомендацій European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes/Council of Europe (Strasbourg, 1986) та Комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (протокол № 5 від 22.11.2022 р.).

Моделювання ХХС здійснювали за методикою [15], адаптованою до умов лабораторії шляхом модифікації температурного режиму, що забезпечило відтворюваність стресової відповіді при збереженні етичних стандартів утримання тварин, яких по черзі утримували при температурі 18 та 4°C спочатку упродовж однієї години, а потім упродовж 5 діб — 12 годин при температурі 4°C і 12 годин при 18°C. Стресове навантаження припиняли на 6-й день і проводили забір крові шляхом пункції

яремної вени. Температура тіла морських свинок після індукції гіпотермії вимірювалась ректально за допомогою електронного термометра, при цьому температура знижувалась на 1–3°C від початкових 38°C.

Тварини були поділені на три групи: 1) інтактна група (тварини, яких не піддавали дії ХХС і утримували при температурі 18°C); 2) контрольна група (тварини, яким вводили 0,5 мл фізіологічного розчину під шкіру за 30 хв до моделювання ХХС); 3) група тварин, яким вводили синтетичний аналог лей-енкефаліну тирозин-2-аланіл-гліцин-фенілаланіл-лейцил-аргініну діацетат («Даларгін», ООО «ФАРМСИНТЕЗ», Україна) у дозі 100 мкг/кг під шкіру за 30 хв до моделювання ХХС. Кількісний склад кожної експериментальної групи становив 12 тварин.

Для оцінки впливу ХХС і даларгіну на білковий обмін у сироватці крові морських свинок визначали концентрацію загального білка, альбуміну та глобулінів. Концентрацію загального білка в сироватці крові визначали біуретовим методом при довжині хвилі 540 нм, а альбуміну — бромкрезолзеленим методом при 630 нм [17]. Концентрацію глобулінів розраховували як різницю між загальним білком і альбуміном; співвідношення альбумін/глобулін (А/Г-коефіцієнт) визначали шляхом ділення концентрації альбуміну на концентрацію глобулінів. Аналіз проводили з використанням стандартних наборів «ТР-Арсенал» і «Alb-Арсенал» (ТОВ НВКП «Філісіт-Діагностика», Україна) згідно з інструкціями виробника. Результати виражали в г/л.

Вміст малонового діальдегіду (МДА) у сироватці крові морських свинок визначали спектрофотометрично методом ТВА-реактивних продуктів з вимірюванням оптичної густини при 532 нм після реакції МДА з 2-тіобарбітуровою кислотою, що є стандартною методикою для оцінки продуктів ліпідної пероксидації в біологічних зразках [16].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програми «Statgraphics plus for Windows 2.1» («Manugistics Inc.», США) за непараметричним критерієм Краскела–Уолліса з наступним post-hoc аналізом із використанням критерію Манна–Уїтні з поправкою Бонфероні [18]. Експериментальні дані наведені як медіана, перший та третій квартиль [Me (Q1; Q3)]. Відмінності вважали значущими при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

З результатів представлених в табл. 1 видно, що під впливом ХХС рівень загального білка не змінювався відносно показників інтактної групи. Водночас спостерігалось зниження концентрації альбуміну на 37,5% порівняно з інтактною групою, що може вказувати на пригнічення його синтезу або підвищене використання в умовах стресу. При цьому вміст глобулінів збільшився на 78,6% відносно інтактних значень. Зменшення альбумінової і збільшення глобулінової фракцій призвело до дисбалансу білкового співвідношення в крові, що підтверджується статистично значущим зниженням А/Г-коефіцієнта та свідчить про зміщення білкового обміну в бік глобулінової фракції (табл. 1).

Основні зміни, що відбувались після введення даларгіну за умов ХХС, були пов'язані з відновленням вмісту альбуміну до інтактних значень (табл. 1) і статистично значущим зменшенням концентрації глобулінів на 54,7 % порівняно з групою ХХС та на 19,0% порівняно з інтактними тваринами. Крім того спостерігалось зростання А/Г-коефіцієнта вище рівня, характерного для інтактних тварин (табл. 1). Тобто, після введення даларгіну спостерігалась нормалізація вмісту альбуміну і глобулінів, що свідчить про стабілізацію білоксинтезуючої функції печінки та підтримку загального метаболічного статусу організму.

Таблиця 1. Показники білкового обміну в крові гомойотермних тварин, підданих хронічному холодовому стресу (ХХС) на фоні введення даларгіна, n=12

Table 1. Indicators of protein metabolism in the blood of homeothermic animals subjected to chronic cold stress (CCS) and dalargin administration, n=12

Група	Загальний білок, г/л	Альбумін, г/л	Глобулін, г/л	А/Г- коефіцієнт	МДА нмоль/мл
Інтакт	57,0 (56,3; 57,8)	36,0 (34,5; 36,0)	21 (20,3; 23,0)	1,7 (1,6; 1,82)	4,4 (4,2; 4,5)
ХХС	60,0 (59,3; 60,8)	22,5 (17,6; 27,2) [#]	37,5 (32,4; 37,8)	0,6 (0,60; 0,82) [#]	7,3 (7,0; 7,5)
ХХС +даларгін	47,0 (45,3; 48,4) ^{#,**}	30,0 (29,3; 30,8) ^{**}	17 (16,6; 25,8) ^{#,**}	1,8 (1,19; 1,25) ^{**}	4,8 (4,72; 4,81)

— відмінності статистично значимі (p<0,05) порівняно з інтактною групою; ** — відмінності статистично значимі (p<0,05) порівняно з ХХС.

— statistically significant differences (p<0.05) compared with the intact group; ** — statistically significant differences (p<0.05) compared with CCS.

За умов ХХС зниження температури середовища призводить до активації перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), що проявляється підвищенням концентрації МДА — одного з ключових біохімічних маркерів оксидативного стресу, який відображає надлишкову продукцію реактивних форм кисню та ліпідні ушкодження мембранних структур [19]. Продукти ПОЛ, включно з МДА, можуть взаємодіяти із білками плазми та індукувати їх окиснювальну модифікацію, що призводить до зміни їх структури та порушення функціональної активності [19, 20]. Посилення оксидативно-антиоксидантного дисбалансу та підвищення рівня продуктів ПОЛ корелюють із порушенням антиоксидантних механізмів і біохімічною модифікацією білків, що беруть участь у підтриманні гомеостазу, і узгоджується із сучасними даними щодо механізмів ушкодження білків і ліпідів за умов оксидативного навантаження [21].

У наших дослідженнях в умовах ХХС вміст МДА в крові морських свинок значуще збільшувався на 66% відносно інтактних значень, що відображає активацію ПОЛ та розвиток оксидативного стресу. Як вже було сказано вище, зниження температури навколишнього середовища супроводжується зростанням енергетичних потреб організму, активацією мітохондріального дихання та посиленням утворенням реактивних форм кисню. Унаслідок цього інтенсифікуються вільнорадикальні процеси, що призводить до накопичення в крові вторинних продуктів ліпідної пероксидації, зокрема МДА. Введення даларгіну піддослідним тваринам до моделювання ХХС запобігало таким змінам і сприяло нормалізації вмісту МДА (табл. 1).

Узагальнюючи результати дослідження можна стверджувати, що ХХС зумовлює порушення білкового гомеостазу, які проявляються не стільки зміною загального вмісту білка, скільки розвитком дисбалансу між його основними фракціями. В умовах ХХС спостерігалось статистично значуще зниження концентрації альбуміну та А/Г-коефіцієнта, що є характерним для типових реакцій організму на переохолодження, таких як метаболічний стрес та латентне запалення. Оскільки альбумін продукується виключно гепатоцитами, такі зміни розглядаються як маркери функціонального напруження та зниження білоксинтезуючої функції печінки [22]. При цьому підвищення вмісту глобулінів відображає активацію гуморальної ланки імунної відповіді, зростання фракції імуноглобулінів та інших білків гострої фази [22]. Таким чином, знижений А/Г-коефіцієнт (<1,0) свідчить про розвиток субклінічного запального процесу та порушення

білоксинтетичної здатності печінки, що в комплексі є раннім індикатором її функціональної недостатності навіть за відсутності виражених клінічних симптомів [23].

Застосування даларгіну в умовах ХХС продемонструвало його виражену протекторну дію. Після введення препарату спостерігалась нормалізація вмісту альбуміну і глобулінів у сироватці крові тварин, що сприяло зміщенню А/Г-коефіцієнта в бік фізіологічної норми. Такий результат свідчить про те, що введення даларгіну перед моделюванням ХХС сприяє стабілізації білкового гомеостазу.

Отримані результати узгоджуються з літературними даними щодо участі опіоїдів у гепатопротекторних механізмах, а також із уявленнями про їх мультифункціональну дію, включаючи антиоксидантну, протизапальну та антиапоптотичну активність [4, 5, 24, 25]. У нашій попередній роботі [26] було показано, що ХХС у морських свинок призводить до порушення азотистого обміну, що проявлялось підвищенням рівня сечовини та зниженням вмісту креатиніну в сироватці крові. Такі зміни можуть відображати активацію катаболізму білкових структур. Введення даларгіну призводить до статистично значущого зниження рівня сечовини, що свідчить про його метаболічно-протекторну дію, спрямовану на обмеження білкового катаболізму. Водночас вміст креатиніну залишається незмінним, що вказує на селективний характер корекції азотистого метаболізму в умовах ХС. У дослідженнях [27–30] показано, що енкефаліни та інші опіоїди здатні знижувати продукцію прозапальних цитокінів, стабілізувати функцію мітохондрій і зменшувати рівень пероксидного ушкодження клітин в умовах запальних процесів різного генезу. Зазначені ефекти реалізуються за участю опіоїдних рецепторів [31], що узгоджується з даними щодо даларгіну, який проявляє свої фармакологічні ефекти переважно через ці рецепторні механізми. Це підтверджено в попередніх дослідженнях із використанням інгібітора опіоїдних рецепторів налоксону [4, 5]. Однак зазначені дослідження проводилися в умовах гострого холодового стресу та були спрямовані на оцінку інших показників, зокрема функціональної активності клітин. У зв'язку з цим постає питання щодо механізмів протекторної дії даларгіну саме за умов ХХС та формування його антистресових і гепатотропних ефектів, які можуть реалізовуватись як на рівні гепатоцитів, так і бути опосередкованими взаємодією опіоїдної системи з гіпоталамо-гіпофізарно-адреналовою віссю. Відомо, що за умов тривалого ХС активність ендогенної опіоїдної системи змінюється як у центральній нервовій системі, так і в периферичних тканинах, що суттєво впливає на адаптаційні реакції організму до дії стресового чинника. Експериментальні дані в роботі [33] свідчать про те, що охолодження модулює рівні різних опіоїдних пептидів, зокрема β -ендорфіну, енкефалінів та дінофорфінів, у структурах мозку та периферичних тканинах, що має важливе значення для координації нейроендокринної та метаболічної відповіді за умов хронічного впливу холоду. Разом з тим опіоїдні пептиди реалізують свої ефекти через взаємодію з опіоїдними рецепторами, модулюючи внутрішньоклітинні сигнальні каскади, пов'язані з енергетичним метаболізмом та стрес-реакцією, у тому числі шляхом регуляції гормональних механізмів та окисно-відновного статусу [32]. Реалізація цих механізмів забезпечує вплив опіоїдної системи на синтез і стабілізацію білків, сприяючи підтриманню білкового гомеостазу в умовах тривалого ХС [33]. У попередній нашій роботі [34] було показано, що застосування даларгіну перед моделюванням ХХС сприяло зниженню концентрації лептину до рівня, характерного для інтактних тварин, тоді як вміст кортизолу залишався незмінним як за умов ХХС, так і після введення даларгіну. Враховуючи вищесказане, можна припустити, що даларгін впливає на гіпоталамічні механізми або периферичні сигнальні шляхи, регульовані гіпоталамусом (зокрема ті, що забезпечують енергетичний метаболізм), однак не чинить суттєвого впливу на класичну гіпоталамо-гіпофізарно-адреналову вісь, ефекти якої реалізуються через дію кортизолу.

Це узгоджується з даними про те, що нейропептиди здійснюють свої ефекти як через центральні нейроендокринні механізми регуляції, так і шляхом безпосереднього впливу на периферичні тканини. При цьому зміни центральних регуляторних процесів не обов'язково супроводжуються активацією класичної гіпоталамо-гіпофізарно-адреналової осі: рівень кортизолу може залишатися відносно стабільним, тоді як вміст інших гормонів, зокрема лептину, істотно змінюється. Це свідчить про формування локальної нейроендокринної адаптації та селективну модифікацію механізмів реалізації стрес-відповіді [35, 36]. Водночас в окремих дослідженнях показано, що опіоїдні пептиди можуть стабілізувати стрес-ушкоджені білки, зменшуючи ризик їх агрегації та катаболічних втрат [37]. Поєднання прямої клітинної дії та опосередкованих ендокринних ефектів забезпечує антистресовий і гепатопротекторний потенціал нейропептидів, що обґрунтовує перспективність їх застосування в умовах холодового стресу.

ВИСНОВКИ

1. Хронічний холодовий стрес призводить до істотних порушень білкового обміну, що проявляються зниженням концентрації альбуміну на 35%, співвідношення А/Г-коефіцієнта на 66,7% та зростанням вмісту глобулінів на 76,8% відносно інтактної групи, що свідчить про зміщення білкового обміну в бік глобулінової фракції.

2. Введення даларгіну в умовах ХХС сприяє стабілізації білкового гомеостазу: зменшенню концентрації глобулінів на 54,7 % порівняно з групою ХХС, на 19,0% порівняно з інтактними тваринами та нормалізації вмісту альбуміну і А/Г-коефіцієнта.

3. Встановлено, що в умовах ХХС вміст МДА в крові морських свинок достовірно збільшувався на 66% відносно інтактних значень та на 52,1% порівняно з групою введення препарату. Введення даларгіну піддослідним тваринам в умовах ХХС сприяло нормалізації рівня МДА.

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

Authors' ORCID ID

Наталія Моїсєєва:  <https://orcid.org/0000-0002-9845-2317>

Владислав Мирний:  <https://orcid.org/0009-0001-2393-2295>

Юлія Ахатова:  <https://orcid.org/0000-0002-1536-6924>

Ольга Горіна:  <https://orcid.org/0000-0003-4075-650X>

REFERENCES

1. Gao R, Shi L, Guo W, Xu Y, Jin X, Yan S, et al. Effects of housing and management systems on the growth, immunity, antioxidation, and related physiological and biochemical indicators of donkeys in cold weather. *Animals*. 2022;12(18):2405. <https://doi.org/10.3390/ani12182405>
2. Gao Y, Liu Y, He J, Zhang Y, Wang T, Wu L, et al. Effects of heat waves and cold spells on blood parameters: a cohort study of blood donors in Tianjin, China. *Environ Health Prev Med*. 2024;29:25. <https://doi.org/10.1265/ehpm.24-00023>
3. Saeki K, Obayashi K, Kurumatani N. Platelet count and indoor cold exposure among elderly people: A cross-sectional analysis of the HEIJO-KYO study. *J Epidemiol*. 2017;27(12):562–7. <https://doi.org/10.1016/j.je.2016.12.018>
4. Moisieieva N, Gulevskyy O, Gorina O. Effect of leu-enkephalin (dalargin) on apoptosis and necrosis of leukocytes after cold stress. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2022;32(1):14–23. <https://doi.org/10.15407/cryo32.01.014>
5. Gulevskyy OK, Moisieieva NM, Gorina OL, Sidorenko OS. Preincubation of L929 line fibroblasts with synthetic leu-enkephalin TYR-D-ALA-GLY-PHE-LEU-ARG preserves their proliferative potential under cold stress. *Cytol Genet*. 2022;56:343–50. <https://doi.org/10.3103/S0095452722040053>

6. Tomé D, Benoit S, Azzout-Marniche D. Protein metabolism and related body function: mechanistic approaches and health consequences. *Proc Nutr Soc.* 2021;80(2):243–51. <https://doi.org/10.1017/S0029665120007880>
7. Liu Y, Liu P, Hu Y, Cao Y, Lu J, Yang Y, et al. Cold-induced RNA-binding protein promotes glucose metabolism and reduces apoptosis by increasing AKT phosphorylation in mouse skeletal muscle under acute cold exposure. *Front Mol Biosci.* 2021;8:685993. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.685993>
8. Kovaničová Z, Karhánek M, Kurdiová T, Baláž M, Wolfrum C, Ukropcová B, et al. Metabolomic analysis reveals changes in plasma metabolites in response to acute cold stress and their relationships to metabolic health in cold-acclimatized humans. *Metabolites.* 2021;11(9):619. <https://doi.org/10.3390/metabo11090619>
9. Manfredi LH, Zanon NM, Garófalo MA, Navegantes LC, Kettelhut IC. Effect of short-term cold exposure on skeletal muscle protein breakdown in rats. *J Appl Physiol.* 2013;115(10):1496–505. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00474.2013>
10. Zhang X, Xiao J, Jiang M, Phillips CJC, Shi B. Thermogenesis and energy metabolism in brown adipose tissue in animals experiencing cold stress. *Int J Mol Sci.* 2025;26(7):3233. <https://doi.org/10.3390/ijms26073233>
11. Shi H, Yao R, Lian S, Liu P, Liu Y, Yang YY, et al. Regulating glycolysis, the TLR4 signal pathway and expression of RBM3 in mouse liver in response to acute cold exposure. *Stress.* 2019;22(3):366–76. <https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1568987>
12. Teleglow A, Romanovski V, Skowron B, Mucha D, Tota Ł, Rosińczuk J, et al. The effect of extreme cold on complete blood count and biochemical indicators: a case study. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;19(1):424. <https://doi.org/10.3390/ijerph19010424>
13. Liu Y, Xue N, Zhang B, Lv H, Li S. Cold stress induced liver injury of mice through activated NLRP3/Caspase-1/GSDMD pyroptosis signaling pathway. *Biomolecules.* 2022;12(7):927. <https://doi.org/10.3390/biom12070927>
14. Indo HP, Yen HC, Nakanishi I, Matsumoto K, Tamura M, Nagano Y, et al. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J Clin Biochem Nutr.* 2015;56:1–7. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.14-42>
15. Kempermann G, Song H, Gage FH. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7:a018812. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018812>
16. Aguilar Diaz De Leon J, Borges CR. Evaluation of oxidative stress in biological samples using the thiobarbituric acid reactive substances assay. *J Vis Exp.* 2020;159:e61122. <https://doi.org/10.3791/61122>
17. Owolabi MA, Abass MM, Emeka PM, Jaja SI, Nnoli M, Dosa BO. Biochemical and histologic changes in rats after prolonged administration of the crude aqueous extract of the leaves of *Vitex grandifolia*. *Pharmacognosy Res.* 2010;2(5):273–8. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.72322>
18. Kim N, Fischer AH, Dyring-Andersen B, Rosner B, Okoye GA. Research techniques mode simple: choosing appropriate statistical methods for clinical research. *J Invest Dermatol.* 2017;137(10):e173–e178. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.08.007>
19. Zhao FQ, Zhang ZW, Qu JP, Yao HD, Li M, Li S, et al. Cold stress induces antioxidants and Hsps in chicken immune organs. *Cell Stress Chaperones.* 2014;19(5):635–48. <https://doi.org/10.1007/s12192-013-0489-9>
20. Rittié L, Monboisse JC, Gorisse MC, Gillery P. Malondialdehyde binding to proteins dramatically alters fibroblast functions. *J Cell Physiol.* 2002;191(2):227–36. <https://doi.org/10.1002/jcp.10093>
21. Korewo-Labelle D, Karnia MJ, Myślińska D, Kaczor JJ. Impact of chronic cold water immersion and vitamin D3 supplementation on the hippocampal metabolism and oxidative stress in rats. *Cells.* 2025;14(9):641. <https://doi.org/10.3390/cells14090641>
22. Shcheniavskiy II. Cardioprotective effect of enkephalins under immobilization stress. *Biotechnol Acta.* 2022;15(1):52–60. <https://doi.org/10.15407/biotech15.01.052>
23. Zhang J, Wang T, Fang Y, Wang M, Liu W, Zhao J, et al. Clinical significance of serum albumin/globulin ratio in patients with pyogenic liver abscess. *Front Surg.* 2021;8:677799. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2021.677799>
24. Martinić R, Sošić H, Turčić P, Konjevoda P, Fučić A, Stojković R, et al. Hepatoprotective effects of Met-enkephalin on acetaminophen-induced liver lesions in male CBA mice. *Molecules.* 2014;19(8):11833–45. <https://doi.org/10.3390/molecules190811833>
25. Duque-Díaz E, Alvarez-Ojeda O, Coveñas R. Enkephalins and ACTH in the mammalian nervous system. *Vitam Horm.* 2019;111:147–93. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.05.001>
26. Myrnyi VH, Moisieieva NM. Modulation of nitrogen metabolism under chronic cold stress in guinea pigs: the role of dalargin and naloxone in mediating a protective effect. *Bulletin of Problems Biology and Medicine.* 2025;3(178):122–8. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2025-3-178-122-128>
27. Stein C, Machelska H, Binder W, Schäfer M. Peripheral opioid analgesia. *Curr Opin Pharmacol.* 2001;1(1):62–5. [https://doi.org/10.1016/s1471-4892\(01\)00005-4](https://doi.org/10.1016/s1471-4892(01)00005-4)
28. Owczarek D, Cibor D, Mach T, Cieśla A, Pierzchała-Koziec K, Sałapa K, et al. Met-enkephalins in patients with inflammatory bowel diseases. *Adv Med Sci.* 2011;56(2):158–64. <https://doi.org/10.2478/v10039-011-0051-x>

29. Wilenska B, Tymecka D, Włodarczyk M, Sobolewska-Włodarczyk A, Wiśniewska-Jarosińska M, Dyniewicz J, et al. Enkephalin degradation in serum of patients with inflammatory bowel diseases. *Pharmacol Rep.* 2019;71(1):42–7. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.08.001>
30. Luo P, Li X, Gao Y, Chen Z, Zhang Q, Wang Z, et al. Central administration of human opiorphin alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice through activation of the endogenous opioid system. *Front Pharmacol.* 2022;13:904926. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.904926>
31. Moisieieva N, Gorina O, Akhatova Yu. Effect of dalargin on apoptosis of L929 fibroblasts during cold stress. *CryoLetters.* 2023;44(6):352–9. <https://doi.org/10.54680/fr23610110212>
32. Mann A, Liebetrau S, Klima M, Dasgupta P, Massotte D, Schulz S. Agonist-induced phosphorylation bar code and differential post-activation signaling of the delta opioid receptor revealed by phosphosite-specific antibodies. *Sci Rep.* 2020;10(1):8585. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65589-7>
33. Palkovits M, Baffi JS, Pacak K. Changes in central and peripheral opioid peptide systems during cold stress. *Neuroendocrinology.* 1988;48(5):514–21.
34. Myrnyi V, Akhatova Y, Gorina O, Moisieieva N. Correction of hormonal disorders induced by chronic cold stress using synthetic neuropeptide. In: Collection of Scientific Papers «ΛΟΓΟΣ» [Internet]; 2024 May 24; Zurich, Switzerland; p. 121–3. Available from: <https://doi.org/10.36074/logos-24.05.2024.027>
35. Friedman JM. Leptin and the endocrine control of energy balance. *Nat Metab.* 2019;1(8):754–64. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0095-y>
36. Holmes D. Leptin attenuates HPA-axis activation and stress responses. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11:255. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.34>
37. Yoshikawa M. Bioactive peptides derived from natural proteins with respect to diversity of their receptors and physiological effects. *Peptides.* 2015;72:208–25. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.013>

REGULATORY EFFECT OF A SYNTHETIC OPIOID NEUROPEPTID ON PROTEIN HOMEOSTASIS UNDER COLD STRESS CONDITIONS

N. M. Moisieieva , V. H. Myrnyi , Y. S. Akhatova , O. L. Horina 

Institute of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Pereyaslavska st, 61016, Kharkiv, Ukraine

e-mail: ukrainanataliy@gmail.com

Submitted August 28, 2025; Revised April 21, 2026;

Accepted April 29, 2026; Published June 25, 2026

Background: Opioid neuropeptides are capable of regulating metabolic processes through the activation of specific opioid receptors, particularly under stress conditions. However, the mechanisms of their impact on protein metabolism under chronic cold stress (CCS) remain insufficiently studied. Given the importance of maintaining protein homeostasis under extreme conditions, investigating the role of neuropeptides in correcting protein profiles is of practical significance for developing new approaches to pharmacological adaptation.

Objective: To investigate changes in protein metabolism in the serum of guinea pigs under chronic cold stress, assess the protective effects of dalargin, and determine the role of the opioid system in regulating these processes.

Materials and Methods: The study involved guinea pigs exposed to CCS conditions. Changes in protein metabolism were assessed by measuring total protein, albumin, and globulins in the serum using standard biochemical methods. A synthetic leu-enkephalin analog (dalargin) was used as a corrective agent and administered subcutaneously at a dose of 100 µg/kg 30 min before CCS induction.

Results. In animals exposed to CCS, a statistically significant decrease in albumin levels and an increase in globulin levels were observed compared with intact values, which led to a disruption of the albumin–globulin ratio and indicated an imbalance in protein metabolism. Administration of dalargin contributed to normalization of the albumin–globulin ratio by restoring globulin and albumin levels in the blood of experimental animals, indicating stabilization of protein homeostasis and a protective effect of dalargin under conditions of CCS.

In addition, administration of dalargin reduced the accumulation of malondialdehyde (MDA) under conditions of cold stress, demonstrating antioxidant and cytoprotective effects and ensuring the maintenance of structural and functional integrity of tissues.

Conclusions. The study results suggest that dalargin is a promising agent for the pharmacological correction of metabolic disturbances induced by chronic cold stress, as it reduces MDA accumulation, exhibiting antioxidant and cytoprotective effects, and highlight the important role of the opioid

neuropeptide system in the regulation of protein metabolism and maintenance of tissue structural integrity under extreme environmental conditions.

KEY WORDS: cryobiology; low temperatures; hypothermia; cold adaptation; dalargin; opioid receptors; protein metabolism; homeothermic animals, albumins; globulins; stress.

MATERIALS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-05>

UDC: 57.088.6:544.77:615.015.4

CDTE QUANTUM DOTS–ALBUMIN BIONANOCOMPLEX: GENOTOXIC POTENTIAL AND BIOIMAGING APPLICATION IN A *DROSOPHILA MELANOGASTER* MODEL**N. Ia. Holub^{1,*}, H. M. Klepach², O. G. Stasyk¹, I. D. Stolyarchuk²,
O. V. Kuzyk², V. O. Los¹, A. I. Stolyarchuk²**¹ Ivan Franko National University of Lviv, Hrushevskyy St., 4, Lviv, 79005, Ukraine;² Drohobych Ivan Franko State Pedagogical University, Ivan Franko St., 24, Drohobych, 82100, Ukraine*Corresponding author: nataliia.holub@lnu.edu.ua

Submitted September 09, 2025; Revised February 15, 2026

Accepted March 16, 2026; Published June 25, 2026

Background: Research on semiconductor nanocrystals, known as quantum dots (QDs), and their applications in biomedical research, bioimaging, and diagnostics is evolving rapidly. Although CdTe QDs exhibit remarkable optical properties, their practical application is limited by their toxicity. As a result, research is ongoing to reduce the toxicity of QDs by coating them with inert shells or by forming complexes with biomolecules.

Objectives: Therefore, the aim of our study was to evaluate the genotoxic potential of the bionanocomplex of CdTe QDs with human serum albumin (HSA) as a safe and promising tool for fluorescence bioimaging *in vivo*, using *D. melanogaster* as a model.

Materials and Methods: CdTe QDs were obtained by chemical colloidal method in the aqueous phase and conjugated with HSA to create CdTe QDs-HSA bionanocomplex. The toxicity and genotoxicity of the QDs were evaluated in relevant tests on the *D. melanogaster Oregon R* strain. To visualize of QDs a fluorescence microscopy was applied. The data were subjected to statistical analysis, with differences deemed significant at $p < 0.05$.

Results and Discussions: It was established that bionanocomplexes, similar to CdTe QDs, penetrated the germline cells, and were transferred to the eggs and larvae, as confirmed by histological preparations. In the muscles of the imago, rare CdTe QDs and their HSA conjugates were detected. The tested QDs types did not cause toxicity in adults after a 3-day exposure period, nor did they decrease their reproductive capacity or cause a genotoxic effect in the DLM test at the embryonic stage. Upon larval feeding, both types of QDs exhibited a teratogenic effect. Unlike CdTe QDs, the bionanocomplex induced phenotypic anomalies in imagos at a significantly lower frequency (2.3 times) and did not cause a reduction in their eclosion compared to the control group ($p > 0.05$).

Conclusion: It was demonstrated that neither HSA-CdTe QDs nor CdTe QDs exhibit genotoxic effects at the embryonic stage. In contrast to CdTe QDs, the bionanocomplex does not cause reproductive toxicity, has significantly lower teratogenic effect, and a toxic impact on the post-embryonic developmental stages. These advantages suggest that HSA-CdTe QDs can be regarded as a relatively safe and promising tool for fluorescence bioimaging *in vitro* and *in vivo* applications in model organisms. However, their use *in vivo* in humans is not recommended.

KEY WORDS: HSA-CdTe QDs; bionanocomplex; CdTe QDs; *Drosophila melanogaster*; toxicity; genotoxicity; fluorescent bioimaging.

Citation: Holub NIa, Klepach HM, Stasyk OG, Stolyarchuk ID, Kuzyk OV, Los VO, Stolyarchuk AI. CDTE quantum dots–albumin bionanocomplex: genotoxic potential and bioimaging application in a *Drosophila melanogaster* model. Biophysical Bulletin. 2026;55:53–64. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-05>

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

Cadmium telluride (CdTe) semiconductor quantum dots (QDs) are recognized for their unique electronic and optical properties as well as their small size (2–8 nm). They exhibit prolonged and intense fluorescence, excellent photostability, resistance to photobleaching, and suitability for biofunctionalization [1]. These characteristics lead to their widespread application in biological and biomedical research, diagnostics [2, 3] and chemical sensing [4]. Specifically, CdTe QDs have been successfully applied for fluorescence imaging of biological objects [5], targeted tumor imaging [6], long-term bioimaging of cellular processes, biosensing, multiplexed imaging [7] and detection [8], preventive oncology [9]. As nanoparticles, CdTe QDs readily penetrate cells, their nuclei and accumulate within them. They can bind to cellular macromolecules such as proteins and nucleic acids and modify their functions leading to cytotoxic and genotoxic effects at the subcellular, cellular and organismal levels [10, 11]. Specifically, in BALB/c mouse models CdTe QDs induced toxicity and apoptosis of liver cells, spleen damage, and systemic effects [12]. They are also cytotoxic towards mouse endothelial cells, erythrocytes, human and rat T- and B-lymphocytes as well as human colon cancer cells (*Colo 205*) and breast cancer cells (MCF-7) [11]. Furthermore, CdTe QDs induce cellular and organismal toxicity in *D. melanogaster* significantly affecting its survival, development and reproduction [10]. Researchers explain the toxic effects of CdTe QDs to the ability of cadmium ions to slowly release from the complex after entering cells, which initiates the formation of reactive oxygen species (ROS). ROS, in turn, trigger a cascade of biochemical and cellular processes, leading to significant morpho-functional changes and, often, to the death of cells and the entire organism [12, 10]. Given these concerns, research actively continues on developing alternative synthesis methods for CdTe QDs, improving their biocompatibility, and reducing their toxicity by coating them with inert shells or conjugating them with biocompatible polymers [1, 3, 11]. Among promising approaches to reduce CdTe QD toxicity, the preparation of their complex with human serum albumin (HSA) stands out as a biocompatible polymer and protective agent. The literature reports data on the physicochemical and optical properties of the HSA-CdTe biocomplex [13, 14], as well as on the binding strength of CdTe quantum dots to albumin, which depends on the stabilizer used [15]. Human serum albumin forms a protein corona around CdTe quantum dots without altering the protein's native structure, which indicates the biocompatibility of the complex, while slowing complex degradation, limiting Cd²⁺ ion release, and reducing toxicity through decreased levels of reactive oxygen species [15–19]. So, a study [16] demonstrated low toxicity, as well as high stability and prolonged fluorescence, when using this bionanocomplex as a probe for osteosarcoma cell bioimaging. In another study [20] biogenic HSA-CdTe QDs have shown antibacterial activity against both Gram-negative strains (*E. coli*) and Gram-positive strains (*E. faecalis*), as well as pronounced cytotoxic effects against human HeLa cells. Therefore, the aim of our study is to determine the genotoxic potential of the HSA-CdTe QDs bionanocomplex as a potentially safe tool for fluorescence bioimaging, using *D. melanogaster* as a model system. The research also focused on the capability CdTe QDs and HSA-CdTe QDs to penetrate into germline cells and their transmission across subsequent developmental stages.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of CdTe quantum dots

Nanoparticles of CdTe were obtained in aqueous solution at room temperature following the procedure described in [13, 21]. As a result, a colloidal solution of CdTe QDs at a concentration of $1.5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ was obtained and stored in a vacuum desiccator at room temperature and in the dark.

Preparation of HSA–CdTe QDs bionanocomplex

A colloidal solution of CdTe QDs in defined amount was mixed with a prepared solution of $3.0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ human serum albumin (HSA, PJSC Biofarma, Ukraine) in a 1:1 ratio and stirred for 2 min using the LD-265U ultrasonic unit. The experiments were started 10 minutes after mixing. The obtained HSA–CdTe QDs bionanocomplex was used immediately.

Fly strain and maintenance

Laboratory low-mutagenic strain *Oregon R* (wild-type) of *D. melanogaster* [19] was used in our research. The flies and larvae were cultured on a standard *Drosophila* nutrient medium consisting of semolina, sugar, yeast, agar and maintained under standard conditions (at the temperature $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, in dark) [23]. In all experiments an equivalent volume of 5 % glucose was used as control. During the all experiments, the flies were maintained in the dark.

Toxicity analysis of QDs

For the assay, 1-2-day-old flies (50 males and 50 females (10 imagos per tube) *D. melanogaster* were transferred to the test tubes containing filter paper discs saturated with diluted colloidal solutions of CdTe QDs (treatment group-1) or HSA–CdTe QDs (treatment group-2). Stock solutions of QDs were diluted with 5 % glucose at a volumetric ratio of 2:1000 (for CdTe QDs) and 4:1000 (for HSA–CdTe QDs). Solutions were re-applied drop wise as the discs dried. Test tubes containing flies were kept for 3 days under standard conditions. The percentage of surviving flies (PS%), was calculated as a ratio of the number of individuals in experimental group to the number of individuals in the control group [24].

Treatment of *D. melanogaster* with CdTe QDs and HSA–CdTe QDs colloidal solutions

For toxicity assessment in larvae, the tested QDs samples were added to 40 ml of fresh, cooled standard nutrient medium in volumes of 0.08 ml (for CdTe QDs) or 0.16 ml (for HSA–CdTe QDs) for larval feeding. Thus, the concentration of quantum dots in the nutrient medium was $3 \cdot 10^{-9} \text{ mol/L}$.

Fly emergence assay and phenotypic analysis of offspring *D. melanogaster*

For the assay, 80 1-2-day-old flies (40 males and 40 females / group) were transferred to each tube (5 males and 5 females / tube) containing standard food (control) and with CdTe QDs (treatment group-1) or HSA–CdTe QDs (treatment group-2) in medium. The tubes were stored under standard conditions throughout the experiment. The parental flies were removed on the third day. The emerged flies in each group were counted. The percentage of fly emergence (FE%) was calculated as the ratio of the number of imagos in experimental group to the number of imagos in control. All of offspring were analyzed for phenotypic defects using a stereomicroscope (Sigeta, China). Flies displaying phenotypic alterations were isolated into separate tube containing standard medium and crossed with normal *Oregon R* imagos. It was done to assess the inheritance and expression of abnormal trait in their offspring.

Genotoxicity assessment

The genotoxicity (mutagenic potential) of CdTe QDs and CdTe QDs–HSA was determined in Dominant Lethal Mutations (DLM) test [22]. Briefly, for DLM test, virgin 1-2-day-old imagos were treated for 3 days with solutions of CdTe QDs or HSA–CdTe QDs dropped on filter paper discs. In experimental variant 1 (typical), only males were treated and then crossed with untreated virgin females. In experimental variant 2 (modified), both males

and females were treated and then crossed with each other.

The frequency of dominant lethal mutations (DLM, %) was calculated as a ratio of the total number of eggs with embryonic death to the total number of fertilized eggs [25].

Fluorescence microscopic analysis of histological preparations

Squash preparations of eggs and larvae obtained in two experimental variants as in DLM test were prepared. Additionally, histological sections of imagos' muscles were prepared as described in the paper [26]. All samples were analyzed with an AxioImager A1 fluorescence microscope (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Germany) and Axio CamMRm digital camera (Carl Zeiss MicroImaging).

Statistical analysis

Statistical significance of the obtained data from control and treated groups was determined using one-way ANOVA with multiple post-hoc comparisons with Tukey (Tukey's Honestly Significant Difference) test. The samples were checked in terms of belonging to normally distributed general populations according to Shapiro-Wilk's test. The Dunnett's multiple comparison test was used to determine the significance of data obtained from the fly emergence assay. The χ^2 test was used to compare the frequencies of phenotypic changes in the offspring. The results were presented as $M \pm SE$ (mean $\pm$ standard error of the mean value), n — number of experiments. Differences between the respective control and the experiment were considered statistically significant (ss) at $p \leq 0.05$, and p values represented as non-significant (ns) when $p > 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

A colloidal solution of CdTe QDs at a concentration $1.5 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹ and their bionanocomplex with HSA (hereafter, HSA-CdTe QDs) were used for these studies. We analyzed CdTe QDs and HSA-CdTe QDs for toxicity and genotoxicity in adult *D. melanogaster* and their offspring. We also assessed their ability to penetrate germline cells, eggs, and larvae and transmitting to imago.

Toxicity test of CdTe QDs and HSA-CdTe QDs on the *Drosophila* model

The toxicity test of the colloidal solutions of CdTe QDs and HSA-CdTe QDs toward *D. melanogaster* imagos (males and females) showed 100% fly survival in both treated groups regardless of sex. During the 3-day exposure period all treated flies (with both CdTe QDs and HSA-CdTe QDs) were actively moving, feeding and mating. The obtained results are consistent with the data described in the article [10].

Fly emergence assay

According to Table 1, only Group 1, treated with CdTe QDs, exhibited reduced fly emergence (53%) compared with the control. This reduction was statistically significant ($p < 0.001$) according to Dunnett's test. Group 2 (treated with HSA-CdTe QDs) exhibited a fly emergence rate to 96% compared to the control, which was not statistically significant ($p > 0.05$). Thus, following larval feeding, the HSA-CdTe QDs did not demonstrate toxic effects on the development of *D. melanogaster*, unlike CdTe QDs. A highly significant difference ($p < 0.001$) in fly emergence frequency was detected when comparing Group-1 and Group 2 (Tab. 1). Presumably, the addition of HSA in the colloidal solution CdTe QDs inhibits the spontaneous release of cadmium ions from HSA-CdTe QDs. This likely results in a substantial reduction of its embryotoxic impact, thus exhibiting a protective effect.

Table 1. Fly emergence of offspring *Drosophila melanogaster* Oregon R strain treated with CdTe QDs and HSA-CdTe QDs and their phenotypic analysis

Indicators	Control	group-1 (treatment with CdTe QDs)	group-2 (treatment with HSA-CdTe QDs)
Number of flies per tube, (M±SD)	390±17	206±9	375±14
Total number of flies	1562	823	1500
Percentage of fly emergence (FE%)	100	53	96
p-values*			
Control	-	<0.001	>0.05
Group-1	<0.001	-	<0.001
Group-2	>0.05	<0.001	-
*Significance is ascribed as, ^{ns} p>0.05 and ^{ss} p<0.001.			

Table 2. Phenotypic analysis of offspring *Drosophila melanogaster* Oregon R strain treated with CdTe QDs and HSA-CdTe QDs

Abnormal phenotype	Number of imagos		
	Control	group-1 (treatment with CdTe QDs)	group-2 (treatment with HSA-CdTe QDs)
Abdominal pigmentation change	0	3	2
Wing deformities abnormalities	0	6	5
Disrupted body segmentation	0	4	1
Appearance of neoplasms	0	2	2
Imago in cocoon	0	1	
Growth on the head	0		1
Acephaly	0		2
Total	0	16	13
Percentage of fly phenotypic changes (PC%)	0	1,94	0,87
p-values**			
Control	-	<0.001	<0.001
Group-1	<0.001	-	<0.05
Group-2	<0.001	<0.05	-
** χ^2 -test was used for statistical significance			

Phenotypic analysis of offspring

The phenotypic analysis of progeny treated with CdTe QDs and HSA-CdTe QDs revealed imagos exhibiting diverse phenotypic alterations (Table 2, fig. 1). Specifically,

among 823 progeny from Group1 (Table 1, treatment with CdTe QDs), 16 imagos were found with phenotypic changes, accounting for a frequency of 1.94 %. Most abnormalities were related to wing deformities, similar to those described in the article [10]. Meanwhile, scattered individuals were observed with changes in abdominal pigmentation, body segmentation, neoplasms, and other morphological changes. In group 2 (treatment with HSA-CdTe QDs), 13 out of 1500 offspring (0.87 %) also displayed similar abnormalities. However, no such phenotypic changes were detected in the 1562 offspring analyzed from the control group. A χ^2 test indicated a highly statistically significant difference in the frequencies of phenotypic abnormalities when comparing Group-1 and Group-2 to the control ($\chi^2(2)=27.99$, $p<0.001$). Moreover, a comparative analysis highlighted a statistically significant difference in the incident of phenotypic abnormalities between two studied groups ($p<0.05$). This suggests that HSA-CdTe QDs bionanocomplex is less toxic to *D. melanogaster* development than CdTe QDs, highlighting its diminished adverse effects. Notably, HSA-CdTe QDs induced phenotypic abnormalities at a frequency 2.3 times lower than that caused by CdTe QDs. Flies exhibiting abnormalities (from both groups) were analyzed for their survivability and fertility. Each one was transferred into individual tube (without QDs) and crossed with untreated wild-type imago of *Oregon R* strain. According to our observations, flies showing marked phenotypic changes were not viable: they died and failed to produce offspring. Conversely, individuals with slight abnormalities (mainly deformed wings) remained fertile and yielded phenotypically normal progeny. Clearly, offspring do not inherit or exhibit the phenotypic abnormalities induced in the parental generation by either CdTe QDs or HSA-CdTe QDs. This suggests that the studied quantum dots primarily exert a modifying effect on the morphogenetic processes in flies.

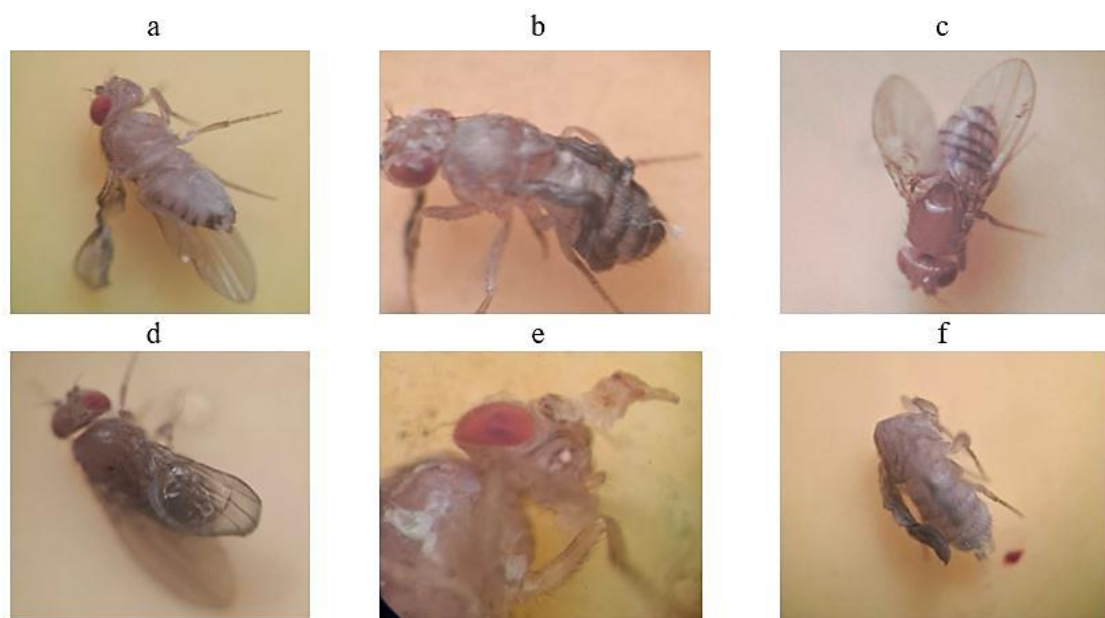


Figure 1. Phenotypic abnormalities in *D. melanogaster* offspring after exposure to CdTe QDs and HSA-CdTe QDs. Images captured using a stereomicroscope: a, b — deformed wings ($\times 112$, $\times 196$); c — altered wing length ($\times 112$); d — malformed wing with a neoplasm ($\times 112$); e — growth on the head ($\times 392$); f — acephaly and deformed wings ($\times 112$).

Therefore, the studied HSA-CdTe QDs, similar to CdTe QDs, exerts teratogenic effect in *D. melanogaster*, becoming apparent during the critical period of ontogenesis — organogenesis. Evidently, at the pupal stage, the cells of imaginal discs are highly susceptible to the influence of the tested quantum dots due to their high mitotic and metabolic activities.

Evaluation of the genotoxic potential of CdTe QDs and HSA-CdTe QDs in the dominant lethal mutation test

To evaluate the genotoxic potential of CdTe QDs and HSA-CdTe QDs, the DLM test was employed. This method is effective in detecting considerable chromosomal mutations caused by various xenobiotics, leading to an arrest in development at the early (embryonic) stages [19]. Our data (Fig. 2) indicate that overall DLM% frequency for the CdTe QD-treated groups (3.083 ± 0.073 and 3.089 ± 0.073 , respectively) did not significantly vary from that of the control group (2.96 ± 0.076). The DLM% frequency for the HSA-CdTe QD-treated groups (2.75 ± 0.07 and 2.853 ± 0.068 , respectively) also did not significantly vary from those of the control group (2.96 ± 0.076). The ANOVA test indicated that the observed differences among the mean values of all groups was not substantial enough to be statistically significant ($p=0.453$; $F=0.879$). A pairwise comparison of the DLM% frequency among all investigated groups, conducted using Tukey's test (at $\alpha=0.05$), demonstrated no statistically significant difference ($p>0.05$). Thus, regardless of which parental form consumed the studied QDs — the male (in the typical DLM test variant) or both parents (in the modified variant) there was not statistically significant impact on the elevation of the DLM frequency. Based on these findings, we propose that neither HSA-CdTe QDs nor CdTe QDs exhibit genotoxic effects at the submolecular level in the *D. melanogaster* model.

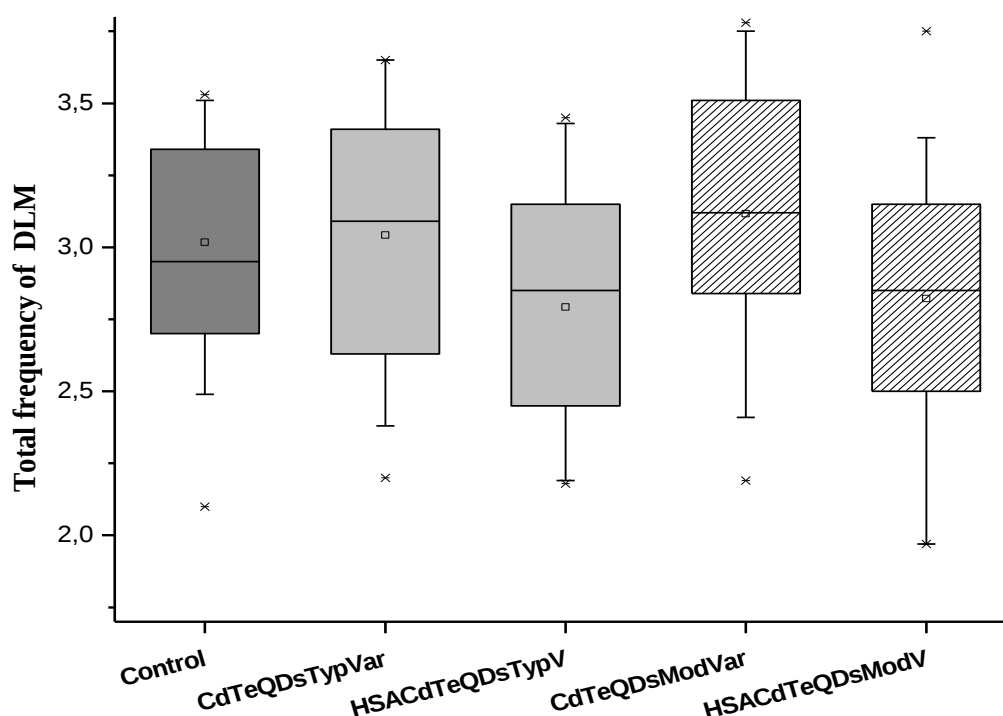


Figure 2. The total frequency of dominant lethal mutations (DLM) *Drosophila melanogaster* Oregon R strain under the influence of CdTe QDs and HSA-CdTe QDs in different experimental variants of test: Control, TypVar — typical variant; ModVar — modifcal variant.

It is important to note that the number of laid and fertilized eggs was significantly reduced in the CdTe QDs-treated group ($p<0.05$), by 24 % and 15 % respectively, compared to the control. The findings suggest that CdTe QDs have a reproductively toxic effect on both females and males. However, in the case of the bioconjugate-treated group, no statistically significant difference ($p>0.05$) was detected in the number of laid and fertilized eggs compared to control group.

Fluorescence visualization of the intergenerational and inter-stage transmission of CdTe QDs and HSA-CdTe QDs in *Drosophila*

To confirm this assumption, we examined the ability of these QDs to penetrate germline cells, eggs, and be transmitted to later developmental stages. For this purpose, two experimental variants were performed. The first experimental variant involved analyzing preparations of unfertilized eggs from treated females. For the second variant, we analyzed preparations of fertilized eggs and larvae obtained by crossing untreated females with treated males. Fig. 3 demonstrates the cellular mass of homogenized eggs, larvae and imagos' muscles, respectively, showing distributed fluorescence in all but control samples.

Our data indicate that both CdTe QDs and the HSA-CdTe QDs penetrate into germ cells of males and females when ingested with food (Fig. 3). During fertilization, these QDs transfer into eggs, and subsequently to larval cells as confirmed by their fluorescence.

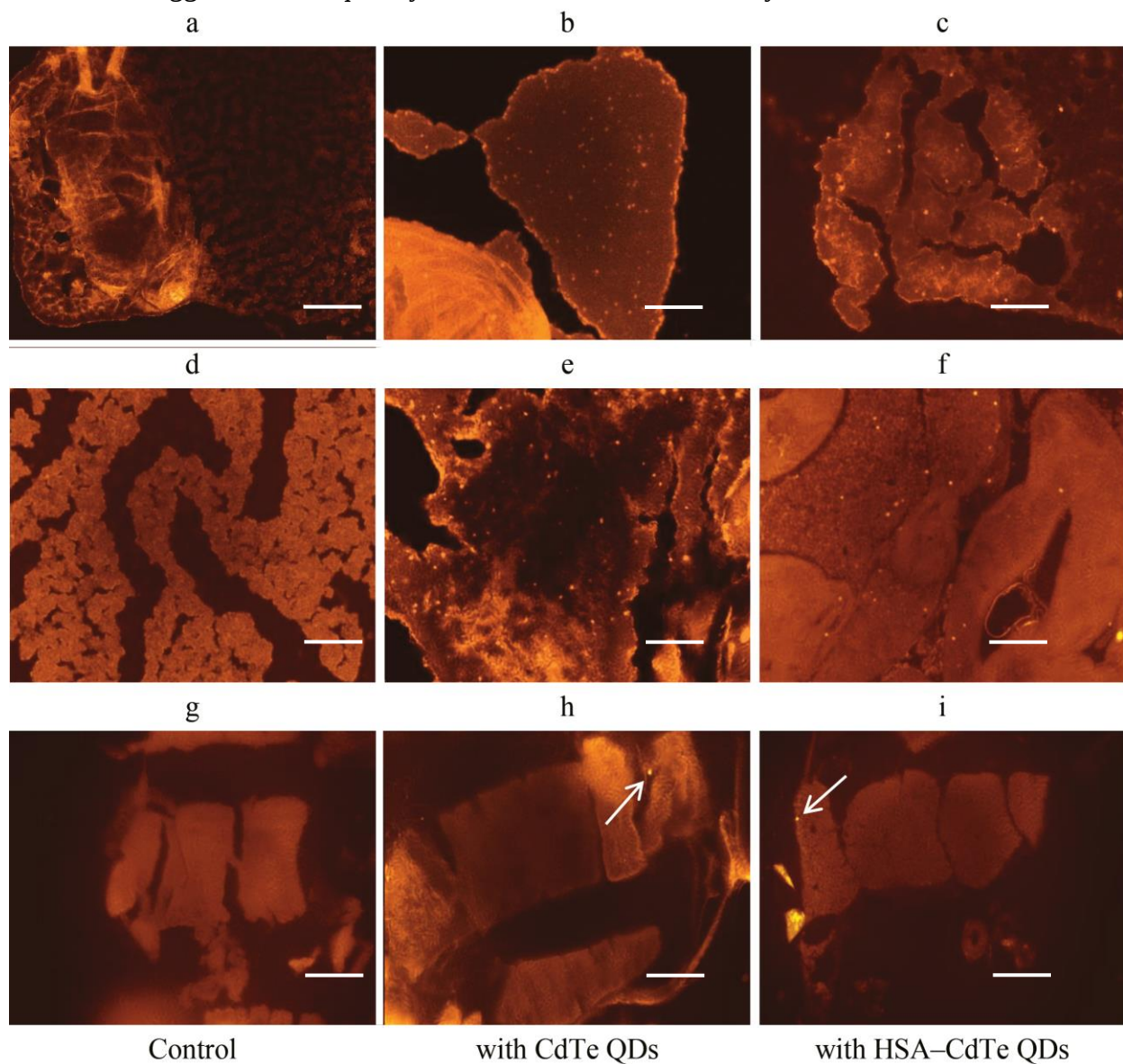


Figure 3. Homogenized eggs (a, b, c), larvae (d, e, f) and histological sections of imagos' muscles (g, h, i) of *D. melanogaster*, untreated (control) and treated with CdTe QDs and HSA-CdTe QDs. Fluorescence imaging was performed using a TRITC filter (emission 570-580 nm, well-suited for visualization of dyes in the orange-red region of the spectrum), with an exposure time of 50 ms at 400× magnification. The segment in the photos corresponds to 50 μ m. Arrows indicate CdTe QDs (h) and HSA-CdTe QDs (i).

It was observed that intact eggs do not fluoresce, indicating that the eggshell masks the signal. Therefore, to effectively detect QDs in eggs, it is advisable to prepare crushed slides of the samples. The images on Fig. 3 (h, i) also demonstrate that both types of QDs are present in imagos' muscles in trace amounts. The ability of the bionanocomplexes and QDs to remain in the organism even after metamorphosis highlights their stability and potential for transmission across developmental stages and generations. Thus, the HSA-CdTe QDs bionanocomplexes can be used in biological and biomedical research as a safer tool for bioimaging *in vitro* and *in vivo* applications in model organisms compared to CdTe QDs; however, their use *in vivo* in humans is not recommended.

CONCLUSION

Using fluorescence microscopy, we established that both HSA-CdTe QDs and CdTe QDs were able to penetrate germline cells of the model organism *Drosophila melanogaster*, were transmitted to the progeny, and accumulated particularly in larval and adult muscle tissues, where they were clearly detected in histological sections. This confirmed not only the effective cellular uptake of both types of quantum dots (QDs), but also their stability and persistence during development. Importantly, the Dominant Lethal Mutation test demonstrated that neither HSA-CdTe QDs nor CdTe QDs induced genotoxic effects at the embryonic stage, suggesting that their direct interaction with the genome did not cause heritable chromosomal mutations at early development. This aspect is essential, as it indicates that the observed biological effects are not related to DNA damage, but rather to other mechanisms, likely involving interference with cellular differentiation and developmental processes.

At the same time, feeding experiments revealed that both types of QDs exhibited a teratogenic effect during larval development, leading to phenotypic abnormalities in the offspring of *D. melanogaster*. The presence of such morphological changes indicates that despite the absence of direct genotoxicity, the QDs are capable of disrupting normal ontogenesis, most probably by affecting cell signaling, oxidative stress responses, or tissue-specific development. However, the comparative analysis clearly showed that conjugation of CdTe QDs with human serum albumin (HSA) significantly reduced their teratogenic potential. Specifically, the frequency of phenotypic abnormalities in the case of HSA-CdTe QDs was 2.3-fold lower ($p < 0.05$) compared to CdTe QDs, indicating that the albumin coating provides an additional protective effect by decreasing the overall toxicity of the nanoparticles.

Another important observation was that HSA-CdTe QDs did not reduce the number of eclosed offspring in comparison to the control, while CdTe QDs led to a noticeable decline in viability. This suggests that the bioconjugation with HSA not only reduces morphological abnormalities but also helps maintain normal survival rate and reproductive outcomes. The protective effect of HSA likely stems from its ability to improve biocompatibility, reduce surface reactivity, and limit the release of toxic cadmium ions, thereby minimizing negative biological consequences potentially mediated by a decrease in the generation of reactive oxygen species.

In summary, our results highlight the dual nature of CdTe QDs: while they are powerful fluorescent probes with strong visualization capacity, their biological application is limited by their inherent developmental toxicity. Conjugation with HSA substantially mitigates these risks, resulting in improved safety without compromising imaging potential. Thus, HSA-CdTe QDs can be considered a promising and relatively safe nanobiotechnological tool for *in vitro* fluorescence bioimaging, offering an advantageous balance between effectiveness and biosafety. For *in vivo* studies this complex can be used in model organisms, but it is not recommended for human use.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Ministry of Education and Science of Ukraine, Grants 0124U001093, 0125U002002.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

Authors' ORCID ID

N. Ia. Holub  <https://orcid.org/0000-0003-4771-4740>
H. M. Klepach  <https://orcid.org/0000-0003-0784-8373>
O. G. Stasyk  <https://orcid.org/0000-0002-0253-2372>
I. D. Stolyarchuk  <https://orcid.org/0000-0001-7549-2335>
O. V. Kuzyk  <https://orcid.org/0000-0002-8474-444X>
V. O. Los  <https://orcid.org/0009-0008-7043-1195>
A. I. Stolyarchuk  <https://orcid.org/0009-0009-5557-8946>

REFERENCES

1. Kini S, Kulkarni SD, Ganiga V, Nagarakhshik TK, Chidangil S. Dual functionalized, stable and water dispersible CdTe quantum dots: Facile, one-pot aqueous synthesis, optical tuning and energy transfer applications. *Mater Res Bull.* 2019;110:57–66. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2018.10.013>
2. Wagner AM, Knipe JM, Orive G, Peppas NA. Quantum dots in biomedical applications. *Acta Biomater.* 2019;94:44–63. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.022>
3. Gidwani B, Sahu V, Shukla SS, Pandey R, Joshi V, Jain VK, et al. Quantum dots: Prospectives, toxicity, advances and applications. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2021;61:102308. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102308>
4. Rodrigues SSM, Ribeiro DSM, Soares JX, Passos MLC, Saraiva MLMFS, Santos JLM. Application of nanocrystalline CdTe quantum dots in chemical analysis: Implementation of chemo-sensing schemes based on analyte-triggered photoluminescence modulation. *Coord Chem Rev.* 2017;330:127–43. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.10.001>
5. Zhu Y, Hong H, Xu Z P, Li Z, Cai W. Quantum dot-based nanoprobe for in vivo targeted imaging. *Curr Mol Med.* 2013;13(10):1549–67. <https://doi.org/10.2174/156652401366613111121733>
6. Park Y, Ryu YM, Wang T, Jung Y, Kim S, Hwang S, et al. Colorectal cancer diagnosis using enzyme-sensitive ratiometric fluorescence dye and antibody–quantum dot conjugates for multiplexed detection. *Adv Funct Mater.* 2018;28:1703450. <https://doi.org/10.1002/adfm.201703450>
7. Pandey S, Mukherjee D, Kshirsagar P, Patra C, Bodas D. Multiplexed bio-imaging using cadmium telluride quantum dots synthesized by mathematically derived process parameters in a continuous flow active microreactor. *Mater Today Bio.* 2021;11:100123. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2021.100123>
8. Castro RC, Saraiva LMFS, Santos JLM, Ribeiro DSM. Multiplexed detection using quantum dots as photoluminescent sensing elements or optical labels. *Coord Chem Rev.* 2021;448:214181. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214181>
9. Sarkar S, Srivastava TP, Sahoo OS, Shankar A, Rai A, Pethusamy K, et al. Applications of quantum dots in preventive oncology. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2024;25(3):747–56. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2024.25.3.747>
10. Paithankar JG, Kushalan S, Nijil S, Hegde S, Kini S, Sharma A. Systematic toxicity assessment of CdTe quantum dots in *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere.* 2022;295:133836. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133836>
11. Garmanchuk L, Borova M, Kapush O, Dzhanagan V, Valakh M, Blume Y, et al. Green synthesis of CdTe quantum dots and their effect on human and animal cells. *Cytol Genet.* 2023;57(3):229–38. <https://doi.org/10.3103/S0095452723030040>
12. Nguyen KC, Zhang Y, Todd J, Kittle K, Patry D, Caldwell D, et al. Biodistribution and systemic effects in mice following intravenous administration of cadmium telluride quantum dot nanoparticles. *Chem Res Toxicol.* 2019;32(8):1491–503. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00397>
13. Stolyarchuk ID, Savchuk AI, Wojnarowska R, Polit J. Characterization of the interaction of CdTe quantum dots with human serum albumin by optical spectroscopic techniques. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies.* 2015;12(3):40–6. <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2015.3.107698>
14. Stolyarchuk ID, Shportia OA. Optical studies of the interactions CdS and CdTe nanoparticles with a human serum albumin. *Physics and Chemistry of Solid State.* 2016;17(4):498–503. <https://doi.org/10.15330/pcss.17.4.498-503>

15. das Dores Aguiar C, Coelho YL, Campos de Paula HM, Neves Santa Rosa L, Virtuoso LS, de Oliveira Mendes TA, et al. Thermodynamic and kinetic insights into the interactions between functionalized CdTe quantum dots and human serum albumin: A surface plasmon resonance approach. *Int J Biol Macromol.* 2021;184:990–99. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.158>
16. Stolyarchuk ID, Wojnarowska-Nowak R, Polit J, Sheregii E, Nowak S, Romerowicz-Misielak M. CdTe quantum dots and their bioconjugate with human serum albumin for fluorescence imaging. *Physics and Chemistry of Solid State.* 2017;18(2):166–72. <https://doi.org/10.15330/pcss.18.2.166-172>
17. Haque M, Mondal A, Lyndem S, Chamlagai D, Roy AS. CdSe core and CdSe@ZnSe core–shell QDs decorated with human serum albumin: deciphering the antimicrobial properties and sensing of mercury ion. *ACS Appl. Nano Mater.* 2024;7(7):7453–64. <https://doi.org/10.1021/acsanm.4c00149>
18. Motevalian M, Ghavamipour T, Maroufi B, Mirshahi M, Sajeda RH. Mutual effect of protein corona formation on CdTe quantum dots. *Anal Biochem.* 2020;610:113983. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113983>
19. Ni X, Lu Y, Li M, Liu Y, Zhang M, Sun F, et al. Application of Se-Met to CdTe QDs significantly reduces toxicity by modulating redox balance and inhibiting apoptosis. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2023;267:115614. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115614>
20. Haque M, Kalita M, Chamlagai D, Lyndem S, Koley S, Kumari P, et al. Human serum albumin directed formation of cadmium telluride quantum dots: Applications in biosensing, anti-bacterial activities and cell cytotoxicity measurements. *Int J Biol Macromol.* 2024;268(Pt 1):131862. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131862>
21. Korbytyak DV, Kalytchuk SM, Geru II. Colloidal CdTe and CdSe quantum dots: Technology of preparing and optical properties. *J Nanoelectron Optoelectron.* 2009;4(1):1–6. <https://doi.org/10.1166/jno.2009.1019>
22. Chifiriuc MC, Ratiu AC, Popa M, Ecovoiu AA. Drosophotoxycology: An emerging research area for assessing nanoparticles interaction with living organisms. *Int J Mol Sci.* 2016;17(2):36. <https://doi.org/10.3390/ijms17020036>
23. Demir E, Demir F. *Drosophila melanogaster* as a dynamic in vivo model organism reveals the hidden effects of interactions between microplastic/nanoplastic and heavy metals. *J Appl Toxicol.* 2023;43(2):212–9. <https://doi.org/10.1002/jat.4353>
24. Eickelberg V, Lüersen K, Staats S, Rimbach G. Phenotyping of *Drosophila melanogaster* - A nutritional perspective. *Biomolecules.* 2022;12(2):221. <https://doi.org/10.3390/biom12020221>
25. Holub NI, Klepach HM, Kryzhanovska MA, Horbulinska SM, Krechivska HV. Evaluation of the genotoxic potential of surface water of anthropogenically loaded areas using eukaryotic test objects (on the Zubra river example, Lviv, Ukraine). *Studia Biologica.* 2025;19(1):61–70. <https://doi.org/10.30970/sbi.1901.812>
26. Kucherenko MM, Marrone AK, Rishko VM, Yatsenko AS, Klepzig A, Shcherbata HR. Paraffin-embedded and frozen sections of *Drosophila* adult muscles. *J Vis Exp.* 2010;46:e2438. <https://doi.org/10.3791/2438>

БІОНАНОКОМПЛЕКС КВАНТОВИХ ТОЧОК CdTe-АЛЬБУМІН: ГЕНОТОКСИЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ДЛЯ БІОВІЗУАЛІЗАЦІЇ НА МОДЕЛІ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Н. Я. Голуб^{1,*}, Г. М. Клепач², О. Г. Стасик¹, І. Д. Столярчук², О. В. Кузик²,
В. О. Лось¹, А. І. Столярчук²

¹Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна;

²Дрогобицький державний педагогічний університет імені Івана Франка, вул. Івана Франка, 24, Дрогобич, 82100, Україна

*e-mail: nataliia.holub@lnu.edu.ua

Надійшла до редакції 09 вересня 2025 р. Переглянута 15 лютого 2026 р.

Прийнята до друку 16 березня 2026 р. Опублікована 25 червня 2026 р.

Актуальність. Дослідження напівпровідникових нанокристалів, відомих як квантові точки (КТ), та їх застосування в біомедичних дослідженнях, біовізуалізації, діагностиці стрімко розвиваються. Хоча КТ демонструють чудові оптичні властивості, їх практичне застосування обмежується токсичністю. У зв'язку з цим тривають дослідження, спрямовані на зниження токсичності КТ шляхом покриття інертними оболонками чи комплексоутворенням з біомолекулами.

Мета роботи: на *D. melanogaster* як моделі оцінити генотоксичний потенціал біонаноконкомплексу КТ CdTe з альбуміном людини (HSA) як безпечного та перспективного інструменту для флуоресцентної біовізуалізації *in vivo*.

Матеріали і методи. КТ CdTe були отримані хімічним колоїдним методом у водній фазі та кон'юговані з HSA для отримання біонаноконкомплексу КТ HSA-CdTe. Токсичність і генотоксичність КТ оцінювали у відповідних тестах на моделі *D. melanogaster* (лінія *Oregon R*). Візуалізували КТ флуоресцентною мікроскопією. Отримані дані аналізували статистичними методами, вважаючи відмінності значущими при $p < 0,05$.

Результати. Встановлено, що біонаноконкомплекси, так само як і CdTe КТ, проникали у клітини зародкової лінії модельного організму, переносилися у яйця й личинки та чітко візуалізувалися на гістологічних препаратах. У м'язах імаго виявлялися поодинокі CdTe КТ і кон'югати з HSA. Досліджувані типи КТ не викликали токсичності у імаго за 3-добової експозиції й зниження їх репродуктивної здатності, а також генотоксичного ефекту на ембріональній стадії розвитку у ДЛМ-тесті. При личинковому згодовуванні, обидва типи КТ спричиняли тератогенний ефект. На відміну від CdTe КТ, біонаноконкомплекс індукував фенотипові аномалії у імаго зі значно меншою частотою (у 2,3 рази) та не спричиняв зменшення їх вильоту порівняно з контролем ($p > 0,05$).

Висновки. Показано, що КТ HSA-CdTe та CdTe не виявляють генотоксичної дії на ембріональній стадії розвитку. На відміну від КТ CdTe, біонаноконкомплекс не чинить репродуктивної токсичності, має значно меншу тератогенну дію й токсичний вплив на постембріональний розвиток моделі. Ці переваги уможливають розглядати КТ HSA-CdTe як відносно безпечний та перспективний інструмент для флуоресцентної біовізуалізації *in vitro* та для використання *in vivo* на модельних об'єктах. Однак їхнє застосування *in vivo* у людини не рекомендується.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: КТ HSA-CdTe QDs; біонаноконкомплекс; CdTe QDs; *Drosophila melanogaster*; токсичність; генотоксичність; флуоресцентна біовізуалізація.

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-06>

UDC 616-056.52:577.353+577.121

**BIOMECHANICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF
MUSCULUS SOLEUS CONTRACTION IN OBESE RATS****D. M. Nozdrenko¹, O. V. Rizun¹, M. Yu. Kuznietsova¹, N. G. Raksha¹,
T. I. Halenova¹, O. V. Lynchak¹, V. P. Berest², Yu. I. Prylutskyi^{1,*}**¹ Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64/13 Volodymyrska Str., Kyiv, 01601, Ukraine;² V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine*Corresponding author: prylut@ukr.net

Submitted March 20, 2026; Revised April 27, 2026;

Accepted April 29, 2026; Published June 25, 2026

Background: Obesity is accompanied by complex metabolic disorders that significantly affect skeletal muscle physiology, including contractile activity and fatigue resistance. However, the mechanisms linking obesity to altered muscle function remain insufficiently characterized.

Objectives: The present study aimed to evaluate the impact of obesity on the biomechanical parameters of *musculus soleus* contraction in rats under fatigue conditions. In parallel, blood levels of creatinine, creatine phosphokinase (CPK), and lactate dehydrogenase (LDH) were measured to assess the relationship between metabolic alterations and neuromuscular dysfunction associated with obesity.

Materials and methods: Experiments were conducted on male white non-linear rats divided into control and high-calorie diet groups. The *musculus soleus* contraction force was recorded using strain gauges attached to the muscle tendons. Electrical stimulation of the L4-L5 efferents was performed with 2 ms impulses at 1 Hz, generated through platinum electrodes controlled by an ADC-DAC system. Muscle fatigue was induced by three stimulation series separated by 5 min rest intervals. The maximum contraction force, time to decrease muscle contraction force by 25% and 50% of the initial level and muscle force impulse were determined. Blood levels of creatinine, CPK, and LDH were measured by commercial kits.

Results: The findings have shown that obesity cause a significant suppression of the contractile activity of rat *musculus soleus*. The concentrations of creatinine, CPK, and LDH in the blood of obese rats increased, indicating impaired neuromuscular function and insufficient recovery during repeated stimulation. These alterations reflect obesity-induced dysfunction in muscle energy metabolism and contractile mechanisms.

Conclusions: Obesity causes pronounced suppression of the contractile activity of *musculus soleus* and disrupts neuromuscular homeostasis, as evidenced by both biomechanical and biochemical markers. The findings contribute to understanding the pathophysiological basis of muscle fatigue in obesity and may support diagnostics of obesity-related muscular dysfunction.

KEY WORDS: *musculus soleus*; obesity; muscle fatigue; contractile activity; biomechanical parameters of muscle contraction; biochemical blood indicators

One of the most important characteristics of the human muscular system is its ability to maintain the level of effort generation, determined by the central nervous system (CNS), for a

Citation: Nozdrenko DM, Rizun OV, Kuznietsova MYu, Raksha NG, Halenova TI, Lynchak OV, Berest VP, Prylutskyi YuI. Biomechanical and biochemical characteristics of *musculus soleus* contraction in obese rats. Biophysical Bulletin. 2026;55:65–75. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-06>

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

© Nozdrenko D. M., Rizun O. V., Kuznietsova M. Yu., Raksha N. G., Halenova T. I., Lynchak O. V., Berest V. P., Prylutskyi Yu. I., 2026

certain period of time. If the factors that induce contractions continue to reach the muscle with constant intensity, and the level of force generated by the muscle gradually decreases, this phenomenon is called muscle fatigue. Muscle fatigue is a protective mechanism of the body against overload and the subsequent development of muscle pain [1]. Its degree is a key factor in the development of adaptation and the improvement of the body's functional and physical capacities. During intense physical activity, the duration of the recovery period (active rest of the muscle) is also an important parameter for maintaining optimal performance and the normal physiological state of contracting muscles [2]. Interestingly, the effects of fatigue are observed not only in the actively working muscle fibers but also in adjacent ones that have not been pre-stimulated. The causes of this effect may include the diffusion of metabolites from active to inactive muscle fibers; reduced effectiveness of neuromuscular transmission due to compression of motor terminals and altered extracellular metabolite composition; and local hypoxia caused by increased intramuscular pressure, which, in turn, alters the excitability and contractile capacity of muscle fibers [3].

Several studies indicate the development of skeletal muscle dysfunction in obesity, such as impaired insulin sensitivity [4]. It has been shown that rats with obesity exhibit disturbances in muscle protein synthesis in response to chronic lipid infiltration [5]. In addition, a decline in oxidative capacity and abnormal organization of muscle fibers has been observed in the skeletal muscles of obese patients [6]. However, the specific features of skeletal muscle contraction dynamics under conditions of obesity remain poorly studied.

Damage to the molecular structure of muscles during the development of obesity may be one of the possible causes of their reduced contractility. Degenerative changes, including partial loss of transverse striation and increased spacing between bundles of muscle fibers, have been observed after the development of obesity [7]. According to the authors, such structural changes may result from oxidative damage, as evidenced by elevated levels of malondialdehyde and lactate dehydrogenase (LDH) in the systemic circulation.

It is known that obese individuals are characterized by a predominance of fast-twitch (type II) muscle fibers and a smaller proportion of slow-twitch (type I) muscle fibers [8]. Evidence suggests that a relative reduction in type I muscle fibers is associated with impaired metabolic health, increased low-density lipoprotein levels, decreased insulin sensitivity, and reduced arterial elasticity [9]. At the same time, type II muscle fibers exhibit a reduced ability to oxidize lipids, which is linked to lower whole-body lipid oxidation and increased lipid accumulation [10]. Furthermore, the type II muscle fiber phenotype is more closely associated with elevated oxidative stress. Therefore, the lack of data on the effect of obesity on the slow skeletal muscle (*musculus soleus*) contractile activity prompted us to conduct such studies.

Today, it is well established that there is no single, distinct mechanism responsible for the development of the muscle fatigue phenomenon; rather, there exists a wide range of mechanisms operating at different systemic levels [11, 12]. These include disturbances in the functioning of the CNS, dysfunction of peripheral nerves and neuromuscular junctions, as well as reversible physiological changes occurring directly within the actively working skeletal muscles. Naturally, such large-scale physiological alterations are reflected in the composition of blood, the body's main transport medium.

Thus, the present study aimed to comprehensively evaluate the effect of obesity on the biomechanical parameters of *musculus soleus* contraction in rats, including the maximum contraction force, the muscle force impulse, and the time required for the reduction of contraction force to 25% and 50% of the initial values, under conditions of fatigue development. In parallel, we assessed key biochemical markers of muscle performance – creatinine, creatine phosphokinase (CPK), and LDH — in the blood plasma of obese rats to elucidate the relationship between metabolic disturbances and functional impairment of the neuromuscular system.

MATERIALS AND METHODS

Experiments on rats were conducted in compliance with international recommendations for biomedical research involving animals, in accordance with the guidelines of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental Purposes. The study was approved by the Bioethical Committee of Taras Shevchenko National University of Kyiv (Protocol No. 5, dated 09.09.2020).

Experiments were carried out on male white non-linear rats with an initial weight of $135\text{--}140 \pm 5$ g. During the first week, the rats were provided with standard food and water *ad libitum*. On the eighth day of the experiment, the animals were randomly divided into two groups. The first group (Control, $n = 20$) received standard food and water, while the second group (High-Calorie Diet, HCD; $n = 20$) was fed a high-calorie diet consisting of standard food (60%), pork fat (10%), chicken eggs (10%), sucrose (9%), peanut butter (5%), milk (5%), vegetable oil (1%), and water [13, 14]. The rats were sacrificed on the 70th day of the experiment.

The body mass of the rats was recorded once a week, while food and water intake were monitored daily in both groups. The body mass index (BMI) — defined as the ratio of body mass (g) to the square of body length (cm^2) — was calculated at the end of the experiment.

The concentration of insulin in the blood of rats was determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [14]. The concentration of glucose in the blood was measured in animals that had been fasted for at least 2 h. Blood samples were collected from the caudal vein using a catheter, and glucose levels were determined with a Glucophot-II glucometer (Ukraine). The concentration of glycosylated hemoglobin in the blood of experimental rats was measured using standard kits manufactured by PLIVA-Lachema Diagnostika (Czech Republic) [14].

The concentration of creatinine in rat blood was measured using the kinetic Jaffe method [15] without deproteinization, for the quantitative determination of serum creatinine. The concentration of CPK was determined by the immunoinhibition method with measurement in the UV region of the spectrum, according to the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) protocol [15]. The concentration of LDH was measured using an optimized IFCC method [15].

The preparation for the experiment included intraperitoneal administration of nembutal (40 mg/kg) for anesthesia. Standard preparation procedures also included cannulation for drug administration and pressure monitoring, tracheotomy, and laminectomy at the level of the lumbar spinal cord. The *musculus soleus* was dissected free from the surrounding tissues and transected transversely at the distal part of its tendon. To prepare for controlled stimulation of the efferent fibers in the L4–L5 segments, the ventral roots were severed at their exit points from the spinal cord. During both surgery and the experimental procedure, heart rate and electrocardiogram amplitude were continuously monitored. Anesthesia was maintained by intraperitoneal injections of a ketamine/xylazine mixture every 30–40 min until the end of the experiment. Body temperature was maintained at $37\text{--}38$ °C using an infrared lamp [16, 17].

The muscle contraction force was measured using strain gauges attached to the tendons of the examined muscle. Programmable signal generators of a specific waveform were used to produce the stimulating signals [16]. Stimulation of the efferent fibers in the L4–L5 segments was performed with electrical impulses of 2 ms duration and 1 Hz frequency, generated by a pulse generator controlled by an ADC–DAC system (Analog to Digital Converter – Digital to Analog Converter) and delivered through platinum electrodes.

To induce muscle fatigue, three series of electrical stimulations were applied, with a 5-min rest interval between them. The current intensity at which the muscle began to contract was considered the threshold, and subsequent stimulation was performed at 1.3–1.4 times the

threshold value. The biomechanical parameters, namely the time required for the reduction of *musculus soleus* contraction force by 25% and 50% from the initial level, as well as the maximum contraction force, as markers of muscle damage [17], in both the Control and HCD groups were recorded. The muscle force impulse, calculated as the total area under the force–time curve, was determined using Origin 9.4 software (OriginLab Corp., USA) [17].

Data analysis, including statistical processing and graph plotting, was performed using Origin 8.0 software (OriginLab Corp., USA). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. The statistical reliability of differences between groups was assessed using Student's *t*-test.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the preliminary metabolic assessment confirmed the successful induction of obesity in rats maintained on a HCD. As shown in Table 1, animals from the HCD group demonstrated a significant increase in body weight, BMI, and blood glucose levels compared to the Control group ($p < 0.05$). Elevated concentrations of glycosylated hemoglobin and insulin further indicated disturbances in carbohydrate metabolism and the onset of insulin resistance. These findings are consistent with earlier reports describing the development of chronic low-grade inflammation and metabolic dysregulation in adipose tissue during obesity [18].

Such systemic alterations are known to profoundly influence skeletal muscle structure and function. The disruption of metabolic homeostasis, accumulation of lipids, and chronic inflammatory background can impair neuromuscular communication and contractile performance. Therefore, in the next stage of the study, a detailed biomechanical analysis of *musculus soleus* contraction dynamics was carried out to evaluate the effect of obesity on its functional state. This approach made it possible to identify characteristic changes in the force generation, fatigue development, and recovery capacity of skeletal muscle under conditions of obesity-induced metabolic imbalance.

Table 1. The key indicators characterizing the disruption of the functioning of metabolic processes associated with the development of obesity in rats

Indicators	Control group	HCD group
Feed consumption, g/day	28 ± 2	$33 \pm 2^*$
Water consumption, mL/day	38 ± 2	$32 \pm 2^*$
Weight gain, %	108 ± 6	$160 \pm 8^*$
BMI, g/cm ²	0.60 ± 0.03	$0.84 \pm 0.05^*$
Concentration of glucose, mM	4.5 ± 0.4	$7.1 \pm 0.5^*$
Concentration of glycosylated hemoglobin, $\mu\text{mol f/g hem}$	0.21 ± 0.03	$0.81 \pm 0.06^*$
Concentration of insulin, rel.units/mg protein	0.13 ± 0.01	$0.26 \pm 0.02^*$

* $p < 0.05$ — the difference is statistically significant compared to the Control group.

Figure 1 shows the mechanograms of *musculus soleus* contraction in the Control and HCD groups, obtained during electrical stimulation at a frequency of 1 Hz in three consecutive series, each separated by a 5-minute rest interval. The time required for a 25% and 50% reduction in contraction force from the baseline level was 14 ± 1 min and 25 ± 1 min, respectively, during the first series of stimulation. In the second and third series, the corresponding values decreased to 9.0 ± 0.5 min and 19 ± 1 min, and 4.0 ± 0.2 min and 11 ± 1 min, respectively.

These data indicate that, unlike the Control group, rats maintained on a high-calorie diet exhibited a progressive decline in muscle endurance, as evidenced by the faster reduction in contraction force across successive stimulation cycles (Fig. 2). It should be noted that the control values remained stable throughout the experiment, confirming the reproducibility of the stimulation protocol and the absence of fatigue accumulation under normal metabolic conditions.

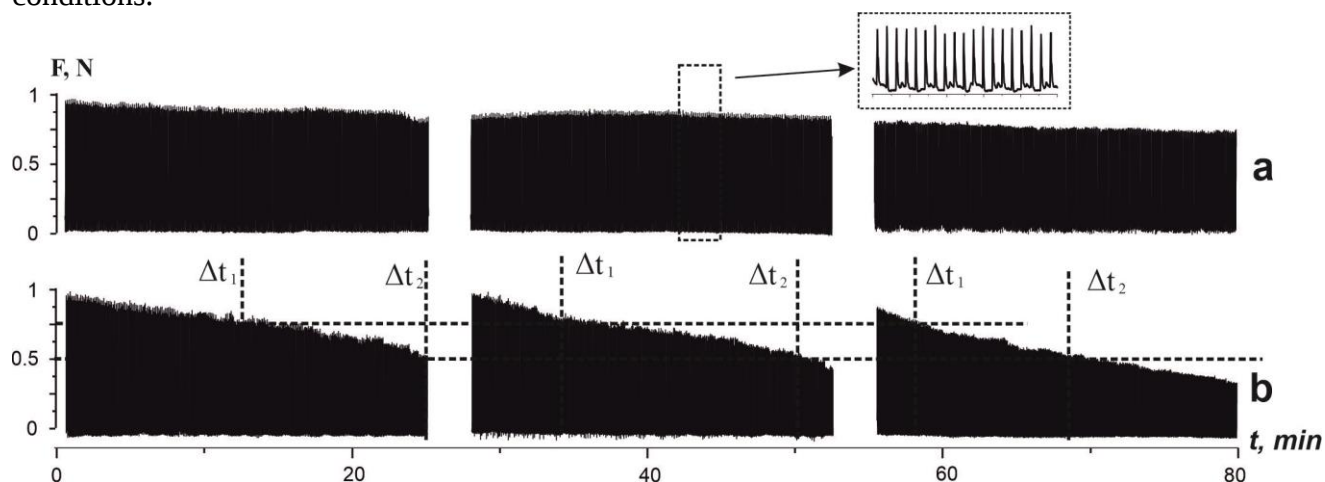


Fig. 1. The force of *musculus soleus* contraction (F, N) caused by electrical stimulation at a frequency of 1 Hz, performed in three series with 5 min relaxation between each: a — Control group; b — HCD group. Δt_1 and Δt_2 — the time of reduction of the muscle force contraction by 25% and 50%, correspondingly, from the initial level.

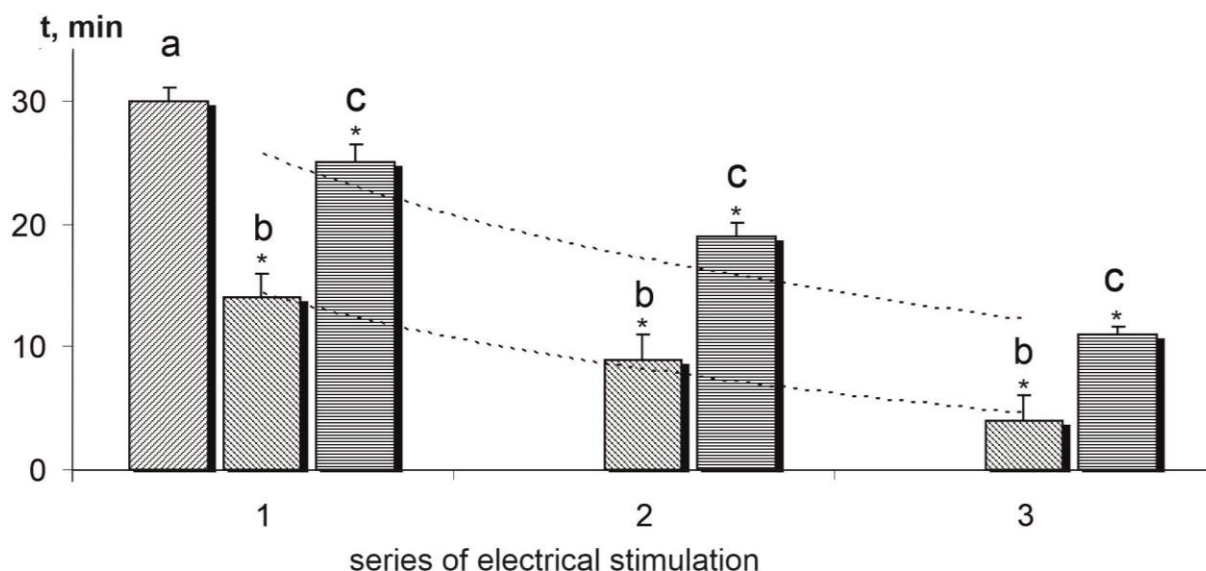


Fig. 2. The time (t, min) of reduction of *musculus soleus* contraction force by 25% (b) and 50% (c) from the initial level in obese rats caused by electrical stimulation at a frequency of 1 Hz, performed in three series (1, 2 and 3) with 5 min relaxation between each. * $p < 0.05$ — the difference is statistically significant compared to the Control group (a).

The maximum contraction force generated by an active muscle reflects its ability to perform rapid, untargeted movements and serves as an indicator of the overall functional state of the muscular system [16]. As shown in Figure 3, the maximum contraction force of the *musculus soleus* in the HCD group decreased to $82 \pm 5\%$ during the first series of contractions, while in the second and third series it dropped further to $63 \pm 3\%$ and $38 \pm 2\%$,

respectively, compared with the Control group. Such a progressive reduction in force generation suggests a significant impairment of neuromuscular performance in obese rats. The observed changes may result from disturbances in both neural regulation and myogenic mechanisms contributing to the pathology under investigation [2, 19].

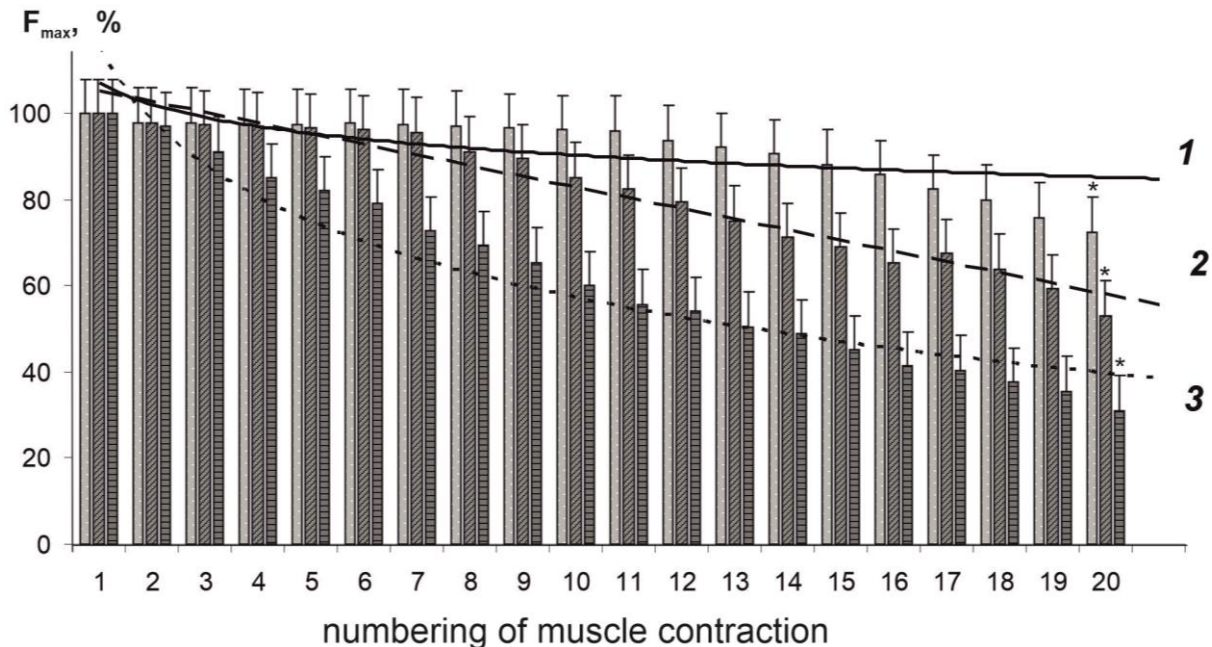


Fig. 3. The maximum force of *musculus soleus* contraction (F_{max} , presented as a percentage of the control levels taken for 100%) in obese rats caused by electrical stimulation at a frequency of 1 Hz, performed in three series (1, 2 and 3) with 5 min relaxation between each. 1–20 — the consecutive muscle contraction; * $p < 0.05$ — the difference is statistically significant compared to the Control group.

The muscle force impulse, which represents the integrated mechanical work performed by the muscle during a series of contractions, serves as an indicator of its overall functional performance [16]. The obtained results show that this parameter decreased to $83 \pm 5\%$, $67 \pm 3\%$, and $49 \pm 2\%$ in the first, second, and third series of contractions, respectively, compared with the Control group (Fig. 4). This progressive decline may be associated with increased intramuscular collagen deposition, the presence of non-functional muscle fibers, and inflammatory processes that develop against the background of obesity [20, 21].

As can be seen, in contrast to the Control group, the biomechanical parameters of muscle contraction in obese rats began to decline from the first minutes of activation (Figs. 1–4). Thus, obesity leads to a pronounced dysfunction or desynchronization of these biomechanical characteristics. As a result, the muscle, functioning as a dynamic system, is unable to adequately respond to neuronal impulses originating from the CNS [19] and therefore cannot maintain the target position or maximal force output throughout the stimulation cycle.

Changes in the chemical composition of blood during the development of fatigue processes reflect the biochemical alterations occurring in skeletal muscle [22]. One of the main biochemical indicators of muscle fatigue is the blood concentration of creatinine, the amount of which depends on muscle mass and the level of its activity. In our study, we observed an increase in creatinine concentration with the development of skeletal muscle fatigue in the Control group after each of the three series of contractions (Fig. 5). The difference in creatinine content between the first and third series was $10 \pm 1\%$, reflecting the physiological fatigue of the control muscles.

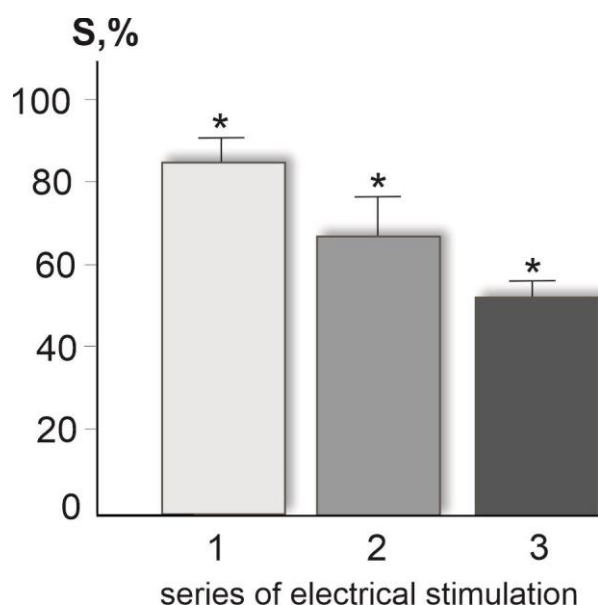


Fig. 4. The muscle force impulse (S, presented as a percentage of the control values taken for 100%) caused by electrical stimulation at a frequency of 1 Hz, performed in three series (1, 2 and 3) with 5 min relaxation between each. * $p < 0.05$ — the difference is statistically significant compared to the Control group.

In contrast, the blood creatinine concentration in obese rats was significantly higher than in the Control group across all series of the experiment. After the first and third stimulation series, the levels increased by $38 \pm 2\%$, indicating a more pronounced metabolic response (Fig. 5). It should be noted that the observed increase in blood creatinine levels in fatigued rats was not associated with any nephrotoxic effects of the barbiturates used for anesthesia, since in the Control group the rise in creatinine remained within the physiological range.

Another marker of muscle fatigue development is the content of CPK. When muscle damage or intense activity occurs, this enzyme is released from muscle cells, leading to an increase in its concentration in the blood. In our study, we observed a slight elevation in CPK levels after the development of muscle fatigue in the Control group, which indicates the presence of physiological muscle fatigue (Fig. 5). In contrast, the CPK concentration in obese rats increased by $32 \pm 2\%$ between the first and third series of contractions (Fig. 5), suggesting a significant impairment of the neuromuscular system in these animals.

In our opinion, the elevated blood CPK fraction reflects a non-specific physiological disruption of the myocyte membrane integrity, accompanied by the partial release of intracellular enzymes into the extracellular space. This process is likely associated with increased energy demands of the muscle to overcome the enhanced stiffness of active muscle components.

The level of LDH is an important marker of tissue damage and cellular destruction, and its concentration in the blood typically increases during intense muscular activity. In our study, the LDH concentration increased following the development of muscle fatigue in the Control group (Fig. 5), which is consistent with previous reports [23] describing similar elevations during high physical activity or muscle injury.

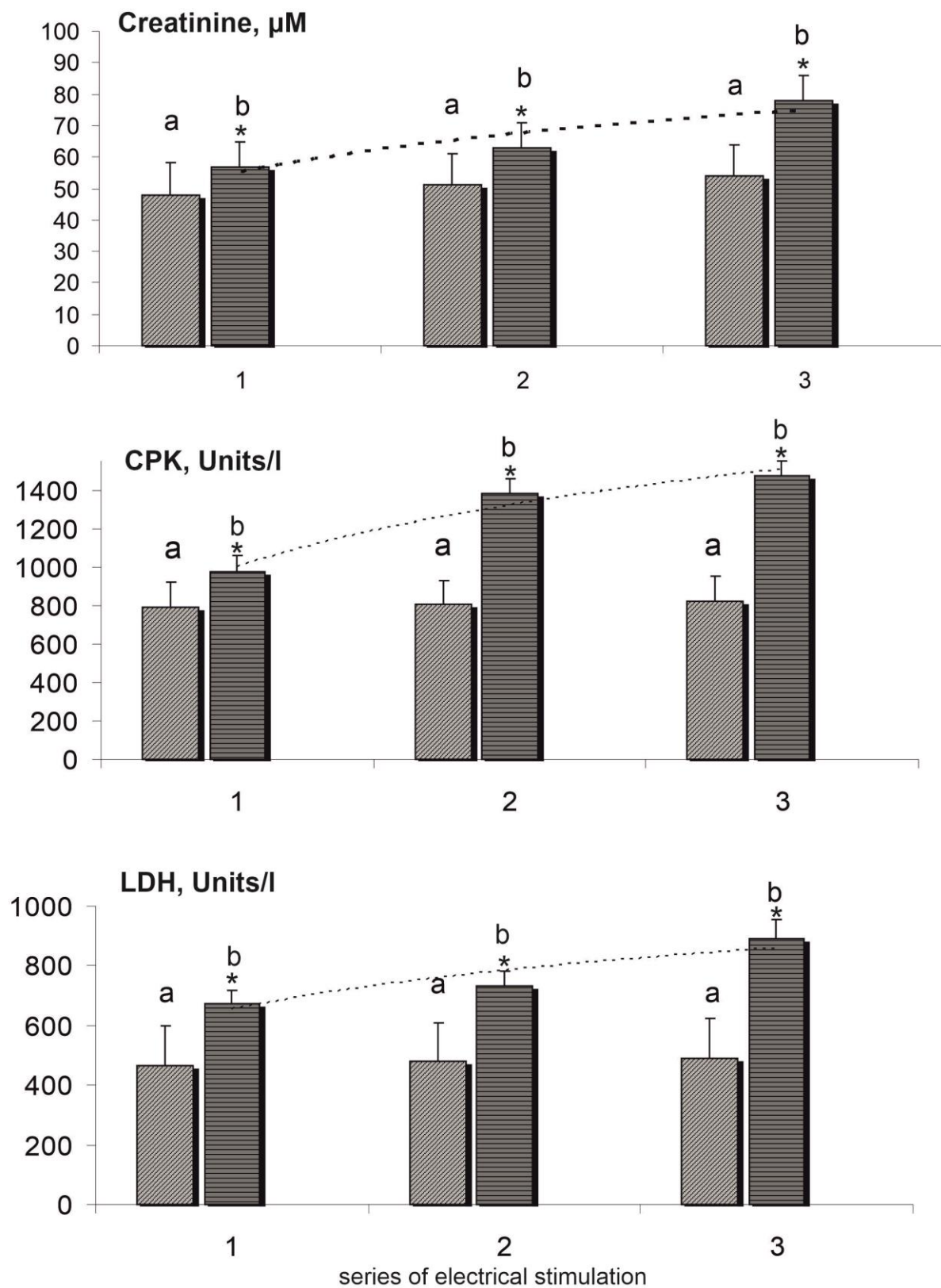


Fig. 5. The concentrations of creatinine, CPK and LDH in the blood plasma of rats after the *musculus soleus* contraction caused by electrical stimulation at a frequency of 1 Hz, performed in three series (1, 2 and 3) with 5 min relaxation between each: a — Control group; b — HCD group. * $p < 0.05$ — the difference is statistically significant compared to the Control group.

In obese rats, the LDH content increased by $27 \pm 1\%$ between the first and third series of contractions (Fig. 5), indicating that the 5-minute rest interval was insufficient for the restoration of muscle biomechanical parameters. Consequently, further stimulation resulted in both impaired activation of motoneuron pools and a significant reduction in the energy components of muscle contraction.

CONCLUSIONS

Thus, the effects of obesity on the dynamics of *musculus soleus* fatigue development and associated blood biochemical parameters in rats were investigated. The results showed that obesity causes a significant suppression of the contractile activity of the rat *musculus soleus*, with the analyzed biomechanical parameters reduced by an average of $50 \pm 5\%$. Moreover, an increase in the concentrations of the studied biochemical markers in the blood of obese rats by an average of $32 \pm 3\%$ indicates a marked impairment of neuromuscular function.

The obtained results provide new insights into the mechanisms of skeletal muscle dysfunction under metabolic overload and may contribute to the diagnosis and prevention of pathological conditions of the muscular system associated with obesity.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

Authors' ORCID ID

D. M. Nozdrenko  <https://orcid.org/0000-0001-7254-1533>
 O. V. Rizun  <https://orcid.org/0009-0004-0917-4047>
 M. Yu. Kuznietsova  <https://orcid.org/0009-0004-1110-3969>
 N. G. Raksha  <https://orcid.org/0000-0001-6654-771X>
 T. I. Halenova  <https://orcid.org/0000-0003-2973-2646>
 O. V. Lynchak  <https://orcid.org/0000-0002-1495-3190>
 V. P. Berest  <https://orcid.org/0000-0001-7779-154X>
 Yu. I. Prylutsky  <https://orcid.org/0000-0002-9847-4137>

REFERENCES

1. Kostyukov AI, Kalezić I, Serenko SG, Ljubisavljević M, Windhorst U, Johansson H. Spreading of fatigue-related effects from active to inactive parts in the medial gastrocnemius muscle of the cat. *Eur J Appl Physiol.* 2002;86(4):295–307. <https://doi.org/10.1007/s00421-001-0550-8>
2. Nozdrenko DN, Bogutskaya KI. About molecular mechanisms of fiber muscle contraction at transition to new equilibrium state: Analysis of experimental data using three-componential electrical stimulating signal. *Biopolym Cell.* 2005;21(3):283–6. <https://doi.org/10.7124/bc.0006F3>
3. Ervilha UF, Farina D, Arendt-Nielsen L, Graven-Nielsen T. Experimental muscle pain changes motor control strategies in dynamic contractions. *Exp Brain Res.* 2005;164(2):215–24. <https://doi.org/10.1007/s00221-005-2244-7>
4. Dittner AJ, Wessely SC, Brown RG. The assessment of fatigue: a practical guide for clinicians and researchers. *J Psychosom Res.* 2004;56(2):157–70. [https://doi.org/10.1016/S0022-3999\(03\)00371-4](https://doi.org/10.1016/S0022-3999(03)00371-4)
5. Boyas S, Guével A. Neuromuscular fatigue in healthy muscle: underlying factors and adaptation mechanisms. *Ann Phys Rehabil Med.* 2011;54(2):88–108. <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2011.01.001>
6. Edwards RH. Human muscle function and fatigue. *Ciba Found Symp.* 1981;82:1–18. <https://doi.org/10.1002/9780470715420.ch1>
7. Thomas CK, Bigland-Ritchie B, Johansson RS. Force-frequency relationships of human thenar motor units. *J Neurophysiol.* 1991;65(6):1509–16. <https://doi.org/10.1152/jn.1991.65.6.1509>
8. Tanner CJ, Barakat HA, Dohm GL, Pories WJ, MacDonald KG, Cunningham PR, et al. Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282(6):E1191–6. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00416.2001>
9. Fisher G, Windham ST, Griffin P, Warren JL, Gower BA, Hunter GR. Associations of human skeletal muscle fiber type and insulin sensitivity, blood lipids, and vascular hemodynamics in a cohort of premenopausal women. *Eur J Appl Physiol.* 2017;117(7):1413–22. <https://doi.org/10.1007/s00421-017-3634-9>

10. He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes*. 2001;50(4):817–23. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.4.817>
11. Darques JL, Jammes Y. Fatigue-induced changes in group IV muscle afferent activity: differences between high- and low-frequency electrically induced fatigues. *Brain Res*. 1997;750(1–2):147–54. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)01341-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)01341-8)
12. Prylutskyi YI, Vereshchaka IV, Maznychenko AV, Bulgakova NV, Gonchar OO, Kyzyma OA, et al. C₆₀ fullerene as a promising therapeutic agent for correcting and preventing skeletal muscle fatigue. *J Nanobiotechnol*. 2017;15:8. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0246-1>
13. Karpovets TP, Konopelnyuk VV, Savchuk OM, Ostapchenko LI. Food behavior of rats under development of obesity. *Res J Pharm Biol Chem Sci*. 2014;5(5):253–9. https://www.rjpbcs.com/2014_5.5.html
14. Karpovets TP, Konopelnyuk VV, Galenova TI, Savchuk OM, Ostapchenko LI. High-calorie diet as a factor of prediabetes development in rats. *Bull Exp Biol Med*. 2014;156(5):639–41. <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2414-3>
15. Harlow E, Lane D. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York; 1988. 726 p.
16. Prylutskyi Y, Nozdrenko D, Gonchar O, Prylutska S, Bogutska K, Franskevych D, et al. C₆₀ fullerene attenuates muscle force reduction in rats during fatigue development. *Heliyon*. 2022;8(12):e12449. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12449>
17. Nozdrenko D, Motuziuk O, Prylutska S, Matvienko T, Bogutska K, Franskevych D, et al. C₆₀ fullerene protective effect against the rat muscle soleus trauma. *Heliyon*. 2024; 10(11): e32677. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32677>
18. Halenova T, Raksha N, Vovk T, Savchuk O, Ostapchenko L, Prylutskyi Y, et al. Effect of C₆₀ fullerene nanoparticles on the diet-induced obesity in rats. *Int J Obes (Lond)*. 2018;42(12):1987–98. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0016-2>
19. Nozdrenko DN, Shut AN, Prylutskyi YI. Possible molecular mechanism of nonlinear muscle contraction and its experimental substantiation. *Biopolym Cell*. 2005;21(1):80–3. <https://doi.org/10.7124/bc.0006e0>
20. Cesanelli L, Minderis P, Balnyte I, Ratkevicius A, Degens H, Satkunskiene D. Obesity-driven musculotendinous remodeling impairs tissue resilience to mechanical damage. *Cell Tissue Res*. 2025;400(3):287–302. <https://doi.org/10.1007/s00441-025-03967-1>
21. Lemus SA, Mohammed J, Chen CB, Best TM, Tiozzo E, Travascio F. The role of obesity in physiological stress, balance, and proprioception during repetitive manual material handling tasks. *PLoS One*. 2025;20(5):e0324996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0324996>
22. Brancaccio P, Lippi G, Maffulli N. Biochemical markers of muscular damage. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48(6):757–67. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2010.179>
23. Pettersson J, Hindorf U, Persson P, Bengtsson T, Malmqvist U, Werkström V, et al. Muscular exercise can cause highly pathological liver function tests in healthy men. *Br J Clin Pharmacol*. 2008;65(2):253–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2007.03001.x>

БІОМЕХАНІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ СКОРОЧЕННЯ

MUSCULUS SOLEUS ЩУРІВ З ОЖИРІННЯМ

Д. М. Ноздренко¹, О. В. Різун¹, М. Ю. Кузнєцова¹, Н. Г. Ракша¹, Т. І. Галєнова¹,
О. В. Линчак¹, В. П. Берест², Ю. І. Прилуцький^{1,*}

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

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

*e-mail: prylut@ukr.net

Надійшла до редакції 20 березня 2026 р. Переглянута 27 квітня 2026 р.

Прийнята до друку 29 квітня 2026 р. Опублікована 25 червня 2026 р.

Актуальність. Ожиріння супроводжується складними метаболічними змінами, які суттєво впливають на фізіологію скелетних м'язів, зокрема їх скоротливу активність і стійкість до втоми. Проте механізми, що поєднують ожиріння з порушенням м'язової функції, залишаються недостатньо з'ясованими.

Мета. Метою цього дослідження було оцінити вплив ожиріння на біомеханічні параметри скорочення *musculus soleus* щурів за умов розвитку втоми. Поряд з цим визначали рівні креатиніну, креатинфосфокінази (КФК) та лактатдегідрогенази (ЛДГ) у крові для оцінки взаємозв'язку між метаболічними порушеннями та нервово-м'язовою дисфункцією, асоційованою з ожирінням.

Матеріали та методи. Експерименти проводили на білих нелінійних самцях щурів, розділених на контрольну та групу, що перебувала на висококалорійному харчуванні. Силу скорочення *musculus soleus* реєстрували за допомогою тензодатчиків, прикріплених до сухожил'я м'яза. Електричну стимуляцію еферентів сегментів L4-L5 здійснювали імпульсами тривалістю 2 мс з частотою 1 Гц через платинові електроди, керовані системою ADC-DAC. М'язову втому індукували трьома серіями стимуляцій,

розділеними 5-хвилинними інтервалами відпочинку. Визначали максимальну силу скорочення, час зниження сили скорочення м'яза на 25% і 50% від початкового рівня та імпульс сили м'яза. Рівні креатиніну, КФК і ЛДГ у крові визначали за використання комерційних наборів.

Результати. Встановлено, що ожиріння спричиняє значне пригнічення скоротливої активності *musculus soleus* щурів. Підвищення концентрацій креатиніну, КФК та ЛДГ у крові тварин із ожирінням свідчить про порушення нервово-м'язової функції та недостатнє відновлення під час повторних стимуляцій. Такі зміни відображають розвиток дисфункції енергетичного метаболізму та скоротливих механізмів м'язів під впливом ожиріння.

Висновки. Ожиріння призводить до вираженого пригнічення скоротливої активності *musculus soleus* і порушення нервово-м'язового гомеостазу, що підтверджується біомеханічними та біохімічними показниками. Отримані результати поглиблюють розуміння патофізіологічних основ розвитку м'язової втоми при ожирінні та можуть бути використані для діагностики ожиріння-асоційованих м'язових дисфункцій.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: *musculus soleus*; ожиріння; м'язова втома; скоротлива активність; біомеханічні параметри скорочення м'яза; біохімічні показники крові.

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-07>

UDC 577.322:004.942:616.24-006.6

COMPUTATIONAL MODELING OF SELECTED PHYTOCHEMICALS FROM *Reevesia formosana*: MECHANISTIC INSIGHTS INTO THEIR POTENTIAL AGAINST LUNG CANCER

Hung Duc Nguyen 

Faculty of Biology, Thai Nguyen University of Education, 24000, Thai Nguyen, Vietnam

e-mail: hungnd@tnue.edu.vn

Submitted December 10, 2025; Revised March 07, 2026;

Accepted March 16, 2026; Published June 25, 2026

Background: Lung cancer remains a dominant cause of cancer mortality, and impaired apoptosis mediated by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins contributes to persistence and treatment resistance. Phytochemicals from *Reevesia formosana* display reported anti-NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer) activity, yet target-level mechanisms remain incompletely defined.

Objectives: To prioritize *Reevesia formosana* phytochemicals as putative Bcl-2 (PDB ID: 6GL8) inhibitors and to derive mechanistic insight through multiscale computation.

Materials and methods: Six phytochemicals and the reference Tivantinib were docked to 6GL8, and the top candidate (CPD1) was evaluated by 100 ns molecular dynamics simulations alongside Tivantinib. MMGBSA binding free energies were computed from 125 snapshots spanning 20-100 ns. ADMET properties were predicted using pkCSM. Frontier-orbital and global reactivity descriptors were obtained by DFT.

Results: Docking ranked CPD1 highest (-10.15 kcal/mol) relative to Tivantinib (-8.83 kcal/mol), with hydrogen bonding to Tyr108 and Arg129 and extensive pocket complementarity. MD trajectories indicated a more confined CPD1-6GL8 complex (RMSD mainly 0.18–0.22 nm) than Tivantinib-6GL8 (0.21–0.26 nm, occasional 0.27–0.28 nm), with comparable compactness (Rg of 1.44 nm) and bounded SASA. Hydrogen-bond counts supported intermittent polar anchoring for CPD1 (0–3) and higher early sampling for Tivantinib. MMGBSA favored CPD1 (Δ TOTAL -32.87 ± 4.28 kcal/mol) over Tivantinib (-17.27 ± 2.81 kcal/mol), supported by stronger Δ VDWAALS (-40.76 vs -31.34 kcal/mol) and a smaller Δ G_{SOLV} (20.28 vs 24.14 kcal/mol). ADMET prediction indicated high intestinal absorption with limited solubility, restricted BBB/CNS permeability, fewer CYP inhibition flags, and no hepatotoxicity alert for CPD1, while hERG II inhibition was flagged for both ligands. DFT showed similar EHOMO (eV) but a narrower Δ E (eV) and higher ω (eV) for CPD1 than for Tivantinib.

Conclusions: Integrated modeling prioritizes CPD1 as a Bcl-2-targeting scaffold for lung cancer-relevant studies, supporting structure-guided optimization and experimental verification.

KEY WORDS: ADMET; anti-apoptosis; Bcl-2; MMGBSA; molecular modeling; *Reevesia formosana*.

Cancer was a leading cause of death globally in 2020, responsible for nearly 10 million deaths, or about one in six total deaths, with major risk factors being lifestyle-related and infections, disproportionately affecting low- and middle-income countries. Among of those, lung cancer is a major global health issue, consistently the leading cause of cancer deaths

Citation: Nguyen HD. Computational modeling of selected phytochemicals from *Reevesia formosana*: mechanistic insights into their potential against lung cancer. Biophysical Bulletin. 2026;55:76–94. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-07>

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

worldwide, responsible for nearly 1.8 million deaths annually, driven primarily by tobacco but also by air pollution, with disparities seen globally [1]. The primary cause of lung cancer is smoking tobacco, responsible for 80-90% of cases, due to over 60 carcinogens in smoke, but other major factors include secondhand smoke, radon gas, asbestos, air pollution, and genetic predispositions, affecting both smokers and non-smokers [2]. Lung cancers are primarily divided into two main groups: Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC), which is the most common type (about 85%) and grows slower, and Small Cell Lung Cancer (SCLC), which is more aggressive and makes up about 15% of cases, with a third, much rarer category being lung carcinoid tumors [3]. In NSCLC, evasion of programmed cell death is frequently supported by dysregulation of apoptosis-regulatory networks, including increased activity of anti-apoptotic members of the Bcl-2 family, enabling survival of genetically compromised cells and contributing to treatment resistance. Bcl-2 is a key anti-apoptotic protein that helps cancer cells, including those in NSCLC, survive by preventing programmed cell death, often leading to chemotherapy resistance [4, 5]. Accordingly, therapeutic inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins may re-establish apoptotic signaling and mitigate resistance to standard chemotherapy and radiotherapy in NSCLC.

Programmed cell death by apoptosis represents a tightly regulated biological pathway defined by characteristic morphological and biochemical hallmarks, including cell shrinkage, chromatin condensation, membrane blebbing, and caspase-driven proteolysis [6]. In many cancers, impaired mitochondrial apoptosis is closely linked to dysregulation of the Bcl-2 family, a network of pro- and anti-apoptotic regulators that controls mitochondrial outer membrane permeabilization and downstream caspase activation. Overexpression or functional dominance of anti-apoptotic members such as Bcl-2 contributes to apoptosis evasion and therapeutic resistance, supporting pharmacological blockade of Bcl-2 as a rational anticancer strategy [7]. Consequently, the central role of Bcl-2-mediated apoptotic blockade in cancer progression and drug resistance motivates the search for new, chemically diverse Bcl-2 inhibitors, for which natural products offer an especially rich and underexploited source of apoptosis-modulating scaffolds [8].

Plant-derived compounds are crucial in drug discovery, providing complex scaffolds for treatments like anticancer, highlighting their ongoing importance despite synthetic challenges, as they offer unique structures and often lower toxicity than purely synthetic counterparts, driving innovation in areas from oncology to neurology [9, 10]. Plant-derived compounds show significant promise in treating NSCLC by inhibiting cancer cell growth, inducing death, and modulating signaling pathways, often acting as adjuvants to enhance chemotherapy/targeted therapy effectiveness and overcome drug resistance, highlighting their potential to improve treatment outcomes and quality of life, though more clinical trials are needed [11, 12]. Building on this therapeutic potential, computational modeling provides a rational and resource-efficient framework to clarify how such phytochemicals engage molecular targets, prioritize candidates, and generate mechanistic hypotheses prior to extensive experimental validation. The mechanism of plant-derived compounds is unveiled computationally through a multi-stage process that integrates various bioinformatics and cheminformatics methods. These approaches streamline the traditional drug discovery pipeline, making it faster and more cost-effective than solely experimental methods [11, 13]. *Reevesia formosana* Sprague is highly cytotoxic, with its root, stem, and fruits containing potent anticancer compounds that showed significant activity against various cancer cell lines, making it a standout among many Formosan plants studied for their bioactivity. Previous study on this species led to the isolation of several phytochemicals with anti NSCLC activity against the NCI-H460 cancer cell line [14]. Despite these advances, the mechanistic underpinnings of their bioactivity, particularly within apoptosis-regulatory pathways, remain underexplored. Therefore, the aim of this study was to prioritize selected

phytochemicals from *R. formosana* as putative Bcl-2 (PDB ID: 6GL8) inhibitors and to gain mechanistic insight into their binding behavior using an integrated in silico approach, including molecular docking, molecular dynamics simulations, MMGBSA, ADMET prediction, and DFT-based electronic descriptors. The combined outputs support prioritization of these phytochemicals for subsequent experimental validation and structure-guided optimization in lung cancer-relevant models, while safety-related inferences remain provisional until confirmation through dedicated in vitro and in vivo investigations.

MATERIALS AND METHODS

Structural preparation of selected ligands

These selected phytochemical, including reevesioside J (CPD1), epi-reevesioside K (CPD2), reevesiterpenol C (CPD3), reevesiterpenol E (CPD4), strophanthidin (CPD5), oleanolic acid (CPD6), have molecular formulas of $C_{30}H_{44}O_8$, $C_{30}H_{38}O_{10}$, $C_{15}H_{20}O_4$, $C_{16}H_{16}O_5$, $C_{23}H_{32}O_6$, $C_{30}H_{48}O_3$, respectively, with molecular weights of 532.3036, 558.2465, 264.1362, 288.0998, 404.2199, 456.3603 *g/mol*. Tivantinib, possessing a molecular formula of $C_{23}H_{19}N_3O_2$ and a molecular weight of 369.1477 *g/mol*, was chosen as the positive control (Fig. 1).

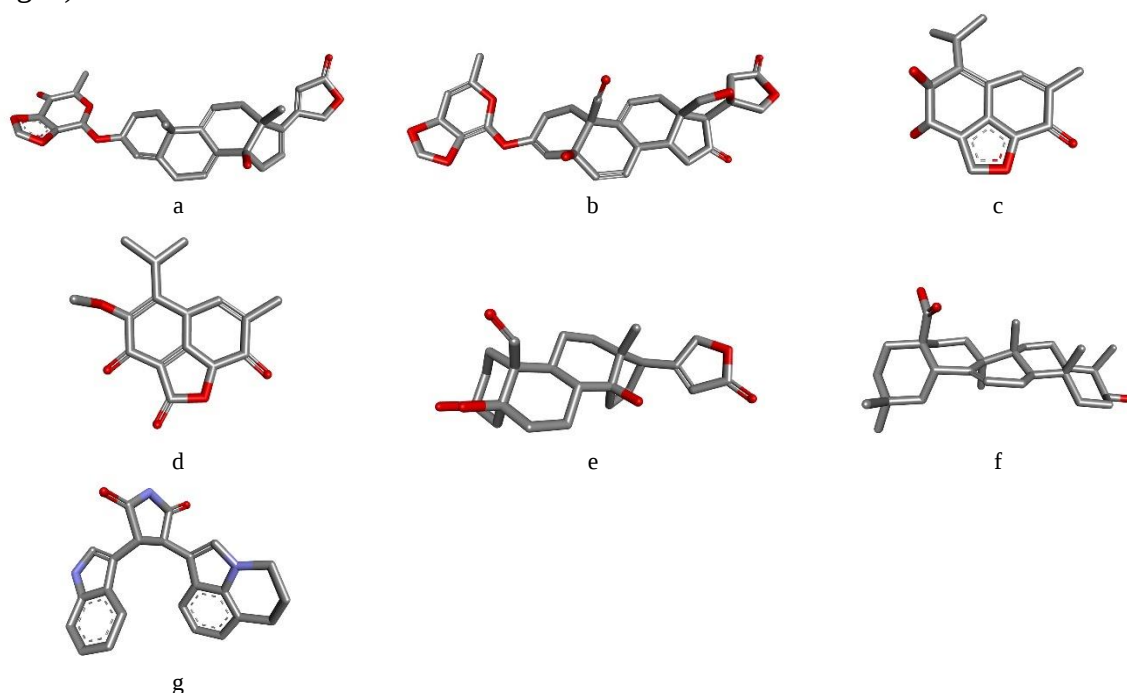


Fig. 1. 3D structures of selected phytochemicals. (a) CPD1; (b) CPD2; (c) CPD3; (d) CPD4; (e) CPD5; (f) CPD6; (g) Tivantinib.

Molecular docking study

Three-dimensional geometries of the selected ligands were constructed with BIOVIA Discovery Studio Visualizer and saved in PDB format. Polar hydrogen atoms were added, Gasteiger partial charges were assigned, and all rotatable bonds were treated as flexible for the docking procedure. The crystallographic structure of Bcl-2 (PDB ID: 6GL8) was retrieved from the RCSB Protein Data Bank in PDB format [15]. Non-protein entities (co-crystallized ligand and crystallographic waters) were removed to avoid bias in the binding site. The receptor was checked for incomplete residues/atoms and corrected when needed. Polar hydrogens were added, and Gasteiger partial charges were assigned to the receptor. The prepared receptor was saved in PDBQT format for docking. Ligand-protein docking was performed in AutoDock

Tools, using a grid with 60 points along each of the x, y, and z directions and a spacing of 0.375 Å. The grid was centered on the binding pocket of 6GL8, defined by coordinates $x = 9.866$ Å, $y = 0.590$ Å, and $z = 16.717$ Å. Conformational sampling employed the Lamarckian genetic algorithm, which enabled identification of low-energy binding modes and energetically favorable interaction patterns. For each ligand, the highest-ranked pose was subsequently examined in Discovery Studio Client 2024 and compared with the docking configuration of Tivantinib on the same Bcl-2 structure in order to assess similarities in binding mode and interaction profile [16].

Molecular dynamics simulation

Molecular dynamics simulations of the highest-ranked docking pose of the ligand in complex with the Bcl-2 protein (PDB ID: 6GL8) were performed for 100 ns using GROMACS 2024.4 [17]. Prior to the production stage, the protein structure was refined in Swiss-PdbViewer by reconstructing missing residues and atoms [17]. Force-field parameters compatible with the simulation were generated for the ligand using SwissParam [18]. The refined complex was inserted into a triclinic simulation box containing SPC water molecules and supplemented with 0.15 M NaCl to reproduce physiological ionic strength. Energy minimization was executed for 50,000 steps to reduce steric conflicts and stabilize electrostatic interactions. System equilibration employed a two-phase protocol, consisting of a 200 ps NVT stage followed by a 200 ps NPT stage, both maintained at 300 K and 1 bar. Production simulations were conducted in three independent replicas, each extending for 100 ns with a 2 fs integration timestep, and trajectory frames were stored every 10 ps. Trajectory analysis with Grace quantified root mean square deviation (RMSD), root mean square fluctuation (RMSF), radius of gyration (Rg), number of hydrogen bonds (H-bonds), and solvent-accessible surface area (SASA). Structural superimposition in UCSF Chimera 1.13.3 allowed assessment of conformational stability across all simulated complexes [19]. To evaluate interaction persistence, ligand orientations at 0 ns and 100 ns were aligned within the binding site, and the continuity of hydrogen bonding, van der Waals forces, and hydrophobic interactions throughout the 100 ns simulation was examined to provide insight into the durability and dynamical behavior of the complex.

Binding free energy calculation using MMGBSA

Binding free energy estimation for the CPD1-6GL8 and Tivantinib-6GL8 complexes was conducted with the `gmx_MMPBSA` workflow under the `charmm36` force field. The polar term of solvation was evaluated using a generalized Born implicit-solvent formulation, whereas the non-polar contribution was derived from solvent-accessible surface area calculations. Calculations were performed on an ensemble of snapshots obtained from the molecular dynamics trajectories during the 20–100 ns window (80 ns total), comprising 125 evenly distributed frames sampled at 80 ps intervals. This trajectory-averaged strategy allowed quantitative comparison of the interaction energetics of the two ligands, thereby elucidating differences in relative binding affinity and complex stability across the analyzed simulation segment [20].

ADMET prediction

Assessment of ADMET attributes constitutes a fundamental component of preclinical screening, enabling early recognition of pharmacokinetic limitations and safety liabilities, reducing late-stage failure, and improving prioritization of candidates with favorable therapeutic potential. In the present work, the pkCSM platform was employed to predict the ADMET profiles of CPD1 and Tivantinib. pkCSM generates estimates using graph-based

molecular signatures, thereby supporting a structured evaluation of absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity characteristics for the selected compounds [21].

Quantum DFT Analysis

Geometry optimisation of CPD1 and Tivantinib was executed in the ORCA quantum-chemistry package (v6.1.0). Starting conformations were generated in Avogadro, whereas molecular orbital inspection and associated electronic evaluations were performed in IboView (v20211019) [22–24]. Density functional theory calculations were carried out using the B3LYP exchange-correlation functional in combination with the 6-31G(d,p) basis set to obtain consistent electronic wavefunctions. Using the converged, fully optimised structures, quantum-chemical descriptors were computed, including the energies of the highest occupied molecular orbital (HOMO) and the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO), the HOMO-LUMO energy gap (ΔE), chemical potential (μ), electronegativity (χ), global hardness (η), softness (σ), and electrophilicity index (ω). These indices were interpreted under the Koopmans' theorem framework to delineate electronic characteristics and infer the chemical reactivity of the investigated compounds [25, 26].

RESULTS AND DISCUSSION

Molecular docking analysis

Molecular docking assess how well potential drug molecules fit into a protein's binding site, predicting their binding affinity and pose, crucial for drug discovery to find potent inhibitors by ranking compounds based on scores and identifying key interactions with the target protein, often followed by more detailed molecular dynamics simulations for stability analysis. Before docking the ligands into 6GL8, protocol performance was assessed by re-docking the co-crystallized ligand (Fig. 2). The re-docked conformation closely matched the experimentally observed binding orientation, with an RMSD of 0.7540 Å, supporting adequacy of the docking parameters and search space definition. In docking validation, RMSD values below 2 Å are commonly regarded as indicative of acceptable pose reproduction and methodological reliability [27]. After validation, docked conformations were ranked by predicted binding score, where increasingly negative binding energies (kcal/mol) correspond to more favorable predicted binding.

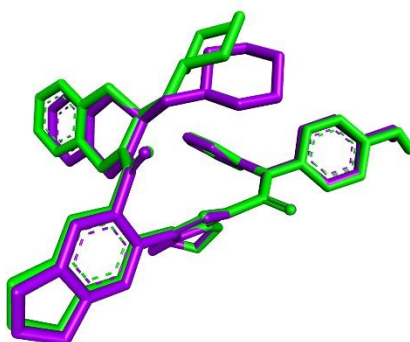


Fig. 2. The superimposition of the docked and native ligands within 6GL8 protein for validation of the molecular docking protocol (violet = native, green = docked).

As summarized in Table 1, docking-derived binding energies and residue-level contact patterns were evaluated for six phytochemical candidates (CPD1–CPD6) within a conserved pocket characterized by recurrent participation of Phe104, Tyr108, Asp111, Phe112, Gln118, Leu137, Ala149, and Phe153. Tivantinib served as the reference ligand under the same docking

protocol. Across all complexes, the interaction landscape reflected a combination of hydrogen bonding and short-range contact complementarity within an aromatic-aliphatic cavity enriched in Phe and Tyr side chains, with polar anchoring frequently involving Asp111 and Gln118.

Table 1. The interactions between the docked ligands and the protein 6GL8

Docked ligands	Binding energy (kcal/mol)	Hydrogen bond	Van der Waals force	Hydrophobic interaction
CPD1	-10.15	Tyr108, Arg129	Asp111, Phe112, Gln118, Thr132, Glu136, Leu137, Ala149	Phe104, Tyr108, Met115, Leu119, Val133, Phe153
CPD2	-9.25	-	Met115, Gln118, His120, Arg129, Thr132, Glu136, Arg146	Phe104, Tyr108, Leu119, Val133, Ala149, Phe153
CPD3	-6.64	-	Asp111, Gln118, Leu119, Val133, Glu152, Phe153	Phe104, Tyr108, Phe112, Met115, Leu137, Ala149
CPD4	-6.44	Gln118	Asp111, Glu114, Phe152	Phe104, Tyr108, Phe112, Met115, Leu119, Val133, Leu137, Ala149
CPD5	-6.87	Gln118	Tyr108, Asp111, Leu119, Arg129, Ala149, Glu152	Phe104, Phe112, Met115, Val133, Phe153
CPD6	-8.78	Asp111, Arg129	Phe104, Gln118, Thr132, Glu136, Leu137	Phe112, Met115, Leu119, Arg129, Val133, Phe153
Tivantinib	-8.83	Ala149	Asp111, Gln118, Leu137, Phe150, Glu152, Phe153	Phe104, Tyr108, Phe112, Met115, Leu119, Val133, Ala149

Within the selected ligands, predicted affinities spanned -10.15 to -6.44 kcal/mol. CPD1 exhibited the most favorable binding energy (-10.15 kcal/mol) and engaged the full set of canonical pocket residues (Phe104, Tyr108, Asp111, Phe112, Gln118, Leu137, Ala149, Phe153). In addition, CPD1 formed two hydrogen bonds involving Tyr108 and Arg129, consistent with a binding pose stabilized by both aromatic enclosure and directional polar constraints (Fig. 3a). CPD2 ranked second by docking score (-9.25 kcal/mol) and maintained contacts with key residues (Phe104, Tyr108, Gln118, Leu137, Ala149, Phe153), with additional proximity to Arg146. However, no hydrogen bond was annotated for CPD2, suggesting that the predicted stabilization may primarily arise from nonpolar packing and van der Waals complementarity rather than explicit polar locking. The selected receptor 6GL8 is a co-crystal structure of Bcl-2 bound to S55746, a selective BH3-mimetic that occupies the hydrophobic groove of Bcl-2. In the reported binding mode, S55746 forms a single hydrogen bond to the backbone carbonyl of Ala149 and is stabilized by extensive hydrophobic and van der Waals interactions within the BH3 groove [15]. Based on the deposited 6GL8 coordinates, residues

lining the S55746 pocket include Phe104, Tyr108, Asp111, Phe112, Met115, Gln118, Val133, Glu136, Leu137, Gly145, Arg146, Ala149, Glu152, and Phe153, defining a conserved aromatic-aliphatic cavity. Notably, CPD1 recapitulates multiple key groove contacts observed for S55746, including Phe104, Tyr108, Asp111, Phe112, Met115, Gln118, Val133, Glu136, Leu137, Ala149, and Phe153, supporting that CPD1 is positioned within the canonical BH3-binding groove similarly to a crystallographically validated Bcl-2 inhibitor, while exhibiting an alternative polar-anchoring pattern (Tyr108 and Arg129).

The reference compound Tivantinib yielded a binding energy of -8.83 kcal/mol, with contacts mapped to the core pocket residues (Phe104, Tyr108, Asp111, Phe112, Gln118, Leu137, Ala149, Phe153) and a hydrogen bond assigned to Ala149. CPD6 displayed a closely comparable affinity (-8.78 kcal/mol) and contacted Phe104, Asp111, Phe112, Gln118, Leu137, and Phe153, while the hydrogen-bond network involved Asp111 and Arg129. Notably, Ala149 did not appear among the CPD6 contact residues, indicating a slightly shifted occupancy within the pocket relative to Tivantinib, despite preservation of interactions around Asp111/Gln118 and the aromatic residues (Fig. 3b).

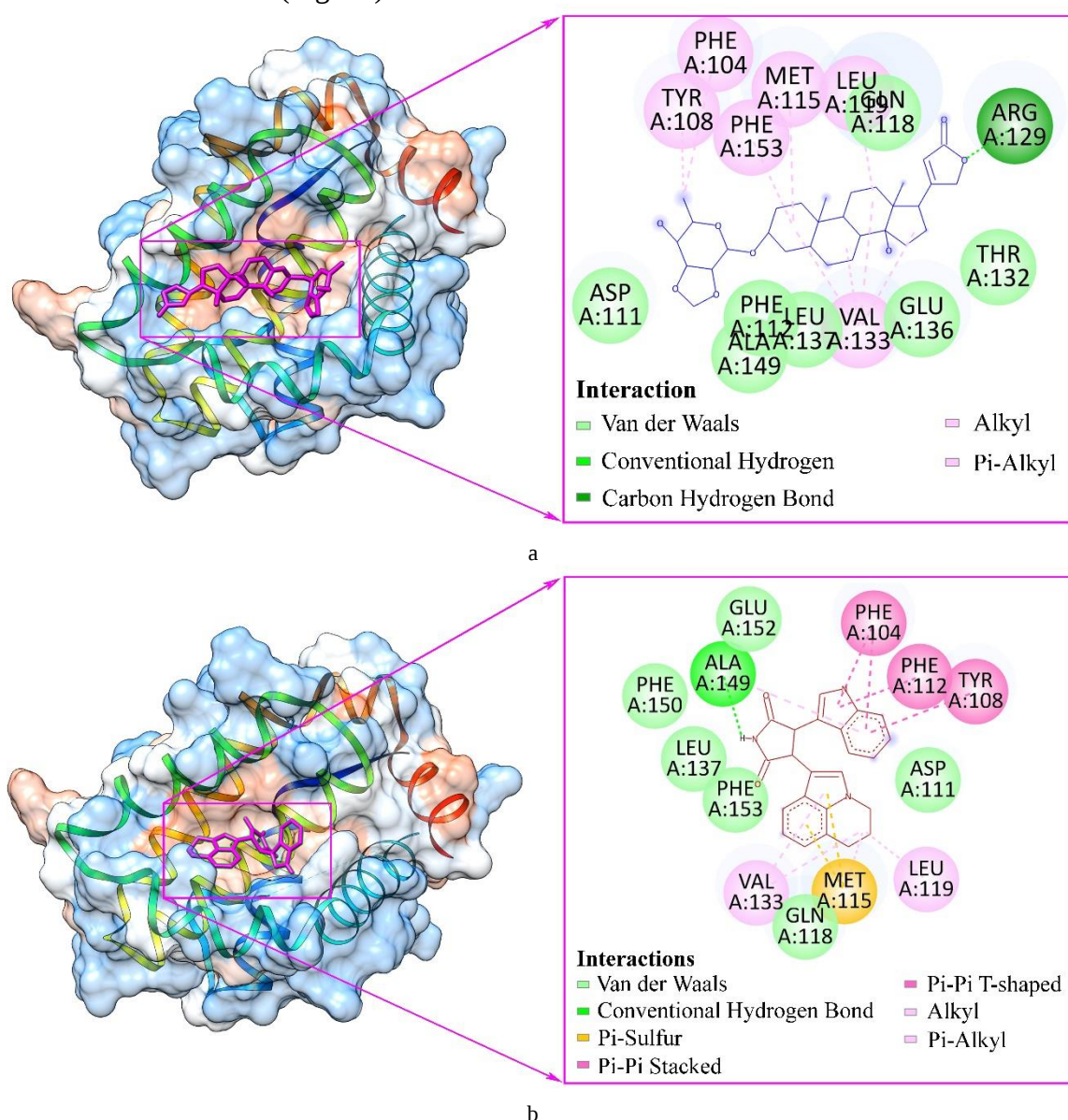


Fig. 3. Molecular docking model and 2D interaction diagram of CPD1 (a), and Tivantinib (b) with 6GL8 protein.

The remaining ligands showed more moderate predicted stabilization. CPD5 produced -6.87 kcal/mol and included a hydrogen bond to Gln118, alongside contacts with Phe104, Tyr108, Asp111, Phe112, Ala149, and Phe153. CPD3 (-6.64 kcal/mol) and CPD4 (-6.44 kcal/mol) both retained the canonical pocket residue set, yet CPD3 lacked annotated hydrogen bonding whereas CPD4 presented a single hydrogen bond to Gln118. Collectively, the dataset indicates that higher affinity within this series coincided with retention of the core pocket residues, supplemented in several cases by hydrogen-bond formation at Tyr108, Asp111, Gln118, Ala149, or Arg129. On the basis of docking, CPD1 and CPD2 outperformed Tivantinib, while CPD6 showed near-equivalent affinity. CPD1 was therefore advanced to molecular dynamics as the top-ranked scaffold, with CPD2 and CPD6 reserved for subsequent simulation-based validation.

Molecular dynamics simulations analysis

Molecular dynamics simulation represents a widely adopted approach in contemporary drug discovery, enabling time-resolved, atomistic characterization of ligand-target recognition. By propagating atomic trajectories under defined thermodynamic conditions, molecular dynamics elucidates conformational flexibility, binding-mode stability, and interaction energetics that inform mechanistic interpretation of molecular association. The resulting ensembles provide access to protein dynamical behavior, including transient pocket formation and allosteric communication, and delineate the influence of solvent structure and water-mediated contacts on affinity and selectivity. These capabilities facilitate rational lead optimization and can reduce reliance on extensive experimental iteration; however, integration with experimental validation remains essential to ensure translational reliability of computational predictions [28]. Integrating molecular docking with molecular dynamics provides an efficient structure-based workflow: docking rapidly screens binding poses and approximates affinity, whereas molecular dynamics evaluates time-dependent stability under conformational flexibility and solvent effects. This combination reduces false positives and improves lead optimization from initial hits to refined candidates [29]. Therefore, the evaluation systematically investigated RMSD, RMSF, Rg, H-bonds, and SASA metrics to determine the stability, flexibility, and solvent exposure of the CPD1-6GL8 and Tivantinib-6GL8 complexes throughout the simulation. Consequently, the total energy and potential energy values for the CPD1-6GL8 complex were found to be -227,502 kJ/mol and -282,584 kJ/mol, respectively. For the Tivantinib-6GL8 complex, the total energy and potential energy values were measured at -228,160 kJ/mol and -283,113 kJ/mol, respectively. The simulation system maintained equilibrium at a temperature of 300 K.

Root mean square deviation (RMSD) provides a time-resolved measure of structural departure from the starting reference after optimal superposition, and is routinely applied to evaluate equilibration behavior and overall conformational stability during molecular dynamics simulations [30]. Over the 100 ns trajectory, the CPD1-6GL8 complex exhibited an initial accommodation within the first several nanoseconds and subsequently remained largely confined, with RMSD values predominantly distributed around 0.18–0.22 nm (Fig. 4a). In contrast, the Tivantinib-6GL8 complex showed a comparable early regime but transitioned toward higher RMSD after approximately the first third of the simulation, fluctuating mainly around 0.21–0.26 nm with sporadic excursions approaching 0.27–0.28 nm. The absence of abrupt jumps suggests preservation of the folded framework in both systems; however, the consistently lower RMSD envelope observed for CPD1 indicates tighter structural confinement relative to the reference ligand under the simulated conditions.

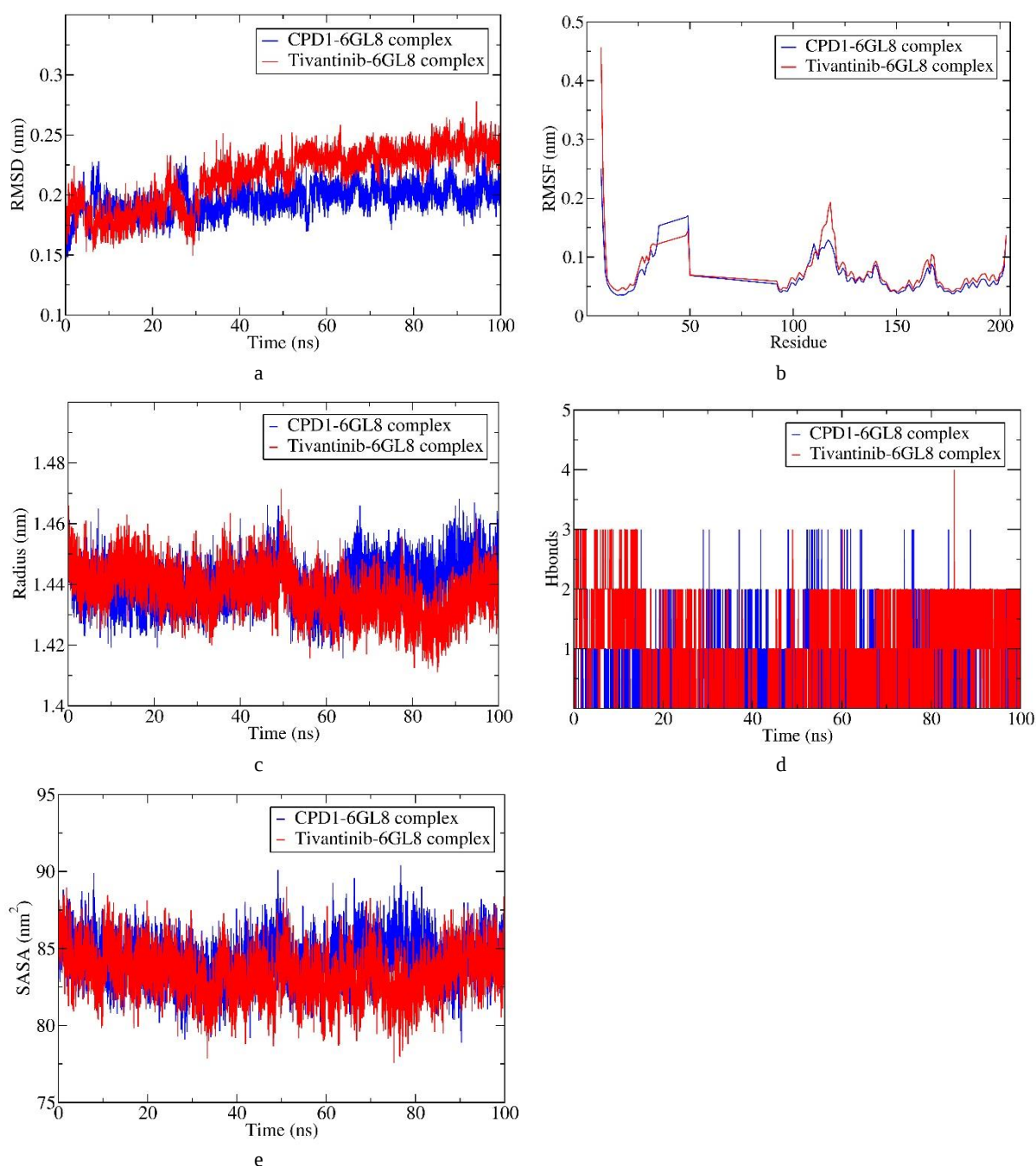


Fig. 4. Results of MD simulation for the bindings of CPD1 (blue) and Tivantinib (red) with 6GL8 protein. (a) RMSD, (b) RMSF, (c) Rg, (d) H-bonds, and (e) SASA.

Root mean square fluctuation (RMSF) quantifies residue-wise mobility around the time-averaged position, enabling localization of flexible segments and comparatively rigid secondary-structure elements [31]. After recalculation of RMSF on a residue basis from the 100 ns trajectories, both complexes displayed the expected non-uniform fluctuation pattern across 6GL8, with the highest mobility localized at the N-terminal region and several additional local maxima along the sequence (Fig. 4b). The largest fluctuation was observed at Gly7 in both systems, reaching 0.249 nm for CPD1-6GL8 and 0.456 nm for Tivantinib-6GL8, indicating markedly greater terminal mobility in the Tivantinib-bound complex. Beyond the N-terminus, local fluctuation peaks were evident in the regions around residues 24–35, 48–50, and most prominently 114–120, with Tivantinib generally producing higher RMSF values than CPD1. In

particular, the 114–120 segment reached approximately 0.116–0.129 nm in the CPD1-6GL8 complex, whereas the corresponding values in the Tivantinib-6GL8 complex increased to about 0.147–0.193 nm. Across most of the remaining structured residues, RMSF values remained relatively low, predominantly within 0.04–0.09 nm for both systems, consistent with preservation of the overall protein fold during simulation. Collectively, the corrected residue-wise RMSF analysis indicates that the Tivantinib-bound complex undergoes somewhat greater local mobility than the CPD1-bound complex, whereas CPD1 maintains comparably lower fluctuations over much of the 6GL8 structure, supporting slightly greater dynamic stabilization under the simulated conditions. Because the crystallographic structure of 6GL8 contains unresolved segments, residue numbering in the RMSF plot follows the native PDB indexing, and missing regions are absent from the profile rather than analyzed as continuous residues.

The radius of gyration (R_g) reflects mass-weighted compactness of the protein assembly and is commonly monitored to detect expansion or compaction events during simulation. As shown in Figure 4c, both complexes maintained R_g within a narrow band centered near 1.44 nm, indicating sustained global compactness without signatures of unfolding. CPD1-6GL8 fluctuated approximately within 1.42–1.47 nm, with a modest upward tendency after 65 ns toward the 1.45–1.46 nm region. Tivantinib-6GL8 occupied a similar interval but exhibited a clearer transient compaction during 75–85 ns, with minima approaching 1.41–1.42 nm. These patterns indicate stable global architecture for 6GL8 in both ligand-bound states, with small ligand-dependent shifts in compactness.

In molecular dynamics, the number of hydrogen bonds (H-bonds) indicates the strength, stability, and structural integrity of interactions, showing how many temporary links form between molecules over time; a higher count often means stronger binding/structure, while tracking changes reveals dynamic processes like protein folding, binding/unbinding, or solvent effects, influencing overall system stability and function [32]. Across the 100 ns simulation (Fig. 4d), the CPD1-6GL8 complex exhibited H-bonds values primarily between 0 and 2, interspersed with short-lived events reaching 3. The Tivantinib-6GL8 complex displayed a broader distribution, commonly populating 1–2 and frequently sampling 3 during the early segment of the trajectory, with an isolated spike reaching 4 near the late stage. Collectively, the profiles indicate that polar contacts persisted intermittently in both systems; the reference ligand showed a higher early-time propensity for multiple H-bonds, whereas CPD1 maintained stability despite a lower upper bound for most of the trajectory.

Solvent-accessible surface area (SASA) reports the extent of solvent exposure and is sensitive to changes in packing and conformational breathing motions. The SASA traces for both complexes remained within a confined range throughout 100 ns, without sustained drift indicative of progressive expansion or collapse (Fig. 4e). CPD1-6GL8 fluctuated approximately within 79–90 nm² and showed a modest elevation during 60–85 ns relative to earlier frames, consistent with slightly increased solvent exposure. Tivantinib-6GL8 spanned roughly 78–89 nm² and displayed comparatively lower SASA during the same window, suggesting transiently reduced exposure and marginally tighter packing. The broadly similar oscillatory behavior across both systems supports stable solvent-exposed surface properties over the analyzed trajectory.

Collectively, the integrated molecular dynamics descriptors delineate the dynamic stability and binding behavior of the CPD1-6GL8 and Tivantinib-6GL8 complexes, underscoring the contribution of 6GL8 pocket dynamics to ligand accommodation. The CPD1-6GL8 system exhibited a generally lower RMSD envelope with comparable compactness and controlled residue-level mobility in the Gly7–Gly203 region, supporting a slightly more stable association than the Tivantinib-6GL8 complex under identical conditions. These observations indicate that CPD1 can sustain persistent binding within the 6GL8 site and merits prioritization as a promising alternative scaffold for further investigation.

MMGBSA calculation

MMGBSA (Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area) is a fast, efficient computational method in drug discovery that estimates ligand-receptor binding free energy by combining molecular mechanics with implicit solvation models, analyzing snapshots from molecular dynamics) to score potential drug candidates, rank binding poses, and predict relative affinities, helping to filter promising compounds by breaking down energy into gas-phase, polar solvation, and nonpolar contributions. It's a powerful tool for virtual screening and lead optimization, offering a good balance between accuracy and computational cost compared to more rigorous methods [33]. Binding free energies of the CPD1-6GL8 and Tivantinib-6GL8 complexes were quantified using the MMGBSA scheme, where the binding term is defined as $\Delta G_{\text{bind}} = G_{\text{complex}} - (G_{\text{receptor}} + G_{\text{ligand}})$. Although ΔG_{bind} can be written in the thermodynamic form $\Delta H - T\Delta S$, omission of configurational entropy yields an enthalpy-weighted metric that remains informative for relative ranking when both ligands are evaluated under the same trajectory sampling and energy model. Energy decomposition was used to resolve the balance between gas-phase interactions ($\Delta G_{\text{GAS}} = \Delta \text{VDWAALS} + \Delta \text{EEL}$) and solvation contributions ($\Delta G_{\text{SOLV}} = \Delta \text{EGB} + \Delta \text{ESURF}$), enabling interpretation of the dominant stabilization factors.

Table 2. Free energy of binding obtained using MMGBSA calculations

Energy Component	Average (kcal/mol)		Standard Deviation	
	CPD1-6GL8	Tivantinib-6GL8	CPD1-6GL8	Tivantinib-6GL8
$\Delta \text{VDWAALS}$	-40.76	-31.34	3.62	2.78
ΔEEL	-12.38	-10.07	8.53	6.05
ΔEGB	25.22	28.45	7.93	4.72
ΔESURF	-4.93	-4.31	0.51	0.29
ΔGGAS	-53.15	-41.41	10.46	6.19
ΔGSOLV	20.28	24.14	7.55	4.57
ΔTOTAL	-32.87	-17.27	4.28	2.81

Consistent with the docking prioritization of CPD1 and the subsequent dynamics indicating tighter structural confinement, MMGBSA analysis produced negative total binding free energies for both complexes, with a pronounced advantage for CPD1. As detailed in Table 2, the mean ΔTOTAL reached -32.87 ± 4.28 kcal/mol for CPD1-6GL8, compared with -17.27 ± 2.81 kcal/mol for Tivantinib-6GL8, corresponding to a 15.60 kcal/mol more favorable estimate for CPD1. The larger dispersion for CPD1 suggests broader energetic sampling across the trajectory, yet the mean difference remains substantial relative to the reported standard deviations. The enhanced affinity of CPD1 is primarily explained by stronger gas-phase interactions. The gas-phase term was $\Delta G_{\text{GAS}} = -53.15 \pm 10.46$ kcal/mol for CPD1, whereas Tivantinib yielded -41.41 ± 6.19 kcal/mol. This gap is driven mainly by van der Waals stabilization, with $\Delta \text{VDWAALS} = -40.76 \pm 3.62$ kcal/mol for CPD1 versus -31.34 ± 2.78 kcal/mol for Tivantinib, indicating tighter short-range packing and shape complementarity in the CPD1-bound state. This pattern aligns with the docking contact map that placed CPD1 deeply within an aromatic-aliphatic cavity enriched in Phe/Tyr side chains and reported

extensive nonpolar contacts (Phe104, Tyr108, Met115, Leu119, Val133, Phe153) together with proximity to canonical pocket residues. Electrostatic interactions contribute additional stabilization in both systems and modestly favor CPD1 ($\Delta EEL = -12.38 \pm 8.53$ kcal/mol) over Tivantinib (-10.07 ± 6.05 kcal/mol). The comparatively higher variability of ΔEEL relative to $\Delta VDWAAALS$ is compatible with time-dependent rearrangements of polar contacts during dynamics, particularly given that hydrogen-bond occupancy was intermittent over the 100 ns trajectories. Solvation effects oppose binding for both ligands, with $\Delta G_{SOLV} = 20.28 \pm 7.55$ kcal/mol for CPD1 and 24.14 ± 4.57 kcal/mol for Tivantinib. The unfavorable solvation term is dominated by the polar GB component ($\Delta EGB = 25.22 \pm 7.93$ kcal/mol for CPD1; 28.45 ± 4.72 kcal/mol for Tivantinib), whereas the nonpolar surface contribution provides a smaller favorable offset ($\Delta ESURF = -4.93 \pm 0.51$ kcal/mol for CPD1; -4.31 ± 0.29 kcal/mol for Tivantinib). Therefore, beyond stronger gas-phase attraction, CPD1 also experiences a reduced desolvation penalty, which further shifts $\Delta TOTAL$ toward more favorable values. This solvation profile is congruent with the dynamics-derived picture of stable pocket accommodation without sustained expansion of solvent exposure, as SASA remained within a narrow range for both systems, supporting comparable global solvation environments while permitting ligand-specific differences in local desolvation costs.

Taken together, the MMGBSA decomposition indicates that the superior binding estimate for CPD1-6GL8 originates chiefly from more favorable van der Waals interactions and a lower polar solvation penalty, with electrostatics contributing additional but secondary stabilization. These energetic findings reinforce the docking outcome in which CPD1 achieved the best score and maintained canonical pocket residue engagement, and they are compatible with the molecular dynamics observations of a lower RMSD envelope and sustained complex stability under the simulated conditions.

ADMET prediction analysis

ADMET prediction in drug design uses computational models to estimate a compound's Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity early on, acting as a crucial filter to identify drug-like molecules, reduce late-stage failures, cut costs, and speed up development by predicting if a potential drug will work in the body and won't be harmful before expensive experiments. Thus, *in silico* ADMET profiling was conducted to characterize the predicted pharmacokinetic behavior and safety-relevant alerts of CPD1 in relation to the reference ligand Tivantinib, with descriptors organized across absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity [34]. The resulting comparative profile supports prioritization decisions following docking and molecular dynamics analyses by highlighting parameters that may influence exposure, transporter liability, metabolic interaction potential, and toxicity risk. Predicted ADMET descriptors for CPD1 and Tivantinib are summarized in Table 3.

Across absorption metrics, both ligands exhibit limited predicted aqueous solubility, with water solubility values of -4.838 log mol/L for CPD1 and -4.405 log mol/L for Tivantinib, indicating similarly constrained dissolution and a modest solubility advantage for Tivantinib. In contrast, epithelial transport indices favor CPD1, as reflected by higher Caco-2 permeability (1.42 vs 1.122 log Papp in 10^{-6} cm/s) and higher predicted human intestinal absorption (98.498% vs 94.761% absorbed). Predicted skin permeability is comparable, with slightly more permissive dermal permeation for Tivantinib (-3.221 log Kp) relative to CPD1 (-3.441 log Kp). Transporter annotations indicate shared involvement with P-glycoprotein: both compounds are predicted to be P-glycoprotein substrates and to inhibit P-glycoprotein I and P-glycoprotein II, suggesting potential for efflux-related modulation of exposure and interaction risk in barrier tissues [35].

Table 3. Predicted ADMET properties of CPD1 and Tivantinib

ADMET properties	Unit	CPD1	Tivantinib
Water Solubility	(Log mol/L)	-4.838	-4.405
Caco2 permeability	(Log Papp in 10 ⁻⁶ cm/s)	1.42	1.122
Intestinal absorption (Human)	(% Absorbed)	98.498	94.761
Skin permeability	(Log Kp)	-3.441	-3.221
P-glycoprotein substrate	Yes/No	Yes	Yes
P-glycoprotein I inhibitor	Yes/No	Yes	Yes
P-glycoprotein II inhibitor	Yes/No	Yes	Yes
VDss	(Log L/kg)	0.21	-0.243
Fraction unbound (human)	(Fu)	0.234	0.046
BBB permeability	(Log BB)	-0.783	0.013
CNS permeability	(Log PS)	-3.253	-1.741
CYP2D6 substrate	Yes/No	No	No
CYP3A4 substrate	Yes/No	Yes	Yes
CYP1A2 inhibitor	Yes/No	No	Yes
CYP2C19 inhibitor	Yes/No	No	Yes
CYP2C9 inhibitor	Yes/No	No	No
CYP2D6 inhibitor	Yes/No	No	No
CYP3A4 inhibitor	Yes/No	No	Yes
Total clearance	(Log ml/min/kg)	0.361	0.458
Renal OCT2 substrate	Yes/No	No	No
AMES toxicity	Yes/No	No	No
Max. tolerated dose (human)	(Log mg/kg/day)	-1.139	0.578
hERG I inhibitor	Yes/No	No	No
hERG II inhibitor	Yes/No	Yes	Yes
Oral rat acute toxicity (LD50)	(mol/kg)	2.474	2.774
Oral rat chronic toxicity (LOAEL)	(Log mg/kg_bw/day)	1.496	2.22
Hepatotoxicity	Yes/No	No	Yes
Skin sensation	Yes/No	No	No
<i>Tetrahymena pyriformis</i> toxicity	(Log ug/L)	0.291	0.462
Minnow toxicity	(Log mM)	0.505	0.65

Distribution parameters differentiate systemic disposition and central exposure. The predicted steady-state volume of distribution is higher for CPD1 ($VD_{ss} = 0.21 \log L/kg$) than for Tivantinib ($-0.243 \log L/kg$), consistent with a greater modeled tendency toward tissue distribution for CPD1. Plasma protein binding is predicted to be weaker for CPD1, as indicated by a larger fraction unbound (F_u) (0.234) compared with Tivantinib (0.046), which may increase free-drug availability in circulation under the model assumptions. Central penetration estimates diverge: BBB permeability ($\log BB$) is -0.783 for CPD1 and 0.013 for Tivantinib, while CNS permeability ($\log PS$) is -3.253 for CPD1 and -1.741 for Tivantinib. These values imply more restricted brain and CNS exposure for CPD1 relative to Tivantinib within the same prediction framework [36].

The metabolism profile indicates shared CYP substrate behavior with notable differences in inhibitory potential. Neither compound is categorized as a CYP2D6 substrate. Both ligands are predicted CYP3A4 substrates, consistent with CYP3A4-mediated metabolic involvement. Inhibition flags separate the profiles: CPD1 is predicted negative for CYP1A2, CYP2C19, and CYP3A4 inhibition, whereas Tivantinib is predicted positive for CYP1A2 inhibitor, CYP2C19 inhibitor, and CYP3A4 inhibitor status. Both ligands are predicted negative for CYP2C9 inhibitor and CYP2D6 inhibitor status [37]. Overall, CPD1 presents fewer predicted CYP inhibition liabilities than Tivantinib in the current output.

For excretion, predicted total clearance is lower for CPD1 ($0.361 \log ml/min/kg$) than for Tivantinib ($0.458 \log ml/min/kg$), suggesting slower modeled elimination for CPD1. Renal OCT2 substrate status is negative for both compounds, indicating no OCT2-associated designation under the applied predictor.

Toxicity endpoints show a mixed set of shared and divergent alerts. Both ligands are predicted AMES-negative and hERG I inhibitor-negative, while hERG II inhibition is flagged for both, indicating a common cardiac electrophysiology concern that warrants attention in subsequent validation. A clinically relevant separation appears for hepatotoxicity, predicted negative for CPD1 and positive for Tivantinib. Skin sensitization is predicted negative for both. Quantitative toxicity indices favor Tivantinib in the same predictive context: the maximum tolerated dose (human) is $-1.139 \log mg/kg/day$ for CPD1 versus 0.578 for Tivantinib; oral rat acute toxicity (LD_{50}) is $2.474 \log mol/kg$ for CPD1 versus $2.774 \log mol/kg$ for Tivantinib; and oral rat chronic toxicity ($LOAEL$) is $1.496 \log mg/kg_{bw}/day$ for CPD1 versus 2.22 for Tivantinib. Ecotoxicity-associated estimates are higher for Tivantinib than CPD1, including *Tetrahymena pyriformis* toxicity (0.462 vs $0.291 \log \mu g/L$) and minnow toxicity (0.65 vs $0.505 \log mM$).

Collectively, the ADMET profile indicates that CPD1 combines high predicted intestinal absorption and higher Caco-2 permeability with lower predicted solubility, shared P-glycoprotein involvement, and reduced BBB/CNS penetration relative to Tivantinib. The metabolic pattern suggests lower CYP inhibition propensity for CPD1, whereas Tivantinib carries multiple inhibitory flags (CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4). Safety-relevant predictions highlight a hepatotoxicity alert for Tivantinib but not for CPD1, while hERG II inhibition remains a shared liability. These features complement the stronger interaction energetics observed for CPD1 in MMGBSA analysis and support its prioritization, with solubility constraints and cardiac-related alerts representing key aspects for further experimental assessment.

DFT calculations

Density Functional Theory (DFT) calculations are used in drug design to find the most stable, lowest-energy three-dimensional arrangement of atoms in a molecule, thereby optimizing its geometric coordinates. This optimized structure is crucial because a drug's efficacy and interaction with a biological target depend heavily on its precise shape and

electronic properties. Quantum chemical analysis using DFT was performed after the classical modeling stage to describe the electronic structure and reactivity-associated tendencies of CPD1 in comparison with the reference ligand Tivantinib. The computed descriptors included EHOMO (eV), ELUMO (eV), ΔE (eV), μ (eV), χ (eV), η (eV), σ (eV⁻¹), and ω (eV), which jointly summarize frontier-orbital energetics, resistance to charge redistribution, and electrophilic character. In this context, EHOMO (eV) reflects electron-donation propensity, whereas ELUMO (eV) indicates electron-acceptance capability; ΔE (eV), defined as ELUMO (eV) - EHOMO (eV), serves as an index of electronic stability versus chemical responsiveness. DFT descriptors for CPD1 and Tivantinib are detailed in Table 4.

Table 4. DFT calculations for CPD1 and Tivantinib

Molecule	EHOMO (eV)	ELUMO (eV)	ΔE (eV)	μ (eV)	χ (eV)	η (eV)	σ (eV ⁻¹)	ω (eV)
CPD1	-7.4261	-3.7620	3.6641	-5.5941	5.5941	1.8321	0.5458	8.5405
Tivantinib	-7.4231	2.9976	10.4207	-2.2128	2.2128	5.2104	0.1919	0.4699

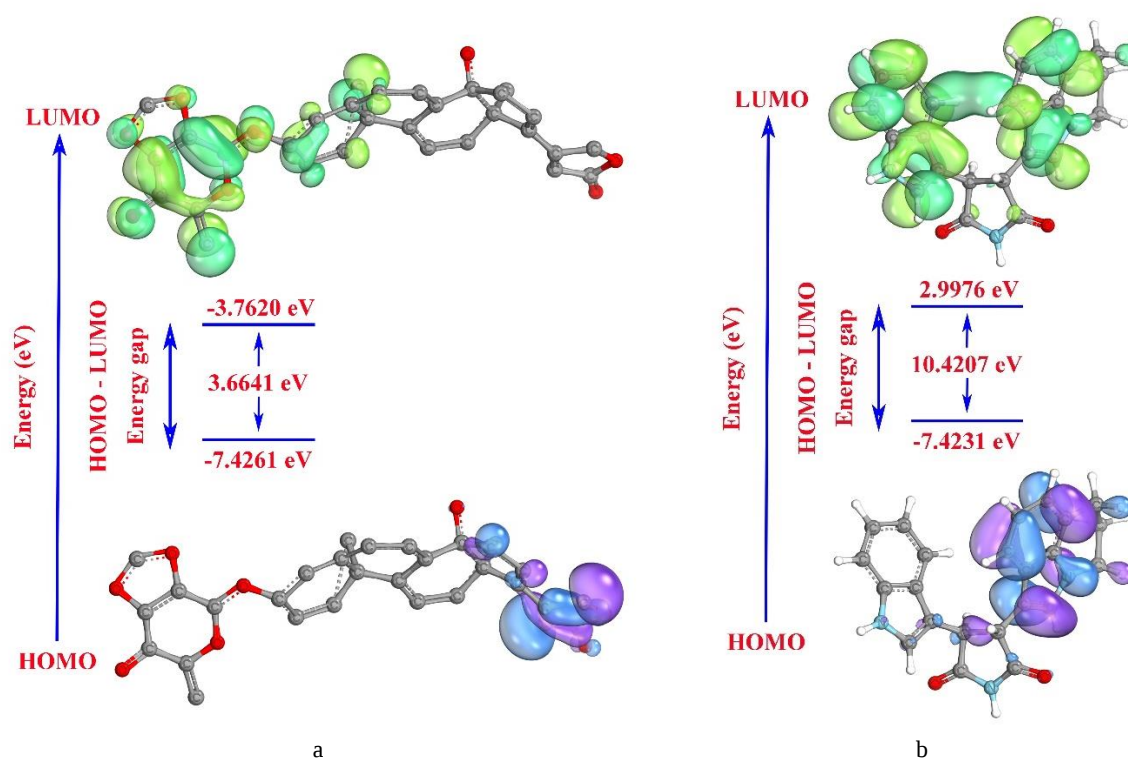


Fig. 5. HOMO and LUMO surface diagrams of CPD1 (a) and Tivantinib (b).

The frontier-orbital energies indicate similar donor levels but strongly different acceptor levels. EHOMO (eV) for CPD1 is -7.4261, closely matching Tivantinib (-7.4231), suggesting comparable intrinsic electron-donating capability under the same calculation conditions. In contrast, ELUMO (eV) differs markedly, with CPD1 presenting a low-lying acceptor orbital (-3.7620) whereas Tivantinib exhibits a positive ELUMO (eV) (2.9976). As a direct consequence, CPD1 displays a substantially smaller ΔE (eV) (3.6641) than Tivantinib (10.4207). The reduced ΔE (eV) for CPD1 is consistent with increased electronic polarizability

and greater readiness for charge transfer, while the wide gap for Tivantinib is compatible with enhanced frontier-orbital stability and lower electronic responsiveness. Global reactivity descriptors further distinguish the two ligands. CPD1 shows higher χ (eV) (5.5941) than Tivantinib (2.2128), indicating stronger electron-attracting character within this DFT dataset. The corresponding μ (eV) values follow the expected inverse relationship with χ (eV), with CPD1 exhibiting a more negative chemical potential (-5.5941) relative to Tivantinib (-2.2128), implying a stronger thermodynamic tendency toward electron uptake. Electronic resistance to deformation, quantified by η (eV), is lower for CPD1 (1.8321) than for Tivantinib (5.2104), and the reciprocal descriptor σ (eV⁻¹) is therefore higher for CPD1 (0.5458) than for Tivantinib (0.1919). This pairing supports greater softness and lower hardness for CPD1, consistent with the smaller ΔE (eV) and the associated capacity for charge redistribution (Fig. 5).

The electrophilic character, measured by ω (eV), shows the most pronounced separation: CPD1 has an electrophilicity index of 8.5405, whereas Tivantinib shows 0.4699. The markedly higher ω (eV) for CPD1 indicates stronger electrophilic strength according to the computed descriptors, in agreement with the combined pattern of higher χ (eV) and lower η (eV).

Overall, the DFT profile characterizes CPD1 as electronically softer and more electrophilic than Tivantinib, while maintaining a comparable donor orbital level as reflected by near-identical EHOMO (eV) values.

Despite the value of *in silico* screening for identifying prioritized candidates, experimental confirmation remains indispensable for establishing the robustness and translational relevance of the present predictions. No laboratory validation was conducted because of limited access to appropriate instrumentation and facilities. Subsequent work should therefore emphasize systematic *in vitro* and *in vivo* evaluation of CPD1, including target-engagement assays and biological model studies to delineate pharmacological efficacy alongside safety-relevant endpoints. The absence of experimental datasets, together with the lack of dedicated assessment of potential unintended covalent inhibition, constitutes a key limitation of the current investigation. If CPD1 demonstrates favorable performance in preclinical testing, progression toward clinically oriented studies may be justified. Overall, the current computational evidence provides a mechanistic basis that can guide rational follow-up experiments and support continued development toward therapeutic application.

CONCLUSIONS

This study integrated docking, molecular dynamics, MMGBSA, ADMET prediction, and DFT descriptors to examine *Reevesia formosana* phytochemicals as potential lung cancer-relevant inhibitors through interaction with the Bcl-2 protein (6GL8). CPD1 consistently emerged as the leading scaffold, exhibiting the most favorable docking profile within the conserved pocket, supported by hydrogen-bond anchoring and extensive short-range complementarity with key residues. Molecular dynamics indicated a more confined and persistent bound state for CPD1 relative to Tivantinib, consistent with sustained pocket accommodation under solvated conditions. MMGBSA energy decomposition further supported stronger association for CPD1, dominated by enhanced van der Waals stabilization with supportive electrostatics and a comparatively reduced solvation penalty. ADMET profiling suggested high oral absorption potential but limited aqueous solubility, shared P-glycoprotein liability, restricted central exposure, and fewer predicted CYP inhibition alerts for CPD1 than for Tivantinib; a hepatotoxicity alert was predicted for Tivantinib but not for CPD1, whereas a shared hERG II signal warrants caution. DFT analysis characterized CPD1 as electronically softer and more electrophilic than the reference, consistent with greater charge-redistribution propensity. Collectively, the convergent evidence prioritizes CPD1 for subsequent optimization

and experimental validation, with emphasis on solubility improvement and cardiotoxicity-focused risk assessment.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

Author's ORCID ID

Hung Duc Nguyen  <http://www.orcid.org/0000-0002-5764-1242>

REFERENCES

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: Cancer J Clin.* 2024;74(3):229–63. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
2. Zou K, Sun P, Huang H, Zhuo H, Qie R, Xie Y, et al. Etiology of lung cancer: Evidence from epidemiologic studies. *J Natl Cancer Cent.* 2022;2(4):216–25. <https://doi.org/10.1016/j.jncc.2022.09.004>
3. Relli V, Trerotola M, Guerra E, Alberti S. Abandoning the notion of non-small cell lung cancer. *Trends Mol Med.* 2019;25(7):585–94. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.04.012>
4. Jiang S-X, Sato Y, Kuwao S, Kameya T. Expression of bcl-2 oncogene protein is prevalent in small cell lung carcinomas. *J Pathol.* 1995;177(2):135–8. <https://doi.org/10.1002/path.1711770206>
5. Qian S, Wei Z, Yang W, Huang J, Yang Y, Wang J. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Front Oncol.* 2022;12:985363. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.985363>
6. Mustafa M, Ahmad R, Tantry IQ, Ahmad W, Siddiqui S, Alam M, et al. Apoptosis: A comprehensive overview of signaling pathways, morphological changes, and physiological significance and therapeutic implications. *Cells* 2024;13(22):1838. <https://doi.org/10.3390/cells13221838>
7. Montero J, Haq R. Adapted to survive: Targeting cancer cells with BH3 mimetics. *Cancer Discov.* 2022;12(5):1217–32. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1334>
8. Hassig CA, Zeng F-Y, Kung P, Kiankarimi M, Kim S, Diaz PW, et al. Ultra-high-throughput screening of natural product extracts to identify proapoptotic inhibitors of Bcl-2 family proteins. *SLAS Discov.* 2014;19(8):1201–11. <https://doi.org/10.1177/1087057114536227>
9. Shah U, Shah R, Acharya S, Acharya N. Novel anticancer agents from plant sources. *Chin J Nat Med.* 2013;11(1):16–23. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(13\)60002-3](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(13)60002-3)
10. Chihomvu P, Ganesan A, Gibbons S, Woollard K, Hayes MA. Phytochemicals in drug discovery-A confluence of tradition and innovation. *Int J Mol Sci.* 2024;25(16):8792. <https://doi.org/10.3390/ijms25168792>
11. Yang Y, Wang H, Xue Q, Peng W, Zhou Q. New advances of natural products in non-small cell lung cancer: From mechanisms to therapies. *J Ethnopharmacol.* 2025;346:119636. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2025.119636>
12. Wei J, Yan Y, Chen X, Qian L, Zeng S, Li Z, et al. The roles of plant-derived triptolide on non-small cell lung cancer. *Oncol Res.* 2019;27(7):849–58. <https://doi.org/10.3727/096504018X15447833065047>
13. Othman ZK, Ahmed MM, Kasimieh O, Musa SS, Branda F, Cue EG, et al. Artificial intelligence for natural product drug discovery and development: current landscape, applications, and future directions. *Intell Med.* 2025;12:100316. <https://doi.org/10.1016/j.ibmed.2025.100316>
14. Hsiao PY, Lee SJ, Chen IS, Hsu HY, Chang HS. Cytotoxic cardenolides and sesquiterpenoids from the fruits of *Reevesia formosana*. *Phytochemistry.* 2016;130:282–90. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.06.009>
15. Casara P, Davidson J, Claperon A, Toumelin-Braizat G Le, Vogler M, Bruno A, et al. S55746 is a novel orally active BCL2 selective and potent inhibitor that impairs hematological tumor growth. *Oncotarget.* 2018;9(28):20075–88. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24744>
16. Nguyen HD. DFT and molecular modelling reveal the mechanism of action of selected alkaloids as anti-colorectal cancer agents targeting topoisomerase II. *Not Sci Biol.* 2025;17(3):12642. <https://doi.org/10.55779/nsb17312642>
17. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC. GROMACS: Fast, flexible, and free. *J Comput Chem.* 2005;26(16):1701–18. <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>
18. Zoete V, Cuendet MA, Grosdidier A, Michielin O. 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>
19. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605–12. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
20. Nguyen HD. Unveiling the anti-apoptotic mechanism of magnolialide as a colorectal cancer inhibitor via molecular modeling, ADMET, and MMGBSA analysis. *Phys Chem Res.* 2025;13(4):783–96.

- <https://doi.org/10.22036/pcr.2025.535946.2708>
21. Pires DE, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J Med Chem.* 2015;58(9):4066–72. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>
 22. Neese F. Software update: The ORCA program system–version 6.0. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci.* 2025;15(2):e70019. <https://doi.org/10.1002/wcms.70019>
 23. Knizia G, Klein JE. Electron flow in reaction mechanisms–revealed from first principles. *Angew Chem Int Ed.* 2015;54(18):5518–22. <https://doi.org/10.1002/anie.201410637>
 24. Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform.* 2012;4(1):17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
 25. Luo J, Xue ZQ, Liu WM, Wu JL, Yang ZQ. Koopmans' theorem for large molecular systems within density functional theory. *J Phys Chem. A.* 2006;110(43):12005–9. <https://doi.org/10.1021/jp063669m>
 26. Das R, Vigneresse J-L, Chattaraj PK. Chemical reactivity through structure-stability landscape. *Int J Quantum Chem.* 2014;114(21):1421–9. <https://doi.org/10.1002/qua.24706>
 27. Bell EW, Zhang Y. DockRMSD: An open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. *J Cheminform.* 2019;11(1):40. <https://doi.org/10.1186/s13321-019-0362-7>
 28. Hollingsworth SA, Dror RO. Molecular dynamics simulation for all. *Neuron* 2018;99(6):1129–43. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>
 29. Zhao S, Ma S, Zhang Y, Gao M, Luo Z, Cai S. Combining molecular docking and molecular dynamics simulation to discover four novel umami peptides from tuna skeletal myosin with sensory evaluation validation. *Food Chem.* 2024;433:137331. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137331>
 30. Salmaso V, Moro S. Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview. *Front Pharmacol.* 2018;9:923. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00923>
 31. Hosseini M, Fattahi A, Pakzadiyan A. Computational and experimental design of L-amino acid-based alternatives to ketorolac. *Sci Rep.* 2025;15(1):42161. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-26171-1>
 32. Schiffmann C, Sebastiani D. Hydrogen bond networks: Structure and dynamics via first-principles spectroscopy. *Phys Status Solidi B.* 2012;249(2):368–75. <https://doi.org/10.1002/pssb.201100556>
 33. Wang E, Sun H, Wang J, Wang Z, Liu H, Zhang JZH, et al. End-point binding free energy calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and applications in drug design. *Chem Rev.* 2019;119(16):9478–508. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00055>
 34. Ferreira LLG, Andricopulo AD. ADMET modeling approaches in drug discovery. *Drug Discov Today.* 2019;24(5):1157–65. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.03.015>
 35. Chandrasekaran B, Abed SN, Al-Attraqchi O, Kuche K, Tekade RK. Computer-aided prediction of pharmacokinetic (ADMET) properties. In: Tekade RK, editor. *Dosage Form Design Parameters*. Volume II. Oxford: Academic Press; 2018 p. 731–55. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814421-3.00021-X>
 36. Nguyen HD. DFT and molecular modelling reveal the mechanism of action of selected alkaloids as anti-colorectal cancer agents targeting topoisomerase II. *Not Sci Biol.* 2025;17(3):12642. <https://doi.org/10.55779/nsb17312642>
 37. Zhao M, Ma J, Li M, Zhang Y, Jiang B, Zhao X, et al. Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism in humans. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23):12808. <https://doi.org/10.3390/ijms222312808>

КОМП'ЮТЕРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ ОКРЕМИХ ФІТОХІМІЧНИХ РЕЧОВИН, ОТРИМАНИХ З *Reevesia formosana*: МЕХАНІСТИЧНИЙ АНАЛІЗ ЇХНЬОГО ПОТЕНЦІАЛУ У БОРОТБІ З РАКОМ ЛЕГЕНІВ

Хунг Дук Нгуєн 

Факультет біології, Педагогічний університет Тай Нгуєна, 24000, Тай Нгуєн, В'єтнам

e-mail: hungnd@tnue.edu.vn

Надійшла до редакції 10 грудня 2025 р. Переглянута 07 березня 2026 р.

Прийнята до друку 16 березня 2026 р. Опублікована 25 червня 2026 р.

Актуальність. Рак легенів залишається провідною причиною смертності від онкологічних захворювань, а порушення апоптозу, опосередковане антиапоптотичними білками сімейства Bcl-2, сприяє персистенції захворювання та резистентності до лікування. Фітохімічні сполуки з *Reevesia formosana*, як повідомляється, виявляють протипухлинну активність щодо недрібноклітинного раку легенів (NSCLC), проте механізми дії на рівні мішеней досі не до кінця з'ясовані.

Мета: визначити пріоритети фітохімічних речовин *Reevesia formosana* як ймовірних інгібіторів Bcl-2 (PDB ID: 6GL8) та отримати механістичне розуміння за допомогою багатомасштабних обчислень.

Матеріали та методи: Шість фітохімічних сполук та еталонний препарат Tivantinib були піддані докінгу до білка 6GL8, а найкращий кандидат (CPD1) було оцінено за допомогою моделювання методом молекулярної динаміки тривалістю 100 нс у порівнянні з Tivantinib. Вільні енергії зв'язування MMGBSA були обчислені на основі 125 знімків, зроблених у проміжку від 20 до 100 нс. Властивості ADMET було передбачено за допомогою pkCSM. Дескриптори граничних орбіталей та глобальної реакційної здатності були отримані за допомогою DFT.

Результати: За результатами докінгу CPD1 посів перше місце (-10,15 ккал/моль) порівняно з Tivantinib (-8,83 ккал/моль), демонструючи водневі зв'язки з Tyr108 та Arg129, а також високий ступінь комплементарності кишень. Траєкторії MD вказували на більш обмежений комплекс CPD1-6GL8 (RMSD переважно 0,18–0,22 нм) порівняно з Tivantinib-6GL8 (0,21–0,26 нм, інколи 0,27–0,28 нм), з порівнянною компактністю (Rg 1,44 нм) та обмеженою SASA. Кількість водневих зв'язків підтверджувала переривчасте полярне закріплення для CPD1 (0–3) та вищу ранню вибірку для Tivantinib. MMGBSA віддавала перевагу CPD1 (Δ TOTAL -32,87 $\pm$ 4,28 ккал/моль) над Tivantinib (-17,27 $\pm$ 2,81 ккал/моль), що підтверджувалося сильнішим Δ VDWAALS (-40,76 проти -31,34 ккал/моль) та меншим Δ G_SOLV (20,28 проти 24,14 ккал/моль). Прогноз ADMET вказав на високу кишкову абсорбцію з обмеженою розчинністю, обмежену проникність через ГЕБ/ЦНС, менше ознак інгібування CYP та відсутність попередження про гепатотоксичність для CPD1, тоді як інгібування hERG II було відзначено для обох лігандів. DFT показав подібний EHOMO (eV), але вужчий Δ E (eV) та вищий ω (eV) для CPD1, ніж для Tivantinib.

Висновки: Інтегроване моделювання надає пріоритет CPD1 як скафолду, що націлений на Bcl-2, для досліджень, пов'язаних із раком легенів, підтримуючи оптимізацію на основі структури та експериментальну верифікацію.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ADMET; антиапоптоз; Bcl-2; MMGBSA; молекулярне моделювання; Reevesia formosana.

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-08>

УДК 619:616.98:578.831.31:636.4

3D МОДЕЛІ БІЛКІВ ТА КОНСЕРВАТИВНИХ G-КВАДРУПЛІ КСІВ В ГЕНОМІ ЦИРКОВІРУСУ СВИНІ

О. Ю. Лиманська^{1*}, О. В. Білойван¹, О. К. Балак², О. П. Лиманський³

¹Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
вул. Григорія Сковороди, 83, Харків, 61023, Україна;

²Харківський національний медичний університет, пр. Науки, 4, Харків, 61022, Україна;

³Інститут фізіологічно активних сполук, пр. Науки, 58, Харків, 61072, Україна

*e-mail: olgaliman@ukr.net

Надійшла до редакції 29 грудня 2025 р. Переглянута 06 травня 2026 р.

Прийнята до друку 07 травня 2026 р. Опублікована 25 червня 2026 р.

Актуальність. Неканонічні структури, що утворюються в молекулах нуклеїнових кислот, до яких відносять, зокрема, мультиспіральні з'єднання 3WJs (three-way junction), квадруплекси (G4s), є регуляторними елементами, які впливають на функціонування геному. Побудова 3D моделей цих структур і білків патогенів є першим етапом у розумінні їхніх функцій. У створеній компанією Google DeepMind разом з EMBL базі даних AlphaFold Protein Structure Database, яка містить понад 241 мільйон структур білків, 3D моделі білків цирковірусу свині типу 3 (ЦВС-3) є відсутніми.

Мета роботи: визначення та структурна характеристика потенційних G4s і 3WJ в геномі ЦВС-3, побудова 3D моделей білків ЦВС-3.

Матеріали і методи. 1138 ізолятів ЦВС-3 з повним геномом з GenBank використано для філогенетичного аналізу за допомогою пакету програм MEGA12. Для побудови графіків ентропії використано пакет програм BioEdit; пошуку мотивів G4s та визначення їх G-рахунків — програму QGRS Mapper; пошуку 100%-ої ідентичності нуклеотидних послідовностей — програму BLAST. 3D моделі білків та G4s побудовано за допомогою штучного інтелекту AlphaFold 3.

Результати. В геномі ЦВС-3 ідентифіковано 4 консервативні досконалі G4s, які утворено трьома тетрадами та підтверджено через побудову їхніх 3D моделей. Визначені послідовності G4s є консервативними мотивами, оскільки число ізолятів ЦВС-3 в GenBank з G4s у геномі становить понад 1000. В якості контролю коректності побудови цих моделей використовували 3D моделі G4s, утворення одного з яких експериментально визначено в геномі вірусу гепатиту Б. 3D моделі реплікази та білка капсиду побудовано для двох еволюційно найвіддаленіших ізолятів ЦВС-3, які визначено з філогенетичних дерев на основі генів *cap* та *rep*, встановлено їхні особливості. 3WJs в геномі ЦВС-3 не виявлено.

Висновки. Отримано 3D моделі реплікази, білка капсиду цирковірусу свині типу 3, а також чотирьох консервативних структурних мотивів G4s, які утворено трьома G-тетрадами. Збільшення довжини фрагментів, які фланкують G4s, не перешкоджає їхньому фолдингу, що свідчить про значущість цих G-багатих мотивів у життєвому циклі ЦВС-3. Існування G4s з трьох тетрад в геномі ЦВС-3 на відміну від двотетрадних G4s вірусу гепатиту Б у складі не тільки аптамерів, а й молекул збільшеної довжини підтверджено за допомогою AlphaFold 3.

Як цитувати: Лиманська ОЮ, Білойван ОВ, Балак ОК, Лиманський ОП. 3D моделі білків та консервативних G-квадруплексів в геномі цирковірусу свині. Біофізичний вісник. 2026;55:95–116. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-08>

Citation: Limanskaya OYu, Biloivan OV, Balak OK, Limanskii AP. 3D models of proteins and conservative G-quadruplexes in the genome of porcine circovirus. Biophysical Bulletin. 2026;55:95–116. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-08> (in Ukrainian)

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

КЛЮЧОВІ СЛОВА: альтернативна структура; біоінформатика; AlphaFold 3; цирковірус свиней типу 3; G-квадруплекс (G4); структура білка; 3D модель.

G-квадруплекси (G4s) — це неканонічні вторинні структури, які утворюються у збагачених гуанідіном послідовностях молекул нуклеїнових кислот шляхом внутрішніх або міжмолекулярних взаємодій. G-квадруплекси складаються з двох або більше планарних G-тетрад, утворених чотирма гуанідінами через Хугстинівські водневі зв'язки. Стабільність G4s визначено стекінг-взаємодією G-тетрад, а також наявністю моно- або бівалентних катіонів за фізіологічних умов, які можуть бути розташованими як між, так і всередині G-тетрад [1]. G4s є регуляторними елементами та відіграють певну роль у таких важливих біологічних процесах, як трансляція, транскрипція, реплікація, мутагенез, рекомбінація та репарація ДНК, а також в організації геному [2, 3].

Утворення G4s спостерігають у випадку низки нейродегенеративних та онкологічних захворювань людини, що дозволяє розглядати G-квадруплекси не тільки як нові цільові мішені для лікарських засобів, а і як, наприклад, складові потенційних протипухлинних препаратів [4–6]. Наявність G-збагачених мотивів, що є схильними до утворення G4s, або існування G-квадруплексів продемонстровано для низки організмів, у тому числі, вірусів — збудників інфекційних захворювань сільськогосподарських тварин [7], зокрема, свиней. Так, показано, що негативний ланцюг геномної РНК вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней містить консервативний паралельний G4, який відіграє ключову роль у реплікації вірусу [8]. Дві послідовності з потенціалом утворення G4s визначено за результатами біоінформатичного аналізу у генах білка шипів S та неструктурного білка Nsp5, необхідного для процесу реплікації вірусу епідемічної діареї свиней. За допомогою спектроскопії кругового дихроїзму та флюоресценції підтверджено можливість фолдингу G-квадруплексів [9].

Консервативну G-збагачену послідовність, яка утворює G4, ідентифіковано у гені неструктурного білка E165R вірусу африканської чуми свиней (АЧС). Поряд з низкою інших неструктурних білків вірусу АЧС E165R відіграє певну роль як фермент метаболізму нуклеїнових кислот у процесі реплікації патогена [10]. Наявність G-квадруплексів у зазначених вище вірусів відкриває перспективи розвитку стратегії створення лікарських препаратів нового типу з урахуванням особливостей молекулярно-генетичної структури патогенів.

Цирковірус свиней типу 3 (ЦВС-3) — один із відомих чотирьох типів ЦВС, належить до роду *Circovirus* сімейства *Circoviridae*. Вперше ЦВС-3 було детектовано у 2016 р. у трьох свиней з патологією серця та мультисистемним запаленням [11]. ЦВС-3 поширений у популяціях свиней в усьому світі [12], в Україні вірус вперше виявлено у 2021 р. [13]. ЦВС-3 асоційований з гострим дерматитом свиней, синдромом нефропатії, репродуктивною недостатністю та, отже, є загрозою для розвитку та благополуччя свинарської галузі [14–17]. Основними резервуарами ЦВС-3 є свині та дикі кабани, проте можливою є міжвидова трансмісія вірусу [18].

Геном ЦВС-3 представлений одноланцюговою кільцевою молекулою ДНК довжиною 2000 нуклеотидів (н.) та містить три відкриті рамки зчитування ORFs. ORF1 та ORF2, які орієнтовано у протилежних напрямках, кодують репліказу та білок капсиду вірусу відповідно. Функція білка, що транслюється з ORF3, залишається нез'ясованою. Інформація щодо утворення неканонічних структур у геномі цирковірусів свиней є вельми обмеженою. Відомо, що на 5'-кінці міжгенної області локалізовано шпилькову структуру з довжиною петлі 9 н., яка є висококонсервативною для ЦВС незважаючи на виявлені незначні відмінності у послідовності петлі.

Вважають, що ця шпилька ініціює реплікацію ЦВС [19]. Інформація щодо можливості утворення G4s у геномі цирковірусів свиней, у тому числі ЦВС-3, у літературі на цей час є відсутньою.

Компанія Google DeepMind Technologies Limited (Лондон, Велика Британія) нещодавно випустила свою нову версію моделі штучного інтелекту (ШІ) AlphaFold 3 [20], яка передбачає 3D структуру білків з амінокислотної послідовності з порівняною для експериментальних методів точністю (0,1–2 нм для різних фрагментів білка).

Штучний інтелект AlphaFold 3 є єдиним серед численних біоінформатичних методів, за розробку якого через надзвичайно високу точність передбачення структури біополімерів його авторам Д. Хассабісу і Д. Джемперу (обидва — Google DeepMind Technologies Ltd) «за передбачення білкових структур», а також Д. Бейкеру (університет Вашингтону в Сіетлі) «за обчислювальний дизайн білків» присуджено Нобелівську премію з хімії 2024 року. Google DeepMind та Європейський Інститут біоінформатики разом з EMBL створили базу даних AlphaFold Protein Structure Database (<https://alphafold.ebi.ac.uk>), випуск якої (станом на листопад 2025 року) у вільному доступі містить понад 241 мільйону структур білків, які передбачено на підставі амінокислотної послідовності, що веде до прискорення наукових досліджень. 3D моделі реплікази та білка капсиду ЦВС-3 у зазначеній базі даних на теперішній час є відсутніми.

Точність передбачення структури білка за допомогою першої версії — ШІ AlphaFold — становила 60%. При розробці другої версії — ШІ AlphaFold 2 — було змінено принцип її роботи. Згорткову нейронну мережу замінили на архітектуру трансформера. В якості вихідних даних користувач отримував безпосередньо координати атомів. Ці модифікації забезпечили точність передбачення структури білка 90%. Як результат, передбачення тривимірної структури білка за допомогою AlphaFold 2 стало можливим з точністю 0,1 нм, що є зіставленим з такою рентгеноструктурного аналізу.

Розвиток AlphaFold не зупинився на другій версії, і у травні 2024 року Google DeepMind представила AlphaFold 3 із значно розширеними можливостями. Крім передбачення тривимірної структури, AlphaFold 3 вміє оцінювати внесок посттрансляційних модифікацій в конформацію белкової молекули, а також передбачати взаємодію білків з іншими білками, нуклеїновими кислотами, іонами [21].

В даній роботі побудовано 3D моделі білків капсиду та реплікази еволюційно найвіддаленіших ізолятів цирковірусу свині типу 3, а також проведено ідентифікацію, характеризацію консервативних потенційних досконалих G-квадруплексів з трьох тетрад в геномі ЦВС-3.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Нуклеотидні та амінокислотні послідовності 1138 ізолятів ЦВС-3 з повним геномом станом на листопад 2025 р. з різних географічних регіонів світу та різноманітного біологічного матеріалу від свиней та диких кабанів (легенів, ротової рідини, сироватки, фекалій, абортів плодів, лімфи) отримано у форматах *.gb та *.fasta через пошук за ключовим словом «porcine circovirus type 3 AND complete genome» (ідентифікатор таксону 1868221) в базі даних GenBank Національного центру біотехнологічної інформації (США). Пошук 100 %-ої ідентичності нуклеотидних послідовностей G-багатих мотивів ізолятів вірусу здійснювали за допомогою програми BLAST nucleotide (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Множинне вирівнювання, філогенетичний аналіз проведено за допомогою пакету програм Molecular Evolutionary Genetics Analysis MEGA12 (версія 12.0.9) [22]. Попередньо 1138 нуклеотидних послідовностей ЦВС-3 з повним геномом розділили на

6 груп: 5 груп по 200 ізолятів та групу з 138 ізолятів, для яких визначали матрицю попарних відстаней та проводили множинне вирівнювання. Потім з кожного з 6 побудованих філогенетичних дерев вибирали по 6 еволюційно найвіддаленіших ізолятів ЦВС-3, які сформували дерево з 36 ізолятів для визначення двох найвіддаленіших ізолятів в наборі з 1138 ізолятів ЦВС-3. Філогенетичні відношення визначено з використанням р-дистанцій, адаптивного бутстреп-аналізу (500 випадкових вибірок для оцінки достовірності дерева), моделі нуклеотидних замін Jukes – Cantor та методу максимальної правдоподібності або приєднання сусідів.

Для маніпулювання з нуклеотидними та амінокислотними послідовностями, мутаційного аналізу білків вірусів, побудови графіків ентропії Шеннона для визначення несинонімічних та синонімічних замін, побудови матриці відмінностей послідовностей для розрахунку швидкості мутацій використовували програму BioEdit (версія 7.2.5) [23].

Для визначення кількості стоп-кодонів застосовували програму HyPhy [24]. Визначення швидкості мутацій здійснювали згідно з [25].

Оцінку впливу природного відбору на гени шляхом визначення відношення частот несинонімічних (dN) до синонімічних (dS) замін на нуклеотидний сайт dN/dS проводили з використанням методу SLAC (single likelihood ancestor counting) на сервері Datamonkey (www.datamonkey.org).

Для пошуку мотивів внутрішньомолекулярних G-квадруплексів в ДНК ЦВС-3, вірусу гепатиту Б (ізолят V01460), а також для визначення G-рахунку (параметра, який характеризує стабільність G-квадруплексу у відносних одиницях) використано програму для аналізу квадруплексів QGRS Mapper на веб-сервері (<https://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/analyze.php>) [26, 27]. Пошук G4 проводили для ізоляту PP067099 за наступних параметрів: максимальна довжина G-квадруплексу — 45 н., мінімальний розмір G-тетради — 3, петля — від 1 до 20 н. Для пошуку потенційних досконалих G4s застосовано програму QGRS Mapper через найкращі показники порівняно з іншими програмами в частині помилково та правильно знайдених, помилково та правильно не знайдених G4s при тестуванні на одному й тому ж G-мотиві [28].

3D моделі білків та G4s (з 10-20 іонами K⁺) побудовано за допомогою штучного інтелекту AlphaFold 3 [20]. Для оцінки надійності передбачення моделі в AlphaFold 3 використано параметр pLDDT (predicted local distance difference test), значення якого для високого рівня достовірності моделі має становити понад 90 за шкалою від 0 до 100. Значення pLDDT від 70 до 90 відповідає середньому рівню надійності моделі, а 70 > pLDDT > 50 — низькому рівню. Для аналізу вторинної структури білків, визначення кількості водневих зв'язків, α -спіралей, β -листів, β -поворотів використовували програми PyMol 2.2 [29] та RasWin Molecular Graphics (версія 2.7.5.2; www.openrasmol.org). Визначення 3WJ-структур проводили за методом, що зазначено в роботі [30].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Геном ЦВС-3 містить дві основні відкриті рамки зчитування ORF–ORF1, ORF2, — а також ORF3. ORF1 (положення 216-1106 на кільцевій ДНК ізоляту референтного штаму NC_031753) кодує репліказу, ORF2, яка направлена протилежно по відношенню до ORF1 (положення 1336-1980), — білок капсиду, ORF3 — білок довжиною 231 амінокислотний залишок (а.з.), функція якого залишається невідомою.

Консервативні G-квадруплекси у геномі ЦВС-3

На першому етапі за допомогою програми QGRS Mapper знайдено 4 потенційні G-квадруплекси, які утворено трьома G-тетрадами, в геномі випадково вибраного ізоляту ЦВС-3 PP067099 з повним геномом, G-рахунок яких становив від 58 до 72 (Табл. 1). Потім за допомогою програми BLAST nucleotide через пошук G-багатого мотиву в позиції 1164–1178 ізоляту PP067099 встановлено, що ця G-багата послідовність є висококонсервативним мотивом: число повногеномних ізолятів ЦВС-3 з цим мотивом становить 1138. Три інші G-багаті мотиви є також висококонсервативними для геному ЦВС-3, оскільки число повногеномних ізолятів вірусу з цими мотивами є більше 1000 для кожного мотиву.

Таблиця 1. Консервативні мотиви потенційних G-квадруплексів в геномі ізолятів ЦВС-3 з повним геномом (G-багаті фрагменти послідовностей підкреслено). Параметр pLDDT характеризує якість передбачення 3D моделі в AlphaFold 3 за шкалою від 0 до 100. Позиції наведено для ізоляту PP067099 ЦВС-3. N - число ізолятів ЦВС-3 в GenBank зі 100% рівнем ідентичності мотиву G4

Table 1. Conserved motifs of putative G-quadruplexes in the genome of PCV-3 isolates with complete genomes (G-rich sequence fragments are underlined). The pLDDT parameter characterizes the quality of the 3D model prediction in AlphaFold 3 on a scale from 0 to 100. The positions are shown for the PP067099 PCV-3 isolate. N is the number of PCV-3 isolates in GenBank with 100% identity to the G4 motif

Позиція, н.	Мотив G-квадруплексу	G- раху- нок	pLDDT	N
645–680, ген <i>rep</i>	5'- <u>GGG</u> TTTGCCTGATTTTTCGG <u>GGG</u> TGAT <u>GGG</u> GTT <u>GGG</u> -3'	59	90 > pLDDT > 70	1172
802–833, ген <i>rep</i>	5'- <u>GGG</u> CCTTGCT <u>GGG</u> ATGGTTA TAAT <u>GGG</u> GA <u>GGG</u> -3'	63	70 > pLDDT > 50	1117
893–930, ген <i>rep</i>	5'- <u>GGG</u> ACAGGTACCCTCTGAG <u>GGT</u> TCCTGTAA <u>GGG</u> T <u>GGG</u> -3'	58	70 > pLDDT > 50	1011
1164–1178, промотор гена <i>cap</i>	5'- <u>GGG</u> T <u>GGG</u> T <u>GGG</u> T <u>GGG</u> -3'	72	pLDDT > 90	1138

На другому етапі для визначення еволюційно найвіддаленіших ізолятів серед 1138 ізолятів ЦВС-3 з повним геномом побудовано філогенетичні дерева на основі гена *cap*, що кодує білок капсиду (Рис. 1), гена *rep*, що кодує репліказу (Рис. 2), та на основі ізолятів ЦВС-3 з повним геномом (результат не показано).

Для проведення 3D моделювання структури білків та подальшого їх біоінформатичного аналізу вибрано ізоляти MT075517 та MG 372488, які належать до різних клад та є еволюційно найвіддаленішими за результатами філогенетичного аналізу на основі гена *cap*. З аналізу зазначених вище філогенетичних дерев випливає, що еволюційно найвіддаленішими ізолятами за геном *rep* є ізоляти MN491030 та MZ851986.

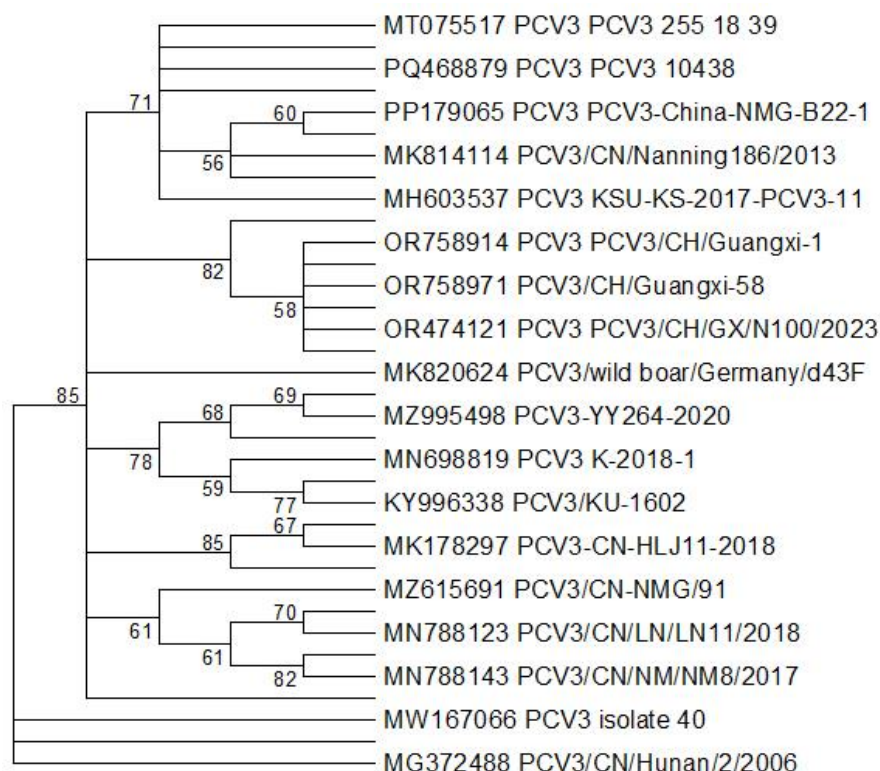


Рис. 1. Філогенетичні відношення між 36 еволюційно найвіддаленішими ізолятами (які визначено за результатами філогенетичного аналізу 1138 ізолятів ЦВС-3 з повним геномом; ізоляти, що перекриваються, не показано) на основі гена *cap*, що кодує білок капсиду. Наведено значення бутстреп-аналізу (500 повторів) для оцінки достовірності дерева, а також номери ізолятів в GenBank. Скорочене дерево побудовано з використанням р-дистанцій, методу приєднання сусідів шляхом об'єднання гілок з низькою достовірністю.

Fig. 1. Phylogenetic relationships between the 36 evolutionarily most distant isolates (determined from a phylogenetic analysis of 1138 PCV-3 isolates with complete genome; overlapping isolates not shown) based on the *cap* gene encoding the capsid protein. Bootstrap values (500 replicates) for assessing the reliability of the tree are shown, as well as the isolate numbers in GenBank. Condensed tree was constructed by p-distances, the neighbor joining method by merging low-confidence branches.

На третьому етапі використано AlphaFold 3 для побудови 3D моделей потенційних G4s в геномі ЦВС-3. В якості контролю коректності побудови цих моделей використовували 3D моделі G4s, утворення одного з яких експериментально визначено в прегеномній РНК (пгРНК) вірусу гепатиту Б (ВГБ) в роботі [30]. ПгРНК — це проміжна мРНК, що утворюється при реплікації ВГБ та служить матрицею для зворотної транскрипції і трансляції вірусних білків.

В геномі ВГБ авторами роботи [31] знайдено 8 потенційних G4s з петлею до 10 н., для яких значення G-рахунку варіювало від 15 до 20. У цьому дослідженні автори зосередилися на РНК-G-квадруплексі, розташованому в положенні 1884–1902 (позицію наведено для ізоляту V01460) пгРНК ВГБ, і експериментально підтвердили його роль у стимулюванні трансляції. За допомогою низки біофізичних (спектроскопії кругового дихроїзму, плавлення олігонуклеотидних дуплексів), імунологічних (ІФА) та молекулярно-генетичних (кількісна ПЛР) автори показали, що зазначений G4 відіграє життєво важливу роль у регуляції трансляції вірусної мРНК.



Рис. 2. Філогенетичні відношення між 36 еволюційно найвіддаленішими ізолятами ЦВС-3 (які визначено за результатами філогенетичного аналізу 1138 ізолятів ЦВС-3 з повним геномом; ізоляти, що перекриваються, не показано) на основі гена *rep*, що кодує репліказу. Наведено значення бутстреп-аналізу (500 повторів) для оцінки достовірності дерева, а також номери ізолятів в GenBank. Скорочене дерево побудовано з використанням р-дистанцій, методу приєднання сусідів шляхом об'єднання гілок з низькою достовірністю. Стрілки вказують на утворення α -спіралі в пентапептиді (позиції 22–26 амінокислотних залишків) реплікази ізоляту MZ851986 (а) порівняно з її відсутністю в репліказі ізоляту MH491030 (б).

Fig. 2. Phylogenetic relationships between 36 most distant isolates of PCV-3 (determined from a phylogenetic analysis of 1138 PCV-3 isolates with complete genome; overlapping isolates not shown) based on the *rep* gene encoding the replicase. Bootstrap values (500 replicates) for assessing the reliability of the tree are indicated, as well as the isolate numbers in GenBank. Condensed tree was constructed by p-distances, the neighbor joining method by merging low-confidence branches. Arrows indicate the formation of α -helix in the pentapeptide (22–26 positions of amino acid residues) in the replicase of MZ851986 isolate (a) in comparison with its absence in the replicase of MH491030 isolate (b).

З 8-ми знайдених в роботі [31] G4s, що утворено двома G-тетрадами, 3D моделі G4s нами побудовано тільки для трьох, послідовності яких наведено в Табл. 2 (моделі для двох з них наведено на Рис. 3а – Рис. 3г). Для інших мотивів, в тому числі, й для мотиву в позиції 2987–3009, побудовано 3D моделі дуплексів або аптамерів (однониткових олігонуклеотидів), а не G-квадруплексів (результати не показано). Відсутність третьої тетради в G4s ВГБ веде до менш стабільних структур порівняно з тритетрадними G4s, але утворення G4s в низці випадків є ще можливим.

Таблиця 2. Консервативні мотиви потенційних G-квадруплексів в РНК вірусу гепатиту Б (G-багаті фрагменти послідовностей підкреслено). Послідовності наведено для ізоляту V01460 ВГБ. G4 в РНК ВГБ в позиції 1884-1902 експериментально перевірено в роботі [31], G4 в ДНК ВГБ* в позиції 1202–1220 — в роботі [32]

Table 2. Conserved motifs of putative G-quadruplexes in hepatitis B virus RNA (G-rich sequence fragments are underlined). Sequences are given for an V01460 HBV isolate. RNA G4 at position 1884-1902 and DNA G4 at position 1202–1220 were experimentally tested in [31] and [32] respectively.

Позиція, н.	Мотив G-квадруплексу	G-раху- нок	pLDDT
1202-1220 ген Р	5'- <u>GG</u> CUG <u>GG</u> GCUU <u>GG</u> UCAU <u>GG</u> -3'	20	pLDDT > 90
	5'- <u>GG</u> CTG <u>GG</u> GCTT <u>GG</u> TCAT <u>GG</u> -3' (*)	20	90 > pLDDT > 70
1774-1795 ген С	5'- <u>GG</u> <u>AGG</u> CUGUA <u>GG</u> CAUAAAUU <u>GG</u> -3'	14	90 > pLDDT > 70
1884-1902 ген С	5'- <u>GG</u> GU <u>GG</u> CUUU <u>GG</u> GGCAU <u>GG</u> -3'	18	90 > pLDDT > 70
2987-3009 ген S	5'- <u>GG</u> AGCU <u>GG</u> AGCAUUC <u>GG</u> GCUG <u>GG</u> -3'	18	-

З наведених на Рис. 3 3D моделей G4s тільки G4 в положенні 1202-1220 РНК ВГБ, який має найвищий параметр pLDDT (pLDDT > 90, Рис. 3а та Рис. 3б), утворено двома досконалими тетрадами (G13-G7-G2-G19 та G15-G6-G1-G18). G4 в цій же позиції в ДНК ВГБ (існування якого експериментально підтверджено в роботі [31]) є недосконалим, оскільки утворено однією досконалою тетрадою (G1-G7-G13-G19) та однією недосконалою структурою (G2-G6-G18), характеризується порівняно з РНК G4 меншим параметром pLDDT (90 > pLDDT > 70). З порівняння 3D моделей G4s в РНК (Рис. 3а та Рис. 3б) та ДНК (Рис. 3г та Рис. 3д) ВГБ в позиції 1202–1220 впливає, що вони також відрізняються сіткою водневих зв'язків. Зокрема, для G18 в РНК визначено три водневих зв'язки (G1 N₇ ... HN₂ G18 (на який вказує стрілка на Рис. 3б), G1 O₆ ... HN₂ G18, G18 N₁H... O₆ G1) та координаційний зв'язок з іоном K⁺ G18 O₆ ... K⁺, в той час як для G18 в РНК — тільки координаційний зв'язок з іоном K⁺ (dG18 O₆ ... K⁺, на який вказує стрілка на Рис. 3д).

З теоретично визначених на першому етапі чотирьох консервативних G-мотивів в геномній ДНК ЦВС-3 для всіх побудовано 3D моделі G4s, які містять три G-тетради (Рис. 4, Рис. 5).

Додатково в якості контролю коректності 3D моделей G4s ЦВС-3 нами побудовано 3D модель G-багатого мотиву в промоторі гена hTERT (human telomerase reverse transcriptase) (результат не показано). Цей фрагмент довжиною 68 н. містить три G4s з трьох тетрад, утворення яких експериментально підтверджено за допомогою методів кругового дихроїзму, термічної денатурації, ЯМР, розсіювання рентгенівського випромінювання [33].

Останні досягнення в розробці експериментальних методів (кріоелектронної мікроскопії, ЯМР, рентгенструктурного аналізу тощо) та обробці даних дозволили охарактеризувати структури в нуклеїнових кислотах з високою роздільною здатністю (0,3–0,8 нм). Так, за допомогою FRET-аналізу визначено кристалічну структуру 3WJ (PDB: 4KZ2) з роздільною здатністю 0,3 нм, яку знайдено в РНК пакувального мотору

бактеріофага phi29, що зчеплений з пакуванням ДНК [34]. В роботах [35] та [36] за допомогою модифікації ЯМР визначено існування структури 3WJ в геномі ВІЛ (PDB: 7lva).

Раніше авторами в роботі [30] проведено оцінку якості передбачення 3D моделі біополімерів за допомогою AlphaFold 3 через порівняння з цими експериментально визначеними структурами з атомарною роздільною здатністю. Показано, що 3D моделі вторинних 3WJ-структур в геномі ВІЛ та РНК бактеріофага phi29, які передбачено за допомогою AlphaFold 3, мають приблизно таку ж точність, як і 3WJs, структуру яких визначено за допомогою експериментальних методів та координати занесено в базу даних PDB.

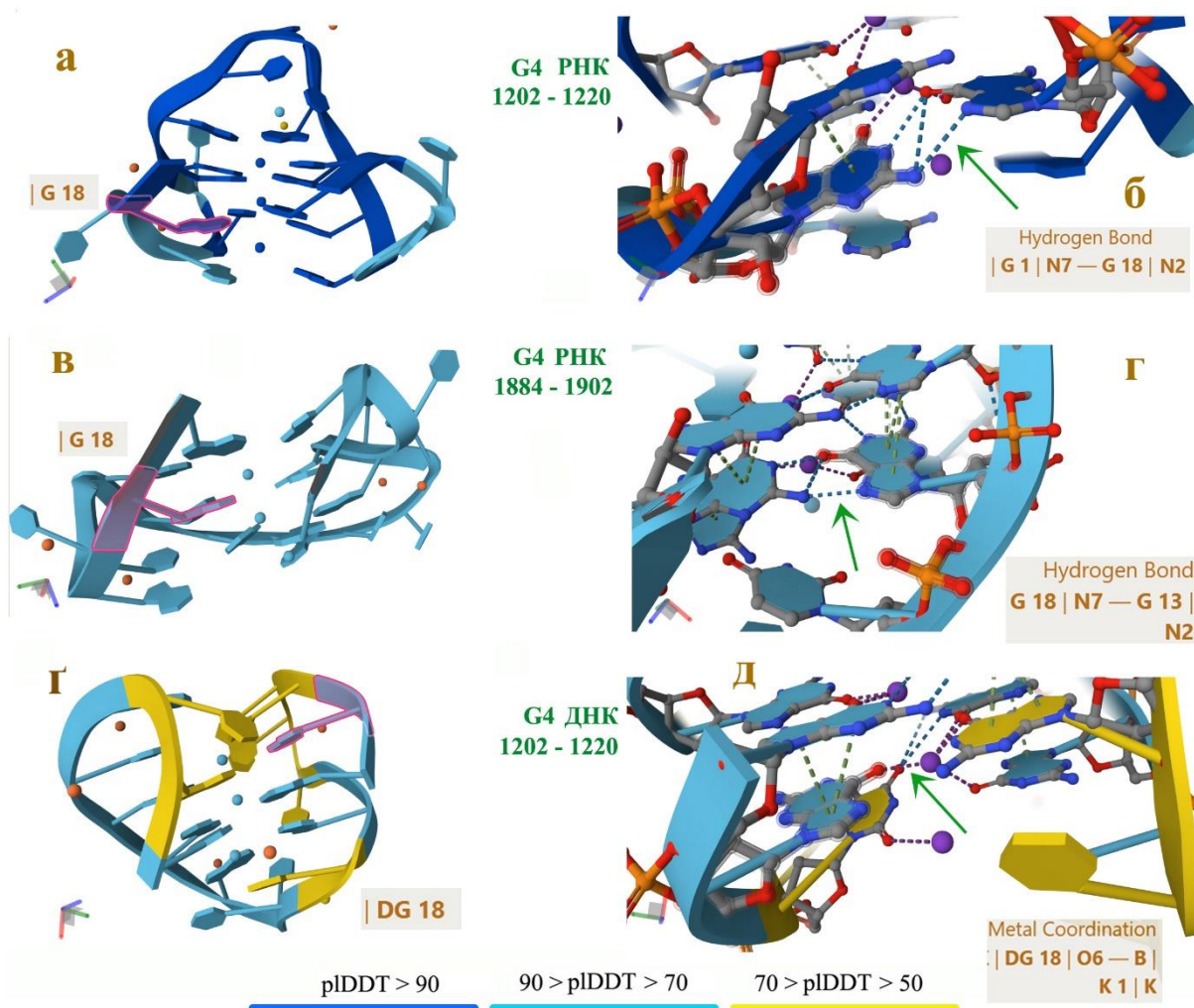


Рис. 3. 3D моделі G-багатих фрагментів в РНК (а-г) та ДНК (е-г) вірусу гепатиту Б з потенціалом утворення G-квадруплексів двома G-тетрадами. Позицію наведено для ізоляту V01460 ВГБ. а, б — pLDDT > 90, позиція 1202–1220; в, г — 90 > pLDDT > 70; позиція 1884–1902; е, ф — положення 1202–1220. Стрілками показано водневі зв'язки (б — G1 N₇ ... HN₂ G18, г — G18 N₇ ... HN₂ G13) та координаційний зв'язок з іоном K⁺ (д — dG18 O₆ ... K⁺).

Fig. 3. 3D models of G-rich fragments in hepatitis B virus RNA (a–d) and DNA (e–f) with the potential for G-quadruplex formation by two G-tetrads. Positions are indicated for V01460 HBV isolate. a, b — pLDDT > 90, 1202–1220; c, d — 90 > pLDDT > 70; b — 1884–1902 position; e, f — 1202–1220 position. The arrows indicate hydrogen bonds (b — G1 N₇ ... HN₂ G18, d — G18 N₇ ... HN₂ G13) and the coordination bond with K⁺ ion (f — dG18 O₆ ... K⁺).

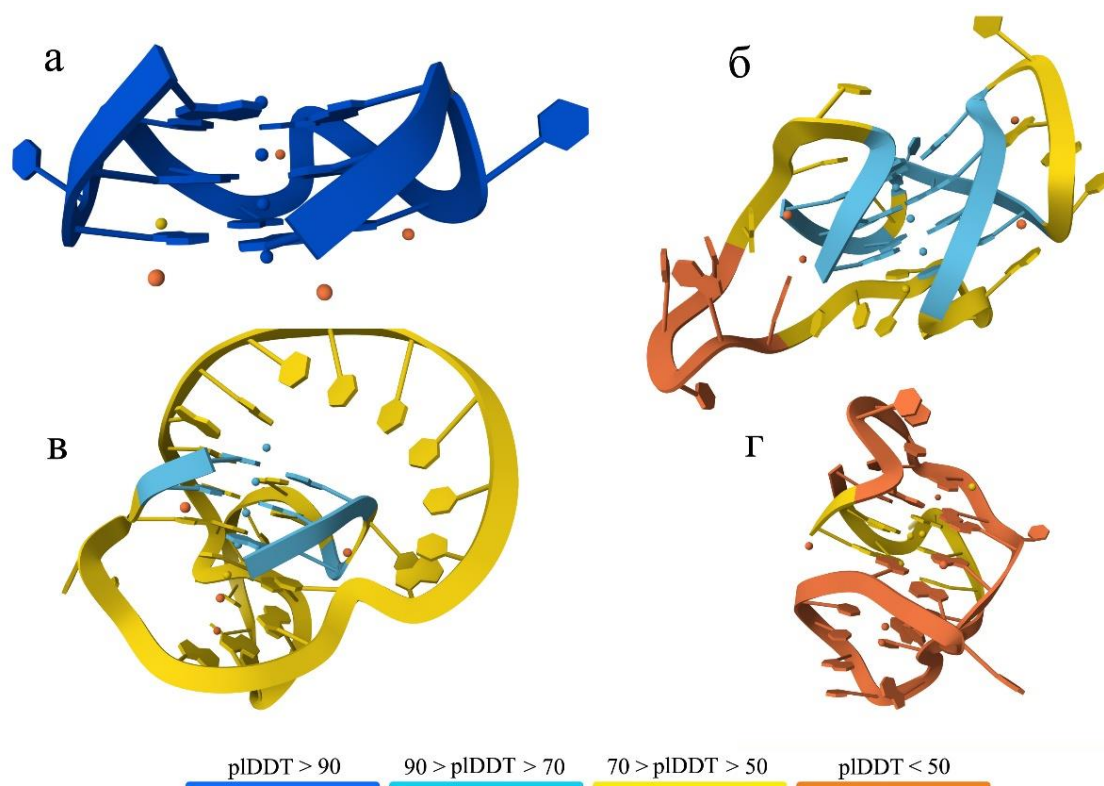


Рис. 4. 3D моделі консервативних G-квадруплексів, які утворено трьома G-тетрадами, в одноланцюговій ДНК ізолятів ЦВС-3 для фрагмента довжиною 15 н. в положенні 1164–1178 промотора гена *cap* (а), довжиною 36 н. в положенні 645–680 (б), довжиною 32 н. в положенні 802–833 (в), довжиною 38 н. в положенні 893–930 (г) гена, що кодує репліказу, з 10 іонами K^+ . (а) — $pLDDT > 90$, (б, в) $90 > pLDDT > 70$, (г) — $70 > pLDDT > 50$.

Fig. 4. 3D models of conservative G-quadruplexes, which are formed by three G-tetrads, in single-stranded DNA of PCV-3 isolates for a fragment with length of 15 nt at 1164–1179 position of gene *cap* promoter (a), fragment with length of 36 nt of the gene encoding the replicase at 645–680 position (b), fragment with length of 32 nt at 802–833 position (c), fragment with length of 38 nt at 893–930 position (d) with 10 K^+ ions (a) — $pLDDT > 90$, (b, c) $90 > pLDDT > 70$, (d) — $70 > pLDDT > 50$

В роботі [37] промоторну область визначили як область, яка локалізована на 500 н. вище сайту старту транскрипції. Всі промотори безпосередньо ранніх генів вірусу простого герпеса першого типу містять консервативні послідовності, які можуть утворювати G4s [38], що підкреслює можливу роль G4s в транскрипційному та трансляційному регулюванні вірусних генів, а також в пошкодженні та відновленні провірусної ДНК [2].

З чотирьох визначених потенційних G4s в геномі ЦВС-3 G-квадруплекс в положенні 1164–1178 знаходиться в області промотору гена *cap*, а інші три G4s — всередині гена *rep*. Для порівняння, з трьох потенційних G4s в геномі ВГБ G-квадруплекс в положенні 1776–1797 є локалізованим в області промотору гена X. Інші два G4s знаходяться всередині генів P та C.

Для підтвердження структури G4s, в тому числі, з високою роздільною здатністю за допомогою ЯМР, криоелектронної мікроскопії [39], дослідники, як правило, використовують аптамери довжиною 12–46 н. [30, 33, 40, 41]. Проте в геномі патогенів

G4s *in vivo* та *in vitro*, якщо вони є термодинамічно вигідними, мають існувати в складі макромолекул, а не тільки аптамерів. З метою перевірки цієї тези нами побудовано 3D моделі послідовностей аптамерів, які містять G-мотиви збільшеної довжини на 10–20 н. (по 5–10 н. з 5'- та 3'-кінця) як для G-багатих фрагментів в геномі ВГБ (Табл. 2), так і для таких ЦВС-3 (Табл. 1).

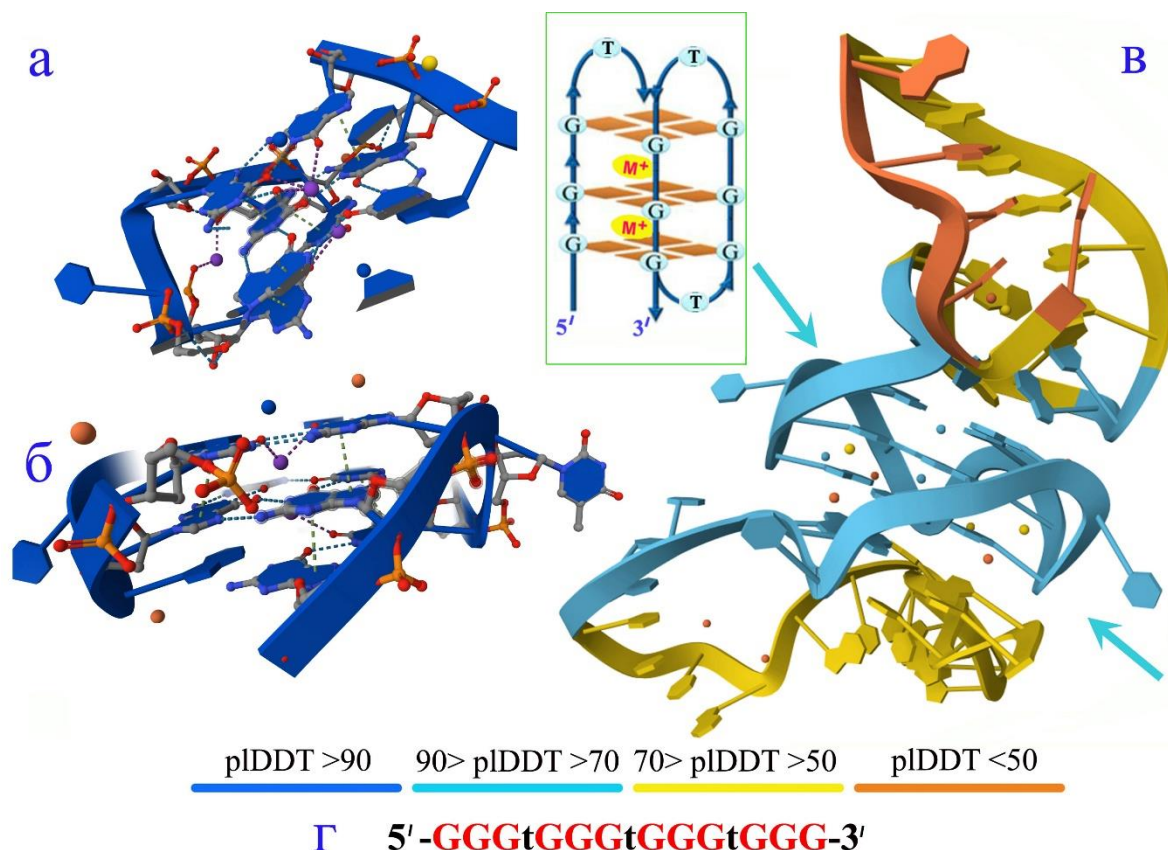


Рис. 5. 3D моделі консервативних G-квадруплексів, які утворено трьома G-тетрадами, в одноланцюговій ДНК ізолятів ЦВС-3 для фрагмента довжиною 15 н. в положенні 1164–1178 з 8 Na⁺ (а, б) та довжиною 57 н. в положенні 1144–1200 з 20 іонами Na⁺ (в; стрілки вказують на G4) в промоторі гена *cap*. (а, б) — pLDDT > 90, (в) — 90 > pLDDT > 70. (г) — мотив G4. Пунктиром показано водневі зв'язки між комплементарними нуклеотидами в тетраді та стекінг взаємодію між нуклеотидами паралельних тетрад в різних площинах (а, б). На вставці — схема консервативного внутрішньомолекулярного антипаралельного G-квадруплексу, що утворено стекінг взаємодією трьох G-тетрад, довжиною 15 н. у позиції 1164–1178 ДНК ЦВС-3 та стабілізовано центральним сольватованим моновалентним катіоном (K⁺ > Na⁺ > Li⁺). G-квартет, який містить чотири копланарних гуанідини, стабілізовано водневими зв'язками.

Fig. 5. 3D models of conservative G-quadruplexes formed by three G-tetrads in single-stranded DNA of PCV-3 isolates for a fragment with length of 15 nt at 1164–1178 position with 8 Na⁺ (a, b) and fragment with length of 57 nt at 1144–1200 position with 20 Na⁺ ions (c; arrows point to G4) in the gene *cap* promoter. (a, b) — pLDDT > 90, (c) — 90 > pLDDT > 70. (d) — G4 motif. The dotted line shows hydrogen bonds between complementary nucleotides in the tetrad and stacking interaction between nucleotides of parallel tetrads in the different planes (a, b). Inset — a scheme of a conservative intramolecular antiparallel G-quadruplex formed by stacking interaction of three G-tetrads with length of 15 nt at 1164–1178 position of the PCV-3 DNA and stabilized by a central solvated monovalent cation (K⁺ > Na⁺ > Li⁺). The G-quartet that contains four coplanar guanidines is stabilized by hydrogen bonds.

3D моделювання трьох аптамерів збільшеної довжини на 10–20 н., які містять потенційні G4s в РНК ВГБ, показало відсутність G4s у теоретично визначених G-багатих фрагментах (послідовності яких наведено в Табл. 2).

Для G4s в геномній ДНК ЦВС-3 ситуація є іншою. Незважаючи на збільшення довжини аптамерів структура трьох визначених G4s (послідовності яких наведено в Табл. 1) зберігається. На Рис. 5в наведено 3D модель для фрагмента довжиною 57 н. (в положенні 1144–1200 н.), який містить G-багатий мотив довжиною 15 н. (в положенні 1164–1178). 3D моделі двох інших визначених потенційних G4s в геномі ЦВС-3 збільшеної довжини на 20 н. (по 10 н. з 5'- та 3'-кінця) не наведено.

Запропоноване та апробоване нами дослідження не коротких G-багатих мотивів, а аптамерів збільшеної довжини узгоджується з наведеними нижче висновками в роботі [2].

Для коротких нуклеотидних послідовностей з потенціалом утворення G4s отримано структури з високою роздільною здатністю за допомогою дифракції рентгенівських променів [42], ЯМР-спектроскопії [43], кріоелектронної мікроскопії [38]. Проте структура таких аптамерів часто відрізняється від їхньої нативної конформації через низку чинників, в тому числі, через вплив оточуючих нуклеотидів. Важливою перевагою AlphaFold 3 над зазначеними методами є можливість отримувати тривимірні моделі для нуклеїнових кислот довжиною до 5 т.н. з роздільною здатністю, яка є порівняною з такою експериментальних методів.

Беручи до уваги наведене вище, нами отримано 3D модель фрагмента довжиною 129 н., який містить два G4s, які знаходяться на відстані понад 100 н. (Табл. 1, в положеннях 802–833 та 893–930). Проте надійність 3D моделі для цих двох G4s в цьому випадку є нижчою порівняно з мономерними G4s: $70 > \text{pLDDT} > 50$ та $50 > \text{pLDDT}$ для кожного з двох G4s відповідно (3D модель не наведено).

Крім того, проведено пошук внутрішньомолекулярних 3WJ (three-way junctions) в мРНК ізоляту MT075518 ЦВС-3 через побудову 3D моделей за допомогою AlphaFold 3.

Структура 3WJ є мультиспіральним з'єднанням, яке утворено трьома з'єднаними у точці зв'язування дуплексами. Попередньо послідовність мРНК було поділено на фрагменти, що не перекриваються, довжиною 300 н., зі зсувом на 150 н. На відміну від спумавірусу великої рогатої худоби (СВ ВРХ), для якого авторами знайдено для набору з 37 ізолятів СВ ВРХ консервативний мотив 3WJ довжиною 73 н. зі 100 %-им рівнем подібності [36], в мРНК ЦВС-3 структуру 3WJ не знайдено.

3D моделі білків ЦВС-3

Тривимірна структура надає важливу інформацію для розуміння біологічних функцій білків. Google DeepMind надає безкоштовний доступ до AlphaFold 3 для некомерційних досліджень через платформу AlphaFold Server, що дозволило отримати наведені в роботі результати.

Для 3D моделювання структури білків вибрано пари ізолятів MH491030 і MZ851986 та MT075517 і MG372488 ЦВС-3, які є еволюційно найвіддаленішими за результатами філогенетичного аналізу на основі гена *cap*, що кодує білок капсиду (Рис. 1), та на основі гена *rep*, що кодує репліказу (Рис. 2).

Фермент реплікази Rep містить 296 амінокислотних залишків (а.з.), а білок капсиду Cap — 214 а.з. З побудованих 3D моделей білків еволюційно найвіддаленіших ізолятів ЦВС-3 за *rep* та *cap* генами (Рис. 6) встановлено їхні особливості, а саме кількість α -спіралей, β -листів, β -поворотів та водневих зв'язків (Табл. 3). Всі передбачені структури характеризуються вбудованими в AlphaFold 3 показниками для оцінки достовірності 3D моделі — pLDDT, pTM та ipTM.

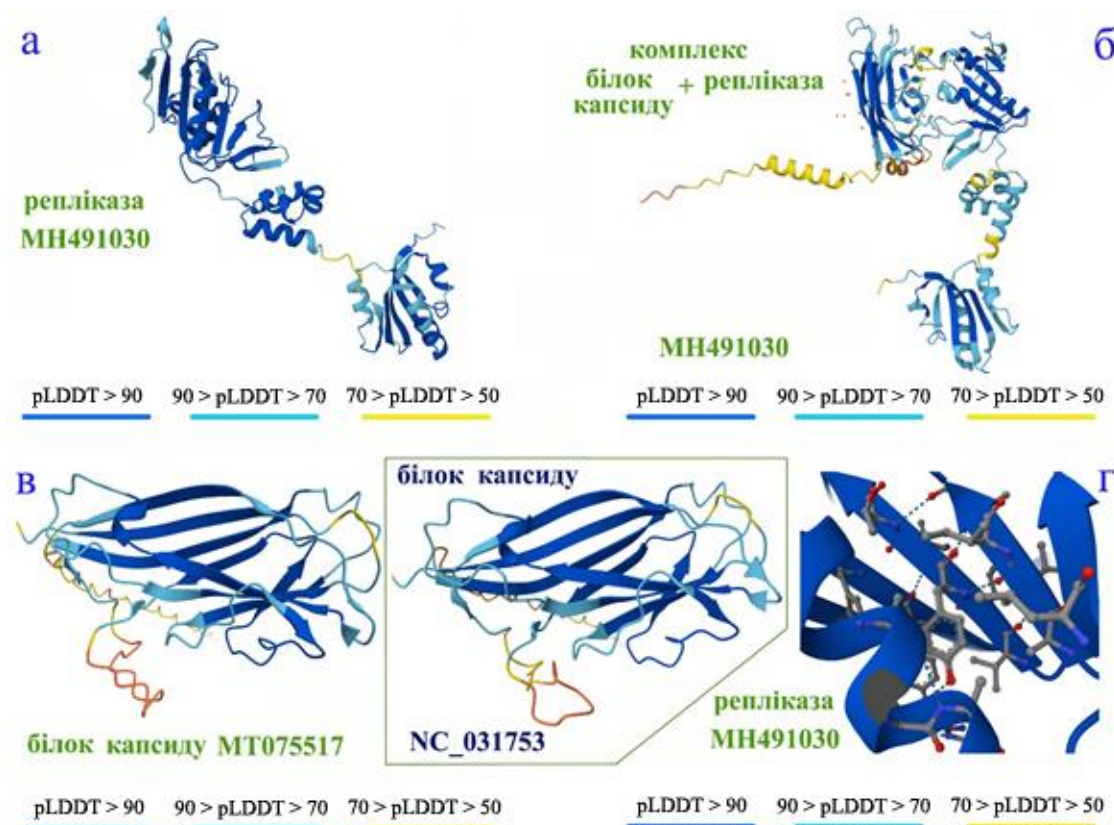


Рис. 6. 3D модель реплікази довжиною 296 а.з. для ізоляту МН491030 (а), білка капсиду довжиною 214 а.з. ізоляту МТ075517 (в), комплексу білок капсиду — репліказа з 25 іонами Na^+ для ізоляту МН491030 (б), α -спіралі та β -листів реплікази ізоляту МН491030 (г). На вставці — 3D модель білка капсиду референтного штаму NC_031753.

Fig. 6. 3D model replicase with length of 296 aa for МН491030 isolate (a), capsid protein with length of 214 aa of МТ075517 isolate (c), capsid protein — replicase complex with 25 Na^+ ions for МН491030 isolate (b), α -helix and β -sheets of the replicase of МН491030 isolate (d). Inset — 3D model capsid protein of NC_031753 reference strain.

Параметр pLDDT визначає достовірність локальної структури, оцінюючи, наскільки добре 3D модель узгоджуватиметься з експериментальною структурою. Для білків цей параметр є аналогічним параметру IDDT- Ca , але має більшу дискретність, оскільки може змінюватися для кожного атома, а не для кожного залишку. Передбачувана структура порівнюється з справжньою структурою з бази даних PDB за допомогою тесту IDDT, який визначає точність домену без необхідності сегментації ланцюгових структур. Відстані обчислюються або між усіма важкими атомами (IDDT), або лише між атомами Ca для вимірювання точності остова (IDDT- Ca).

Для переважної частини кожного з трьох доменів реплікази ізолятів ЦВС-3, які містять β -листи та α -спіралі (Рис. 6а, Табл. 3), значення pLDDT перевищує 90, а для незначної частини доменів та неупорядкованої структури реплікази – в інтервалі від 70 до 90. Отримані значення pLDDT вказують на високу достовірність і точне передбачення 3D моделі реплікази ЦВС-3. NC_031753 – референтний штам [44].

Білок капсиду еволюційно найвіддаленіших ізолятів ЦВС-3 містить β -листи, значення pLDDT для переважного числа яких перевищує 90, а неупорядкована структура характеризується значеннями pLDDT від рахунку менше 50 до не більше 70 (Рис. 6в).

Таблиця 3. Параметри білків Rep та Cap еволюційно найвіддаленіших ізолятів МН491030 і МZ851986 та МТ075517 і МG372488 з 1138 ізолятів ЦВС-3 з повним геномом згідно з філогенетичними відношеннями для повновимірних генів *rep*, який кодує репліказу, та *cap*, який кодує білок капсиду. NC_031753 — референтний штаб [44]

Table 3. Parameters of Rep and Cap proteins of the evolutionarily most distant МН491030 and МZ851986, МТ075517 and МG372488 isolates from 1138 of PCV-3 isolates with a complete genome according to phylogenetic relationships for the full-length *rep* gene which encodes the replicase and *cap* gene which encodes the capsid protein. NC_031753 — reference strain [44]

Білок	Ізолят	Число α-спіралей, %	Число β-листів, %	Число β-поворотів, %	Число водневих зв'язків
Репліказ	МН491030	21	26	32	188
	МZ851986	23	27	31	189
	NC_031753	12	16	32	190
Капсидний	МТ075517	0	43	22	129
	МG372488	15	35	19	124
	NC_031753	1	16	22	126

Параметри rTM та ipTM показують оцінку передбаченої матриці моделювання (rTM; predicted template modeling) та оцінку передбаченого інтерфейсу матриці моделювання (ipTM; interface predicted template modeling). Обидві ці оцінки виводяться з показника матриці моделювання (TM), яка визначає точність всієї структури [45, 46]. Рахунок rTM вище 0,5 означає, що загальний передбачений фолдінг має бути подібним до справжньої структури. Параметр ipTM вимірює точність передбаченого відносного положення субодиниць всередині комплексу.

Рахунок rTM для 3D моделей реплікази та білка капсиду ЦВС-3 (Рис. 6) становить 0,7, що задовольняє умові достовірності даних моделей. ipTM показує точність передбаченого відносного положення всередині комплексу, і тому цей показник для зазначених вище моделей не визначено.

Репліказа ЦВС — це вірусний білок, необхідний для реплікації одноланцюгової кільцевої ДНК вірусу, що працює за механізмом кільця, що котиться, і взаємодіє з іншими вірусними білками, такими як капсидний білок Cap [47]. Репліказа (Rep) та білок капсиду (Cap) взаємодіють, причому Rep безпосередньо зв'язується з Cap, утворюючи комплекси, які впливають на реплікацію, складання та патогенез вірусу, часто за участю факторів хазяїна. ipTM комплексу білок капсиду — репліказа за 25 іонів Na⁺ для ізоляту МН491030 (Рис. 6) становить 0,11, а rTM — 0,39.

В роботі [48] розглянуто точність передбачення тривимірних структур за допомогою AlphaFold 3 через порівняння прогнозів 3D моделей з експериментально визначеними структурами аптамерів у базі даних білків PDB, а також зі структурами аптамерів, які не включено до PDB та охарактеризовано іншими методами. Показано, що AlphaFold 3 ефективно моделював низку аптамерів, для яких є структура в базі даних PDB, включаючи G4s. Для аптамерів, щодо яких відсутні відомості в PDB, прогнози AlphaFold 3 характеризувалися меншою достовірністю, проте демонстрували достатнє збігання з експериментальними даними, точно прогнозуючи конформацію G4s.

Структурне порівняння 3D моделей білків двох еволюційно віддалених ізолятів ЦВС-3 показало, що їхня просторова організація відрізняється кількістю водневих

зв'язків, α -спіралей, β -листів, β -поворотів (структур, що представляють собою повернену на 180° петлю) (Табл. 3). Визначена різниця може бути пов'язаною з замінами амінокислотних залишків різних класів.

Мутаційний та еволюційний аналіз білків та генів ЦВС-3

За допомогою аналізу графіків ентропії Шеннона — залежності міри мінливості амінокислотних залишків в заданому положенні від їхньої позиції — виявлено поліморфні сайти для білка капсиду та реплікази еволюційно віддалених ізолятів ЦВС-3. Радикальні та консервативні заміни виявлено для обох білків, які транскрибуються з відкритих рамок зчитування ЦВС-3.

Нами ідентифіковано 20 та 21 амінокислотний варіабельний сайт для еволюційно віддалених ізолятів ЦВС-3 (Рис. 7). Відносна кількість варіабельних сайтів для реплікази та білка капсиду, що транскрибуються з відкритих рамок зчитування ORF1 та ORF2, становила: *Rep* — 6,7 % (20/296), *Cap* — 9,8 % (21/214).

Згідно з класичною шкалою гідрофобності Кайта-Дуліттла [49], яку широко застосовують для аналізу структури білків, до гідрофобних амінокислот належать ізолейцин, валін, лейцин, фенілаланін, цистеїн, метіонін, аланін (по порядку зменшення гідрофобності). Решта амінокислот належать до числа гідрофільних.

При порівнянні амінокислотних послідовностей реплікази цих двох ізолятів ЦВС-3 (Табл. 4) виявлено 19 різних замін, з яких 2 консервативні заміни $E \rightarrow D$ у позиціях 77 та 260. Найбільшу кількість замін (5) встановлено за участю гідрофільного серину (S), дві із яких є замінами на гідрофобні залишки аланіну (A) та ізолейцину (I). Чотири заміни виявлено для гідрофільного аргініну (R), одна із яких є заміною на гідрофобний залишок валіну (V).

Зазначені вище амінокислотні заміни ведуть до зростання гідрофобності і зміни поверхневих властивостей білків. Наприклад, заміна амінокислотного залишку $Q \rightarrow R$ (в положенні 125 для ізолятів MG372488 і MT075517, Табл. 5) веде до зниження полярності білка.

Оскільки найчастішою молекулярно-генетичною подією в ході молекулярної еволюції патогенів є мутації, нами проведено мутаційний аналіз генів реплікази *rep* та білка капсиду *cap*, 5'-нетрансльованої області (НТО, позиції 1–222), міжгенної області (позиції 1114–1342) повногеномних ізолятів ЦВС-3, а також геномної ДНК вірусу, розраховано швидкість мутацій (Табл. 6).

Для білка капсиду ізолятів ЦВС-3 виявлено 20 замін, із яких 9 є неконсервативними. Три однакові консервативні заміни ($R \rightarrow K$) визначено у позиціях 27, 82, 148. Найбільшу кількість замін (6) виявлено за участю гідрофільних залишків лізину (K) та аргініну (R) (Табл. 5).

Встановлено, що найвищу швидкість мутацій має 5'-НТО кільцевої ДНК ЦВС-3, а найменшу — ген *rep*, що дозволяє розглядати його як потенційний маркер для детекції ЦВС-3 шляхом ПЛР.

Для встановлення напряму природного відбору, що діє на гени та фрагменти геному ЦВС-3, визначено відношення частот несинонімічних замін (dN) до синонімічних (dS) на нуклеотидний сайт dN/dS для генів *rep* та *cap*, 5'-НТО, міжгенної області повногеномних ізолятів ЦВС-3. За цим параметром встановлено, що тільки послідовність 5'-НТО перебуває під тиском позитивного відбору (Табл. 6), що узгоджується з встановленою для цієї області найвищою швидкістю мутацій.

З аналізу заряджених амінокислотних залишків в парі ізолятів MH491030 $\rightarrow$ MZ851986 випливає, що в репліказі ізоляту MH491030 є 5 позитивно заряджених а.з., 2 негативно заряджених а.з. Репліказа ізоляту MZ851986 містить 3 позитивно заряджених а.з., 2 негативно заряджених а.з., а також 1 полярний а.з., який позитивно заряджений.

Аналіз заміन амінокислот, виходячи з їхньої полярності, показує, що репліказа ізоляту МН491030 характеризується збільшеною полярністю (4 а.з.) порівняно з такою ізоляту МZ851986 (3 а.з., один з яких, а саме, гістидин, несе позитивний заряд).

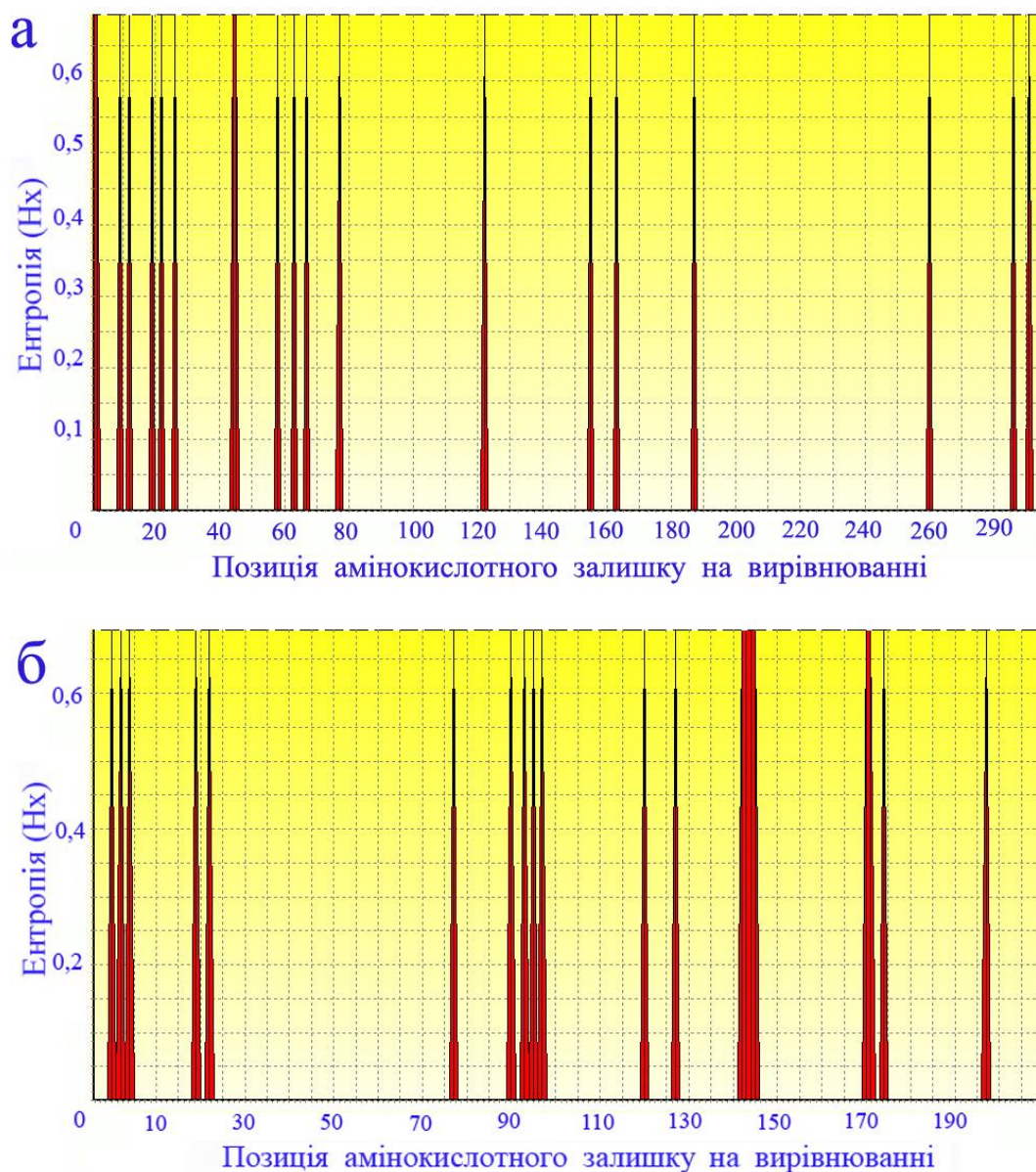


Рис. 7. Графік ентропії Шеннона для реплікази довжиною 296 а.з. еволюційно найвіддаленіших ізолятів МН491030 та МZ851986 (а) та для білка капсиду довжиною 214 а.з. еволюційно найвіддаленіших ізолятів МТ075517 та МG372488 (б). Міру мінливості кожного сайту отримано на підставі множинного вирівнювання амінокислотних послідовностей білків наведених вище ізолятів ЦВС-3.

Fig. 7. Shannon entropy plot for the replicase with a length of 296 aa of the evolutionarily most distant isolates МН491030 and МZ851986 (a) and the capsid protein with a length of 214 aa of the evolutionarily most distant isolates МТ075517 and МG372488 (b). The measure of variability of every site was obtained based on multiple alignment of the amino acid sequences of the proteins of the above mentioned PCV-3 isolates.

Таблиця 4. Амінокислотні заміни для реплікази еволюційно найвіддаленіших ізолятів МН491030→МЗ851986 ЦВС-3 з локалізацією у α -спіралях (α), β -листах (β), неупорядкованих ділянках (-). Позицію наведено відповідно до графіка ентропії Шеннона на Рис. 7 а. Підкреслено заряджені, курсивом виділено полярні амінокислоти. Виділено позиції, заміна залишків в яких веде до утворення α -спіралі в пентапептиді (позиції з 22 по 26 а.з.) реплікази ізоляту МЗ851986

Table 4. Amino acid substitutions for the replicase of the evolutionarily most distant isolates МН491030→МЗ851986 of PCV-3 with localization in α -helices, β -sheets, disordered fragments. The position is indicated according to Shannon entropy plot in Fig. 7 a. Charged amino acids are underlined, polar amino acids are shown by italic. Positions are highlighted, the substitution of residues in which leads to the formation of α -helix in the pentapeptide (22–26 aa position) in the replicase of МЗ851986 isolate

Позиція	1	2	9	12	19	22	26
Заміна амінокислоти	V→ <u>R</u> - → -	<u>R</u> →де- леція	<u>R</u> →S - → -	F→L β → β	P→Q - → -	W→L - → α	V→L - → α
Позиція	44	45	58	63	67	77	122
Заміна амінокислоти	<u>K</u> → <u>R</u> - → -	S→G - → -	N→S - → -	S→I - → -	<u>R</u> →P - → -	<u>E</u> → <u>D</u> β → β	A→S - → -
Позиція	155	163	187	260	286	291	-
Заміна амінокислоти	P→A - → -	Y→H β → β	Q→ <u>K</u> β → β	<u>E</u> → <u>D</u> - → -	<u>K</u> → <u>D</u> - → -	V→M - → -	-

Заміна тріптофану (W), ароматичної гетероциклічної амінокислоти, та валіну (V), аліфатичної амінокислоти, на лейцин (L), аліфатичну амінокислоту, в пентапептиді (позиції 22 а.з. та 26 а.з.; Табл. 4) веде до утворення α -спіралі в пентапептиді реплікази ізоляту МЗ851986 (позиції з 22 по 26 а.з.; Рис. 2а) на відміну від ізоляту МН491030 (Рис. 2б). Через наявність у вторинній структурі α -спіралей та β -листів репліказа ізоляту МЗ851986, як, доречі, й капсидні білки, може відноситися до білків « α + β » класу. Репліказу МН491030 через наявність у вторинній структурі тільки β -листів (Табл. 4) можна віднести до білків « β »-класу (Табл. 4).

За будь-яких структурних переходів відбувається зміна загальної енергії системи, на яку, як відомо, впливають ентальпійний та ентропійний фактори, внесок яких є різним при формуванні тих чи інших елементів вторинної структури білка. В альфа-спіралях амінокислотні залишки утворюють більше внутрішньомолекулярних зв'язків, ніж у бета-листах [50]. Ентропія при утворенні альфа-спіралей знижується більшою мірою, ніж при утворенні бета-структури, що має сприяти переходу з альфа-спіралі до бета-листа. Через більшу кількість зв'язків між залишками ентальпія при утворенні альфа-спіралей знижується більшою мірою, ніж при формуванні бета-листів, що має сприяти переходу з бета-листа до альфа-спіралі.

Варто зазначити, що положення еволюційно найвіддаленіших ізолятів ЦВС-3, у тому числі, ізолятів МЗ851986 та МГ372488, на філогенетичному дереві визначено нами коректно за допомогою методу приєднання сусідів, що підтверджено положенням ізоляту МГ372488 на дереві, яке визначено для повногеномних ізолятів ЦВС-3 за допомогою методу максимальної правдоподібності [51].

Капсидний білок ізоляту МГ372488 має 7 позитивно заряджених амінокислотних залишків, 1 негативно заряджений та 6 полярних незаряджених залишків, в той час як білок капсиду ізоляту МТ075517 має 4 позитивно заряджених і 4 полярних незаряджених залишків.

Таблиця 5. Амінокислотні заміни для білка капсиду еволюційно найвіддаленіших ізолятів MG372488→MT075517 ЦВС-3 з локалізацією у α -спіралях (α), β -листах (β), неупорядкованих ділянках (-). Позицію наведено відповідно до графіка ентропії Шеннона на Рис. 7 б. Підкреслено заряджені, курсивом виділено полярні амінокислоти

Table 5. Amino acid substitutions for the capsid protein of the evolutionarily most distant isolates MG372488→MT075517 of PCV-3 with localization in α -helixes, β -sheets, disordered fragments. The position is shown according to Shannon entropy plot in Fig. 7 b. Charged amino acids are underlined, polar amino acids are shown by italic

Позиція	5	7	9	24	27	82	95
Заміна амінокислоти	P→A - → -	Y→F - → -	<u>K</u> → <u>R</u> - → -	A→V α → β	<u>R</u> → <u>K</u> - → -	<u>R</u> → <u>K</u> β → β	L→S β → -
Позиція	98	100	102	125	132	147	148
Заміна амінокислоти	<u>K</u> →Q - → β	<u>K</u> →T - → β	L→T - → β	Q→P - → -	G→ <u>R</u> - → -	L→P α → -	<u>R</u> → <u>K</u> α → -
Позиція	149	150	175	176	179	202	-
Заміна амінокислоти	S→P α → -	L→I α → β	<u>R</u> →T - → -	F→Y - → -	V→T α → -	<u>D</u> →G - → -	-

Таблиця 6. Швидкість мутацій та відношення частот несинонімічних замінь до синонімічних на нуклеотидний сайт dN/dS для генів і фрагментів геному ЦВС-3

Table 6. Mutation rate and frequencies ratio of nonsynonymous substitutions to synonymous ones per nucleotide site dN/dS for PCV-3 genes and genome fragments

Ген/фрагмент геному	<i>rep</i>	<i>cap</i>	5'-НТО	Міжгенна область	Геномна ДНК
Швидкість мутацій, %	0,003	0,009	0,032	0,025	0,021
dN/dS	0,309	0,628	3,230	0,927	-

Примітка. dN/dS >1 вказує на позитивний відбір, dN/dS <1 — очищуючий відбір.

Note. dN/dS >1 indicates positive selection, dN/dS <1 indicates purifying selection.

З наведеного вище випливає, що капсидний білок еволюційно віддалених ізолятів ЦВС-3 відрізняється розподілом заряду, полярністю залишків, що веде до різної здатності утворювати водневі зв'язки та, як наслідок, до різного числа α -спіралей та β -листів. Репліказа цих ізолятів ЦВС-3 є значно консервативнішою структурою порівняно з капсидним білком через майже ідентичні значення наведених вище параметрів.

ВИСНОВКИ

За допомогою біоінформатичних методів ідентифіковано потенційні G-квадруплєкси в геномі цирковірусу свині третього типу, а також визначено особливості структурної організації білків, що транскрибуються з двох відкритих рамок зчитування, — реплікази та капсидного білка.

Проведено порівняння двох еволюційно найвіддаленіших ізолятів ЦВС-3 на основі побудованих за допомогою AlphaFold 3 3D моделей та мутаційного аналізу білків, еволюційного аналізу генів. 3D моделі реплікази, білка капсиду цирковірусу свині типу

3, а також чотирьох консервативних структурних мотивів — G4s, — які утворено трьома G-тетрадами, мають, як випливає з показників AlphaFold 3 [20], порівняну до експериментальних методів точність (0,1–2 нм для різних фрагментів білка, зокрема).

Отримані результати показують, що 3D моделі реплікази двох ізолятів ЦВС-3, які перебувають на максимальній еволюційній дистанції, незначно відрізняються числом α -спіралей, β -листів, β -поворотів та водневих зв'язків на відміну від 3D моделей капсидного білка таких ізолятів, для яких виявлено значно більшу різницю між зазначеними вище параметрами. Мутаційний та еволюційний аналізи реплікази і капсидного білка та генів, що їх кодують, віддалених ізолятів ЦВС-3 вказують на значно більшу варіабельність гена *cap* та більше число варіабельних сайтів для капсидного білка порівняно з геном *rep* та репліказою відповідно. Зазначені молекулярно-генетичні відмінності генів та білків двох ізолятів ЦВС-3 ведуть до відмінностей тривимірних структур їхніх білків.

Найстабільніший G4 з чотирьох визначених в геномі ЦВС-3, який утворено трьома G-тетрадами, локалізовано у промоторі гена *cap*. Збільшення довжини фрагментів, які фланкують цей G4, не перешкоджає його фолдингу, що свідчить про його значущість у життєвому циклі ЦВС-3. Існування G4s з трьох тетрад в геномі цирковірусу на відміну від двотетрадних G4s вірусу гепатиту Б у складі не тільки аптамерів, а й молекул збільшеної довжини підтверджено за допомогою AlphaFold 3.

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

ПОДЯКА

Роботу частково підтримано грантом 34.02.01.01 Ф Національної академії аграрних наук України.

Автори висловлюють подяку проф. Yuchen Xia (State Key Laboratory of Virology and Hubei Province Key Laboratory of Allergy and Immunology, Institute of Medical Virology, TaiKang Center for Life and Medical Sciences, TaiKang Medical School, Wuhan University, Wuhan, China) за інформаційну підтримку (додаткову інформацію щодо ізоляту ВГБ) при підготовці статті.

Окремо автори щиро дякують невідомому рецензенту за надзвичайно ретельний, критичний аналіз статті та низку корисних зауважень, рекомендацій, порад, направлених на покращення статті.

Authors' ORCID ID

О. Ю. Лиманська  <https://orcid.org/0000-0002-6022-0342>

О. В. Білоїван  <https://orcid.org/0000-0002-9973-4551>

О. К. Балак  <https://orcid.org/0009-0000-8745-8089>

О. П. Лиманський  <https://orcid.org/0009-0007-9922-4619>

REFERENCES

1. Zareie AR, Dabral P, Verma SC. G-quadruplexes in the regulation of viral gene expressions and their impacts on controlling infection. *Pathogens*. 2024;13(1):60. <http://doi.org/10.3390/pathogens13010060>
2. Monsen RC, Trent JO, Chaires JB. G-quadruplex DNA: a longer story. *Acc Chem Res*. 2022;55(22):3242–52. <http://doi.org/10.1021/acs.accounts.2c00519>
3. Wulfridge P, Sarma K. Intertwining roles of R-loops and G-quadruplexes in DNA repair, transcription and genome organization. *Nat Cell Biol*. 2024;26(7):1025–36. <http://doi.org/10.1038/s41556-024-01437-4>
4. Teng F-Y, Jiang Z-Z, Guo M, Tan X-Z, Chen F, Xi X-G, et al. G-quadruplex DNA: a novel target for drug design. *Cell Mol Life Sci*. 2021;78(19-20):6557–83. <http://doi.org/10.1007/s00018-021-03921-8>
5. Balasubramanian S, Neidle S. G-quadruplex nucleic acids as therapeutic targets. *Curr Opin Chem Biol*. 2009;13(3):345–53. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.04.637>

6. Teng Y, Girvan AC, Casson LK, Pierce WM, Qian M, Thomas SD, et al. AS1411 alters the localization of a complex containing protein arginine methyltransferase 5 and nucleolin. *Cancer Res.* 2007;67(21):10491–500. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4206>
7. Zhang X, Xu H, Sun R, Xiong G, Shi X. An insight into G-quadruplexes: Identification and potential therapeutic targets in livestock viruses. *Eur J Med Chem.* 2024;279:116848. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116848>
8. Fang P, Xie C, Pan T, Cheng T, Chen W, Xia S, et al. Unfolding of an RNA G-quadruplex motif in the negative strand genome of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by host and viral helicases to promote viral replication. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(19):10752–67. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad759>
9. Li Y, Zhu Y, Wang Y, Feng Y, Li D, Li S, et al. Characterization of RNA G-quadruplexes in porcine epidemic diarrhea virus genome and the antiviral activity of G-quadruplex ligands. *Int J Biol Macromol.* 2023;231:123282. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123282>
10. Liu W, He X, Zhu Y, Li Y, Wang Z, Li P, et al. Identification of a conserved G-quadruplex within the E165R of African swine fever virus (ASFV) as a potential antiviral target. *J Biol Chem.* 2024;300(7):107453. <http://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107453>
11. Phan TG, Giannitti F, Rossow S, Marthaler D, Knutson T, Li L, et al. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virol J.* 2016;13:184. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0642-z>
12. Da Silva RR, da Silva DF, da Silva VH, de Castro AM. Porcine circovirus 3: a new challenge to explore. *Front Vet Sci.* 2024;10:1266499. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1266499>
13. Rudova N, Lymanska O, Stegnyy B, Bolotin V, Solodiankin O, Gerilovych A. First detection of porcine circovirus type 3 in Ukraine. *Agricult Sci Pract.* 2021;8(2):16–23. <https://doi.org/10.15407/agrisp8.02.016>
14. Ha Z, Li J, Xie C, Yu C, Hao P, Zhang Y, et al. Prevalence, pathogenesis, and evolution of porcine circovirus type 3 in China from 2016 to 2019. *Vet Microbiol.* 2020;247:108756. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108756>
15. Chang C-C, Wu C-W, Chang Y-C, Wu C-Y, Chien M-S, Huang C. Detection and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 3 in Taiwan. *Arch Virol.* 2021;166(1):259–63. <http://doi.org/10.1007/s00705-020-04870-6>
16. Turliewicz-Podbielska H, Augustyniak A, Pomorska-Mól M. Novel porcine circoviruses in view of lessons learned from porcine circovirus type 2-epidemiology and threat to pigs and other species. *Viruses.* 2022;14(2):261. <http://doi.org/10.3390/v14020261>
17. Assao VS, Santos MR, Pereira CER, Vannucci F, Silva-Junior A. Porcine circovirus 3 in North and South America: Epidemiology and genetic diversity. *Transbound Emerg Dis.* 2021;68(6):2949–56. <http://doi.org/10.1111/tbed.14238>
18. Zhai S-L, Lu S-S, Wei W-K, Lv D-H, Wen X-H, Zhai Q, et al. Reservoirs of porcine circoviruses: a mini review. *Front Vet Sci.* 2019;6:319. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00319>
19. Gao Y-Y, Wang Q, Li H-W, Zhang S, Zhao J, Bao J, et al. Genomic composition and pathomechanisms of porcine circoviruses: A review. *Virulence.* 2024;15(1):2439524. <http://doi.org/10.1080/21505594.2024.2439524>
20. Abramson J, Adler J, Dunger J, Evans R, Green T, Pritzel A, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature.* 2024;630(8016):493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
21. Nobel Prize in Chemistry. Press release 2024 [homepage on the Internet]. [9 October 2024]. Available from <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2024/press-release/>
22. Kumar S, Stecher G, Suleski M, Sanderford M, Sharma S, Tamura K. MEGA12: molecular evolutionary genetics analysis version 12 for adaptive and green computing. *Mol Biol Evol.* 2024;41:1–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msae263>
23. Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999;41:95–8.
24. Kosakovsky Pond SL, Frost SDW. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol Biol Evol.* 2005;22(5):1208–22. <http://doi.org/10.1093/molbev/msi105>
25. Gupta S, Gupta D, Bhatnagar S. Analysis of SARS-CoV-2 genome evolutionary patterns. *Microbiol Spectr.* 2024;12(2):e0265423. <http://doi.org/10.1128/spectrum.02654-23>
26. Kikin O, D'Antonio L, Bagga PS. QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(2):W676–W82. <http://doi.org/10.1093/nar/gkl253>
27. Menendez C, Frees S, Bagga PS. QGRS-H Predictor: a web server for predicting homologous quadruplex forming G-rich sequence motifs in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(W1):W96–W103. <http://doi.org/10.1093/nar/gks422>
28. Lombardi EP, Londono-Vallejo A. A guide to computational methods for G-quadruplex prediction. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(1):1–15. <http://doi.org/10.1093/nar/gkz1097>

29. Powell HR, Islam SA, David A, Sternberg MJE. Phyre2.2: A community resource for template-based protein structure prediction. *J Mol Biol.* 2025;437(15):168960. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2025.168960>
30. Limanskaya OYu, Balak OK, Limanskii AP. Noncanonical structures in the genome of bovine foamy virus. *Cytology and Genetics.* 2025;59(5):503–15. <http://doi.org/10.3103/S009545272505007X>
31. Wang J, Huang H, Zhao K, Teng Y, Zhao L, Xu Z, et al. G-quadruplex in hepatitis B virus pregenomic RNA promotes its translation. *J Biol Chem.* 2023;299(9):105151. <http://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105151>
32. Molnár OR, Végh A, Somkuti J, Smeller L. Characterization of a G-quadruplex from hepatitis B virus and its stabilization by binding TMPyP4, BRACO19 and PhenDC3. *Sci Rep.* 2021;11:23243. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02689-y>
33. Monsen RC, DeLeeuw L, Dean WL, Gray RD, Sabo TM, Chakravarthy S, et al. The hTERT core promoter forms three parallel G-quadruplexes. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(10):5720–34. <http://doi.org/10.1093/nar/gkaa107>
34. Zhang H, Endrizzi JA, Shu Y, Haque F, Sauter C, Shlyakhtenko LS, et al. Crystal structure of 3WJ core revealing divalent ion-promoted thermostability and assembly of the Phi29 hexameric motor pRNA. *RNA.* 2013;19(9):1226–37. <http://doi.org/10.1261/rna.037077.112>
35. Chu C-C, Plangger R, Kreutz C, Al-Hashimi HM. Dynamic ensemble of HIV-1 RRE stem IIB reveals non-native conformations that disrupt the Rev-binding site. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(13):7105–17. <http://doi.org/10.1093/nar/gkz498>
36. Song Z, Gremminger T, Singh G, Cheng Y, Li J, Qiu L, et al. The three-way junction structure of the HIV-1 PBS-segment binds host enzyme important for viral infectivity. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(10):5925–42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab342>
37. Stefos GC, Theodorou G, Politis I. Genomic landscape, polymorphism and possible LINE-associated delivery of G-quadruplex motifs in the bovine genes. *Genomics.* 2022;114(2):110272. <http://doi.org/10.1016/j.ygeno.2022.110272>
38. Frasson I, Nadai M, Richter SN. Conserved G-quadruplexes regulate the immediate early promoters of human Alphaherpesviruses. *Molecules.* 2019;24(13):2375. <http://doi.org/10.3390/molecules24132375>
39. Monsen RC, Chua EYD, Hopkins JB, Chaires JB, Trent JO. Structure of a 28.5 kDa duplex-embedded G-quadruplex system resolved to 7.4 Å resolution with cryo-EM. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(4):1943–59. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad014>
40. Wolfe AL, Singh K, Zhong Y, Drewe P, Rajasekhar VK, Sanghvi VR, et al. RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer. *Nature.* 2014;513(7516): 65–70. <http://doi.org/10.1038/nature13485>
41. Wang SR, Zhang QY, Wang JQ, Ge X-Y, Song Y-Y, Wang Y-F, et al. Chemical targeting of a G-quadruplex RNA in the Ebola virus L gene. *Cell Chem Biol.* 2016;23(9):1113–22. <http://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.07.019>
42. Krauss IR, Spiridonova V, Pical A, Napolitano V, Sica F. Different duplex/quadruplex junctions determine the properties of anti-thrombin aptamers with mixed folding. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(2):983–91. <http://doi.org/10.1093/nar/gkv1384>
43. Tsukakoshi K, Yamagishi Y, Kanazashi M, Nakama K, Oshikawa D, Savory N, et al. G-quadruplex-forming aptamer enhances the peroxidase activity of myoglobin against luminol. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(11):6069–81. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab388>
44. Palinski R, Piceyro P, Shang P, Yuan F, Guo R, Fang Y, et al. A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure. *J Virol.* 2017;91(10): e01879-16. <https://doi.org/10.1128/jvi.01879-16>
45. Zhang Y, Skolnick J. Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. *Proteins.* 2004;57(4):702–10. <http://doi.org/10.1002/prot.20264>
46. Xu J, Zhang Y. How significant is a protein structure similarity with TM-score = 0.5? *Bioinformatics.* 2010;26(7):889–95. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq066>
47. Cheung AK. Rolling-circle replication of an animal circovirus genome in a theta-replicating bacterial plasmid in *Escherichia coli*. *J Virol.* 2006;80(17):8686–94. <http://doi.org/10.1128/JVI.00655-06>
48. Ochoa S, Milam VT. Direct modeling of DNA and RNA aptamers with AlphaFold 3: A promising tool for predicting aptamer structures and aptamer–target interactions. *ACS Synth Biol.* 2025;14(8):3049–64. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5c00196>
49. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* 1982;157(1):105–32. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
50. Abrusán G, Marsh JA. Alpha helices are more robust to mutations than beta strands. *PLoS Comput Biol.* 2016;12(12):e1005242. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005242>
51. Zhang M, Liu CC, Huang Y, Hill JE, Araya MB, Ojkic D, et al. Phylogenetic analysis of porcine circovirus 3 circulating in Canadian pigs. *Vet Med Sci.* 2022 Sep;8(5):1969–74. <http://doi.org/10.1002/vms3.851>

3D MODELS OF PROTEINS AND CONSERVATIVE G-QUADRUPLEXES IN THE GENOME OF PORCINE CIRCOVIRUS

O. Yu. Limanskaya^{1,*}, O. V. Biloivan¹, O. K. Balak², A. P. Limanskii³

¹National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine",
83 Hryhoriia Skovorody St., Kharkiv, 61023, Ukraine;

²Kharkiv National Medical University, 4 Nauka Ave., Kharkiv, 61022, Ukraine;

³Institute of Physiological Active Compounds, 58 Nauka Ave., Kharkiv, 61072, Ukraine

*e-mail: olgaliman@ukr.net

Submitted December 29, 2025; Revised May 06, 2026;

Accepted May 7, 2026; Published June 25, 2026

Background: Non-canonical structures formed in nucleic acid molecules, which include, in particular, multihelical connections 3WJs (three-way junctions), quadruplexes (G4s), are regulatory elements that affect the functioning of the genome. Building 3D models of these structures and pathogen proteins is the first step in understanding their functions. AlphaFold Protein Structure Database was created by Google DeepMind together with EMBL and it contains more than 241 million protein structures. 3D models of porcine circovirus type 3 (PCV-3) proteins have not been identified in this database.

The objective was to identify and characterize potential G4s and 3WJs in the PCV-3 genome, to build 3D models of PCV-3 proteins.

Materials and Methods: 1138 PCV-3 isolates with complete genomes from GenBank were applied for phylogenetic analysis by MEGA12 software. The BioEdit software was used to construct entropy plots; the QGRS Mapper program was used to search for G4s motifs and determination of their G-scores; the BLAST software was used to search for 100% nucleotide sequence identity. 3D models of proteins and G4s were designed by AlphaFold 3 artificial intelligence.

Results: 4 conserved perfect G4s were identified in the PCV-3 genome, which are formed by three tetrads and confirmed by designing their 3D models. The determined G4s sequences are conservative structural motifs, since the number of PCV-3 isolates in GenBank with G4s in the genome is over 1000. 3D models of G4s the formation of one of which was experimentally determined in the genome of the hepatitis B virus were used as a control of the correctness of these models design. 3D models of the replicase and capsid protein were designed for the two evolutionarily most distant PCV-3 isolates, which were determined from phylogenetic trees based on the *cap* and *rep* genes, and the features of their structures were established. 3WJs were not identified in the PCV-3 genome.

Conclusions: 3D models of the replicase, capsid protein of porcine circovirus type 3 as well as four conservative G4s, which are formed by three G-tetrads, were obtained. Increasing the length of the fragments flanking G4s does not prevent their folding, which indicates the importance of these G-rich motifs in the PCV-3 life cycle. The existence of G4s with three tetrads in PCV-3 genome, in contrast to two-tetrad G4s in HBV, in the composition of not only aptamers, but also in molecules of increased length was confirmed by AlphaFold 3.

KEY WORDS: alternative structure; bioinformatics; AlphaFold 3; porcine circovirus type 3; G-quadruplex (G4); protein structure; 3D model.

Original article<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-09>

UDC 004.932.2:004.85:611.711

IMPROVING THE EFFICIENCY OF SPINE REGION SEGMENTATION USING AN ENSEMBLE OF PRE-TRAINED NEURAL NETWORKS**V. D. Koniukhov^{1,*}, O. M. Morgun², K. E. Nemchenko³**¹ National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine",
83 Hryhoriia Skovorody St., Kharkiv, 61023, Ukraine;² "Laboratory of X-ray Medical Equipment" LTD, 1 Dostoevsky St., Kharkiv, 61102, Ukraine;³ V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine*Corresponding author: v.koniukhov.iecv@gmail.com

Submitted December 24, 2025; Revised May 18, 2026;

Accepted May 20, 2026; Published June 25, 2026

Background: The accuracy of segmentation of vertebrae in X-ray images is critical for clinical decisions as the manual method is laborious. The use of deep learning is complicated by low contrast, noise, and patient position artifacts. These negative factors make a single neural network unreliable. Thus, to improve the accuracy and efficiency of segmentation, regardless of the quality of X-ray images, there is a need for an ensemble of neural networks that compensates for the individual shortcomings of the models by aggregating their results.

Objectives: Increasing the accuracy and efficiency of segmentation of a spinal region consisting of four vertebrae (Th8, Th9, Th10, Th11) in X-ray images by using an ensemble of pre-trained neural networks.

Materials and methods: Two datasets were used for the experiments: the first set with 183 images was distributed in the ratio of 70% / 10% / 20% for training, validation, and testing, in turn, the second set of 58 images was used exclusively for the final assessment of the generalization ability of the ensemble on new data. In the process of research, segmentation accuracy with and without augmentation was first compared, after which the 10 best from the initial 20 neural networks were selected for further use, and five ensemble algorithms were used for mask aggregation.

Results: For the ensemble of pre-trained neural networks, the best result was shown by soft voting. Comparing the obtained result with the results presented by Koniukhov et al. (2024), the improvement was 3.06%. This indicator clearly confirms the effectiveness of using pre-trained networks for segmentation of the spine area.

Conclusions: Soft voting for an ensemble of pre-trained neural networks demonstrated the greatest improvement in segmentation accuracy compared to other methods. Aggregating knowledge from 10 models successfully eliminated the limitations of individual models. The use of an ensemble of pre-trained neural networks improved segmentation accuracy for both the test data from the first dataset and the data from the second dataset. Such results confirm the feasibility of applying the proposed ensemble-based approach to chest X-ray radiographs for vertebrae segmentation in medical imaging tasks.

KEY WORDS: image segmentation; deep learning; ensemble learning; medical imaging; neural networks; spinal diseases.

Spinal diseases are a common problem in our time. Such diseases as: osteochondrosis, spondylosis, spondylarthrosis, deforming arthrosis, scoliosis, kyphosis, lordosis and others are

Citation: Koniukhov VD, Morgun OM, Nemchenko KE. Improving the efficiency of spine region segmentation using an ensemble of pre-trained neural networks. Biophysical Bulletin. 2026;55:117–129. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-09>

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

a global problem and lead to significant pain for a patient. For example, low back pain alone affected 619 million people in 2020 and by 2050, 843 million are predicted [1]. Timely diagnosis of diseases is a key necessity for building effective treatment. The use of medical imaging methods is an integral part of the diagnostic process. Medical imaging can also be used to monitor and plan treatment. There are a significant number of medical imaging methods: radiography, computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), ultrasound diagnostics. X-ray images are the cheapest and most accessible, as well as a powerful tool for obtaining a primary diagnosis [2]. Although radiography is often underestimated in comparison with such methods as MRI or CT, using X-ray images doctors obtain the necessary information [3].

Manual radiograph analysis is too often subject to variability. For example, a study [4] supports this idea, based on high inter- and intra-operator error in calculating the Cobb angle. Such subjectivity can negatively affect the choice of treatment tactics and disease monitoring. To solve this problem, it is recommended to use automatic methods, which are considered more reliable [5]. Similar problems are also observed when performing other tasks associated with the manual method.

Deep learning methods can be used to solve problems associated with manual methods. It is deep learning models that have taken image segmentation to a new level compared to traditional methods [6]. Every year, deep learning methods demonstrate better results, as not only their quality improves, but also the number of publicly available data sets for training increases, which significantly accelerates research in this area [7]. The use of deep learning methods has made it possible to significantly increase the accuracy and efficiency of image analysis and successfully perform the following tasks: classification of chest X-ray images [8]; detection of COVID-19 [9]; recognition of periodontitis and dental caries on X-ray images [10]; detection of wrist fractures on X-ray images [11]; detection and classification of knee osteoarthritis [12]; detection of grain defects on X-ray images [13]; detection of anomalies on shoulder X-ray images [14]; detection of vertebral fractures on X-ray images [15]. The listed works are a small tip of the iceberg in the use of deep learning methods. It is obvious that when any new high-performance methods appear, scientists always try to apply the corresponding methods in their applied problems. Such improvements include not only deep learning methods but also various ensemble approaches or multi-stage methods. Using a multi-stage deep learning method, it is possible to first find a region of the spine and then isolate the necessary vertebrae that are in this section [16]. Using ensemble methods, it is possible to aggregate the predictions of several models, reducing the impact of random errors of individual models on the final mask [17]. Architectures such as U-Net [18] can use powerful backbones (e.g. ResNet50, SEResNext50, EfficientNetB0) to extract high-level features. Thus, we have the opportunity to use the weights of a model that has already been pre-trained on a large dataset. This approach allows the model to quickly identify both low-level and medium-level features that are relevant to natural and medical images. In our previous work [19], using an ensemble approach for spine segmentation, we were able to obtain a Dice-Sørensen coefficient (DSC) of 81.79% for an independent dataset. In order to increase the reliability of the results, this study proposes to use an ensemble of pre-trained neural networks and some other improvements.

MATERIALS AND METHODS

Datasets, preprocessing, and evaluation metrics

Open-source chest X-ray images of human patients were used for training, validation, and testing. The first dataset [20] consists of 183 radiographic images, which were split into 70% for training, 10% for validation, and 20% for testing. Using the second resource [21], an

additional test dataset of 58 images was created. The thoracic vertebrae Th8, Th9, Th10, and Th11 were selected as the target anatomical structures for the segmentation task. All images were resized to the same size of 512×512 pixels and converted to grayscale. Segmentation masks for all images in both datasets were created by O. M. Morgun.

No additional methods were used at the preprocessing stage, which allowed us to preserve the original data structure.

Seven metrics were used to evaluate the performance: Intersection over Union (IoU), DSC, recall, specificity, precision, F1-score, pixel accuracy (PA). The corresponding formulas are given below:

$$IoU = \frac{TP}{TP + FP + FN}. \quad (1)$$

IoU is a metric used to evaluate the overlap between a predicted and a ground truth.

$$DSC = \frac{2TP}{2TP + FP + FN}. \quad (2)$$

DSC is a standard metric used to evaluate the similarity between a predicted mask and a corresponding ground truth mask by measuring the amount overlap between them.

$$Recall = \frac{TP}{TP + FN}. \quad (3)$$

Recall represents an ability of a model to correctly identify all relevant cases.

$$Specificity = \frac{TN}{TN + FP}. \quad (4)$$

Specificity measures a proportion of true negative cases that are correctly identified by a model.

$$Precision = \frac{TP}{TP + FP}. \quad (5)$$

Precision shows a proportion of positive identifications that were actually correct.

$$F1 = \frac{2 \cdot Precision \cdot Recall}{Precision + Recall}. \quad (6)$$

F1-score is a harmonic mean of precision and recall.

$$PA = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}. \quad (7)$$

Pixel accuracy calculates a ratio of all correctly classified pixels to the total number of pixels, where TP is true positive, FP is false positive, FN is false negative, and TN is true negative.

Computational complexity

The computational efficiency of the ensemble was evaluated on a workstation running Windows 11 Pro and equipped with an Intel Core i7-10700, NVIDIA GeForce RTX 4060 Ti (16GB VRAM), and 32 GB of RAM. To measure the inference time, we calculated the average duration of a single forward pass for a 512×512 image through the entire ensemble of 10 models. Memory consumption was also monitored at the prediction stage.

Stage 1: Comparative analysis of augmentation robustness

The first stage of the research compared two approaches – with and without augmentation. U-Net was used as the basic neural network architecture. Both options were trained on the same datasets and with the same hyperparameters. The main goal was to demonstrate the benefits of fine-tuning the augmentation parameters, which can potentially improve the overall performance of the model. For each approach, the model was trained 50 times, after which the average values of the corresponding metrics were calculated.

All input images were resized to a uniform size of 256×256 pixels. The training process was performed using a batch size of 4, the *Adam* optimizer, a learning rate of 1×10^{-4} , and a *binary cross-entropy* loss function. To prevent overfitting an *early stopping* mechanism with *patience*=10 and *validation* DSC monitoring were used, while the best model weights were kept. Each model was trained for a maximum of 100 epochs.

Augmentation parameters included random image rotation from -10° to 10° , scaling from 0.8 to 1.2, shift from $\pm 10\%$ of the image size, and brightness change from -20 to $+20$ units. In addition, pixel intensities could be multiplied by a factor of 0.7 to 1.3, Gaussian blurring with σ in the range of 0.0-0.4 was applied, and with a probability of 30% the image remained unchanged.

Stage 2: Statistical selection of ensemble candidate architectures

In the second stage, the U-Net model was trained using twenty different backbones: None, ResNet34, ResNet50, ResNet152, SEResNet34, SEResNet50, SEResNet152, ResNeXt50, SEResNeXt50, DenseNet121, InceptionV3, InceptionResNetV2, MobileNetV2, EfficientNetB0, EfficientNetB1, EfficientNetB2, EfficientNetB3, EfficientNetB4, EfficientNetB5, EfficientNetB6. For each backbone, the training process was repeated 10 times, which allowed us to average the results, reduce the influence of random factors, and assess the stability of performance indicators. After a successful training process, the top 10 best models were selected based on their performance on the validation subset of the first dataset. The selection criterion was the $DSC \geq 91.5\%$ on the first dataset. These ten models will subsequently be used in the third stage. At this stage all input images were resized to a same size of 256×256 pixels. During training a batch size of 4 was used and the maximum number of epochs was 300. ImageNet was used as pre-trained weights for the encoder, which provided better initial generalizability of the model. The optimization process was carried out using the *Adam* optimizer with a learning rate of 1×10^{-4} , and *binary cross-entropy* was chosen as the loss function. To prevent overtraining, an *early stopping* mechanism was used, which monitored the value of the validation DSC metric in *max* mode with the *patience*=25 parameter. If there was no improvement in the metric within the specified number of epochs, training was stopped and the model restored the best weights. The augmentation parameters were used from the first stage.

Stage 3: Final training of base ensemble models

At this stage, the ensemble of neural networks was trained. Ten models from the second stage were selected, with the following backbones: SEResNet50, SEResNet152,

SEResNeXt50, DenseNet121, InceptionV3, EfficientNetB1, EfficientNetB2, EfficientNetB3, EfficientNetB4, EfficientNetB6. Almost all the parameters specified for the second stage were used for training, except for the following – all images were resized to the same size of 512×512 pixels, and the training rate was also changed to 1×10^{-5} .

Stage 4: Comparative ensemble combination and validation

At the final stage, a comparison of five ensemble methods was conducted: the max voting method, the min voting method, the soft voting method, the shape averaging method, and the union ensemble method. In all methods where a threshold T was used, we set $T=0.5$. All of these methods were applied to the ensemble defined in the third point, with the aim of identifying the most effective mask aggregation method. For the mathematical description of the ensemble methods, let $P_k(i,j)$ be the probability of pixel (i,j) belonging to the target class, as predicted by the k -th model, where M is the total number of models in the ensemble.

Max voting. In this method, the final ensemble decision is based on the maximum probability predicted across all models for each specific pixel. The ensemble $E_{max}(i,j)$ result is defined as:

$$P_{max}(i,j) = \max_{k \in \{1, \dots, M\}} P_k(i,j). \quad (8)$$

$$E_{max}(i,j) = \begin{cases} 1, & \text{if } P_{max}(i,j) > T \\ 0, & \text{otherwise} \end{cases}. \quad (9)$$

Min voting. In this method, the ensemble predicts the target class only if even the minimum probability across all models exceeds the binarization threshold. Then the resulting ensemble probability $P_{min}(i,j)$ and the binary prediction $E_{min}(i,j)$ are defined as:

$$P_{min}(i,j) = \min_{k \in \{1, \dots, M\}} P_k(i,j). \quad (10)$$

$$E_{min}(i,j) = \begin{cases} 1, & \text{if } P_{min}(i,j) > T \\ 0, & \text{otherwise} \end{cases}. \quad (11)$$

Soft voting. This method is based on calculating the arithmetic mean of the prediction values from all ensemble models for each pixel, followed by binarization of the obtained average. The average probability value $\bar{P}(i,j)$ and the final binary prediction $E_{soft}(i,j)$ are determined by the following formulas:

$$\bar{P}(i,j) = \frac{1}{M} \sum_{k=1}^M P_k(i,j). \quad (12)$$

$$E_{soft}(i,j) = \begin{cases} 1, & \text{if } \bar{P}(i,j) > T \\ 0, & \text{otherwise} \end{cases}. \quad (13)$$

Union ensemble. This method is based on the logical addition (OR) operation. This means that a pixel is considered part of the target object if it has been classified as such by at least one model in the ensemble. Let S_k be a binary mask obtained from the k -th ensemble model. The final combined mask E_{union} is determined through the set union operation:

$$E_{union} = \bigcup_{k=1}^M S_k. \quad (14)$$

Shape averaging. This method is based on aggregating the geometric properties of the masks by transforming them into signed distance fields. For each binary mask S_k , a signed distance matrix D_k is calculated as the difference between the distance transform of the mask and its inverted mask. The individual matrices are then accumulated into a global distance matrix $\bar{D}$ through an element-wise summation of all ensemble models. The final binary ensemble prediction E_{shape} is obtained by selecting pixels where the total accumulated distance value is positive. For each mask, a matrix of signed distances D_k is calculated:

$$D_k(i, j) = DT(S_k) - DT(\neg S_k), \quad (15)$$

where DT is a distance transformation function that calculates the distances from pixel (i, j) to the nearest boundary of the object. The value $D_k(i, j)$ is positive for pixels inside the object and negative for background pixels.

The aggregated distance matrix $\bar{D}$ is calculated as the sum of individual transformations:

$$\bar{D}(i, j) = \sum_{k=1}^M D_k(i, j). \quad (16)$$

The final binary ensemble mask $E_{shape}(i, j)$ is obtained by selecting pixels with a positive total distance value:

$$E_{shape}(i, j) = \begin{cases} 1, & \text{if } \bar{D}(i, j) > 0 \\ 0, & \text{otherwise} \end{cases}. \quad (17)$$

RESULTS AND DISCUSSION

To illustrate the X-ray data used to train and test the models, example X-ray images and corresponding masks are shown in Figure 1. The top row shows an example image from the first set and the bottom row shows an image from the second set.

We acknowledge that the segmentation masks were created by a single author. Although this ensured consistency in the annotation style across images, it introduces potential annotation bias and does not allow for analysis of interobserver variability. This limitation will be addressed in future work by involving multiple independent radiologists.

At the beginning of the research, it was proposed to consider the impact of data augmentation on its generalization ability. Augmentation parameters were selected in such a way as to simulate natural variations in biomedical images as accurately as possible.

The results are shown in Table 1 demonstrating the improvement of the DSC for the variant that used data augmentation. The DSC increased by 2.53% and the IoU by 3.85%. The noticeable increase in efficiency confirms the fact that the correct setting of the augmentation parameters can be used as a factor to counteract overfitting and as a general factor to increase the generalization ability. In the future, all stages will be performed using the described set of data augmentation parameters.

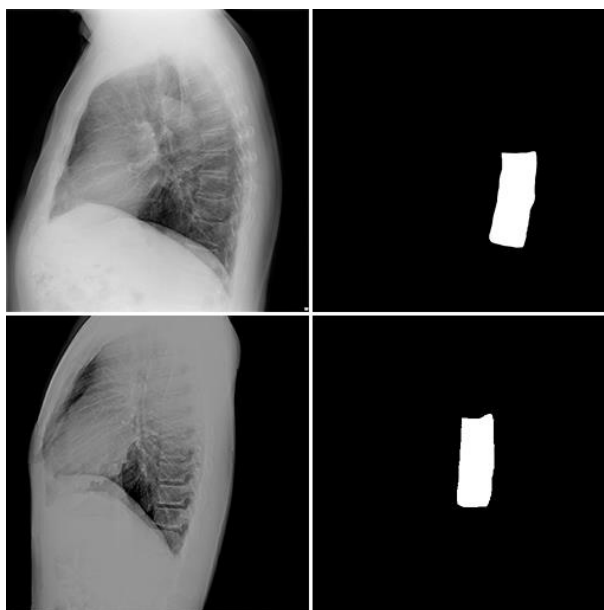


Fig. 1. Examples of chest X-ray radiographs of human patients and their corresponding ground truth segmentation masks of thoracic vertebrae, illustrating differences in image quality between the datasets. The top row shows a sample from dataset 1 [20], while the bottom row shows a sample from dataset 2 [21].

Table 1. Comparison of U-Net with VGG16 backbone performance metrics (%): data augmentation vs. no augmentation (dataset 1)

Type	IoU	DSC	Recall	Specificity	Precision	F1	PA
With augmentation	86.61	92.57	90.56	99.81	95.04	92.57	99.46
Without augmentation	82.76	90.04	91.90	99.48	89.11	90.04	99.19

The number and quality of models in the ensemble play a key role. To improve the generalization ability, it is necessary to include backbones of different architectures in the ensemble. At the second stage a comparison of the efficiency of U-Net using different backbones was performed. The results shown in Tables 2, 3 made it possible to determine the optimal backbones for performing the task. The poor results obtained for the backbones: ResNet34, ResNet50, ResNet152, SEResNet, ResNeXt50 may indicate insufficient relevance for performing a specific task. Such a result could also be influenced by a too sharp decrease in spatial resolution in the initial layers. Comparing the results of SEResNet and ResNet, one can see a huge difference in efficiency. Such a result is most likely due to the use of attention mechanisms in SEResNet. The comparative analysis of 20 backbones allowed for the selection of the optimal top ten architectures that demonstrated the highest accuracy on the first dataset, with DSC scores exceeding 91.5% (Table 2). These selected models were then evaluated using the second dataset to test their generalization ability. A performance drop averaging 7.61% was observed on the second dataset due to lower image quality (Table 3). This is expressed in lower contrast or higher noise levels.

Table 2. Comparison of U-Net segmentation performance metrics (%) across different backbone architectures (dataset 1)

Backbone	IoU	DSC	Recall	Specificity	Precision	F1	PA
None	84.85	91.53	89.46	99.78	94.15	91.53	99.38
ResNet34	8.34	14.79	73.82	57.07	18.68	14.79	57.69
ResNet50	7.29	12.95	65.99	65.34	7.55	37.79	65.36
ResNet152	6.37	11.13	62.63	57.79	6.84	38.93	57.98
SEResNet34	8.43	13.85	39.46	79.67	14.61	41.30	78.17
SEResNet50	87.19	92.93	91.70	99.78	94.61	92.93	99.47
SEResNet152	87.36	93.07	91.58	99.80	95.00	93.07	99.49
ResNeXt50	9.16	15.59	81.18	51.53	19.60	15.86	52.62
SEResNeXt50	86.77	92.69	90.61	99.81	95.31	92.69	99.46
DenseNet121	86.60	92.60	91.30	99.77	94.22	92.60	99.44
InceptionV3	86.55	92.56	90.28	99.82	95.45	92.56	99.46
InceptionResNetV2	84.63	91.49	89.31	99.78	94.24	91.49	99.38
MobileNetV2	73.37	83.95	77.68	99.76	93.13	83.95	98.93
EfficientNetB0	83.27	90.53	88.27	99.75	93.52	90.53	99.31
EfficientNetB1	85.81	92.09	90.36	99.77	94.24	92.09	99.42
EfficientNetB2	85.46	91.86	90.24	99.76	93.97	91.86	99.39
EfficientNetB3	85.99	92.21	89.67	99.83	95.40	92.21	99.44
EfficientNetB4	84.98	91.58	89.57	99.77	94.03	91.58	99.38
EfficientNetB5	84.57	91.27	89.89	99.72	93.29	91.27	99.35
EfficientNetB6	85.53	91.91	89.68	99.79	94.58	91.91	99.40

Table 3. Comparison of U-Net segmentation performance metrics (%) across different backbone architectures (dataset 2)

Backbone	IoU	DSC	Recall	Specificity	Precision	F1	PA
None	70.39	81.50	81.13	99.42	82.72	81.50	98.80
ResNet34	7.27	12.98	73.11	56.28	17.53	13.32	56.83
ResNet50	7.22	12.84	67.68	64.96	7.98	34.20	65.04
ResNet152	5.16	9.18	59.54	58.23	5.44	39.95	58.29
SEResNet34	4.66	7.95	29.30	79.73	8.43	53.17	78.08
SEResNet50	73.61	83.76	83.27	99.50	85.13	83.76	98.95
SEResNet152	73.96	84.02	83.51	99.51	85.65	84.02	98.96
ResNeXt50	8.09	13.86	81.14	50.97	18.60	14.72	51.98
SEResNeXt50	73.45	83.65	81.45	99.58	87.18	83.65	98.97
DenseNet121	73.58	83.82	84.08	99.45	84.27	83.82	98.93
InceptionV3	72.65	83.14	82.72	99.46	84.31	83.14	98.89
InceptionResNetV2	70.90	81.31	80.72	99.45	83.55	82.26	98.80
MobileNetV2	57.07	69.39	61.55	99.74	90.54	69.73	98.50
EfficientNetB0	70.05	80.81	80.06	99.44	82.87	82.19	98.79
EfficientNetB1	72.82	83.31	82.75	99.48	84.72	83.31	98.90
EfficientNetB2	73.23	83.51	83.30	99.47	84.61	83.51	98.92
EfficientNetB3	73.37	83.57	83.65	99.46	84.05	83.57	98.92
EfficientNetB4	72.92	83.28	83.43	99.46	84.36	83.28	98.91
EfficientNetB5	72.45	82.97	83.70	99.39	83.31	82.97	98.85
EfficientNetB6	73.24	83.49	83.04	99.48	84.78	83.49	98.91

Tables 4 and 5 show the training results of the 10 best backbones. The key differences in the training process in the second and third stages were the number of training sessions for each model and the size of the images, as well as the change in the training speed. If in the second stage training was performed 10 times for each model to select the best models, then in the third stage, training was performed only once. Another significant change was the use of different image sizes, in the second stage images of 256×256 pixels were used and in the third 512×512 pixels. This difference is due to the need to perform statistical analysis in the second stage, since it was necessary to train the model 10 times. Reducing the size made it possible to reduce the number of calculations and memory consumption.

Based on the results presented in Tables 4 and 5, statistical indicators (min, max, mean) were calculated. These data are given in Tables 6 and 7, respectively. Analysis of the obtained results showed that there is a gap in the generalization ability of the models between the two datasets. The difference in the average DSC between the first and second datasets was 9.66%. Whereas, when comparing 20 models, a DSC of 7.61% was obtained. Comparison of the results obtained at the third stage with the results of the second stage also demonstrates positive dynamics: the maximum value increased by 1.99% for the first set and by 0.5% for the second. In general, all backbone architectures at the third stage demonstrated high efficiency indicators, both for the first set and for the second. Final training was carried out for 10 U-Net models, each of which used a unique backbone architecture. The main goal was to create a diversified ensemble, because models with different backbones may focus on different features of X-ray images.

Table 4. Comparison of segmentation performance metrics (%) for top 10 models (dataset 1)

Backbone	IoU	DSC	Recall	Specificity	Precision	F1	PA
SEResNet50	90.83	95.06	95.74	99.77	94.71	95.06	99.62
SEResNet152	88.47	93.69	93.72	99.75	93.98	93.69	99.52
SEResNeXt50	87.52	93.17	93.71	99.70	93.18	93.17	99.47
DenseNet121	87.54	93.08	93.78	99.71	92.84	93.08	99.47
InceptionV3	89.10	94.04	94.42	99.75	94.03	94.04	99.55
EfficientNetB1	87.26	92.89	93.04	99.72	93.38	92.89	99.47
EfficientNetB2	87.70	93.08	92.05	99.78	94.49	93.08	99.48
EfficientNetB3	86.64	92.53	91.79	99.75	93.79	92.53	99.45
EfficientNetB4	87.52	93.04	91.82	99.79	94.76	93.04	99.48
EfficientNetB6	85.93	92.10	92.20	99.69	92.55	92.10	99.41

Table 5. Comparison of segmentation performance metrics (%) for top 10 models (dataset 2)

Backbone	IoU	DSC	Recall	Specificity	Precision	F1	PA
SEResNet50	73.13	83.55	87.37	99.28	80.74	83.55	98.89
SEResNet152	73.03	83.45	85.96	99.33	81.68	83.45	98.88
SEResNeXt50	72.16	82.89	86.14	99.28	80.72	82.89	98.84
DenseNet121	73.67	83.85	86.29	99.36	82.23	83.85	98.93
InceptionV3	73.13	83.31	84.85	99.38	83.12	83.31	98.92
EfficientNetB1	73.40	83.68	86.03	99.36	82.04	83.68	98.92
EfficientNetB2	74.12	84.19	85.09	99.45	84.34	84.19	98.98
EfficientNetB3	72.78	83.30	82.86	99.49	84.48	83.30	98.93
EfficientNetB4	74.82	84.51	85.07	99.47	84.58	84.51	98.99
EfficientNetB6	72.60	83.33	84.68	99.41	82.94	83.33	98.92

Table 6. Statistical summary of segmentation performance metrics (%) for top 10 models (dataset 1)

Statistic	IoU	DSC	Recall	Specificity	Precision	F1	PA
Min	85.93	92.10	91.79	99.69	92.55	92.10	99.41
Max	90.83	95.06	95.74	99.79	94.76	95.06	99.62
Mean	87.85	93.27	93.23	99.74	93.77	93.27	99.49

Table 7. Statistical summary of segmentation performance metrics (%) for top 10 models (dataset 2)

Statistic	IoU	DSC	Recall	Specificity	Precision	F1	PA
Min	72.16	82.89	82.86	99.28	80.72	82.89	98.84
Max	74.82	84.51	87.37	99.49	84.58	84.51	98.99
Mean	73.28	83.61	85.44	99.38	82.69	83.61	98.92

At the final stage, the effectiveness of various aggregation methods for creating an ensemble was assessed. The goal was to determine the optimal strategy for combining individual predictions to achieve maximum accuracy. Analysis of Tables 8 and 9 demonstrates that the soft voting method provides the highest efficiency, although the shape averaging method is a close second. The success of the soft voting method is associated with effective error smoothing and its ability to compensate for uncertainty at the boundaries of objects. Having achieved a DSC of 94.21% for the first set and 84.85% for the second set, the soft voting method demonstrates that it is the optimal ensemble technique, since it is the one that best uses the diversification of features extracted by different backbones.

Table 8. Comparison of segmentation performance metrics (%) across different ensemble methods (dataset 1)

Ensemble method	IoU	DSC	Recall	Specificity	Precision	F1	PA
Min voting	85.31	91.77	86.31	99.95	98.68	91.77	99.43
Max voting	82.48	90.24	98.15	99.23	83.87	90.24	99.19
Soft voting	89.42	94.21	93.20	99.83	95.73	94.21	99.57
Shape averaging	89.33	94.17	93.32	99.82	95.44	94.17	99.57
Union ensemble	82.61	90.30	98.15	99.23	84.00	90.30	99.19

Analysis of the ensemble's operational performance revealed that the average inference time per single X-ray image for the entire 10-model ensemble is 226 ms. While this is slower than a single model (which averages 22-26 ms), the speed of the ensemble remains effective for clinical diagnostic tasks where real-time processing is not strictly necessary. The peak GPU memory usage during the inference of the most complex backbone did not exceed 6 GB of VRAM.

Table 9. Comparison of segmentation performance metrics (%) across different ensemble methods (dataset 2)

Ensemble method	IoU	DSC	Recall	Specificity	Precision	F1	PA
Min voting	71.38	82.07	76.22	99.74	91.21	82.07	98.97
Max voting	66.95	79.39	90.41	98.74	71.20	79.39	98.46
Soft voting	75.15	84.85	85.93	99.46	84.38	84.85	99.01
Shape averaging	74.78	84.66	85.55	99.46	84.44	84.66	99.00
Union ensemble	67.51	79.85	90.24	98.80	72.04	79.85	98.51

To better position our contribution within the current state-of-the-art, we compared our results with several recent studies on spine segmentation across different imaging modalities. Qadri et al. (2022) [22] utilized stacked sparse autoencoders for patch-based classification in CT images (SVseg), achieving DSC of 87.39%; in comparison, our ensemble approach on X-ray images demonstrated performance with DSC of 84.85%. Similarly, Lu et al. (2023) [23] proposed a two-stage localization and segmentation framework (XUnet) for CT scans. Their method requires a separate localization step to handle the complexity of lumbar vertebrae. In contrast, our method achieved high accuracy by leveraging the diversity of 10 pre-trained models without the need for a separate localization network. Furthermore, van der Graaf et al. (2024) [24] emphasized the effectiveness of nnU-Net for 3D volumetric data. Our study confirms that an ensemble with soft voting and shape averaging is equally robust for 2D X-ray radiography. Our method effectively compensates for lower contrast and overlapping structures, providing competitive anatomical consistency relative to these recent state-of-the-art frameworks.

CONCLUSIONS

Correctly setting the data augmentation parameters provided an increase in the DSC by 2.53% compared to the option without data augmentation. Ensemble deep learning methods represent an effective approach to enhance the accuracy of X-ray image segmentation. The results suggest that ensembles leveraging models with diverse architectures or backbones can effectively combine the strengths of individual models, potentially reducing the impact of specific errors. In this study, an ensemble of the 10 best-performing models was found to be an effective compromise for improving segmentation accuracy.

A comparison of the main ensemble mask aggregation methods has shown that for segmentation tasks with high requirements (as in the case of X-ray images), the use of the soft voting method with threshold 0.5 is the most efficient option. While the shape averaging method showed slightly different morphological results, it remains a valid alternative. The comparison with previous work [19] showed an improvement in the DSC from 81.79% to 84.85% for the second dataset. This 3.06% increase highlights the benefits of using pre-trained backbones in biomedical segmentation tasks.

The obtained results may be useful for improving computer-aided analysis of chest X-ray images. It may also support more accurate vertebrae segmentation in medical imaging workflows, contributing to the development of decision-support tools for clinical diagnostics.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

Authors' ORCID ID

V. D. Koniukhov  <https://orcid.org/0009-0007-0256-1388>

O. M. Morgun  <https://orcid.org/0009-0005-6157-9110>

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

REFERENCES

1. GBD 2021 Low Back Pain Collaborators. Global, regional, and national burden of low back pain, 1990–2020, its attributable risk factors, and projections to 2050: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Rheumatol.* 2023;5(6):e316–e329. [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(23\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(23)00098-X)
2. Ou X, Chen X, Xu X, Xie L, Chen X, Hong Z, et al. Recent development in X-ray imaging technology: future and challenges. *Research.* 2021;2021:9892152. <https://doi.org/10.34133/2021/9892152>
3. Goodwin ML, Buchowski JM, Sciubba DM. Why X-rays? The importance of radiographs in spine surgery. *Spine J.* 2022;22(11):1759–67. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2022.07.102>
4. Jin C, Wang S, Yang G, Li E, Liang Z. A review of the methods on Cobb angle measurements for spinal curvature. *Sensors.* 2022;22(9):3258. <https://doi.org/10.3390/s22093258>
5. Wills BP, Auerbach JD, Zhu X, Caird MS, Horn BD, Flynn JM, et al. Comparison of Cobb angle measurement of scoliosis radiographs with preselected end vertebrae: traditional versus digital acquisition. *Spine.* 2007;32(1):98–105. <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000251086.84420.d1>
6. Minaee S, Boykov Y, Porikli F, Plaza A, Kehtarnavaz N, Terzopoulos D. Image segmentation using deep learning: a survey. *IEEE Trans. Pattern Anal Mach Intell.* 2022;44(7):3523–42. <https://doi.org/10.1109/TPAMI.2021.3059968>
7. Çallı E, Sogancioglu E, van Ginneken B, van Leeuwen KG, Murphy K. Deep learning for chest X-ray analysis: a survey. *Med Image Anal.* 2021;72:102125. <https://doi.org/10.1016/j.media.2021.102125>
8. Baltruschat IM, Nickisch H, Grass M, Knopp T, Saalbach A. Comparison of deep learning approaches for multi-label chest X-ray classification. *Sci Rep.* 2019;9(1):6381. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42294-8>
9. Akter S, Shamrat F, Chakraborty S, Karim A, Azam S. COVID-19 detection using deep learning algorithm on chest X-ray images. *Biology.* 2021;10(11):1174. <https://doi.org/10.3390/biology10111174>
10. Chen IDS, Yang C-M, Chen M-J, Chen M-C, Weng R-M, Yeh C-H. Deep learning-based recognition of periodontitis and dental caries in dental X-ray images. *Bioengineering.* 2023;10(8):911. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10080911>
11. Hardalaç F, Uysal F, Peker O, Çiçeklidağ M, Tolunay T, Tokgöz N, et al. Fracture detection in wrist X-ray images using deep learning-based object detection models. *Sensors.* 2022;22(3):1285. <https://doi.org/10.3390/s22031285>
12. Abdullah SS, Rajasekaran MP. Automatic detection and classification of knee osteoarthritis using deep learning approach. *Radiol med.* 2022;127(3):398–406. <https://doi.org/10.1007/s11547-022-01476-7>
13. Hamdy S, Charrier A, Corre LL, Rasti P, Rousseau D. Toward robust and high-throughput detection of seed defects in X-ray images via deep learning. *Plant Methods.* 2024;20(1):63. <https://doi.org/10.1186/s13007-024-01195-2>
14. Alzubaidi L, Salhi A, Fadhel MA, Bai J, Hollman F, Italia K, et al. Trustworthy deep learning framework for the detection of abnormalities in X-ray shoulder images. *PLoS One.* 2024;19(3):e0299545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299545>
15. Cheng L-W, Chou H-H, Cai Y-X, Huang K-Y, Hsieh C-C, Chu P-L, et al. Automated detection of vertebral fractures from X-ray images: A novel machine learning model and survey of the field. *Neurocomputing.* 2024;566:126946. <https://doi.org/10.1016/j.neucom.2023.126946>
16. Koniukhov V. Improving the segmentation of the vertebrae using a multi-stage machine learning algorithm. *Radioelectronic and Computer Systems.* 2024;(4):83–90. <https://doi.org/10.32620/reks.2024.4.07>
17. Koniukhov VD, Morgun OM, Nemchenko KE. Impact of preprocessing and comparison of neural network ensemble methods for segmentation of the thoracic spine in X-ray images. *Radio Electronics, Computer Science, Control.* 2024;4:102–12. <https://doi.org/10.15588/1607-3274-2024-4-10>
18. Ronneberger O, Fischer P, Brox T. U-net: convolutional networks for biomedical image segmentation. In: Navab N, Hornegger J, Wells W, Frangi A, editors. *Medical image computing and computer-assisted intervention – MICCAI 2015. MICCAI 2015. Lecture notes in computer science*, vol 9351. Cham: Springer; 2015. p. 234–41. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24574-4_28
19. Koniukhov VD, Morgun OM, Nemchenko KE. Comparative analysis of ensemble methods for X-ray images: study of the influence on trained and new data. In: *Computer modeling in science-intensive technologies*:

- proceedings of the International scientific and technical conference. Kharkiv; 2024. p. 100–103. (In Ukrainian). Available from: <https://drive.google.com/file/d/1Vyvntnwud71YE21aGqyZMb483fAQL6pe/>
20. Stanford AIMI. CheXpert Chest X-Rays [Internet]. AIMI Center. [cited 2025 Nov 16]. Available from: <https://aimi.stanford.edu/datasets/chexpert-chest-x-rays>
 21. Vindr.ai. Vindr.ai datasets: SpineXR [Internet]. Vindr.ai. [cited 2025 Nov 16]. Available from: <https://vindr.ai/spinexr>
 22. Qadri SF, Shen L, Ahmad M, Qadri S, Zareen SS, Akbar MA. SVseg: stacked sparse autoencoder-based patch classification modeling for vertebrae segmentation. *Mathematics*. 2022;10(5):796. <https://doi.org/10.3390/math10050796>
 23. Lu H, Li M, Yu K, Zhang Y, Yu L. Lumbar spine segmentation method based on deep learning. *J Appl Clin Med Phys*. 2023;24(6):e13996. <https://doi.org/10.1002/acm2.13996>
 24. van der Graaf JW, van Hooff ML, Buckens CFM, Rutten M, van Susante JLC, Kroeze RJ, et al. Lumbar spine segmentation in MR images: a dataset and a public benchmark. *Scientific Data*. 2024;11(1):264. <https://doi.org/10.1038/s41597-024-03090-w>

ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ СЕГМЕНТАЦІЇ ОБЛАСТІ ХРЕБТА ЗА ДОПОМОГОЮ АНСАМБЛЮ ПОПЕРЕДНЬО НАВЧЕНИХ НЕЙРОННИХ МЕРЕЖ

В. Д. Конюхов ¹, О. М. Моргун ², К. Е. Немченко ³

¹ Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», вул. Григорія Сковороди, 83, м. Харків, 61023, Україна;

² ТОВ «Лабораторія рентгенівської медичної техніки», вул. Достоевського, 1, м. Харків, 61102, Україна;

³ Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, м. Харків, 61022, Україна
e-mail: v.koniukhov.iecvu@gmail.com

Надійшла до редакції 24 грудня 2025 р. Переглянута 18 травня 2026 р.

Прийнята до друку 20 травня 2026 р. Опублікована 25 червня 2026 р.

Актуальність. Точність сегментації хребців на рентгенівських знімках є критичною для клінічних рішень, оскільки ручний метод є трудомістким. Використання глибокого навчання ускладнене через низький контраст, шум та артефакти положення пацієнта. Ці негативні фактори роблять одну нейронну мережу ненадійною. Таким чином, для покращення точності та ефективності сегментації, незалежно від якості рентгенівських знімків, виникає потреба в ансамблі нейронних мереж, який нівелює індивідуальні недоліки моделей шляхом агрегації їхніх результатів.

Мета роботи — підвищення точності та ефективності сегментації ділянки хребта, яка складається із чотирьох хребців (Th8, Th9, Th10, Th11), на рентгенівських знімках завдяки використанню ансамблю попередньо навчених нейронних мереж.

Матеріали і методи. Для проведення експериментів було використано два набори даних: перший набір зі 183 зображеннями було розподілено у співвідношенні 70% / 10% / 20% для навчання, валідації та тестування, в свою чергу другий набір із 58 зображень застосовувався виключно для фінальної оцінки генералізаційної здатності ансамблю на нових даних. У процесі дослідження спочатку порівнювали точність сегментації з аугментацією та без, після чого з початкових 20 моделей було відібрано 10 найкращих для подальшого використання, а для агрегації масок було використано п'ять ансамблевих алгоритмів.

Результати. Для ансамблю попередньо навчених нейронних мереж найкращий результат показав метод м'якого голосування. Порівняння отриманого результату з даними, наведеними у праці Конюхова В. Д. та ін. (2024), продемонструвало покращення на 3.06%. Такий показник однозначно підтверджує ефективність використання попередньо навчених мереж для сегментації ділянки хребта.

Висновки. Метод м'якого голосування для ансамблю попередньо навчених нейронних мереж продемонстрував найбільше покращення точності сегментації в порівнянні з іншими методами. Агрегування знань із 10 моделей успішно нівелювало недоліки використання кожної з них окремо. Використання ансамблю попередньо навчених нейронних мереж покращило точність сегментації як для тестових даних першого набору, так і для другого набору даних. Такі результати підтверджують доцільність застосування запропонованого ансамблевого підходу для сегментації хребців на рентгенівських зображеннях органів грудної клітки в медичних задачах.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: сегментація зображень; глибоке навчання; ансамблеве навчання; медична візуалізація; нейронні мережі; захворювання хребта.

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-10>

УДК 577.323

БІОФІЗИЧНИЙ ТИЖДЕНЬ 2026. БІОФІЗИКА В УКРАЇНІ: ЕНЕРГІЯ І ВОЛЯ ЛЮДЕЙ В НАУЦІ І ОСВІТІ В УМОВАХ ВІЙНИ

Вже другий рік поспіль в Україні пройшов Біофізичний тиждень, головним організатором якого виступило [Українське біофізичне товариство](#) (УБФТ) [1]. Ця подія є частиною глобальної ініціативи Американського біофізичного товариства, яка передбачає проведення щорічних березневих міжнародних наукових та науково-популярних заходів.

Участь Українського біофізичного товариства у проведенні Всесвітнього Біофізичного тижня ([Biophysics Week 2026](#) [2]) мала на меті популяризацію цієї стратегічно важливої міждисциплінарної галузі, аналіз сучасного стану та викликів в освітній і науковій сферах, а також консолідацію дослідників для вирішення актуальних завдань, що постали перед українською наукою в умовах війни.

У 2025-му році ініціатором проведення щорічного Біофізичного тижня в Україні виступили Харківське відділення УБФТ і Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна.

У поточному 2026-му році ця подія відбулася у масштабах всієї країни.

Активну роль в організації та проведенні заходів в рамках цього річного Біофізичного тижня відіграли Київське, Харківське, Львівське та Закарпатське відділення УБФТ.

До ініціативи УБФТ приєдналися провідні заклади вищої освіти та академічні установи Національної академії наук України, зокрема:

- Київський національний університет імені Тараса Шевченка;
- Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна;
- Львівський національний університет імені Івана Франка;
- Ужгородський національний університет;
- Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України;
- Інститут теоретичної фізики ім. М. М. Боголюбова Національної академії наук України;
- Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного Національної академії наук України;
- Інститут фізики Національної академії наук України;
- Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця Національної академії наук України;

Як цитувати: Мартинюк ВС. Біофізичний тиждень 2026. Біофізика в Україні: енергія і воля людей в науці і освіті в умовах війни. Біофізичний вісник. 2026;55:130–35. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-10>

In cites: Martynyuk VS. Biophysics Week 2026. Biophysics in Ukraine: human energy and willpower in science and education during the wartime. Biophysical Bulletin. 2026;55:130–35. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2026-55-10> (in Ukrainian)

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

- Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького Національної академії наук України;
- Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І.Веркіна Національної академії наук України;
- Інститут скінтіляційних матеріалів Національної академії наук України.

Символічно, що **25 березня відкриття Біофізичного тижня 2026** відбулося в ННЦ «Інститут біології та медицини» КНУ імені Тараса Шевченка, саме там, де у 1993 році співробітниками кафедри біофізики було засновано Українське біофізичне товариство.

Президент УБФТ, професор кафедри біофізики та нейробіології Віктор Мартинюк разом з директором Інституту біології та медицини КНУ імені Тараса Шевченка професором Дмитром Лукашовим привітали наукову спільноту з цією подією, відмітивши, що всупереч всім обставинам, пов'язаним з війною в Україні, викладачі і науковці продовжують проводити дослідження, працювати зі студентами і аспірантами і готувати нове покоління висококваліфікованих спеціалістів.

Згідно з програмою заходів в цей день лунали спогади професора Миколи Мірошніченка про часи, коли народилась ідея створення Українського біофізичного товариства, і як ця ідея була втілена завдяки зусиллям викладачів кафедри біофізики на чолі з академіком Національної академії наук України Михайлом Шубою.

Академік Національної академії наук України, Лауреат Державної Премії України в галузі науки і техніки професор Сергій Костерін ознайомив учасників зібрання з роботою Міждисциплінарного загально-академічного наукового семінару в галузі природничих наук «Актуальні питання фізико-хімічної та математичної біології», який щомісячно відбувається в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України. Головна мета семінару полягає в обговоренні сучасних досліджень на стику біології, фізики, хімії та математики: від фізико-хімії, біофізики та біоінформатики до математичного моделювання та штучного інтелекту в біології та медицині. У роботі семінару беруть участь не тільки провідні науковці, але й аспіранти і студенти. Професор Сергій Костерін запросив всіх бажаючих виступити з доповідями на цьому міждисциплінарному семінарі.

Віце-президент УБФТ, професор Ярослав Шуба, поділився з присутніми своїм досвідом тривалого перебування в лавах Американського біофізичного товариства, підкресливши важливість присутності Українського біофізичного товариства у міжнародному просторі наукових товариств.

Віце-президент УБФТ, професор, завідувач кафедри біофізики та нейробіології Інституту біології та медицини КНУ імені Тараса Шевченка Олександр Жолос поділився своїми роздумами про біофізику як фундаментальну міждисциплінарну науку, яка об'єднує разом фахівців як природничих, так і гуманітарних наук.

Доктор фізико-математичних наук, директор Інституту теоретичної фізики ім. М. М. Боголюбова Сергій Перепелиця доповів про роботу Київського відділення УБФТ і значний внесок у цю діяльність його очільника, доктора фізико-математичних наук Сергія Волкова. В Інституті теоретичної фізики ім. М. М. Боголюбова досліджують особливості структурної організації біологічних молекул, щорічно проводять різноманітні міжнародні заходи із залученням молодих вчених. У 2026 році Інститут був головним організатором APS Satellite Symposium & Workshop "Applied Problems of Theoretical and Computational Biophysics".

Професор Ігор Коцан, президент УБФТ попередніх каденцій, зосередив свою увагу на важливості розширення міжнародних контактів в рамках діяльності УБФТ, зокрема, з науковими установами і університетами Республіки Польщі.

Кандидат біологічних наук, доцент кафедри твердотільної електроніки Ужгородського національного університету Марія Суховія доповіла про наукові здобутки Ужгородського відділення УБФТ, відмітивши важливий внесок першого президента УБФТ Михайла Федоровича Шуби у становленні і подальшу діяльність цього регіонального відділення наукового товариства.

Віце-президент УБФТ, професор, завідувач кафедри молекулярної і медичної біофізики факультету радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна Володимир Берест акцентував увагу на вагомому внеску Харківського відділення у діяльність Українського біофізичного товариства. Він відмітив, що у Харкові науковці і викладачі працюють в дуже складних умовах, пов'язаних з близькістю бойових дій.

Останнім виступив Президент УБФТ, професор Віктор Мартинюк, який поділився спогадами про свою роботу у складі Кримського відділення УБФТ, яке у зв'язку з анексією Криму припинило своє існування у 2014 році. Він нагадав, що невелика команда Кримського відділення була головним організатором періодичних міждисциплінарних міжнародних конференцій, таких як «Космос і біосфера», «Біологічно активні речовини. Фундаментальні і прикладні аспекти використання», «Адаптаційні стратегії живих систем». Після 2014 року більшість членів Кримського відділення переїхала до Києва і на цей час працює в Київському національному університеті імені Тараса Шевченка. Віктор Мартинюк закликав відновити традиції проведення міжнародних наукових конференцій під прапором Українського біофізичного товариства.

Зустріч в цей день завершилася дискусією про сучасний стан біофізичних досліджень в Україні і світі, які є ключем до вирішення складних міждисциплінарних питань сучасної медицини, біотехнології, молекулярної біології та багатьох інших суміжних галузей знань. Водночас з цим відмічено, що в Україні виникла певна кризова ситуація з підготовкою молодих фахівців в сфері біофізики, яка пов'язана з падінням інтересу молоді до фундаментальних природничих наук. Така ситуація потребує від наукової спільноти більш активної роботи з популяризації сучасних знань серед школярів і студентів. У цьому контексті Українське біофізичне товариство має продовжити активно працювати з Малою академією наук України.

Другий день Біофізичного тижня, 26 березня, був присвячений діяльності Харківського відділення УБФТ, голова якого, завідувач кафедри молекулярної і медичної біофізики Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, професор Берест В. П., розпочав засідання з привітання усім присутнім колегам.

З пленарними доповідями виступили науковці Інституту сцинтиляційних матеріалів (ІСМА) НАН України. Чл.-кор. НАН України, професор Єфімова С. Л., у своїй доповіді «Наноструктуровані платформи в тераностиці» розповіла про розробку у ІСМА нових видів наночастинок, дослідження їх біологічної активності та впровадження в практику. Професор Лисецький Л. Н. узагальнив методологію та результати біофізичних досліджень у ІСМА з використанням уявлень про супрамолекулярне упорядкування у рідкокристалічних системах.

В плані висвітлення такого нагального аспекту зустрічі як незламність науковців та освітян в умовах війни, завідувачка відділу біологічної фізики Інституту радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України, професор Шестопалова Г. В., доповіла про значні пошкодження приміщень своєї установи внаслідок бойових дій та героїчну працю співробітників по збереженню наукового потенціалу.

Співробітник відділу, к. ф.-м. н. Духопельников Є. В. розповів про результати виконаних в таких тяжких умовах досліджень взаємодій лігандів з наночастинами та білками та впливу на них іонізуючого випромінювання.

Провідний науковий співробітник відділу молекулярної біофізики Фізико-технічного інституту низьких температур (ФТІНТ) ім. Б. І. Веркіна НАН України, д. ф.-м. н. Пашинська В. А. обговорила ідею «м'якої сили» нековалентних взаємодій у біологічно значущих міжмолекулярних взаємодіях лікарських сполук.

Вельми актуальними для сучасної ситуації виявилися тематики досліджень колишніх випускників кафедри біофізики Харківського національного університету, які наразі працюють у передових закордонних лабораторіях. PhD Яковенко С. (Associate Professor of Department of Neuroscience of West Virginia University) доповів про унікальні досягнення у галузі біофізики сенсомоторних інтерфейсів людина-машина для електричних протезів та розробки на їх основі прототипів протезів кінцівок. PhD Гриценко В. (Associate Professor of School of Medicine of West Virginia University) розповіла про дослідження у галузі дистанційної оцінки нейром'язового здоров'я астронавтів у космічних місіях.

Провідний науковий співробітник відділу молекулярної біофізики ФТІНТ ім. Б. І. Веркіна НАН України, д. ф.-м. н. Косевич М. В. у своїй доповіді «Професійна реалізація наукового ступеня «Доктор Філософії»» підняла низку питань, пов'язаних з викликами, які ставлять науковцям та освітянам умови війни та дистанційного навчання поряд з розвитком технологій штучного інтелекту.

У заключній частині засідання відбулася гаряча та плідна дискусія з гострих питань сьогодення, що пролунали у доповідях колег.

Третій день Біофізичного тижня, 27 березня, був відведений Київському відділенню УБФТ. Після привітальних слів Президента УБФТ Віктора Мартинюка слово для пленарної доповіді взяв академік Національної академії наук України, лауреат Державної премії України в галузі науки і техніки, заступник директора з наукової роботи та завідувач відділу Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, професор Сергій Костерін. Він доповів про багатопараметричний метод аналізу механокінетики та енергетики процесу скорочення та релаксації гладеньких м'язів на прикладі різноманітних моделей з використання біологічно активних речовин, з особливим акцентом на механізми дії калексаренів.

Олена Громозова, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник Відділу промислових мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України ознайомила учасників зібрання з сучасними даними про вплив електромагнітних полів на мікроорганізми, акцентувавши увагу на важливість і слабку вивченість цієї проблеми.

Співробітники Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, доктор біологічних наук Юрій Данилович і науковий співробітник Марія Рудницька доповіли про біофізичні та біохімічні закономірності утворення та функціонування оксиду азоту в мітохондріях та роль іонів K^+ у регуляції цього процесу.

Молоді вчені кафедри біофізики та нейробиології Інституту біології та медицини КНУ імені Тараса Шевченка Дарія Дринь і Роман Стратійчук представили дані з моделювання взаємодії біологічно активних сполук з іонними TRPV-каналами *in silico*, а також результати експериментальної верифікації отриманих теоретичних даних.

Інститут фізики НАН України на Біофізичному тижні представляли молоді вчені Григорій Монастирський і Тарас Войцицький, які доповіли українській біофізичній спільноті про дослідження у Відділі фізики біологічних систем, який очолює професорка Галина Довбешко. Зокрема, акценти були зроблені на використанні сучасних штучно-інтелектуальних систем і скануючої електронної мікроскопії для визначення структурних особливостей біомолекул і клітин.

Четвертий день Біофізичного тижня, 28 березня, пройшов під прапором Львівського і Закарпатського відділень УБФТ.

Голова Львівського відділення УБФТ, професор, завідувач кафедри біофізики та біоінформатики біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка Андрій Бабський доповів про історію створення кафедри, видатну роль у заснуванні якої відіграв видатний науковець, професор Мирон Деркач.

Доцент кафедри Ярина Шалай проінформувала присутніх про успіхи кафедри у залученні молоді до наукових досліджень, починаючи ще зі школи. Зокрема, співробітники кафедри започаткували спільну роботу з Малою академією наук України. На кафедрі студенти беруть активну участь у міжнародних програмах стажування у провідних наукових центрах світу.

Марта Бура підвела підсумки науково-дослідної роботи кафедри протягом останніх десятиліть і навела плани роботи на найближче майбутнє, запросивши членів УБФТ до більш тісної співпраці з львівськими науковцями.

Закарпатське відділення підготувало доповіді з історії розвитку біофізичної науки в Ужгородському національному університеті. Професор Іван Шафраньош і доцент Марія Суховія розповіли про фізичні процеси у біоструктурах, що їх ініціює електронний удар.

Молоді вчені університету розповіли про науковий внесок у розвиток біофізики, радіобіології та електрофізіології провідних вчених, які працювали у Ужгородському національному університеті — докторів біологічних наук, професорів Мирона Клевця, Омеляна Гойди, Миколи Бедзіллі.

Останню доповідь зробила кандидат біологічних наук, співробітниця Карпатського біосферного заповідника Богдана Москалюк, яка розповіла про фотобіофізичні аспекти біологічної активності псораленів і ксантотоксинів, які продукуються агресивним рослинним інвазійним видом Борщовиком Сосновського.

Президент Українського біофізичного товариства професор Віктор Мартинюк підбив підсумки роботи регіональних відділень в рамках Біофізичного тижня та окреслив стратегічні пріоритети діяльності товариства на найближчу перспективу. В першу чергу активність Українського біофізичного товариства має бути направлена на роботу з молоддю і розширення міжнародного співробітництва.

Програму (https://ubpht.knu.ua/Files/2026_BW_Program.pdf) [3] і збірник матеріалів «Біофізичного тижня 2026» (https://ubpht.knu.ua/Files/2026_BiophysWeek.pdf) [4] можна подивитись на сайті Українського біофізичного товариства (<https://ubpht.knu.ua>) [1].

Конфлікт інтересів: Автор повідомляє про відсутність конфлікту інтересів.

REFERENCES

1. Ukrainian Biophysical Society. Main page [Internet]. Ubpht.knu.ua. 2026 [cited 2026 Apr 15]. Available from: <https://ubpht.knu.ua>
2. Biophysics Week | The Biophysical Society [Internet]. Biophysics.org. 2026 [cited 2026 Apr 15]. Available from: <https://www.biophysics.org/biophysics-week#/>
3. The program of the scientific events of Ukrainian Biophysical Society [Internet]. [cited 2026 Apr 15]. Available from: https://ubpht.knu.ua/Files/2026_BW_Program.pdf
4. Biophysics Week 2026. Biophysics in Ukraine: Human energy and willpower in science and education during the wartime [Internet]. 2026 [cited 2026 Apr 15]. Available from: https://ubpht.knu.ua/Files/2026_BiophysWeek.pdf

В. С. Мартинюк

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, 01601, Україна*
Victor Martynyuk  <https://orcid.org/0000-0002-5311-3565>

БІОФІЗИЧНИЙ ТИЖДЕНЬ 2026. БІОФІЗИКА В УКРАЇНІ: ЕНЕРГІЯ І ВОЛЯ ЛЮДЕЙ В НАУЦІ І ОСВІТІ В УМОВАХ ВІЙНИ

В. С. Мартинюк 

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

e-mail: vittorio.martini.office@gmail.com

У березні 2026 року в Україні вдруге відбувся Біофізичний тиждень — щорічний міжнародний захід у рамках глобальної ініціативи Американського біофізичного товариства. Цього року подія набула загальнонаціонального масштабу за участі Київського, Харківського, Львівського та Закарпатського відділень Українського біофізичного товариства (УБФТ), а також провідних університетів і наукових установ НАН України. Упродовж чотирьох днів (25–28 березня) науковці та молоді вчені представили доповіді з широкого кола тем: від молекулярної біофізики та нанотехнологій до нейронних інтерфейсів, біоінформатики і застосування штучного інтелекту в біомедицині. Особливий акцент було зроблено на незламності наукової спільноти в умовах війни, популяризації біофізики серед молоді та розширенні міжнародного співробітництва. Стратегічними пріоритетами УБФТ визначено роботу з молоддю, зокрема через Малу академію наук України та зміцнення міжнародних наукових зв'язків.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: Біофізичний тиждень 2026, Українське біофізичне товариство, міждисциплінарні дослідження, наука в умовах війни, популяризація науки.

BIOPHYSICS WEEK 2026. BIOPHYSICS IN UKRAINE: HUMAN ENERGY AND WILLPOWER IN SCIENCE AND EDUCATION DURING THE WARTIME

V. S. Martynyuk 

Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64/13, Volodymyrska Street, City of Kyiv, 01601, Ukraine

e-mail: vittorio.martini.office@gmail.com

In March 2026, Ukraine hosted the second annual Biophysics Week — an international event held as part of the global initiative of the American Biophysical Society. This year, the event took on a nationwide scale, with the active participation of the Kyiv, Kharkiv, Lviv, and Zakarpattia branches of the Ukrainian Biophysical Society (UBS), along with leading universities and research institutions of the National Academy of Sciences of Ukraine. Over four days (March 25–28), scientists and young researchers presented reports spanning a broad range of topics, including molecular biophysics, nanotechnology, neural interfaces, bioinformatics, and artificial intelligence applications in biomedicine. Special emphasis was placed on the resilience of the scientific community under wartime conditions, the promotion of biophysics among young people, and the expansion of international collaboration. The strategic priorities of the UBS were defined as engaging youth — in particular through the Junior Academy of Sciences of Ukraine — and strengthening international scientific ties.

KEY WORDS: Biophysics Week 2026; Ukrainian Biophysical Society; interdisciplinary research; science under war conditions, science outreach.

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 10 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 реферат). 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 10 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 "Peфeпap" 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. 55

Збірник наукових праць

Укр. та англ. мовами.

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

Підписано до друку 22.06.2026. Формат 60×84 1/8.
Папір офсетний. Друк цифровий.
Ум. друк. арк. 8,21. Обл.-вид. арк. 10,26. 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