

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

Біофізичний Вісник

1'15

Biophysical Bulletin

2015

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ

В редакцію подається рукопис українською, російською або англійською мовою у двох екземплярах з направленням установи і експертним висновком, а також електронний варіант статті (у форматі MS Word 2003 і вище) приєднаним файлом на електронну адресу редакції biofiz-visnyk@karazin.ua

Текст друкується на білих аркушах формату А4, через один інтервал, з високою якістю друку. Використовується редактор MS Word, шрифт Times New Roman (Cyr), розмір шрифту 12 pt., вирівнювання тексту по ширині. Поля справа і зліва по 2,5 см, зверху 3,5 см, знизу 2 см. Сторінки нумеруються послідовно на зворотному боці аркуша олівцем. Математичні та хімічні символи (із вбудованої до MS Word таблиці символів), рівняння і формули вводяться до тексту статті за допомогою редактора MathType. Рисунки, у вигляді повністю придатного до репродукції, вставляються до тексту в межах площі сторінки, вказаної вище. Графіки будуються у будь-якому програмному пакеті, призначеному для обробки і візуалізації наукових даних: Origin, Mathcad, тощо. Цифри і підписи на осях та надписах повинні мати шрифт 9 pt. Використання офісного пакету MS Excel для побудови графіків не допускається. Бажано розміщувати рисунки у таблицю із прозорими зовнішніми границями, вирівнювання по ширині. Рисунок розміщувати у першому рядку таблиці, підпис та коментарі до рисунку – у другому рядку таблиці. Підписи під рисунками друкуються шрифтом 10 pt. Рисунки мають бути вставлені до файлу MS Word із файлів у форматі *.emf, *.wmf, *.jpg, *.jpeg, *.png. Формули, таблиці й рисунки нумеруються послідовно арабськими цифрами, наприклад, (1); Табл. 1; Рис. 1.

Послідовність розміщення матеріалу:

На першій сторінці зверху на першому рядку в лівому верхньому куті друкується УДК (курсив, 11 pt.). Потім, після пропуску одного рядка, розміщується назва статті (прямий напівжирний шрифт, 12 pt., всі букви прописні, вирівнювання по центру). Після пропуску одного рядка друкуються спочатку ініціали, потім прізвища авторів (прямий напівжирний шрифт, 12 pt., вирівнювання по центру). На наступному рядку друкуються повні назви й адреси установ, де виконувалась робота (курсив, 10 pt., вирівнювання по центру), адреса електронної пошти друкується за бажанням авторів. 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 вміщується реферат статті, обсягом 1000-1200 символів, з коротким викладом об'єкту дослідження, мети або задач, методичних підходів, використаних у роботі, та основних результатів і висновків. Слово "реферат" не пишеться (використовується прямий шрифт розміром 10 pt.). На наступному рядку вміщуються 5-8 ключових слів (10 pt., заголовок "**КЛЮЧОВІ СЛОВА:**" пишеться прописом на тому ж рядку, що й ключові слова і виділяється напівжирним шрифтом).

Текст реферату і ключові слова мають ширину на 1 см меншу, ніж основний текст (по 0,5 см з кожного боку). Після пропуску одного рядка приводяться назва статті, автори й реферат англійською та українською або російською мовою (в залежності від мови статті) тобто, перед статтею мають бути розміщені усі три реферати із назвами статті та авторами. Заголовки "Abstract" і "Реферат" не пишуться. Назва статті: прописом, шрифт прямий 10 pt., напівжирний, вирівнювання по центру. На наступному рядку - ініціали та прізвища авторів (шрифт прямий 10 pt., напівжирний, вирівнювання по центру). На наступному рядку друкується повна назва організації та її адреса (курсив 9 pt., вирівнювання по центру). Після пропуску одного рядка вміщується текст реферату (шрифт прямий 10 pt., вирівнювання по ширині, без червоного рядка). На наступному рядку після слів "**KEY WORDS:**" (прописом, шрифт прямий напівжирний, 9 pt.) вміщуються ключові слова (шрифт прямий 9 pt., вирівнювання по ширині). Текст рефератів і ключові слова мають ширину на 1 см меншу, ніж основний текст (по 0,5 см з кожного боку).

Після пропуску одного рядка, вміщується основний текст статті, шрифт Times New Roman (Cyr), розмір шрифту 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 (в назвах розділів усі букви прописні і виділяються напівжирним шрифтом, вирівнювання по центру). При необхідності розділи поділяються на підрозділи. Назви підрозділів пишуться з великої букви і виділяються напівжирним шрифтом (вирівнювання по центру). Після кожного розділу або підрозділу іде один пустий рядок. Після назв розділів і підрозділів крапка не ставиться. У кінці тексту статті, після пропуску одного рядка, якщо необхідно, зазначається назва фонду, який фінансував роботу, і номер гранту.

Літературні посилання нумеруються в порядку цитування в тексті, номер посилання пишеться у квадратних дужках. Не допускаються посилання на неопубліковані роботи. Список літератури (шрифт 10 pt.) розміщується за основним текстом статті й виділяється як розділ. Оформлення бібліографічних посилань має відповідати вимогам ДСТУ ГОСТ 7.1:2006. Посилання на російськомовні і україномовні публікації дублюються у транслітерації. Транслітерація робиться за допомогою, наприклад, сайту <http://translit.net>. Приклад:

1. ¹H ЯМР анализ самоассоциации рибофлавин-мононуклеотида и его комплексобразования с никотинамидом в водном растворе / А. Н. Веселков, А. О. Лантушенко, А. С. Чубаров [и др.] // Журн. физ. химии. – 2002. – Т. 76., № 7. – С. 1313–1320. /¹H ЯМР анализ самоассоциации рибофлавин-мононуклеотида и его комплексобразования с никотинамидом в водном растворе А. Н. Веселков, А. О. Лантушенко, А. С. Чубаров [и др.] // Zhurn. fiz. himii. – 2002. – Т. 76., № 7. – S. 1313–1320./

Рукописи оформлені не у відповідності до наведених правил не розглядатимуться.

ISSN 2075-3810

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

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

Біофізичний Вісник Biophysical Bulletin

Випуск 33 (1) Issue

Заснований 1998 р.

Founded in 1998

Харків 2015 Kharkiv

Журнал "БІОФІЗИЧНИЙ ВІСНИК" – періодичне наукове фахове видання України в галузі фізико-математичних та біологічних наук.

Журнал публікує статті, короткі повідомлення та огляди, які містять оригінальні результати вирішення фізико-математичних проблем, що відносяться до біологічних систем різного рівня організації, методами експериментальної і теоретичної фізики та математичного моделювання.

Розрахований на науковців, викладачів, аспірантів, студентів, що працюють у галузі біофізики, медичної фізики та суміжних областях.

The journal **BIOPHYSICAL BULLETIN** is a periodic Ukrainian scientific publication in a field of biology, physics and math.

The journal publishes articles, short communications and reviews that contain original results of solution of physical and mathematical problems corresponding to biological systems of various levels of organization by using the methods of experimental and theoretical physics and mathematical modeling.

Затверджено до друку рішенням Вченої ради Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна (протокол № 7 від 1 липня 2015 р).

Редакційна колегія:

головний редактор -

Горбенко Г.П. - д.ф.-м.н., професор, ХНУ ім. В.Н.Каразіна

заступник головного редактора -

Катрич В.О. - д.ф.-м.н., проф., ХНУ ім. В.Н.Каразіна

Баранник Є.О. - д.ф.-м.н., ХНУ ім. В.Н.Каразіна

Бондаренко В.А. - д.б.н., проф., ХНУ ім. В.Н.Каразіна

Гордієнко Є.О. - д.б.н., член-кор НАНУ, проф., ІПКіК НАНУ

Делігеоргієв Т. - проф.,

Софійський університет, Болгарія

Доран О. – проф., Університет Західної Англії, Бристоль, Великобританія

Карачевцев В.О. - д.ф.-м.н., проф. ФТІНТ НАНУ

Кнігавко В.Г. - д.б.н., проф., ХНМУ

Косевич М.В. - д.ф.-м.н. ФТІНТ НАНУ

Малєєв В.Я. - д.ф.-м.н., професор., ІРЕ НАНУ

Мартиненко О.В. - д.ф.-м.н., проф., ХНУ ім. В.Н.Каразіна

Осецький О.І. - д.ф.-м.н., проф. ІПКіК НАНУ

Перський Є.Е. - д.б.н., проф., ХНУ ім. В.Н.Каразіна

Семенов М.О. - д.ф.-м.н., проф., ІРЕ НАНУ

Сорокін В.О. - д.ф.-м.н., проф., ФТІНТ НАНУ

Толсторуков М. - к.ф.-м.н., Гарвардський університет, США

Шестопалова Г.В. - д.ф.-м.н., ІРЕ НАНУ

відповідальний секретар -

Берест В.П. - к.ф.-м.н., доц., ХНУ ім. В.Н.Каразіна

Технічна група: Горобченко О.О., Адельянов О.В.

Technical Board: O.O. Gorobchenko, O.V. Adeljanov

Адреса редакційної колегії:

кафедра молекулярної і медичної біофізики
факультет радіофізики, біомедичної електроніки та
комп'ютерних систем

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

тел. / phone: +38 057 7075576

e-mail: biofiz-visnyk@karazin.ua

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

Editorial Board:

Editor-in-Chief -

G.P. Gorbenko – Dr.Sci., Prof., V.N.Karazin KhNU

Vice Editor-in-Chief -

V.O. Katrych – Dr.Sci., Prof., V.N.Karazin KhNU

Ye.O. Barannik – Dr.Sci., V.N.Karazin KhNU

V.A. Bondarenko – Dr.Sci., Prof., V.N.Karazin KhNU

Ye.O. Gordienko – Dr.Sci., Prof., Corresponding member of the NASU, IPC&C NASU

T. Deligeorgiev – Professor, University of Sofia, Bulgaria

O. Doran - Professor, University of West of England, Bristol, Great Britain

V.A. Karachevtsev – Dr.Sci., Prof., ILTPI NASU

V.G. Knigavko – Dr.Sci., Prof., KhNMU

M.V. Kosevich – Dr.Sci., ILTPI NASU

V.Ya. Maleev – Dr. Sci., Prof., IRE NASU

A.V. Martynenko – Dr.Sci., Prof., V.N.Karazin KhNU

O.I. Osetskiy – Dr.Sci., Prof., IPC&C NASU

Ye.Ye. Perskiy – Dr.Sci., Prof., V.N.Karazin KhNU

M.O. Semenov – Dr.Sci., Prof., IRE NASU

V.O. Sorokin – Dr.Sci., Prof., ILTPI NASU

M. Tolstorukov - Ph.D., Harvard Medical School, USA

A.V. Shestopalova – Dr.Sci., IRE NASU

Executive Secretary -

V.P. Berest - Ph.D., Associate Prof., V.N.Karazin KhNU

Статті пройшли внутрішнє та зовнішнє рецензування.

Свідоцтво про державну реєстрацію КВ № 11007 від 17.02.2006

ЗМІСТ

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

В.С. Шелковский

Использование окислительно-восстановительных и агрегационных свойств красителя метиленового синего в нанобиофизических исследованиях 5

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

О.І. Гордієнко, М.О. Баранник, Є.О. ГордієнкоРоль електростатичних взаємодій у адгезії *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини в середовищах з різною концентрацією 1:1 електроліту 30**О.І. Гордієнко, М.О. Баранник, Є.О. Гордієнко**Роль електростатичних взаємодій у адгезії *Streptococcus thermophilus* на еритроцитах людини в середовищах з різною концентрацією 2:1 електроліту 38

МЕДИЧНА ФІЗИКА

О.О.Мартинюк, Л.Ф.Суходуб, Л.Б.Суходуб

Нанокompозитні матеріали на основі гідроксиапатиту та альгінату натрію: синтез і характеристика 48

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

Е.А. Аверченко, Н.С. Кавок, Ю.В. Никитченко, В.К. Клочков, М.Ю. Малюкина, С.А. Климов, Е.Н. Ткачева, С.Л. Ефимова

Влияние наночастиц на основе ортованадатов редкоземельных элементов и оксида церия на биоэнергетические процессы в митохондриях гепатоцитов 60

МЕДИЧНА ФІЗИКА

Л.В. Батюк

Вибір по ROC-кривим вирішувальних правил для діагностичних тестів 68

CONTENTS**MOLECULAR BIOPHYSICS****V.S. Shelkovsky**

Utilization of redox and aggregation properties of methylene blue dye in nanobiophysical investigations 5

CELL BIOPHYSICS**O.I. Gordiyenko, M.O. Barannyk, E.O. Gordiyenko**The role of electrostatic interactions in the *Streptococcus thermophilus* adhesion on human erythrocytes in media with different 1:1 electrolyte concentration 30**O.I. Gordiyenko, M.O. Barannyk, E.O. Gordiyenko**The role of electrostatic interactions in the *Streptococcus thermophilus* adhesion on human erythrocytes in media with different 2:1 electrolyte concentration 38**MEDICAL PHYSICS****O.O. Martynyuk, L.F. Sukhodub, L.B. Sukhodub**

Nanocomposite materials based on hydroxyapatite and sodium alginate: synthesis and characteristics 48

CELL BIOPHYSICS**K.A. Averchenko, N.S. Kavok, Yu.V. Nikitchenko, V.K. Klochkov,****M.Yu. Malyukina, S.A. Klimov, E.N. Tkacheva, S.L. Yefimova**

Influence of rare-earth based orthovanadate nanoparticles and cerium oxide on bioenergetic processes in mitochondria of hepatocytes 60

MEDICAL PHYSICS**L.V. Batyuk**

The choice of rules of making decisions for diagnostic tests by ROC-curves 68

УДК 547.869.53:620.3:543.51

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ И АГРЕГАЦИОННЫХ СВОЙСТВ КРАСИТЕЛЯ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО В НАНОБИОФИЗИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

В.С. Шелковский*Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины,**пр. Ленина, 47, Харьков, 61103, Украина**e-mail: shelkovsky@ilt.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 2 июня 2015 года

Принята 23 июня 2015 года

В обзоре рассматриваются новые возможности применения популярного катионного красителя метиленового синего в молекулярно-биофизических исследованиях и нанотехнологии. Основное внимание уделяется использованию окислительно-восстановительных и агрегационных свойств метиленового синего в моделировании биофизических процессов и разработке схем функционирования наноструктур на молекулярном уровне. Систематизируются подходы к исследованию редокс-процессов с участием метиленового синего и его взаимодействия с наноматериалами с использованием экспериментальных возможностей метода масс-спектрометрии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: краситель метиленовый синий, димеризация, окислительно-восстановительные реакции, межмолекулярные взаимодействия, масс-спектрометрия, наноматериалы, нанотехнология, электрохимические сенсоры, перенос электрона.

ВИКОРИСТАННЯ ОКИСЛЮВАЛЬНО-ВІДНОВНИХ І АГРЕГАЦІЙНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БАРВНИКА МЕТИЛЕНОВОГО СИНЬОГО В НАНОБІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

В.С. Шелковський*Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України,**пр. Леніна, 47, Харків, 61103, Україна*

В огляді розглядаються нові можливості застосування популярного катіонного барвника метиленового синього в молекулярно-біофізичних дослідженнях і нанотехнології. Основна увага приділяється використанню окислювально-відновних і агрегаційних властивостей метиленового синього в моделюванні біофізичних процесів і розробці схем функціонування нанопристроїв на молекулярному рівні. Систематизуються підходи до дослідження редокс-процесів за участю метиленового синього і його взаємодії з наноматеріалами з використанням експериментальних можливостей методу мас-спектрометрії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: барвник метиленовий синій, димеризація, окислювально-відновні реакції, міжмолекулярні взаємодії, мас-спектрометрія, наноматеріали, нанотехнологія, електрохімічні сенсоры, перенос електрона.

UTILIZATION OF REDOX AND AGGREGATION PROPERTIES OF METHYLENE BLUE DYE IN NANOBIOPHYSICAL INVESTIGATIONS

V.S. Shelkovsky*B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine,**47, Lenin Avenue, Kharkov, 61103, Ukraine*

Novel potentialities of applications of popular cationic dye Methylene Blue in molecular biophysical investigations and nanotechnology are considered in this review. The main attention is paid to utilization of redox and aggregation properties of Methylene Blue in modeling of biophysical processes and elaboration of schemes for nanodevices functioning at the molecular level. Approaches to study of methylene blue-involving redox processes and its interactions with nanomaterials using possibilities of experimental mass spectrometric techniques are systematized.

KEY WORDS: methylene blue dye, dimerization, redox reactions, intermolecular interactions, mass spectrometry, nanomaterials, nanotechnology, electrochemical sensors, electron transfer.

В данной работе дается краткий обзор возможностей использования окислительно-восстановительных и агрегационных свойств редокс-активного катионного красителя

метиленового синего (МС) [1-3] в биофизических исследованиях и нанотехнологических разработках, а также приводятся примеры изучения этих свойств в условиях масс-спектрометрических экспериментов. Рассматриваются следующие вопросы:

- структура метиленового синего
- димеризация метиленового синего
- окислительно-восстановительные свойства метиленового синего
- использование редокс-свойств метиленового синего в нанотехнологических разработках
- использование различий в свойствах мономерной и димерной форм метиленового синего в биофизических и молекулярно-биологических исследованиях
- подходы к разработке наноустройств с использованием взаимодействия метиленового синего с нуклеиновыми кислотами
- новые применения метиленового синего в фармакологии
- проявление редокс-свойств метиленового синего в масс-спектрометрических экспериментах.

СТРУКТУРА МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО

Метиленовый синий (метиленовая синь, метиленовый голубой, *Methylenum coeruleum* (лат.), *Methylene Blue* (англ.), N,N,N',N'-тетраметилтионина хлорид, *dimethylaminophenothiazin-5-ium chloride*) относится к органическим основным тиазиновым красителям [4, 5] - производным фенотиазина [6, 7]. МС был впервые синтезирован Генрихом Каро в 1876 году [8,9].

МС представляет собой соль, состоящую из органического катиона, обозначаемого далее как MC^+ или Cat^+ , и аниона Cl^- (рис. 1).

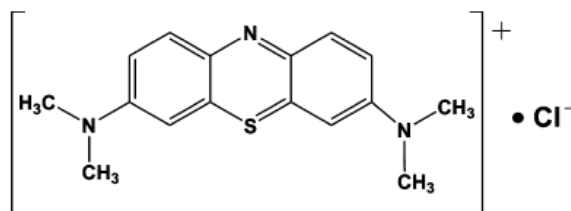


Рис. 1. Структурная формула метиленового синего $Cat^+ \cdot Cl^-$. Брутто-формула $C_{16}H_{18}ClN_3S$, молекулярная масса 319,85 г·моль⁻¹. Значение моноизотопной массы катиона Cat^+ - 284 а. е. м.

В соответствии с кристаллографическими данными [10, 11], МС кристаллизуется в форме кристаллогидрата ($C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot H_2O$). В твердом состоянии имеет вид кристаллов темно-зеленого цвета с характерным бронзовым отливом, хорошо растворимых в воде.

Отметим, что структурная формула на рис. 1 наиболее адекватно отражает свойства катиона MC^+ в отличие от встречающихся в ранней литературе [4] устаревших представлений, в которых указано локализованное положение положительного заряда (+) у атомов серы или азота. Недавние квантово-химические расчеты [12] показали, что единичный положительный заряд в MC^+ делокализован. Карта распределения электростатического потенциала (рис. 2) показывает, что положительный потенциал распределен практически равномерно вокруг катиона MC^+ . Карта распределения электронной плотности в катионе показывает, что наибольшая электронная плотность наблюдается возле атомов азота, а возле гетероатома серы и атомов водорода – наименьшая. «Избыток» положительного заряда катиона делокализован по всем атомам водорода гетероциклов и CH_3 групп.

Такие электронные свойства позволяют отнести катион MC^+ к специфическому классу так называемых гидрофобных катионов, ярким примером которых являются алкиламмониевые катионы [13-17]. Невзирая на гидрофобный характер CH_3 групп и

трициклической системы в целом, делокализованный положительный заряд обеспечивает растворимость MC^+ в воде.

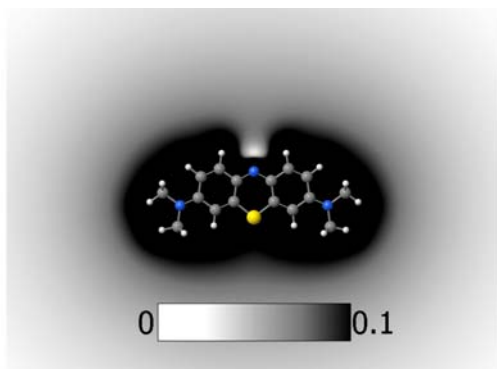


Рис. 2. Карта распределения положительного электростатического потенциала вокруг катиона MC^+ (по данным квантово-химических расчетов методом DFT/M05-2X/6-31++G(d,p) [12]). (Белый цвет соответствует нулевому потенциалу, черный – +0,1 e).

Структурные и электронные параметры катиона MC^+ изучались различными расчетными методами [12, 18-20].

Практическое применение находят также близкие по структуре к MC тиазиновые красители азуров – азур А, В, С, отличающиеся от MC отсутствием двух, одной и трех CH_3 групп, соответственно [21].

Для поиска данных о свойствах MC используется его идентификатор – регистрационный номер CAS (Chemical Abstracts Service) - CAS Registry No. 61-73-4. Справочные данные о спектральных параметрах MC можно найти в электронных базах данных: ИК спектры приводятся в базе Национального Института Стандартов и Технологий (National Institute of Standards and Technology, NIST) [22] и базе данных спектров органических соединений (Spectral Database for Organic Compounds, SDBS) [23]; там же [23] приводятся ЯМР и масс-спектры MC . Что касается спектров поглощения водных растворов MC в УФ и видимой области, то приводимые в различных литературных источниках [8, 9, 24-27] численные значения максимумов полос поглощения несколько различаются, что, по всей видимости, обусловлено варьированием экспериментальных условий и использованием разных способов обработки спектров.

ДИМЕРИЗАЦИЯ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО

Гидрофобно-гидрофильный баланс обеспечивает возможность димеризации катионов MC^+ в водной среде: энергетический выигрыш от десольватации двух контактирующих поверхностей катионов компенсирует электростатическое отталкивание одноименных зарядов. Последнее уменьшается также за счет уменьшения плотности заряда вследствие его делокализации, отмеченной выше (рис. 1).

Константа димеризации MC составляет $K_{\text{дим}} = 5 \cdot 10^3$ при pH 4-5,5 [8], по другим данным – $3,6 \cdot 10^3$ [28], $(3,9 \pm 0,8) \cdot 10^3$ [29].

В связи с широким практическим применением MC , влиянию на агрегационные параметры MC различных физических и химических факторов (концентрация, тип растворителя, pH, ионная сила, температура, давление, добавки) посвящено большое количество исследований [25, 30-42], в которых основное внимание уделяется балансу мономерной и димерной форм MC . При определенных условиях, в основном при адсорбции MC на структурированных поверхностях [43-48], возможно образование тримеров и больших агрегатов MC .

Особо отметим исследования димеризации MC в экстремальных условиях – при высоком давлении [41] и при низких температурах в замороженных водных растворах [42].

Основным методом определения наличия агрегатов МС в системе является оптическая спектроскопия, поскольку спектры поглощения мономерной и димерной форм МС различаются. МС как ароматическое гетероциклическое соединение характеризуется высоким коэффициентом поглощения в диапазоне 600-700 нм. В водных растворах максимум полосы поглощения λ_{\max} для мономера в разных работах приводится как 668 нм [8], 664 нм [25], 660 нм [26, 27]; λ_{\max} для димера – 614 нм [26, 27], 612 нм [22], 605 нм [25]; λ_{\max} для тримера - 580 нм [25]. В УФ области для мономера $\lambda_{\max} = 292$ нм [27].

Были выполнены квантово-химические расчеты возможных структур димеров $2(\text{МС}^+)$, учитывавшие конфигурации с параллельной ориентацией плоскостей катионов (стэкинг), ортогональной ориентацией длинных осей и перпендикулярным расположением плоскостей катионов [49].

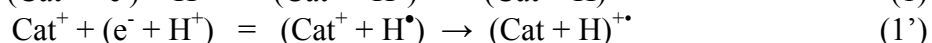
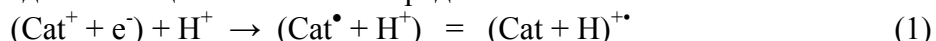
Отметим разработку экспериментальных и теоретических подходов к изучению ассоциации, включая димеризацию, катионных форм биологически активных соединений в серии работ Веселкова А.Н. и Евстигнеева М.П. с соавт. [29, 50-53].

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО

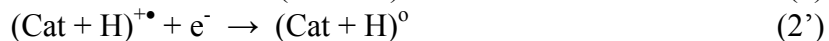
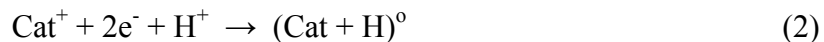
МС относится к так называемым редокс-активным или редокс-чувствительным красителям («редокс» от английского сокращения «reduction-oxidation» до “redox”) [54, 55]. Катион МС^+ легко восстанавливается; нормальный окислительно-восстановительный потенциал E_0 МС при рН 7 равен +0,011 В, при рН 0 E_0 составляет +0,53 В [55, 56]. По данным работ [57, 58] редокс-потенциал МС составляет -0,186 В относительно Ag/AgCl электрода.

Водный раствор МС в исходном (окисленном) состоянии имеет синюю окраску; восстановленная, так называемая лейкоформа (от древнегреческого λευκός — белый) МС – бесцветная. Явление изменения цвета водного раствора МС (как и других основных красителей) называется метахромазией.

Реакции восстановления Cat^+ при поступлении электрона и протона или атома водорода из внешней среды выглядят следующим образом. На стадии так называемого одноэлектронного восстановления образуется промежуточный продукт – полувосстановленная форма, представляющая собой катион-радикал:



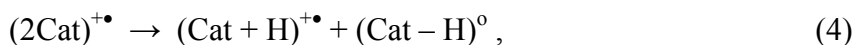
Завершение двухэлектронного процесса дает нейтральную обесцвеченную восстановленную форму:



Если в системе присутствуют димеры $(2\text{Cat})^{2+}$, то возможен их переход в возбужденное состояние путем захвата электрона



При диссоциации такого нечетноэлектронного димера образуется полувосстановленный продукт



который далее преобразуется в соответствии с реакцией (2').

В работе [59] описываются превращения в твердых образцах МС под действием УФ облучения. Поглощение кристаллическим МС излучения в УФ диапазоне приводит к образованию полувосстановленной и полуокисленной форм МС вследствие переноса электрона между соседствующими катионами:



Реакции окисления-восстановления МС являются обратимыми. Обратимость реакций наглядно демонстрируется в рекомендуемом для учебного курса химии лабораторном эксперименте с «синей бутылкой» (“blue bottle” experiment) [60, 61]: при добавлении к водному раствору МС смеси глюкозы с гидроксидом натрия раствор быстро обесцвечивается вследствие восстановления МС до его лейкоформы. При встряхивании колбы раствор насыщается кислородом, который окисляет лейкоформу, и раствор приобретает синюю окраску, которая вновь исчезает по мере расходования кислорода.

Лейкоформа МС [62] сама по себе является нестабильной в воде [63] и легко окисляется, однако разрабатываются методы синтеза ее производных [64, 65]. Процесс восстановления МС в различных условиях, а также продукты редокс-реакций продолжают активно изучаться [26, 27, 66-68].

По данным спектроскопии поглощения в УФ и видимой области [26] максимум полосы поглощения λ_{max} для полувосстановленной радикальной формы МС (Cat^{\bullet}) составляет 420 нм; продукт двухэлектронного восстановления без протона (Cat^{\ominus}) определяется по полосе с $\lambda_{\text{max}} = 256$ нм. Для восстановленной нейтральной бесцветной лейкоформы $(\text{Cat} + \text{H})^{\circ}$ ($\text{pH} < 2$) максимумы регистрируются на 256 и 314 нм [66]; для протонированной лейкоформы ($2 < \text{pH} < 7$) $\lambda_{\text{max}} = 232$ нм [67].

Окислительно-восстановительные свойства МС определяют ряд его полезных практических применений.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕДОКС-СВОЙСТВ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО В НАНОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РАЗРАБОТКАХ

Создание наноматериалов с включением редокс-чувствительных компонентов и разработка методов управления функциональной активностью таких материалов является одной из актуальных задач нанотехнологии [69-71]. Роль редокс-активных красителей в таких наноматериалах состоит в управляемом переносе электронов и/или протонов [71].

Основные перспективные применения наноматериалов, включающих МС, ожидаются при разработке наносенсоров и биосенсоров [72-88], а также элементов для солнечных батарей [89, 90] и фотоэлементов (photovoltaic cells). Отметим, что небольшие редокс-активные биомолекулы, рассматриваются сейчас как прототипы «вдохновленных биологией» (“biologically inspired”, своего рода бионика на молекулярном уровне) материалов для электрических аккумуляторов [91].

В зависимости от функции, выполняемой МС в различных системах, материалах и устройствах, его называют редокс-активным или редокс-чувствительным красителем, редокс-меткой/биркой (label, tag), обратимым окислительно-восстановительным индикатором, медиаторным веществом, репортерской (reporter) молекулой, сигнальной молекулой или маяком (beacon), фотосенсибилизатором (photosynthertiser), электрохимически активным веществом.

В разрабатываемых электрохимических амперометрических биосенсорах [72-74, 86, 92, 93] МС выполняет функцию медиаторного вещества [75, 76], роль которого состоит в переносе электронов (“shuttling electrons”), генерируемых биокомпонентом сенсора в процессе реакции узнавания искомого анализируемого вещества [72, 75, 76]. Сообщается об использовании МС в сенсорах на перекись водорода [75-78], нуклеиновые кислоты [79, 80], аскорбиновую кислоту [81], НАДФ [82], колиморфные (колиформные) бактерии группы кишечной палочки [83], ионы шестивалентного хрома [84], определенные фармацевтические препараты [85] и биологически активные низкомоле-

кулярные соединения [86]. Также предлагаются сенсоры на наночастицы с редокс-активной поверхностью [87], а также сам МС [88].

Наноконпозиты с включением МС разрабатываются на основе таких материалов как углеродные нанотрубки (УНТ) [12, 46, 78, 79, 94, 95], нафионовые пленки [75], оксиды кремния [76] и титана [46, 47], пленки диоксидов титана и кремния [81, 96], структурированная матрица (array) из окиси алюминия [77], полупроводниковые нанокристаллы CdTe [97], пористый оксид кремния и циркония [98], ионные жидкости [40], графен [99-100] и окисленный графен [101], фуллерен C₆₀ [102, 103], коллоидное серебро [104] и серебряные электроды [105]. Сообщалось о модификации электродов амперометрического биосенсора слоем электрополимеризованного МС (поли-МС) в сочетании с органическим полимером [82].

Отметим также использование свойства углеродных наноматериалов адсорбировать МС при разработке материалов для очистки воды [106] и свойства мезопористых оксидных пленок влиять на фотостабильность и фотодеградацию МС [96].

Существенным для практических применений является также наличие у МС флуоресцентных свойств, которые определяют его использование в качестве «нанозонда» (“nanoprobe”) при разработке современных методов визуализации (“imaging”) биоматериалов в целях клинической диагностики [106], а также в биотехнологии [108]. К современным нанотехнологиям относятся создаваемые в последнее десятилетие методы визуализации и картирования распределения различных веществ на уровне клеток и тканей с помощью флуоресцентной (отмеченной в 2014 году Нобелевской премией по химии [109]) и масс-спектрометрических [110] методик, а также сканирующей электрохимической микроскопии [111].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗЛИЧИЙ В СВОЙСТВАХ МОНОМЕРНОЙ И ДИМЕРНОЙ ФОРМ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО В БИОФИЗИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

В последнее время разрабатываются интересные приемы биофизических исследований, основанные на использовании различий в определенных параметрах и поведении мономерной и димерной форм МС⁺ в модельных и реальных биологических системах. Сразу же заметим, что эти различия в большинстве случаев связаны с различиями в протекании окислительно-восстановительных реакций с участием мономерной и агрегированной форм МС⁺, т.е. неразрывно связаны с редокс-свойствами МС. Физико-химическое обоснование этих различий формулируется достаточно просто и четко: при каком-либо возбуждающем воздействии на систему, содержащую МС в редокс-неактивной среде, для осуществления реакции восстановления МС⁺ необходим источник атомов водорода (электрона и протона), которым может служить второй катион МС⁺ в димере (агрегате); релаксация возбуждения, переданного мономеру, осуществляется другим способом, описанным ниже. Таким образом, регистрация протекания реакции восстановления МС⁺ является доказательством агрегированной формы МС⁺ в системе, а ее отсутствие свидетельствует о мономерной форме МС⁺. Обнаруженные в таких фундаментальных исследованиях эффекты являются перспективными для дальнейшего применения в наноустройствах с использованием взаимодействий биомолекул с МС.

Среди ряда частных уникальных исследований проявлений агрегационных эффектов МС в различных средах отметим следующие.

Интересные исследования касались установления связи между константой димеризации МС и его бактерицидной активностью [112, 113]. Было показано, что в присутствии определенных видов бактерий наблюдается более активная димеризация

МС и что именно димеры МС играют определяющую роль в фотоповреждении бактерий.

Переход между мономерной и димерной формами МС использовали при разработке такого уникального приспособления как «enzyme-specific activatable probe using photoacoustic imaging» (избирательный к ферментам активационный зонд для фотоакустической визуализации) [114].

Более детально остановимся на двух биологически важных объектах, в которых переход между мономерной и димерной формами МС⁺ определяет как поведение самих этих биосистем, так и перспективы дальнейшего применения МС для их исследования, а именно, отрицательно заряженные биомембраны и наноструктуры на основе нуклеиновых кислот.

Взаимодействие МС⁺ с монослоями поверхностно-активных веществ и биомембранами

Переходы между мономерной и димерной формами МС наблюдались при фазовых переходах вида гель-жидкий кристалл в модельных двухслойных мембранах [115]. Отмечалось влияние агрегации МС на морфологию доменов, формирующихся в монослоях димиристоил-фосфатидной кислоты [116].

Взаимодействие МС⁺ с мембранами митохондрий, которые являются известными мишенями для фотосенсибилизаторов, изучалось в связи с такой важной биомедицинской проблемой как фотодинамическая терапия злокачественных новообразований [117, 118]. Было установлено, что при мономерной или димерной формах адсорбции МС⁺ на отрицательно заряженных поверхностях молекулярные механизмы фотодинамических процессов качественно отличаются. Исследования проводили как на реальных мембранах митохондрий, характеризующихся отрицательным мембранным потенциалом [118], так и на модельных системах, представляющих собой слои анионного поверхностно-активного вещества (ПАВ, сурфактанта) додецилсульфата натрия (sodium dodecylsulphate, SDS) [119-121]. Были выявлены два сценария фотодинамических процессов под воздействием УФ-облучения системы в зависимости от агрегационного состояния МС⁺. Если в системе обеспечивалось наличие МС⁺ в мономерной форме, механизм фотохимической трансформации фотовозбужденного катиона МС⁺* состоял в переносе энергии от катиона к присутствующему в растворе молекулярному кислороду с образованием синглетного кислорода ¹O₂. В этом случае редокс-состояние катиона МС⁺ не изменялось. Если же в системе обеспечивалось образование димеров (2МС)²⁺, то становился возможным перенос электрона между возбужденным и невозбужденным компонентами димера, приводящий к образованию полувосстановленного (МС[•]) и полуокисленного (МС^{2•+}) радикалов МС⁺ [119]. Это различие имеет важное биологическое значение, поскольку, как было установлено, от формы релаксации УФ-возбуждения фотосенсибилизатора зависит механизм повреждения злокачественных клеток. В первом из рассмотренных случаев при участии синглетного кислорода запускается механизм апоптоза, т. е. самопроизвольной гибели злокачественных клеток, что является более мягким и, соответственно, желательным процессом. Во втором случае при участии редокс-реакций реализуется некроз клеток, что является более травмирующим процессом. Соответственно, для более эффективной терапии требуются не высокие, а определенные низкие концентрации фотосенсибилизатора МС.

Реализация и отсутствие восстановления МС⁺ в зависимости от его концентрации в модельных слоях SDS, было подтверждено экспериментально в наших исследованиях с использованием набора десорбционных масс-спектрометрических методик [122].

Описанный эффект, обнаруженный и изученный на биологических и биомиметических системах, был использован при синтезе нового функционального наноматериала. А именно, сообщалось о синтезе фотосенсибилизирующих наночастиц с заданным регулируемым соотношением мономерных и димерных форм фенотиазиновых фотосенсибилизаторов, сконструированных для модуляции получения либо синглетного кислорода, либо радикалов красителей в фото-индуцированных процессах [123, 124].

Взаимодействие MC^+ с нуклеиновыми кислотами

Что касается взаимодействий MC с ДНК, то они достаточно хорошо изучены в рамках молекулярно-биофизических исследований комплексообразования биологически активных лигандов с нуклеиновыми кислотами [86, 125-138-144]. Установлено, что MC^+ связывается с двунитевой ДНК в основном по интеркаляционному механизму с предпочтительным стэкинг-взаимодействием с участками, обогащенными парами оснований гуанин-цитозин (G-C) [125, 126, 144]. Возможно также связывание MC^+ с малой бороздкой (желобком) двунитевой ДНК в области пар аденин-тимин (A-T) [127-129]. В комплексах с одонитевой ДНК MC^+ связывается преимущественно с гуанином. В исследованиях *in vitro* интеркаляционный механизм преимущественно реализуется при малых ионных силах раствора; при повышении концентрации солей и MC возможно неспецифическое электростатическое «внешнее» связывание катионов MC^+ с отрицательно заряженными фосфатными группами сахарофосфатного остова ДНК [139-142]. В различных исследованиях показано, что в зависимости от условий возможна реализация как одного определенного, так и одновременно нескольких механизмов связывания MC с нуклеиновыми кислотами [139-143].

В связи с важным вкладом в комплексообразование с ДНК взаимодействий MC с пуриновым основанием гуанином, последним посвящены отдельные как экспериментальные [145], так и теоретические [146-148] исследования.

В условиях фотодинамической терапии связывание MC с ДНК может способствовать возникновению разрывов цепочек нуклеиновой кислоты [125, 137, 138].

Было установлено, что при УФ-воздействии на комплексы MC с ДНК возможен перенос электрона и восстановление MC^+ [138]. В таком случае возможны гетерореакции с участием в качестве второго компонента не второго катиона MC^+ , а основания ДНК; механизмы таких процессов продолжают изучаться и обсуждаться. Так, перенос энергии возбуждения от MC^+ к ДНК при фотовозбуждении интеркаляционных комплексов MC^+ с ДНК доказывается спектроскопическими экспериментами, в которых наблюдалось тушение флуоресценции на характерной для MC^+ длине волны 682 нм при его встраивании в двунитевую ДНК [142, 135, 136, 142]. Также показано, что при электрохимических реакциях на поверхностях, модифицированных пленками ДНК толщиной порядка 50 Å, происходит миграция заряда по двойным спиральям и электрохимическое восстановление редокс-активных репортерских молекул, включенных в пленку [149, 150].

На возможности переноса электрона в молекулах ДНК и ее комплексах [151-156] основываются новые подходы к конструированию наноустройств с участием нуклеиновых кислот и красителей [58, 157], в частности, комплексов MC с ДНК.

ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ НАНОУСТРОЙСТВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ MC^+ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

В последние десятилетия появились работы, в которых определенные параметры комплексов MC с нуклеиновыми кислотами предлагается использовать при конструировании сенсоров для анализа различных веществ, геносенсоров и мониторинга

функционирования самой ДНК [58, 80, 86, 158-189].

Основной принцип действия таких электрохимических сенсоров состоит в детектировании эффективности переноса электрона (параметр “electron transfer”, eT в англоязычной литературе) в используемой системе, проявляющейся в интенсивности детектируемого электрического сигнала, в зависимости от расстояния редокс-активного красителя от поверхности электрода (рис. 3). Для конструктивной реализации этого принципа молекулы нуклеиновой кислоты, с которыми связывается редокс-активный краситель, закрепляются на поверхности электрода (обычно золотого); в ходе функционирования устройства меняется конформация биополимера и, соответственно, расстояния между связанным с ним красителем и электродом. Электрохимический сигнал, возникающий вследствие редокс-реакции при определенном внешнем воздействии, тем больше, чем ближе краситель к электроду. В исходном состоянии биополимер может находиться либо в вытянутой, либо в изогнутой конформации; при взаимодействии с целевой (“target”) молекулой, подлежащей детектированию, возможно как распрямление изогнутой конформации (например, при гибридизации ДНК), либо, наоборот, изгибание полимерной цепочки (например, при взаимодействии с белками).

Варианты конкретных схем устройства сенсоров, обобщением которых является рис. 3, представлены во многих цитируемых здесь работах и графических аннотациях к ним [58, 161, 165, 166, 181, 187].

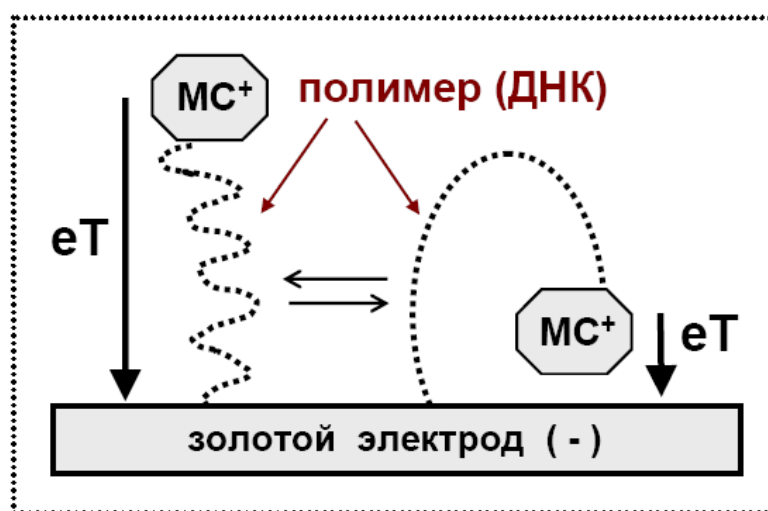


Рис. 3. Схематическое изображение и принцип работы электрохимических амперометрических сенсорных устройств, использующих свойства комплексов биополимера (ДНК) и редокс-активного красителя (МС). При изменении расстояния между МС и электродом, определяемым конформацией полимера, с которым связан краситель, меняется эффективность переноса электрона (eT) в электрохимических процессах и, соответственно, регистрируемый электрический сигнал.

Используются одонитевые ДНК [163, 175, 182], двунитевые ДНК [165, 166, 175], конформации одонитевой ДНК в виде шпилек (“hairpin”) [161, 184], (“loop-stem”) [181, 185, 187], аптамеры ДНК и РНК [181, 186]. Варьируется способ закрепления молекул ДНК: в виде наборов-матриц (“array”) молекул, вертикально пришитых через линкер к электроду одним концом, или иммобилизованных в плоской конформации на положительно заряженной поверхности электрода [58]. Краситель МС может быть связанным с ДНК как ковалентно [163-167], так и путем невалентных взаимодействий [161, 186]. В обзоре [58] можно найти таблицу со сравнительным анализом известных по состоянию на 2011 год 15 систем, основанных на комплексах ДНК с МС: сравниваются свойства систем в зависимости от длины молекул нуклеиновых кислот, состава и порядка оснований в них, способа иммобилизации комплексов на электроду, разницы в электрохимическом ответе МС, связанного с одонитевой или двунитевой ДНК, сдвига редокс-потенциала МС при его связывании с разными типами ДНК. Возможны два механизма переноса электрона и восстановления МС в таких системах: опосредо-

ванный через стэкинг-взаимодействие МС с основаниями в ДНК и прямой путем восстановления красителя при его контакте с электродом; эффективность переноса электрона во втором процессе выше в 20 раз [166]. Следует отметить, что, наряду с МС, испытываются некоторые другие редокс-активные красители (нильский синий [165, 166], антрахинон [165, 168], ферроцен [162]), сравнительная оценка свойств которых, однако, выходит за рамки данного обзора.

Поскольку, как уже отмечалось выше, GC пары являются предпочтительными местами связывания МС в дуплексе, электрохимический сигнал, генерируемый в системе ДНК-МС, коррелирует с содержанием гуанина в ДНК [161]. Также изучалась зависимость эффективности работы сенсора от длины используемых фрагментов ДНК [156, 161] и было показано, что из общего количества связанного МС электрохимически активными («electrochemically readable, visible»), т.е. способными переносить электроны на электрод, были молекулы МС, находящиеся на относительно небольшом расстоянии от электрода, соответствующем длине фрагментов ДНК из примерно 20 пар оснований [161].

Обнаружено, что эффективность переноса электрона зависит также от того, каким концом ДНК закреплена на электроде [169]. Так, если фрагмент двунитевой ДНК из 16-22 пар оснований закреплена на электроде 3' концом, а МС пришит, соответственно, с противоположного 5' конца, то для дуплекса ДНК «разрешен» наклон к поверхности электрода с углом в 57° - 45° , что повышает эффективность переноса электрона. Дуплекс ДНК, закреплённый 5', сохраняет ортогональную ориентацию по отношению к поверхности, при которой эффективность переноса электрона остается низкой. Обнаруженный эффект позволяет изучать диффузию на нано-уровне на расстояниях, соизмеримых с длиной фрагмента ДНК, что представляет интерес для развития молекулярной электроники [169].

Рассмотрим несколько наиболее характерных примеров разработки сенсоров на основе систем ДНК-МС. Так, в работе [161] предлагалось использовать взаимодействие МС с ДНК как редокс-индикатор процесса гибридизации молекул ДНК, различающихся по длине, конформации и содержанию гуанина. Обнаруженный эффект усиления электрохимического сигнала МС, связанного с гибридами коротких фрагментов ДНК, и его уменьшения для гибридов более длинных нитей ДНК, авторы работы [161] предложили использовать при разработке геносенсоров. Основы и варианты создания геносенсоров, базирующиеся на электрохимических процессах в комплексах МС с ДНК рассматривались также в работах [169, 171]. Разрабатываются сенсоры для исследования гибридизации ДНК [161, 164, 173, 174, 184], обнаружения повреждений ДНК [180], мониторинга полимеразных цепных реакций (ПЦР) в режиме реального времени [183], и определения продуктов ПЦР, указывающих на генетически модифицированные организмы (ГМО) [182]. Отметим разработку биосенсоров на основе комплексов МС с G-квадруплексами [178].

Несомненно, важной областью практического применения сенсоров является клиническая диагностика [73, 190], в первую очередь, онкологических заболеваний [191]. Предлагаются конструкции электрохимических сенсоров для обнаружения маркеров злокачественных процессов непосредственно в цельной крови, таких как цитокины [192] и специфический протеин хемокин IP-10 [193]. Разрабатываются сенсоры для детектирования вируса гепатита В [174].

Описанные выше принципы используются в новаторских, достаточно экзотических разработках электрохимических биокомпьютеров как нового класса молекулярно-электронных логических устройств [194], а также для систем обеспечения безопасности биокомпьютеров [195].

НОВЫЕ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО В ФАРМАКОЛОГИИ

Будучи впервые синтезированным в 1876 году, МС изначально применялся и до сих пор используется в качестве антисептического средства [1-4, 6, 7, 196, 197]. МС внесен в Перечень основных лекарственных средств Всемирной Организации Здравоохранения [198]. Данные о применении и фармакологических свойствах МС доступны в любом современном фармакологическом справочнике [4] и соответствующих обзорах [1-3]. В рамках данного обзора для полноты картины мы лишь коротко перечислим основные применения с акцентом на новые поисковые разработки.

Окислительно-восстановительные свойства МС лежат в основе его второго важного применения в качестве антидота при отравлениях цианидами, окисью углерода, сероводородом [4, 199]. Действие МС при отравлении синильной кислотой основано на способности МС переводить гемоглобин в метгемоглобин, связывающийся с цианидами [4].

Следует отметить, что в последнее время наблюдается возрождение интереса к старым применениям МС и, в то же время, продолжающиеся исследования открывают новые возможности использования препарата в терапии разнообразных заболеваний [200-202].

Так, в начале XX века МС использовали при лечении малярии [1, 3, 7, 203, 204] и, после некоторого забвения, в последние годы вновь тестируются новые более эффективные и менее токсичные антималярийные препараты, включающие МС [203, 204]. Проверяется антивирусная [205] и противоопухолевая активность МС [117].

Рассматривается использование способностей красителей, в том числе МС, модулировать редокс-процессы для разработки иммуотропных препаратов [206, 207].

Весьма обнадеживающие результаты получены при разработке методов лечения или, по крайней мере, торможения развития нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона. Наиболее вероятной причиной этих заболеваний в настоящее время считают агрегацию определенных видов белков в нервных клетках, которая нарушает их нормальное функционирование, препятствует нормальной передаче нервных импульсов и может приводить к гибели нейронов. В частности, при болезни Альцгеймера наблюдается образование агрегатов и фибрилл из так называемых *tau*-белков [208], которые в норме должны находиться в водорастворимой мономерной форме. Соответственно, перспективной стратегией разработки лекарственных препаратов является поиск соединений, предотвращающих агрегацию *tau*-белков. Обнаружен ряд малых молекул [209], обладающих таким свойством, к которым относится МС и его производные азуры. Исследования по установлению молекулярных механизмов действия МС дали результаты буквально в последние годы: было показано, что МС окисляет остатки аминокислоты цистеина в *tau*-белках и влияет на образование межмолекулярных дисульфидных мостиков между остатками цистеина [210-212]. Рассматриваются и другие возможные механизмы действия МС, например, вмешательство в цепь электронного транспорта в митохондриях, конкуренцию с кислородом и уменьшение окислительного стресса, замедляющее процесс старения нервных клеток [213, 214]. Соответствующие редокс-процессы включают восстановление МС до лейкоформы НАДФ-дегидрогеназой с последующим окислением цитохромом С [214].

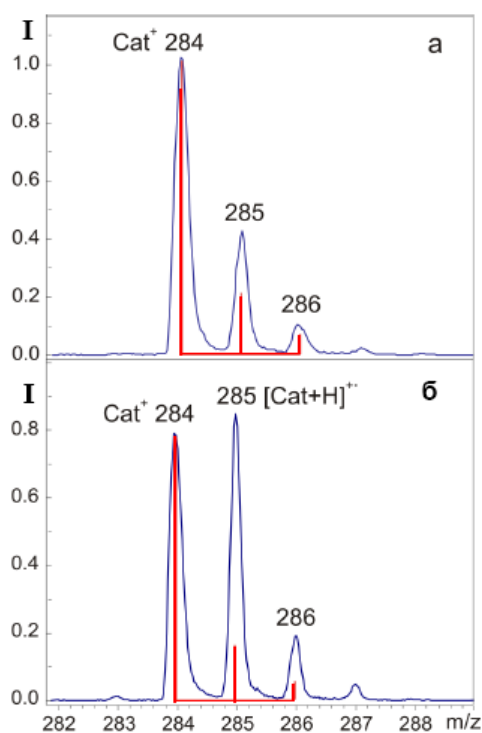
МС также используется в биологических исследованиях для окрашивания биологических материалов [21], в частности, в гистологии для окрашивания тканей [107, 110].

ПРОЯВЛЕНИЕ РЕДОКС-СВОЙСТВ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО В МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ

МС, представляющий собой органическую соль – полярное нелетучее соединение – был практически недоступен для исследования первыми масс-спектрометрическими методиками, требовавшими перевода вещества в газовую фазу. И только с появлением мягкоионизационных и десорбционных масс-спектрометрических методик [215, 216], таких как бомбардировка быстрыми атомами (ББА), матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (МАЛДИ), ионизация электрораспылением (ИЭР), создававшихся для анализа именно таких термолабильных соединений, стало возможным масс-спектрометрическое исследование МС [217-224].

Масс-спектр МС с ионизацией электронным ударом (энергия электронов 75 эВ), приводимый в базе данных [23], полученный при температуре испарения образца 200°C, соответствует, скорее всего, продукту термического превращения МС.

Десорбционные масс-спектры индивидуального катиона МС⁺, обозначаемого далее как Cat⁺, представляют собой пакет пиков с интенсивностями, соответствующими изотопному распределению C₁₆H₁₈N₃S – Cat⁺ : (Cat⁺ + 1) : (Cat⁺ + 2) соотносятся как 100 : 21 : 7 [12, 122] (рис. 4,а).



Однако еще в ранних работах, посвященных исследованию редокс-процессов в десорбционных масс-спектрометрических экспериментах [217-221], было обнаружено, что при определенных условиях в масс-спектрах МС, равно как и ряда других редокс-активных красителей, наблюдалось существенное отклонение экспериментально зарегистрированного соотношения пиков в группе

Рис. 4. Типичный вид группы пиков катиона МС⁺ в масс-спектрах, полученных в режиме лазерной десорбции/ионизации в различных условиях: а) МС в составе нанокompозита УНТ-МС при адсорбции МС⁺ на поверхности УНТ в мономерной форме; б) кристаллический МС на металлической поверхности. Вертикальные линии обозначают соотношение пиков, соответствующее рассчитанному изотопному распределению индивидуального катиона Cat⁺:(Cat⁺+1):(Cat⁺+2) = 100:21:7. Доля интенсивности пика при m/z 285, превышающая изотопный вклад, соответствует продукту одноэлектронного восстановления [Cat + H]^{•+}. (Воспроизведено с разрешения [12]: Copyright (2012) American Chemical Society.)

пиков катиона от теоретически рассчитанного [12, 225]. А именно, относительная интенсивность пиков на массах (Cat + 1) и (Cat + 2) значительно превышала вклад соответствующих изотопомеров (рис. 4,б). Этот эффект был объяснен протеканием реакций восстановления с образованием соответствующих продуктов восстановления МС⁺, инициаторами которых являлись ионизирующие агенты, используемые в десорбционных методиках: ускоренные атомы или ионы, лазерное облучение. Эффекту восстановления редокс-активных соединений в условиях различных масс-спектрометрических методик было посвящено достаточно большое количество исследований, обзор которых приводится в наших работах [12, 122, 225-227].

Установление факта восстановления МС в условиях масс-спектрометрического эксперимента имеет свои особенности, поскольку в масс-спектрах регистрируются только заряженные частицы. Так, нейтральный продукт двухэлектронного восстановления МС $(\text{Cat} + \text{H})^0$, образующийся в реакциях (2), (2'), может быть зарегистрирован в протонированной форме (6):



(в квадратных скобках указываются ионы, регистрируемые в масс-спектрах).

Для выделения вклада заряженного полувосстановленного продукта - ион-радикала $(\text{Cat} + \text{H})^{+\bullet}$, образующегося в реакциях (1), (1') - из интенсивности пика на массе $(\text{Cat} + 1)$ необходимо вычесть изотопный вклад (определяемый в основном ^{13}C) (рис. 4,б). Аналогично, вклад продукта $[\text{Cat} + 2\text{H}]^+$ определяется вычитанием изотопного вклада из интенсивности пика на массе $(\text{Cat} + 2)$.

Эффективность реакции восстановления зависит не только от вида ионизирующего агента, но и от свойств веществ, используемых в качестве вспомогательных матриц в десорбционных методиках. Так, в методе БА наибольшая эффективность восстановления наблюдалась при использовании в качестве жидкой матрицы глицерина. При использовании нитробензилового спирта (НОВА), проявляющего свойства ловушки электронов (electron scavenger), восстановление МС практически полностью подавлялось [217]. В условиях лазерной десорбции/ионизации (ЛДИ) интенсивность восстановления MC^+ зависит от состояния или формы адсорбции красителя на поверхности подложки, изготовленной из различных материалов [12, 223, 227-229]. Высокая эффективность восстановления наблюдается при ЛДИ кристаллических образцов МС на металлической подложке (рис. 4,б).

Эффект восстановления МС в условиях масс-спектрометрического эксперимента был использован нами при изучении поведения МС в бионаносистемах и взаимодействия МС с наноматериалами. Так, ЛДИ масс-спектрометрия была использована для установления формы адсорбции MC^+ на углеродных нанотрубках в составе нанокompозита УНТ-МС, полученного ультразвуковым методом [12]. Было обнаружено, что изотопное распределение в пакете MC^+ в ЛДИ масс-спектрах сухих образцов УНТ-МС соответствует распределению индивидуального катиона и вклад продуктов восстановления в нем практически отсутствует (рис. 4,а). В соответствии с описанными выше особенностями реакций восстановления МС, в частности, необходимости наличия как минимум димера MC^+ для его восстановления в редокс-неактивной среде, был сделан вывод о мономерной форме адсорбции катиона MC^+ на нанотрубках. Этот вывод был далее подтвержден компьютерным моделированием методом молекулярной динамики и квантово-химическими расчетами.

Обсуждавшиеся выше литературные данные о модуляции фотоактивности МС в зависимости от мономерной или димерной формы его адсорбции на отрицательно заряженных слоях анионного ПАВ SDS [119, 120], моделирующих мембраны митохондрий в процессе фотодинамической терапии [118], послужили основой для наших масс-спектрометрических исследований подобных модельных систем [122]. Было обнаружено, что при малых концентрациях МС в системе, соответствующих его мономерной форме, в масс-спектрах практически отсутствовали продукты восстановления МС (рис. 5). При больших концентрациях МС, обеспечивающих его димеризацию и агрегацию, в масс-спектрах наблюдались интенсивные продукты восстановления. Таким образом, прослеживалась корреляция между результатами масс-спектрометрического исследования и данными, полученными другими методами.

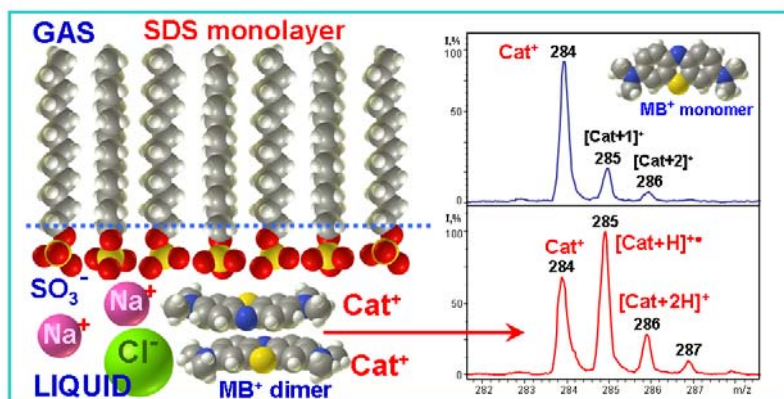


Рис. 5. Схематическое изображение монослоя ПАВ SDS на поверхности раздела жидкость-газ с адсорбированными катионами MC^+ (слева) и масс-спектры (справа), характерные для мономерной (верхний спектр) и димерной (нижний спектр) форм катиона (Cat^+) МС. (Графическая аннотация, адаптированная из работы [122]).

Серия работ сотрудников Института химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины посвящена масс-спектрометрическому исследованию адсорбции MC^+ на поверхности различных наноматериалов – пористого кремния [223, 228], мезопористых пленок оксидов титана и кремния [96, 224, 229], модифицированного кремния, термо-расширенного графита [230-233]. Изучена фотостабильность и эффективность фото-деградации MC^+ в зависимости от свойств адсорбирующей поверхности [96], а также фотокаталитические процессы на поверхности TiO_2 [234].

С использованием метода ИЭР исследовалась гидратация МС [20] и электрополимеризация МС [235].

Различные масс-спектрометрические методики в сочетании с хроматографическими используются для решения традиционных аналитических задач по определению наличия и содержания МС, его метаболитов и продуктов трансформации в различных средах [63, 236-238].

Таким образом, масс-спектрометрические методики являются эффективным и информативным средством изучения поведения редокс-активного красителя МС в наносистемах, что имеет прикладное практическое значение для нанотехнологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ литературных источников последних лет восполняет пробел в обобщении результатов исследований перспективных применений красителя МС в нанотехнологии, а также изучения систем и наноматериалов, содержащих МС, с использованием экспериментальных масс-спектрометрических методик.

Показано, что полезные применения МС в нанотехнологии основываются на связи его агрегационных (переход мономер-димер) и редокс-свойств.

Редокс-свойства МС, а именно его способность переносить электроны в молекулярных системах, используются при конструировании различных наноустройств, в частности, биосенсоров. Новые интересные применения МС в электрохимических наносенсорах с ДНК основаны на переносе электрона на разные расстояния от электрода.

В фармакологии продолжается поиск новых применений МС для лечения малярии, онкологических заболеваний (фотодинамическая терапия), нейродегенеративных болезней Альцгеймера и Паркинсона.

Одним из практически важных результатов биофизических исследований молекулярных механизмов биологического действия МС является установление того факта,

что механизмы фотодинамической терапии различаются для мономерной и димерной форм МС.

Современные методики десорбционной масс-спектрометрии эффективны в исследовании редокс-свойств МС в его композитах с наноматериалами.

Таким образом, продолжение фундаментальных биофизических исследований свойств красителя МС и его взаимодействий как с биомолекулами, так и с неорганическими наноматериалами, является актуальным в связи с активным поиском его новых практических применений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clifton J.II. Methylene blue / J.II Clifton, J.B. Leikin // *Am. J. Therapeut.* – 2003. – V. 10, № 4. – P. 289–291.
2. Lest we forget you - methylene blue... / R.H. Schirmer, H. Adler, M. Pickhardt, E. Mandelkow // *Neurobiol. Aging.* – 2011. – V. 32, №12. – P. 2325.e7–2325.e16.
3. Scheindlin S. Something old... something blue / S. Scheindlin // *Mol. Interv.* – 2008. – V. 8, № 6. – P. 268–273.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – М. : Медицина, 1988. – Т. 2. – 576 с. / *Mashkovskij M.D. Lekarstvennye sredstva / M.D. Mashkovskij.* – М. : Medicina, 1988. – Т. 2. – 576 s.
5. Гороновский И.Т. Краткий справочник по химии / И.Т. Гороновский, Ю.П. Назаренко, Е.Ф. Некряч. – К. : Наук. думка, 1987. – 830 с. / *Goronovskij I.T. Kratkij spravochnik po himii / I.T. Goronovskij, Ju.P. Nazarenko, E.F. Nekrjach.* – К. : Nauk. dumka, 1987. – 830 s.
6. Ohlow M.J. Foundation review: Phenothiazine: the seven lives of pharmacology's first lead structure / M.J. Ohlow, B. Moosmann // *Drug Discovery Today.* – 2011. – V. 16, № 3–4. – P. 119–131.
7. Wainwright M. The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs / M. Wainwright, L. Amaral // *Trop. Med. Int. Health.* – 2005. – V. 10, № 6. – P. 501–511.
8. Метиленовый синий. Материал из Википедии — свободной энциклопедии [Electronic resource] - Mode of access: https://ru.wikipedia.org/wiki/Метиленовый_синий. Last access: 2015. – Title from the screen. / *Metilenovyj sinij. Material iz Vikipedii — svobodnoj jenciklopedii* [Electronic resource] - Mode of access: https://ru.wikipedia.org/wiki/Метиленовый_синий. Last access: 2015. – Title from the screen.
9. Methylene blue. From Wikipedia, the free encyclopedia [Electronic resource] - Mode of access: http://en.wikipedia.org/wiki/Methylene_blue. Last access: 2015. – Title from the screen.
10. Marr H.E. The crystal structure of methylene blue pentahydrate / H.E. Marr, J.M. Stewart, M.F. Chiu // *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* – 1973. – V. B29, № 4. – P. 847–853.
11. 3,7-Bis(dimethylamino)phenothiazin-5-ium nitrate dihydrate / K.J. Kavitha, M.M. Raj, K. Panchanatheswaran, D.E. Lynch // *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online.* – 2004. – V. E60, № 8. – P. o1367–o1369.
12. Noncovalent interaction of methylene blue with carbon nanotubes: theoretical and mass spectrometry characterization / V.V. Chagovets, M.V. Kosevich, S.G. Stepanian [et al.] // *J. Phys. Chem. C.* – 2012. – V. 116, № 38. – P. 20579–20590.
13. Babiacyk W.I. Hydration structure of the quaternary ammonium cations / W.I. Babiacyk, S. Bonella, L.G. Ciccotti // *J. Phys. Chem. B.* – 2010. – V. 114, № 46. – P. 15018–15028.
14. Small hydrophobic organic ions in aqueous solutions / W. Kunz, P. Calmettes, T. Cartailier, P. Turq // *J. Chem. Phys.* – 1993. – V. 99, № 3. – P. 2074–2078.
15. Van der Post S.T. Water dynamics in aqueous solutions of tetra-n-alkylammonium salts: hydrophobic and coulomb interactions disentangled / S.T. Van der Post, S. Scheidelaar, H.J. Bakker // *J. Phys. Chem. B.* – 2013. – V. 117, № 48. – P. 15101–15110.
16. Yamakata A. Destruction of the water layer on a hydrophobic surface induced by the forced approach of hydrophilic and hydrophobic cations / A. Yamakata, M. Osawa // *J. Phys. Chem. Lett.* – 2010. – V. 1, № 9. – P. 1487–1491.
17. Noncovalent complexes of tetramethylammonium with chlorine anion and 2,5-dihydroxybenzoic acid as models of the interaction of quaternary ammonium biologically active compounds with their molecular targets. A theoretical study / V. Pashynska, M. Kosevich, S. Stepanian, L. Adamowicz // *J. Mol. Struct.: THEOCHEM.* – 2007. – V. 815, № 1–3. – P. 55–62.
18. Lévy B. Theoretical study of methylene blue: a new method to determine partial atomic charges; investigation of the interaction with guanine / B. Lévy, M. Enescu // *J. Mol. Struct.: THEOCHEM.* – 1998. – V. 432, № 3. – P. 235–245.
19. Quintao A.D. Theoretical study of the hydrogen bond interaction between methylene blue and water and possible role on energy transfer for photodynamics / A.D. Quintao, K. Coutinho, S. Canuto // *Int. J. Quantum Chem.* – 2002. – V. 90, № 2. – P. 634–640.

20. Microhydration of the methylene blue cation in an electrospray ion source / T. Sato, T. Majima, K. Hashimoto [et al.] // *Europ. Phys. J. D.* – 2011. – V. 63, № 2. – P. 189-194.
21. Козлов А.В. От D. Romanowski к Д.Л. Романовскому. Дорога длиной в 121 год / А. В. Козлов, Н. М. Хмельницкая, Г. Д. Большакова // *TERRA MEDICA. Лабораторная диагностика.* – 2011. – № 2 (25) – С. 21–28. / Kozlov A.V. Ot D. Romanowski k D.L. Romanovskomu. Doroga dlinoj v 121 god / A. V. Kozlov, N. M. Hmel'nickaja, G. D. Bol'shakova // *TERRA MEDICA. Laboratornaja diagnostika.* – 2011. – № 2 (25) – S. 21–28.
22. Methylene blue. NIST Chemistry WebBook. [Electronic resource] // National Institute of Standards and Technology's web site - Mode of access: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=61-73-4&Units=SI&cIR=on&cMS=on&cUV=on&cIE=on&cIC=on&cES=on>. – Last access: 2015. – Title from the screen.
23. Methylene blue. SDBS Search Results (CNMR, HNMR, MS). [Electronic resource] // Spectral Database for Organic Compounds, SDBS web site - Mode of access: http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_frame_disp.cgi?sdbno=2609 – Last access: 2015. – Title from the screen.
24. Optical absorption of methylene blue. [Electronic resource] // Oregon Medical Lazer Center, OMLC web site - Mode of access: <http://omlc.org/spectra/mb/>. – Last access: 2015. – Title from the screen.
25. Cenens J. Visible spectroscopy of methylene blue on hectorite, laponite B, and barasym in aqueous suspension / J. Cenens, R.A. Schoonheydt // *Clays. Clay Miner.* – 1988. – V. 36, № 3. – P. 214–224.
26. Kinetics and mechanism of a fast leuco-Methylene Blue oxidation by copper(II)-halide species in acidic aqueous media / O. Impert, A. Katafias, P. Kita, [et al.] // *Dalton Trans.* – 2003, – № 3. – P. 348-353.
27. de Tacconi N.R. Reversibility of photoelectrochromism at the TiO₂/Methylene Blue interface / N.R. de Tacconi, J. Carmona, K. Rajeshwar // *J. Electrochem. Soc.* – 1994. – V. 144, № 7. – P. 2486–2490.
28. UV-Vis spectroscopic and chemometric study on the aggregation of ionic dyes in water / L. Antonov, G. Gergov, V. Petrov [et al.] // *Talanta.* – 1999. – V. 49, № 1. – P. 99–106.
29. Барановский С.Ф. Агрегация 1,3,7-триметилксантина с метиленовым голубым в водном растворе / С.Ф. Барановский, П.А. Болотин, М.П. Евстигнеев // *Журн. прикл. спектроскопии.* – 2006. – Т. 73, № 2. – С. 158–163. / Baranovskij S.F. Agregacija 1,3,7-trimetilksantina s metilenovym golubym v vodnom rastvore / S.F. Baranovskij, P.A. Bolotin, M.P. Evstigneev // *Zhurn. prikl. spektroskopii.* – 2006. – Т. 73, № 2. – S. 158–163.
30. Dimeric and other forms of methylene blue: absorption and fluorescence of the pure monomer / G.N. Lewis, O. Goldschmid, T.T. Magel, J. Bigeleisen // *J. Am. Chem. Soc.* – 1943. – V. 65, № 6. – P. 1150–1154.
31. Bergmann K. A spectroscopic study of methylene blue monomer, dimer, and complexes with montmorillonite / K. Bergmann, C.T. O'Konski // *J. Phys. Chem.* – 1963. – V. 67, № 10. – P. 2169–2177.
32. Spencer W. Kinetic study of the monomer-dimer equilibrium of methylene blue in aqueous solution / W. Spencer, J.R. Sutter // *J. Phys. Chem.* – 1979. – V. 83, № 12. – P. 1573–1576.
33. Mukerjee P. Ionic strength effects on the activity coefficient of methylene blue and its self-association / P. Mukerjee, A.K. Ghosh // *J. Am. Chem. Soc.* – 1970. – V. 92, № 22. – P. 6413-6415.
34. Mukerjee P. Thermodynamic aspects of the self-association and hydrophobic bonding of methylene blue. Model system for stacking interactions / P. Mukerjee, A.K. Ghosh // *J. Am. Chem. Soc.* – 1970. – V. 92, № 22. – P. 6419–6424.
35. Thermodynamic study of the dimerization equilibrium of methylene blue, methylene green and thiazole orange at various surfactant concentrations and different ionic strengths and in mixed solvents by spectral titration and chemometric analysis / O. Yazdani, M. Irandoust, J.B. Ghasemi, Sh. Hooshman // *J. Appl. Spectr.* – 2007. – V. 74, № 4. – P. 598-601.
36. Tafulo P.A.R. On the “concentration-driven” methylene blue dimerization / P.A.R. Tafulo, R.B. Queiros, G. Gonzalez-Aguilar // *Spectrochim. Acta Part A: Biomol. Spectr.* – 2009. – V. 73, № 2. – P. 295–300.
37. Golz E.K. Modeling methylene blue aggregation in acidic solution to the limits of factor analysis / E.K. Golz, D.A. Vander Griend // *Anal. Chem.* – 2013. – V. 85, № 2. – P. 1240–1246.
38. Patil K. Self-aggregation of Methylene Blue in aqueous medium and aqueous solutions of Bu₄NBr and urea / K. Patil, R. Pawar, P. Talap // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2000. – V. 2, № 19. - P. 4313–4317.
39. Bulakov D.V. Dimerization of molecules of methylene blue in microstructured polymer-micelle solutions / D.V. Bulakov, A.M. Saletskii // *J. Appl. Spectr.* – 2007. – V. 74, № 4. – P. 598-601.
40. Sanan R. Complexation, dimerisation and solubilisation of methylene blue in the presence of biamphiphilic ionic liquids: a detailed spectroscopic and electrochemical study / R. Sanan, T.S. Kang, R. K. Mahajan // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2014. – V. 16, № 12. – P. 5667–5677.
41. Kai W. High pressure-enhanced dimeric aggregation in methylene blue solution / W. Kai, Q. Guangyu, J. Zhangmei, L. Aolei // *Chem. J. Chinese U* – 2014. – V. 35, № 11. – P. 2431–2434.
42. Heger D. Aggregation of methylene blue in frozen aqueous solutions studied by absorption spectroscopy / D. Heger, J. Jirkovsk, P. Kln // *J. Phys. Chem. A.* – 2005. – V. 109, № 30. – P. 6702–6709.

43. Rabinowitch E. Polymerization of dyestuffs in solution. Thionine and methylene blue / E. Rabinowitch, L.F. Epstein // *J. Am. Chem. Soc.* – 1941. – V. 63, № 1. – P. 69–78.
44. Braswell E. Evidence for the trimerisation in aqueous solutions of methylene blue / E. Braswell // *J. Phys. Chem.* – 1968. – V. 72, № 7. – P. 2477–2483.
45. Ghosh A.K. Multiple association equilibria in the self-association of methylene blue and other dyes / A.K. Ghosh, P. Mukerjee // *J. Am. Chem. Soc.* – 1970. – V. 92, № 12. – P. 6408–6412.
46. Polymeric adsorption of methylene blue in TiO₂ colloids — highly sensitive thermochromism and selective photocatalysis / B. Liu, L. Wen, K. Nakata [et al.] // *Chem. Eur. J.* – 2012. – V. 18, № 40. – P. 12705–12711.
47. Preparation, characterization, and photophysical study of thiazine dyes within the nanotubes and nanocavities of silicate host: influence of titanium dioxide nanoparticle on the protonation and aggregation of dyes / K. Senthilkumar, P. Paul, C. Selvaraju, P. Natarajan // *J. Phys. Chem. C.* – 2010. – V. 114, № 15. – P. 7085–7094.
48. Jockusch S. Aggregation of methylene blue adsorbed on starburst dendrimers / Steffen Jockusch, Nicholas J. Turro, Donald A. Tomalia // *Macromolecules.* – 1995. – V. 28, № 22. – P. 7416–7418.
49. Homem-de-Mello P. Cationic dye dimers: a theoretical study / P. Homem-de-Mello, B. Mennucci, J. Tomasi, A. B. F. da Silva // *Theor. Chem. Acc.* – 2007. – V. 118, № 2. – P. 305–314.
50. Davies D. B. ¹H NMR investigation of self-association of aromatic drug molecules in aqueous solution. Structural and thermodynamical analysis / D.B. Davies, L.N. Djimant, A.N. Veselkov // *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* – 1996. – V. 92, № 3. – P. 383–390.
51. Davies D. B. Structure and thermodynamics of the hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution determined by NMR spectroscopy / D.B. Davies, D.A. Veselkov, A.N. Veselkov // *Mol. Phys.* – 1999. – V. 97, № 3. – P. 439–451.
52. Evstigneev M. P. DNA-binding aromatic drug molecules: Physico-chemical interactions and their biological roles / M. P. Evstigneev. – Saarbrücken : LAP LAMBERT Academic Publishing, 2010. – 96 p.
53. Евстигнеев М. П. Межмолекулярные взаимодействия биологически активных ароматических веществ и ДНК в водном растворе: дис... д-ра физ.-мат. наук.: 03.00.02/ Евстигнеев Максим Павлович. – Севастополь, 2006. – 341 с. – Библиогр.: 313-341. / Evstigneev M. P. Mezhmolekuljarnye vzaimodejstvija biologicheski aktivnyh aromaticeskikh veshhestv i DNK v vodnom rastvore: dis... d-ra fiz.-mat. nauk.: 03.00.02/ Evstigneev Maksim Pavlovich. – Sevastopol', 2006. – 341 s. – Bibliogr.: 313-341.
54. Harmann C. Electrochemistry / C. Harmann, A. Hamnett, W. Vielstich. – Weinheim : Wiley, 2007. – 550 p.
55. Hulanicki A. Redox indicators. Characteristics and applications / A. Hulanicki, S. Glab // *Pure Appl. Chem.* – 1978. – V. 50, № 5. – P. 463–498.
56. Химические реактивы и препараты. Справочник. / Ред. В.И. Кузнецова. – М. : ГНТИХЛ, 1953. – 662 с. / Himicheskie reaktivy i preparaty. Spravochnik. / Red. V.I. Kuznecova. – M. : GNTIHL, 1953. – 662 s.
57. The electrochemical behavior of methylene blue at a microcylinder carbon fiber electrode / H.X. Ju, J. Zhou, C.X. Cai H.Y. Chen // *Electroanalysis.* – 1995. – V. 7, № 2. – P. 1165–1170.
58. Ferapontova E.E. Electrochemical indicators for DNA electroanalysis // *Curr. Analyt. Chem.* – 2011. – V. 7, № 1. – P. 51–62.
59. Studies on the radical species in solid methylene blue as revealed from the ESR spectra / M. Okuda, T. Kowata, Y. Usui, M. Koizumi // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1968. – V. 41, № 10. – P. 2274–2280.
60. Engerer S.C. The Blue Bottle Reaction as a general chemistry experiment on reaction mechanisms / S.C. Engerer, A.G. Cook // *J. Chem. Educ.* – 1999. – V. 76, № 11. – P. 1519.
61. What is happening when the blue bottle bleaches: an investigation of the methylene blue-catalyzed air oxidation of glucose / L. Anderson, S. Wittkopp, C. Painter [et al.] // *J. Chem. Educ.* – 2012. – V. 89, № 11. – P. 1425–1431.
62. PubChem. Open Chemistry Database. Leucomethylene blue. [Electronic resource] // U.S. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information's web site - Mode of access: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/164695#section=Top>. Last access: 2015. – Title from the screen.
63. Determination of methylene blue residues in aquatic products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / J. Xu, L. Dai, B. Wu [et al.] // *J. Sep. Sci.* – 2009. – V. 32, № 23-24. – P. 4193–4199.
64. Пат. 2013/0315992 А1 США, МКИ C07D 279/20. Phenothiazine diaminium salts and their use: Пат. 2013/0315992 А1 США, МКИ C07D 279/20 / S.Clunas (GB) et al.; Wista Laboratories Ltd. – № 13/984841; заяв. 15.08.2011; опубл. 28.11.2013; НКИ 424/464. – 67 с. / Pat. 2013/0315992 А1 SShA, МКИ C07D 279/20. Phenothiazine diaminium salts and their use: Pat. 2013/0315992 А1 SShA, МКИ C07D 279/20 / S.Clunas (GB) et al.; Wista Laboratories Ltd. – № 13/984841; zajav. 15.08.2011; opubl. 28.11.2013; NKI 424/464. – 67 s.
65. The PubChem Compound Database. [Electronic resource] // U.S. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information's web site - Mode of access: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound?cmd=Link&LinkName=pccompound_pccompound_mixture&from_uid=164695 Last access: 2015. – Title from the screen.
66. Obata H. Photoreduction of methylene blue by visible light in the aqueous solution containing certain kinds

- of inorganic salts. II. Photobleached product / H. Obata // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1961. – V. 34. – P. 1057–1063.
67. Mills A. Photobleaching of methylene blue sensitised by TiO₂: an ambiguous system / A. Mills, J. Wang // *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry.* – 1999. – V. 127, № 1-3. – P. 123–134.
68. Lee S.-K. Luminescence of Leuco-Thiazine dyes / S.-K. Lee, A. Mills // *J. Fluoresc.* – 2003. – V. 13, № 5. – P. 375–377.
69. Redox systems under nano-space control / Ed. T.Hirao. – Berlin : Springer-Verlag, 2006. – 295 p.
70. Gilardi G. Manipulating redox systems: applications to nanotechnology / G. Gilardi, A. Fantuzzi // *Trends Biotechnol.* – 2001. – V. 19, № 11. – P.468–476.
71. Tuning the unidirectional electron transfer at interfaces with multilayered redox-active supramolecular bionanoassemblies / O. Azzaroni, M. Álvarez, A.I. Abou-Kandil [et al.] // *Adv. Funct. Mater.* – 2008. – V. 18, № 21. – P. 3487–3496.
72. Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques, Volume 44 (Comprehensive Analytical Chemistry) / Ed. L. Gorton. – Amsterdam: Elsevier, 2005. – 635 p.
73. Recent advances in nano-based electrochemical biosensors: application in diagnosis and monitoring of diseases // R.M. Iost, W.C. da Silva, J.M. Madurro [et al.] // *Front. Biosci. (Elite Ed).* – 2011. – V. 3. – P. 663–689.
74. Дзядевич С.В. Наукові та технологічні засади створення мініатюрних електрохімічних біосенсорів / С.В. Дзядевич, О.П. Солдаткін. – 1-е изд. – К. : Наук. думка, 2006. – 256 с. / Dzjadevich S.V. Naukovi ta tehnologichni zasadi stvorennya miniatjurnih elektrohimichnih biosensoriv / S.V. Dzjadevich, O.P. Soldatkin. – 1-е изд. – К. : Nauk. dumka, 2006. – 256 s.
75. Wu X. Biosensor sensitive to hydrogen peroxide via methylene blue incorporated into nafion film as an electron transfer mediator / X. Wu, T. Ying, K. Sun // *J. Shanghai Univ.* – 1998. – V. 2, № 2. – P. 156–163.
76. Electrochemical study of a new methylene blue/silicon oxide nanocomposition mediator and its application for stable biosensor of hydrogen peroxide / H. Yao, N. Li, S. Xu [et al.] // *Biosens. Bioelectron.* – 2005. – V. 21, № 2. – P. 372–377.
77. Yao H. Amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on the co-electrodeposition of horseradish peroxidase and methylene blue on an ITO electrode modified with an anodic aluminum oxide template / H. Yao, H. Liu, M. Sun, L. Gong // *Microchim. Acta.* – 2012. – V. 177, № 1-2. – P. 31–37.
78. Tiwari I. Preparation and characterization of methylene blue-SDS- multiwalled carbon nanotubes nanocomposite for the detection of hydrogen peroxide / I. Tiwari, M. Singh // *Microchim. Acta.* – 2011. – V. 174, № 3–4. – P. 223–230.
79. Li J. Novel magnetic single-walled carbon nanotubes/methylene blue composite amperometric biosensor for DNA determination / J. Li, W. Zhu, H. Wang // *Anal. Lett.* – 2009. – V. 42. – № 2. – P. 366–380.
80. Gu J.Y. DNA sensor for recognition of native yeast DNA sequence with methylene blue as an electrochemical hybridization indicator / J.Y. Gu, X.J. Lu, H.X. Ju // *Electroanalysis.* – 2002. – V. 14, № 13. – P. 949–954.
81. Methylene blue immobilized on cellulose acetate with titanium dioxide: an application as sensor for ascorbic acid / A.A. HoffmannI, S.L.P. Dias, J.R. Rodrigues [et al.] // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2008. – V. 19, № 5. – P. 943–949.
82. NADH oxidation using modified electrodes based on lactate and glucose dehydrogenase entrapped between an electrocatalyst film and redox catalyst-modified polymers / E. Al-Jawadi, S. Pöller, R. Haddad, W. Schuhmann // *Microchim. Acta.* – 2012. – V. 177, № 3-4. – P. 405–410.
83. A rapid and selective method for monitoring the growth of coliforms in milk using the combination of amperometric sensor and reducing of methylene blue / Y.G. Lee, H.Y. Wu, C.L. Hsu [et al.] // *Sens. Actuators, B: Chemical.* – 2009. – V. 141, № 2. – P. 575–580.
84. Korshoj L.E. Methylene Blue-mediated electrocatalytic detection of hexavalent chromium / L.E. Korshoj, A.J. Zaitouna, R.Y. Lai // *Anal. Chem.* – 2015. – V. 87, № 5. – P. 2560–2564.
85. Evtugyn G.A. Amperometric DNA-peroxidase sensor for the detection of pharmaceutical preparations / G.A. Evtugyn, O.E. Goldfarb, H.C. Budnikov [et al.] // *Sensors.* – 2005. – V. 5, № 6. – P. 364–376.
86. Евтюгин Г.А. Электрохимические ДНК-сенсоры для определения биологически активных низкомолекулярных соединений / Г.А. Евтюгин, Г.К. Будников, А.В. Порфирьева // *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева).* – 2008, – Т. LII, № 2. – С. 66–79. / Evtjugin G.A. Jelektrohimicheskie DNK-sensory dlja opredelenija biologicheski aktivnyh nizkomolekuljarnyh soedinenij / G.A. Evtjugin, G.K. Budnikov, A.V. Porfir'eva // *Ros. him. zh. (Zh. Ros. him. ob-va im. D.I. Mendeleeva).* – 2008, – Т. LII, № 2. – С. 66–79.
87. Colorimetric detection of catalytic reactivity of nanoparticles in complex matrices / C. Corredor, M.D. Borysiak, J. Wolfer [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* – 2015. – V. 49, № 6. – P. 3611–3618.
88. Development of highly selective interdigitated electrode sensor for detection of methylene blue / S. Zougar,

- A. Sbartai, N. Jaffrezic-Renault, R. Kherrat / *Sensor Lett.* – 2015. – V. 13, № 5. – P. 349–356.
89. Jana A.K. Solar cells based on dyes / A.K.Jana // *J. Photochem. Photobiol. A.* – 2000. – V. 132, № 1–2. – P. 1–17.
90. Gangotri K.M. Use of mixed dyes in photogalvanic cell for solar energy conversion and storage: EDTA–Methylene blue and Azur–B system / K.M. Gangotri, C. Lal // *Energy Sources.* – 2001. – V. 23, № 3. – P. 267–273.
91. Biologically inspired pteridine redox centers for rechargeable batteries / J. Hong, M. Lee, B. Lee [et al.] // *Nature Commun.* – 2014. – V. 5. – Art. N. 5335 (9 p.).
92. Дзядевич С.В. Амперометрические биосенсоры. Основные принципы работы и особенности датчиков разных генераций / С.В. Дзядевич // *Bioplym. Cell.* – 2002. – Т. 18, № 1. – С. 13–25. / Dzjadevich S.V. Amperometricheskie biosensory. Osnovnye principy raboty i osobennosti datchikov raznyh generacij / S.V. Dzjadevich // *Bioplym. Cell.* – 2002. – Т. 18, № 1. – С. 13–25.
93. Дзядевич С.В. Амперометрические биосенсоры. Современные технологии и коммерческие варианты анализаторов / С.В. Дзядевич // *Bioplym. Cell.* – 2002. – Т. 18, № 5. – С. 363–376. / Dzjadevich S.V. Amperometricheskie biosensory. Sovremennyye tehnologii i kommercheskie varianty analizatorov / S.V. Dzjadevich // *Bioplym. Cell.* – 2002. – Т. 18, № 5. – С. 363–376.
94. An amperometric biosensor based on the coimmobilization of horseradish peroxidase and methylene blue on a carbon nanotubes modified electrode / J.Z. Xu, J.J. Zhu, Q. Wu [et al.] // *Electroanalysis.* – 2003. – V. 15, № 3. – P. 219–224.
95. Adsorption of methylene blue dye onto carbon nanotubes: a route to an electrochemically functional nanostructure and its layer-by-layer assembled nanocomposite / Y. Yan, M. Zhang, K. Gong [et al.] // *Chem. Mater.* – 2005. – V. 17, № 13. – P. 3457–3463.
96. The effect of nanosized titania-silica film composition on the photostability of adsorbed methylene blue dye / N.I. Surovtseva, A.M. Eremanov, N.P. Smirnova [et al.] // *Theor. Exp. Chem.* – 2007. – V. 43. – P. 235–240.
97. Photosensitizer methylene blue-semiconductor nanocrystals hybrid system for photodynamic therapy / A. Rakovich, T. Rakovich, V. Kelly [et al.] // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2010. – V. 10, № 4. – P. 2656–2662.
98. Electrochemical property of methylene blue redox dye immobilized on porous silica-zirconia-antimonia mixed oxide / G. Zaitseva, Y. Gushikem, E.S. Ribeiro, S.S. Rosatto // *Electrochim. Acta.* – 2002. – V. 47, № 9. – P. 1469–1474.
99. Electrochemically functional graphene nanostructure and layer-by-layer nanocomposite incorporating adsorption of electroactive methylene blue / D. Zhang, L. Liao, B. Dai [et al.] // *Electrochim. Acta.* – 2012. – V. 75. – P. 71–79.
100. Electron interaction among the noncovalently engineered graphene-methylene blue nanocomposites / Z. Li, X.J. Shi, X.P. Ge [et al.] // *Chem. Res. Chin. Univ.* – 2012. – V. 28, № 3. – P. 520–523.
101. The route to functional graphene oxide / K. Haubner, J. Murawski, Ph. Olk, L. M. Eng [et al.] // *ChemPhysChem.* – 2010. – V. 11, № 10. – P. 2131–2139.
102. Complexation of C60 fullerene with aromatic drugs / M.P. Evstigneev, A.S. Buchelnikov, D.P. Voronin [et al.] // *ChemPhysChem.* – 2013. – V. 14, № 3. – P. 568–578.
103. Механизм комплексообразования фенотиазинового красителя метиленового голубого с фуллереном C60 / А.С. Бучельников, В.В. Костюков, М.П. Евстигнеев, Ю.И. Прилуцкий // *Физ. химия.* – 2013. – Т. 87, № 4. – С. 672–678. / *Mehanizm kompleksoobrazovaniya fenotiazinovogo krasitelja metilenovogo golubogo s fulleronom C60 / A.S. Buchel'nikov, V.V. Kostjukov, M.P. Evstigneev, Ju.I. Priluckij // Fiz. himija.* – 2013. – Т. 87, № 4. – С. 672–678.
104. Adsorption of methylene blue on colloidal silver - a surface-enhanced raman spectroscopy study combined with density functional theory calculations / L. Zhong, Y.J. Hu, D. Xing, H.M. Gu // *Spectroscopy and Spectral Analysis [in Chinese].* – 2010. – V. 30, № 1. – P. 90–94.
105. Nicolai S.H.A. Surface-enhanced resonance raman (serr) spectra of methylene blue adsorbed on a silver electrode / S.H.A. Nicolai, J.C. Rubim // *Brazil Langmuir.* – 2003. – V. 19, № 10. – P. 429–4294.
106. Shahryari Z. Experimental study of methylene blue adsorption from aqueous solutions onto carbon nanotubes / Z. Shahryari, A.S. Goharrizi, M. Azadi // *Int. J. Water Resour. Environ. Eng.* – 2010. – V. 2. – P. 016–028.
107. Fluorescent nanoprobe dedicated to *in vivo* imaging: from preclinical validations to clinical translation / J.Mérian, J.Gravier, F.Navarro, I.Texier // *Molecules.* – 2012. – V. 17, № 5. – P. 5564–5591.
108. Methylene Blue- and thiol-based oxygen depletion for super-resolution imaging / P. Schäfer, S. van de Linde, J. Lehmann [et al.] // *Anal. Chem.* – 2013. – V. 85, № 6. – P. 3393–3400.
109. The Nobel Prize in Chemistry 2014 [Electronic resource]: The Official Web Site of the Nobel Prize - Mode of access: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/. Last access: 2015. – Title from the screen.
110. Integrating histology and imaging mass spectrometry / P. Chaurand, S.A. Schwartz, D. Billheimer [et al.] //

Anal. Chem. – 2004. – V. 76, № 4. – P. 1145–1155.

111. Wain A.J. Scanning electrochemical microscopy imaging of DNA microarrays using methylene blue as a redox-active intercalator / A.J. Wain, F. Zhou // *Langmuir*. – 2008. – V. 24, № 9. – P. 5155–5160.

112. Usacheva M.N. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria / M.N. Usacheva, M.C. Teichert, M.A. Biel // *J. Photochem. Photobiol. B*. – 2003. – V. 71, № 1-3. – P. 87–98.

113. Usacheva M.N. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms / M.N. Usacheva, M.C. Teichert, M.A. Biel // *Lasers Surg. Med.* – 2001. – V. 29, № 2. – P. 165–173.

114. Photoacoustic lifetime contrast between methylene blue monomers and self-quenched dimers as a model for dual-labeled activatable probes / E. Morgounova, Q. Shao, B.J. Hackel [et al.] // *J. Biomed. Opt.* – 2013. – V. 18, № 5. – P. 056004-1–056004-8.

115. Hachisako H. Extraordinary monomer-dimer transition of methylene blue induced by the phase transition of telomer-bilayer membranes formed from dialkyl L-glutamate amphiphiles with oligo-acrylic acid-head group / H. Hachisako, Y. Motozato, R. Murakami, K. Yamada // *Chem. Lett.* – 1992. – V. 21, № 2. – P. 219–222.

116. Effect of the molecular methylene blue aggregation on the mesoscopic domain morphology in mixed monolayers with dimyristoyl-phosphatidic acid / J.J. Giner-Casares, G. de Miguel, M. Pérez-Morales [et al.] // *J. Phys. Chem. C*. – 2009. – V. 113, № 14. – P. 5711–5720.

117. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications / J.P. Tardivo, A. Del Giglio, C.S. de Oliveira [et al.] // *Photodiagn. Photodyn. Ther.* – 2005. – V. 2, № 3. – P. 175–191.

118. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions / D. Gabrielli, E. Belisle, D. Severino [et al.] // *Photochem. Photobiol.* – 2004. – V. 79, № 3. – P. 227–232.

119. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces / H.C. Junqueira, D. Severino, L.G. Dias [et al.] // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2002. – V. 4, № 11. – P. 2320–2328.

120. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue / D. Severino, H.C. Junqueira, M. Gugliotti [et al.] // *Photochem. Photobiol.* – 2003. – V. 77, № 5. – P. 459–468.

121. Interactions between methylene blue and sodium dodecyl sulfate in aqueous solution studied by molecular spectroscopy / M.K. Carroll, M.A. Unger, A.M. Leach [et al.] // *Appl. Spectrosc.* – 1999. – V. 53, № 7. – P. 780–784.

122. Monomer/dimer dependent modulation of reduction of the cationic dye methylene blue in negatively charged nanolayers as revealed by mass spectrometry / V.S. Shelkovsky, M.V. Kosevich, O.A. Boryak [et al.] // *RSC Advances*. – 2014. – V. 4, № 104. – P. 60260–60269.

123. Nanoparticle platform to modulate reaction mechanism of phenothiazine photosensitizers / D.B. Tada, L.M. Rossi, C.A.P. Leite [et al.] // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2010. – V. 10, № 5. – P. 3100–3108.

124. Tada D.B. Photosensitizing nanoparticles and the modulation of ROS generation / D.B. Tada, M.S. Baptesta // *Front. Chem.* – 2015. – V. 3, № 33. – P. 1–14.

125. Methylene blue binding to DNA with alternating GC base sequence: a modeling study / R. Rohs, H. Sklenar, R. Lavery, B. Röder // *J. Am. Chem. Soc.* – 2000. – V. 122, № 12. – P. 2860–2866.

126. Rohs R. Methylene blue binding to DNA with alternating GC base sequence: continuum treatment of salt effects / R. Rohs, H. Sklenar // *Indian J. Biochem. Biophys.* – 2001. – V. 38, № 1-2. – P. 1–6.

127. Rohs R. Methylene blue binding to DNA with alternating AT base sequence: minor groove binding is favored over intercalation / R. Rohs, H. Sklenar // *J. Biomol. Str. Dyn.* – 2004. – V. 21, № 5. – P. 699–711.

128. Molecular flexibility in ab initio drug docking to DNA: binding-site and binding-mode transitions in all-atom Monte Carlo simulations / R. Rohs, I. Bloch, H. Sklenar, Z. Shakked // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – V. 33, № 22. – P. 7048–7057.

129. Nogueira J.J. Molecular dynamics simulations of binding modes between methylene blue and DNA with alternating GC and AT sequences / J.J. Nogueira, L. González // *Biochemistry*. – 2014. – V. 53, № 14. – P. 2391–2412.

130. Tuite E. Sequence-specific interaction of Methylene Blue with polynucleotides and DNA: a spectroscopic study / E. Tuite, B. Norden // *J. Am. Chem. Soc.* – 1994. – V. 116, № 17. – P. 7548–7556.

131. Fluorescence and photobleaching studies of methylene blue binding to DNA / B.S. Fujimoto, J.B. Clendenning, J.J. Delrow [et al.] // *J. Phys. Chem.* – 1994. – V. 98, № 26. – P. 6633–6643.

132. Elucidation of the mechanism of single-stranded DNA interaction with methylene blue: A spectroscopic approach / M. Ortiz, A. Frago, P.J. Ortiz, C.K. O'Sullivan // *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*. – 2011. – V. 218, № 1. – P. 26–32.

133. Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue / S. Nafisi, A.A. Saboury, N. Keramat [et al.] // *J. Mol. Struct.* – 2007. – V. 827, № 1–3. – P. 35–43.

134. Hossain M. DNA intercalation by quinacrine and methylene blue: a comparative binding and thermodynamic characterization study / M. Hossain, P. Giri, G.S. Kumar // *DNA Cell Biol.* – 2008. – V. 27, № 2. – P. 81–90.
135. Tong C. Interaction between methylene blue and calf thymus deoxyribonucleic acid by spectroscopic technologies / C. Tong, Z. Hu, J. Wu // *J. Fluoresc.* – 2010. – V. 20, № 1. – P. 261–267.
136. Hu Z. Synchronous fluorescence determination of DNA based on the interaction between methylene blue and DNA / Z. Hu, C. Tong // *Anal. Chim. Acta.* – 2007. – V. 587, № 2. – P. 187–193.
137. Methylene blue photosensitized strand cleavage of DNA: effects of dye binding and oxygen / C. Oh, Uigin, D.J. McConnell, J.M. Kelly, W.J. van der Putten // *Nucleic Acids Res.* – 1987. – V. 15, № 18. – P. 7411–7427.
138. Tuite E.M. New trends in photobiology: Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates / E.M. Tuite, J.M. Kelly // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* – 1993. – V. 21, № 2-3. – P. 103–124.
139. Спектрофотометрический анализ связывания ароматических биологически активных соединений с ДНК / Чернышев Д.Н., Бучельников А.С., Мухина Ю.В., Барановский С.Ф. // *Вісник СевНТУ: Серія: Фізика біологічних систем і молекул.* – 2011. – Вип. 113. – С. 57–66. / *Spektrofotometričeskij analiz svjazyvanija aromaticeskix biologičeski aktivnyh soedinenij s DNK / Chernyshev D.N., Buchel'nikov A.S., Muhina Ju.V., Baranovskij S.F.* // *Visnik SevNTU: Serija: Fizika biologičnih sistem i molekul.* – 2011. – Vip. 113. – S. 57–66.
140. Mechanisms for binding between methylene blue and DNA / P.O. Vardevanyan, A.P. Antonyan, M.A. Parsadanyan [et al.] // *J. Appl. Spectrosc.* – 2013. – V. 80, № 4. – P. 595–599.
141. Механизмы связывания метиленового синего с ДНК / П.О. Вардеванян, А.П. Антонян, М.А. Парсаданян [et al.] // *ЖПС.* – 2013. – Т. 80, № 4. – С. 610–614. / *Mehanizmy svjazyvanija metilenovogo sinego s DNK / P.O. Vardevanjan, A.P. Antonjan, M.A. Parsadanjan [et al.] // ZhPS.* – 2013. – Т. 80, № 4. – С. 610–614.
142. Исследование связывания метиленового синего с ДНК спектроскопическими методами / П.О. Вардеванян, А.П. Антонян, М.А. Шагинян, Л.А. Амбарцумян // *ДНАН РА.* – 2013. – Т. 113, № 2. – С. 180–188. / *Issledovanie svjazyvanija metilenovogo sinego s DNK spektroskopičeskimi metodami / P.O. Vardevanjan, A.P. Antonjan, M.A. Shaginjan, L.A. Ambarcumjan // DNAN RA.* – 2013. – Т. 113, № 2. – S. 180–188.
143. Термодинамический анализ комплексов ДНК с метиленовым синим, бромистым этидием и Hoechst 33258 / П.О. Вардеванян, А.П. Антонян, Л.А. Амбарцумян [et al.] // *Biopolym. Cell.* – 2013. – Т. 29, № 6. – С. 515–520. / *Termodinamicheskij analiz kompleksov DNK s metilenovym sinim, bromistym jetidijem i Hoechst 33258 / P.O. Vardevanjan, A.P. Antonjan, L.A. Ambarcumjan [et al.] // Biopolym. Cell.* – 2013. – Т. 29, № 6. – С. 515–520.
144. Hambardzumyan L.A. Effect of DNA GC-content on interaction with methylene blue / L.A. Hambardzumyan // *Proc. of the Yerevan State Univ. Chemistry and Biology.* – 2015. – № 1. – P. 45–49.
145. Evidence for the direct interaction between methylene blue and guanine bases using DNA-modified carbon paste electrodes / W. Yang, M. Ozsoz, D.B. Hibbert, J.J. Gooding // *Electroanalysis.* – 2002. – V. 14, № 18. – P. 1299–1302.
146. Enescu M. Molecular dynamics simulation of methylene blue - guanine complex in vacuo / M. Enescu, V. Gheorghe // *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* – 1998. – V. 423, № 3. – P. 213–218.
147. Enescu M. Molecular Dynamics Simulation of Methylene Blue–Guanine Complex in Water: The Role of Solvent in Stacking / M. Enescu, B. Levy, V. Gheorghe // *J. Phys. Chem. B.* – 2000. – V. 104, № 5. – P. 1073–1077.
148. Enescu M. Electron transfer modeling in condensed phase by molecular dynamics simulation: Application to methylene blue-guanine complex in water / M. Enescu, J. Ridard, V. Gheorghe, B. Levy // *J. Phys. Chem. B.* – 2002. – V. 106, № 1. – P. 176–184.
149. Electrochemistry of methylene blue bound to a DNA-modified electrode / S.O. Kelley, J.K. Barton, N.M. Jackson, M.G. Hill // *Bioconjug. Chem.* – 1997. – V. 8, № 1. – P. 31–37.
150. Jackson N.M. Electrochemistry at DNA-modified surfaces: new probes for charge transport through the double helix / N.M. Jackson, M.G. Hill // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2001. – V. 5, № 2. – P. 209–215.
151. Boon E.M. Charge transport in DNA / E.M. Boon, J.K. Barton // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2002. – V. 12, № 3. – P. 320–329.
152. Delaney S. Long-range DNA charge transport / S. Delaney, J.K. Barton // *J. Org. Chem.* – 2003. – V. 68, № 17. – P. 6475–6483.
153. Sontz P.A. DNA charge transport for sensing and signaling / P.A. Sontz, N.B. Muren, J.K. Barton // *Acc. Chem. Res.* – 2012. – V. 45, № 10. – P. 1792–1800.
154. Genereux J.C. DNA-mediated charge transport in redox sensing and signaling / J.C. Genereux, A.K. Boal, J.K. Barton // *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. – V. 132, № 3. – P. 891–905.

155. Gorodetsky A.A. DNA-Mediated Electrochemistry / A.A. Gorodetsky, M.C. Buzzeo, J.K. Barton // *Bioconjugate Chem.* – 2008. – V. 19, № 12. – P. 2285–2296.
156. Wohlgamuth C.H. DNA as a molecular wire: distance and sequence dependence / C.H. Wohlgamuth, M.A. McWilliams, J.D. Slinker // *Anal. Chem.* – 2013. – V. 85, № 18. – P. 8634–8640.
157. ДНК-сенсоры с электрохимически активными индикаторами – производными фенотиазина / Е.Е. Стойкова, О.Э. Гольдфарб, С.В. Белякова и др. // *Вестник ТО РЭА.* – 2003. – №3. – С. 51–55. / DNK-sensory s jelektrohimicheski aktivnymi indikatorami – proizvodnymi fenotiazina / E.E. Stojkova, O. Je. Gol'dfarb, S.V. Beljakova i dr. // *Vestnik TO RJeA.* – 2003. – №3. – S. 51–55.
158. Drummond, T.G. Electrochemical DNA sensors / T.G. Drummond, M.G. Hill, J.K. Barton // *Nat. Biotech.* – 2003. – V. 21, № 10. – P. 1192–1199.
159. Odenthal K.J. An introduction to electrochemical DNA biosensors / K.J. Odenthal, J.J. Gooding // *Analyst.* – 2007. – V. 132, № 7. – P. 603–610.
160. Overview of electrochemical DNA biosensors: new approaches to detect the expression of life / S. Cagnin, M. Caraballo, C. Guiducci [et al.] // *Sensors (Basel).* – 2009. – V. 9, № 4. – P. 3122–3148.
161. DNA interactions with a Methylene Blue redox indicator depend on the DNA length and are sequence specific / E. Farjami, L. Clima, K.V. Gothelf, E.E. Ferapontova // *Analyst.* – 2010. – V. 135, № 6. – P. 1443–1448.
162. Comparing the properties of electrochemical-based DNA sensors employing different redox tags / D. Kang, X. Zuo, R. Yang [et al.] // *Anal. Chem.* – 2009. – V. 81, № 21. – P. 9109–9113.
163. García-González R. Methylene blue covalently attached to single stranded DNA as electroactive label for potential bioassays / R. García-González, A. Costa-García, M.T. Fernández-Abedul // *Sens. Actuators B.* – 2014. – V. 191. – P. 784–790.
164. García-González R. Enzymatic amplification-free nucleic acid hybridisation sensing on nanostructured thick-film electrodes by using covalently attached methylene blue / R. Garcia-González, A. Costa-García, M.T. Fernández-Abedul // *Talanta.* – 2015. – V. 142. – P. 11–19.
165. Catrina G. Intraduplex DNA-mediated electrochemistry of covalently tethered redox-active reporters / C.G. Pheaney, J.K. Barton // *J. Am. Chem. Soc.* – 2013. – V. 135, № 40. – P. 14944–14947.
166. Pheaney C.G. DNA electrochemistry with tethered methylene blue / C.G. Pheaney, J.K. Barton // *Langmuir.* – 2012. – V. 28, № 17. – P. 7063–7070.
167. A multiplexed, two-electrode platform for biosensing based on DNA-mediated charge transport / A.L. Furst, M.G. Hill, J.K. Barton // *Langmuir.* – 2015. – V. 31, № 23. – P. 6554–6562.
168. Abi A. Unmediated by DNA electron transfer in redox-labeled DNA duplexes end-tethered to gold electrodes / A. Abi, E.E. Ferapontova // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – V. 134, № 35. – P. 14499–14507.
169. Farjami E. Effect of the DNA end of tethering to electrodes on electron transfer in methylene blue-labeled DNA duplexes / E. Farjami, R. Campos, E.E. Ferapontova // *Langmuir.* – 2012. – V. 28, № 46. – P. 16218–16226.
170. Electrochemical interrogation of interactions between surface-confined DNA and methylene blue / D. Pan, X. Zuo, Y. Wan [et al.] // *Sensors.* – 2007. – V. 7, № 11. – P. 2671–2680.
171. Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA / P. Kara, K. Kerman, D. Ozkan [et al.] // *Electrochem. Commun.* – 2002. – V. 4, № 9. – P. 705–709.
172. DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label / D. Ozkan, P. Kara, K. Kerman [et al.] // *Bioelectrochemistry.* – 2002. – V. 58, № 1. – P. 119–126.
173. Label-free and label based electrochemical detection of hybridization by using methylene blue and peptide nucleic acid probes at chitosan modified carbon paste electrodes / P. Kara, K. Kerman, D. Ozkan // *Electroanalysis.* – 2002. – V. 14, № 24. – P. 1685–1690.
174. Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus / A. Erdem, K. Kerman, M. Meric [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2000. – V. 422, № 2. – P. 139–149.
175. Tani A. Methylene blue as an electrochemical discriminator of single- and double-stranded oligonucleotides immobilized on gold substrates / A. Tani, A.J. Thomson, J.N. Butt // *Analyst.* – 2001. – V. 126, № 10. – P. 1756–1759.
176. The effect of interfacial design on the electrochemical detection of DNA and microRNA using methylene blue at low-density DNA films / R. Tavallaie, N. Darwish, M. Gebala [et al.] // *ChemElectroChem.* – 2014. – V. 1, № 1. – P. 165–171.
177. Supercoiled and linear plasmid DNAs interactions with methylene blue / A. Gniazdowska, A. Palinska-Saadi, E. Krawczyk [et al.] // *Bioelectrochemistry.* – 2013. – V. 92. – P. 32–41.
178. Methylene blue as a G-Quadruplex binding probe for label-free homogeneous electrochemical biosensing / F.T. Zhang, J. Nie, D.W. Zhang [et al.] // *Anal. Chem.* – 2014. – V. 86, № 19. – P. 9489–9495.
179. Amplified electrochemical detection of DNA through the aggregation of Au nanoparticles on electrodes and

- the incorporation of methylene blue into the DNA-crosslinked structure / D. Li, Y. Yan, A. Wiecekowska, I. Willner // *Chem. Commun.* – 2007. – № 34. – P. 3544–3546.
180. Zhang Y. Cyclic voltammetric detection of chemical DNA damage induced by styrene oxide in natural dsDNA layer-by-layer films using methylene blue as electroactive probe / Y. Zhang, N. Hu // *Electrochem. Commun.* – 2007. – V. 9, № 1-9. – P. 35–41.
181. Combining a loop-stem aptamer sequence with methylene blue: a simple assay for thrombin detection by resonance light scattering technique / X. Huang, Y. Li, X. Huang [et al.] // *RSC Adv.* – 2015. – V. 5, № 38. – P. 30268–30274.
182. Electrochemical behaviors of methylene blue on DNA modified electrode and its application to the detection of PCR product from NOS sequence / L. Zhu, R. Zhao, K. Wang [et al.] // *Sensors.* – 2008. – V. 8, № 9. – P. 5649–5660.
183. Electrochemical method for monitoring the progress of polymerase chain reactions using Methylene blue as an indicator / K. Wang, Y.P. Chen, Y. Lei [et al.] // *Microchim. Acta* – 2013. – V. 180, № 9-10. – P. 871–878.
184. Hairpin DNA probe based on electrochemical biosensor using methylene blue as hybridization indicator / Y. Jin, X. Yao, Q. Liu, J. Li // *Biosens. Bioelectron.* – 2007. – V. 22, № 6. – P. 1126–1130.
185. Yang W. Comparison of the stem-loop and linear probe-based electrochemical DNA sensors by alternating current voltammetry and cyclic voltammetry / W. Yang, R.Y. Lai // *Langmuir.* – 2011. – V. 27, № 23. – P. 14669–14677.
186. Adenosine-triggered elimination of methylene blue noncovalently bound to immobilized functional dsDNA-aptamer constructs / D. Yun, C. Banani, G. Bixia, Y. Hua-Zhong // *J. Phys. Chem. B.* – 2012. – V. 116, № 22. – P. 6361–6368.
187. Yu Z. effect of signaling probe conformation on sensor performance of a displacement-based electrochemical DNA sensor / Z. Yu, R.Y. Lai // *Anal. Chem.* – 2013. – V. 85, № 6. – P. 3340–3346.
188. Wu Y. Effects of DNA probe and target flexibility on the performance of a “signal-on” electrochemical DNA sensor / Y. Wu, R.Y. Lai // *Anal. Chem.* – 2014. – V. 86, № 17. – P. 8888–8895.
189. Будников Г.К. Амперометрические ДНК-сенсоры на основе модифицированных графитовых электродов / Г.К. Будников, Г.А. Евтюгин, О.Э. Гольдфарб // *Наукоемкие технологии* – 2004. – Т. 5, № 4. – С. 30–37. / Budnikov G.K. Amperometric DNK-sensory na osnove modifitsirovannykh grafitovykh jelektrodov / G.K. Budnikov, G.A. Evtjugin, O.Je. Gol'dfarb // *Naukoemkie tehnologii* – 2004. – Т. 5, № 4. – С. 30–37.
190. Belluzo M.S. Assembling amperometric biosensors for clinical diagnostics / M.S. Belluzo, M.É. Ribone, C.M. Lagier // *Sensors* – 2008. – V. 8, № 3. – P. 1366–1399.
191. Farjami E. An "off-on" electrochemical hairpin DNA-based genosensor for cancer diagnostics / E. Farjami, L. Clima, K.V. Gothelf // *Anal. Chem.* – 2011. – V. 83, № 5. – P. 1594–1602.
192. Liu Y. An aptasensor for electrochemical detection of tumor necrosis factor in human blood / Y. Liu, Q. Zhoua, A. Revzin // *Analyst.* – 2013. – V. 138, № 15. – P. 4321–4326.
193. Detection of IP-10 protein marker in undiluted blood serum via an electrochemical E-DNA scaffold sensor / A.J. Bonham, N.G. Paden, F. Ricci, K.W. Plaxco // *Analyst.* – 2013. – V. 138, № 19. – P. 5580–5583.
194. Electrochemical biocomputing: a new class of molecular-electronic logic devices / Y. Jia, R. Duan, F. Hong [et al.] // *Soft Matter.* – 2013. – V. 9, № 29. – P. 6571–6577.
195. Biocomputing security system: Concatenated enzyme-based logic gates operating as a biomolecular keypad lock / G. Strack, M. Ornatska, M. Pita, E. Katz // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – V. 130, № 13. – P. 4234–4235.
196. Kristiansen J.E. Dyes, antipsychotic drugs, and antimicrobial activity. Fragments of a development, with special reference to the influence of Paul Ehrlich / J.E. Kristiansen // *Dan. Med. Bull.* – 1989. – V. 36, № 2. – P. 178–185.
197. Kwok E.S. Use of methylene blue in sepsis: a systematic review / E.S. Kwok, D. Howes // *J. Intensive Care Med.* – 2006. – V. 21, № 6. – P. 359–363.
198. WHO Model List of Essential Medicines. 18th list. [Electronic resource] // 18th WHO Model List of Essential Medicines (April 2013). WHO Medicines web site - Mode of access: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/93142/1/EML_18_eng.pdf. Last access: 2015. – Title from the screen.
199. Brookes M.M. Methylene blue as antidote for cyanide and carbon monoxide poisoning / M.M. Brookes // *J. Am. Med. Assoc.* – 1933. – V. 100, № 1. – P. 59.
200. Thayer A.M. Giving new life to an old molecule / A.M. Thayer // *Chem. Eng. News.* – 2011. – V. 89, № 12. – P. 16–17.
201. Ginimuge P.R. Methylene Blue: Revisited / P.R. Ginimuge, S.D. Jyothi // *J. Anaesthesiol., Clin. Pharmacol.* – 2010. – V. 26, № 4. – P. 517–520.
202. Wainwright M. Methylene Blue - a therapeutic dye for all seasons? / M. Wainwright, K.B. Crossley // *J. Chemother.* – 2002. – V. 14, № 5. – P. 431–443.
203. Methylene blue as an antimalarial agent / R.H. Schirmer, B. Coulibaly, A. Stich [et al.] // *Redox Rep.* –

2003. – V. 8, № 5. – P. 272–275.
204. Wainwright M. The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs / M. Wainwright., L. Amaral // *Trop. Med. Int. Health.* – 2005. – V. 10, № 6. – P. 501–511.
205. Wagner S.J. Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes / S.J. Wagner // *Transfus. Med. Rev.* – 2002. – V. 16, № 1. – P. 61–66.
206. Пирузян Л.А. Красители со свойствами модуляторов окислительно-восстановительных процессов как потенциальные иммуностропные средства / Л.А. Пирузян, И.Е. Ковалев, В.Л. Ковалева // *Известия РАН, Серия биологическая.* – 2001. – № 5. – С. 563–572. / Piruzjan L.A. Krasiteli so svojstvami moduljatorov oksislitel'no-vosstanovitel'nyh processov kak potencial'nye immunotropnye sredstva / L.A. Piruzjan, I.E. Kovalev, V.L. Kovaleva // *Izvestija RAN, Serija biologicheskaja.* – 2001. – № 5. – S. 563–572.
207. Piruzian L.A. Dyes with properties of modulators of redox processes as potential immunotropic agents / L.A. Piruzian, I.E. Kovalev, V.L. Kovaleva // *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* – 2001. – V. 28, № 5. – P. 477–485.
208. Structure and pathology of tau protein in alzheimer disease / M. Kolarova, F. Garcia-Sierra, A. Bartos [et al.] // *Int. J. Alzheimer's Dis.* – 2012. – V. 2012. – Article ID 731526, 13 p.
209. Modulation and detection of tau aggregation with small-molecule ligands / E. Chang, N.S. Honson, B. Bandyopadhyay [et al.] // *Curr. Alzheimer Res.* – 2009. – V. 6, № 5. – P. 409–414.
210. Mechanistic basis of phenothiazine-driven inhibition of Tau aggregation / E. Akoury, M. Pickhardt, M. Gajda [et al.] // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2013. – V. 52, № 12. – P. 3511–3515.
211. Aminothienopyridazines and methylene blue affect Tau fibrillization via cysteine oxidation / A. Crowe, M.J. James, V.M.-Y. Lee [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2013. – V. 288, № 16. – P. 11024–11037.
212. Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments / O. Schweers, E.M. Mandelkow, J. Biernat, E. Mandelkow // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – V. 92, № 18. – P. 8463–84677.
213. Rojas J.C. Neurometabolic mechanisms for memory enhancement and neuroprotection of methylene blue / J.C. Rojas, A.K. Bruchey, F. Gonzalez-Lima // *Prog. Neurobiol.* – 2012. – V. 96, № 1. – P. 32–45.
214. Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways / H. Atamna, A. Nguyen, C. Schultz [et al.] // *FASEB J.* – 2008. – V. 22, № 3. – P. 703–712.
215. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии / А.Т. Лебедев. – М.: БИНОМ, 2003.–493 с. / Lebedev A.T. Mass-spektrometrija v organicheskoj himii / A.T. Lebedev. – М.: BINOM, 2003.–493 s.
216. Покровский В.А. Десорбционная масс-спектрометрия и ее применение в химии поверхности: дис.... докт. физ.-мат. наук.: 01.04.01 / Покровский Валерий Александрович. – К., 1990. - 347 с. / Pokrovskij V.A. Desorbcionnaja mass-spektrometrija i ee primenenie v himii poverhnosti: dis.... dokt. fiz.-mat. nauk.: 01.04.01 / Pokrovskij Valerij Aleksandrovich. – К., 1990. - 347 s.
217. Kazakoff C.W. Reduction processes in fast atom bombardment mass spectrometry: Methylene blue in glycerol-thioglycerol and glycerol-nitrobenzyl alcohol matrices / C.W. Kazakoff, R.T.B. Rye // *Org. Mass Spectrom.* – 1991. – V. 26, № 3. – P. 154–156.
218. Burinsky D.J. Reduction of methylene blue during the ionization process / D.J. Burinsky, R.L. Dilliplane, G.C. DiDonato, K.L. Busch // *Org. Mass Spectrom.* – 1988. – V. 23, № 4. – P. 231–235.
219. Pelzer G. Oxidation-reduction processes occurring in secondary ion mass spectrometry and fast atom bombardment of glycerol solutions / G. Pelzer, E. De Pauw, J. Marien // *J. Phys. Chem.* – 1984. – V. 88, № 21. – P. 5065–5068.
220. Gale P.J. Reduction in liquid secondary ion mass spectrometry. Comparison of the fission fragments and liquid secondary ion mass spectra for organic dyestuff / P.J. Gale, B.L. Bentz // *Anal. Chem.* – 1986. - V. 58, № 6. – P. 1070–1076.
221. Reduction of organic dyes in matrix-assisted laser desorption/ionization and desorption/ionization on porous silicon / S. Okuno, M. Nakano, G.E. Matsubayashi [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2004. – V. 18, № 23. – P. 2811–2817.
222. Козик О.И. Масс-спектрометрическое изучение термической деструкции гетероароматических катионных красителей в твердой фазе и на поверхности дисперсного кремнезема: дис.... канд. хим. наук: 02.00.18 / Козик Олег Иосифович – К., 1992. – 175 с. / Kozik O.I. Mass-spektrometricheskoe izuchenie termicheskoy destrukcii geteroaromaticeskikh kationnykh krasitelej v tverdoj faze i na poverhnosti dispersnogo kremnezema: dis.... kand. him. nauk: 02.00.18 / Kozik Oleg Iosifovich – К., 1992. – 175 s.
223. Шмиголь І.В. Хімічно модифікований пористий кремній як підкладка для лазерної десорбції / іонізації низькомолекулярних органічних сполук: дис. ... канд. хім. наук: 01.04.18 / І. В. Шмиголь Ірина Василівна. – К., 2009. – 125 с. / Shmigol' I.V. Himichno modifikovanij poristij kremnij jak pidkladka dlja lazernoї desorbції / ionizacії niz'komolekuljarnih organichnih spoluk: dis. ... kand. him. nauk: 01.04.18 / I. V. Shmigol' Irina Vasilivna. – К., 2009. – 125 s.
224. Фесенко Т.В. Лазерна десорбція/іонізація фотоактивних органічних молекул на поверхні мезопористих оксидних золь-гель плівок: дис.... канд. хім. наук: 01.04.18 / Фесенко Татьяна Викторовна.

- K., 2014. – 143 с. / Fesenko T.V. Lazerna desorbciija/ionizacija fotoaktivnih organichnih molekul na poverhni mezoporistih oksidnih zol'-gel' plivok: dis.... kand. him. nauk: 01.04.18 / Fesenko Tat'jana Viktorovna. – K., 2014. – 143 s.
225. Kosevich M.V. Chapter Seven: Interactions of Biologically Active Redox-Sensitive Dyes with Nanomaterials: Mass Spectrometric Diagnostics / M.V. Kosevich, O.A. Boryak, V.V. Chagovets, V.S. Shelkovsky, V.A. Pokrovskiy // *Nanobiophysics: Fundamental and Applications*. Ed. V. Karachevtsev. – Singapore: Pan Stanford Publishing, 2015. – P. 193–233.
226. Evaluation of the reduction of imidazophenazine dye derivatives under fast atom bombardment mass spectrometric conditions / M.V. Kosevich, O.A. Boryak, V.V. Orlov [et al.] // *J. Mass Spectrom.* – 2006. – V. 41, № 1. – P. 113–123.
227. Sensitivity of redox reactions of dyes to variations of conditions created in mass spectrometric experiments / M.V. Kosevich, V.V. Chagovets, I.V. Shmigol [et al.] // *J. Mass Spectrom.* – 2008. – V. 43, № 10. – P. 1402–1412.
228. Chemically modified porous silicon for laser desorption/ionization mass spectrometry of ionic dyes / I.V. Shmigol, S.A. Alekseev, O.Yu. Lavrynenko [et al.] // *J. Mass Spectrom.* – 2009. – V. 44, № 8. – P. 1234–1240.
229. Масс-спектрометрия с лазерной десорбцией/ионизацией красителя метиленового голубого с поверхности мезопористых тонких пленок TiO₂, SiO₂/TiO₂ и SiO₂ / Т.В. Фесенко, М.В. Косевич, Н.И. Суровцева и др. // *Масс-спектрометрия*. – 2007. – Т. 4, N 4. – С. 289-296. / *Mass-spektrometrija s lazernoj desorbciiej/ionizaciej krasitelja metilenovogo golubogo s poverhnosti mezoporistyh tonkih plenok TiO2, SiO2/TiO2 i SiO2* / T.V. Fesenko, M.V. Kosevich, N.I. Surovceva i dr. // *Mass-spektrometrija*. – 2007. – Т. 4, N 4. – С. 289-296.
230. Габович В.О. Іоноутворення метиленового блакитного на різних поверхнях / Габович В.О., Покровський В.О. // *Поверхність*. – 2011. – Т. 3, № 18. – С. 191–195. / *Gabovich V.O. Ionoutvorennja metilenovogo blakitnogo na riznih poverhnjah* / Gabovich V.O., Pokrovs'kij V.O. // *Poverhnost'*. – 2011. – Т. 3, № 18. – С. 191–195.
231. Експериментальне та теоретичне дослідження лазерної десорбції/іонізації метиленового блакитного з поверхні терморозширеного графіту / В.О. Габович, В.О. Покровський, Є.М. Дем'яненко, А.Г. Гребенюк // *Укр. фіз. журнал*. – 2012. – Т. 57, № 7. – С. 775–782. / *Ekspierimental'ne ta teoretichne doslidzhennja lazernoj desorbciij/ionizacij metilenosvogo blakitnogo z poverhni termorozshirenogo grafitu* / V.O. Gabovich, V.O. Pokrovs'kij, Є.М. Dem'janenko, A.G. Grebenjuk // *Ukr. fiz. zhurnal*. – 2012. – Т. 57, № 7. – С. 775–782.
232. Габович В.О. Порівняння лазерної десорбції/іонізації барвників акридинового оранжевого та метиленового блакитного з поверхні терморозширеного графіту / В.О. Габович, В.О. Покровський // *Хім., фіз. та технологія поверхні*. – 2013. – Т. 4, № 2. – С. 196–201. / *Gabovich V.O. Porivnjannja lazernoj desorbciij/ionizacij barvnikiv akridinovogo oranzhevogo ta metilenovogo blakitnogo z poverhni termorozshirenogo grafitu* / V.O. Gabovich, V.O. Pokrovs'kij // *Him., fiz. ta tehnologija poverhni*. – 2013. – Т. 4, № 2. – С. 196–201.
233. Квантовохімічне дослідження структурних перетворень акридинового оранжевого в умовах лазерної десорбції/іонізації на поверхні терморозширеного графіту / Є.М. Дем'яненко, А.Г. Гребенюк, В.В. Лобанов [та інш.] // *Хім., фіз. та технологія поверхні*. – 2014. – Т. 5, № 3. – С. 284–290. / *Kvantovohimichne doslidzhennja strukturnih peretvoren' akridinovogo oranzhovogo v umovah lazernoj desorbciij/ionizacij na poverhni termorozshirenogo grafitu* / Є.М. Dem'janenko, A.G. Grebenjuk, V.V. Lobanov [ta insh.] // *Him., fiz. ta tehnologija poverhni*. – 2014. – Т. 5, № 3. – С. 284–290.
234. Photocatalytic degradation of methylene blue on nanocrystalline TiO₂: Surface mass spectrometry of reaction intermediates / H. Gnaser, M.R. Savina, W.F. Calaway [et al.] // *Int. J. Mass Spectrom.* – 2005. – V. 245, № 1-3. – P. 61–67.
235. Kertesz V. Electropolymerization of Methylene Blue investigated using on-line electrochemistry / electro spray mass spectrometry / V. Kertesz, G.J. Van Berkel // *Electroanalysis*. – 2001. – V. 13, № 17. – P. 1425–1430.
236. Quantification of cationic anti-malaria agent methylene blue in different human biological matrices using cation exchange chromatography coupled to tandem mass spectrometry / J. Burhenne, K.D. Riedel, J. Rengelshausen [et al.] // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2008. – V. 863, № 2. – P. 273–282.
237. Analysis of methylene blue and its metabolites in blood by capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry / F. Yang, S. Xia, Z. Liu, Chen J, Lin Y, Qiu B, Chen G. [et al.] // *Electrophoresis*. – 2011. – V. 32, № 6-7. – P. 659–64.
238. Paper spray for direct analysis of complex mixtures using mass spectrometry / H. Wang, J. Liu, R.G. Cooks, Z. Ouyang // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2010. – V. 49, № 5. – P. 877–880.

УДК 576.524

РОЛЬ ЕЛЕКТРОСТАТИЧНИХ ВЗАЄМОДІЙ У АДГЕЗІЇ *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* НА ЕРИТРОЦИТАХ ЛЮДИНИ В СЕРЕДОВИЩАХ З РІЗНОЮ КОНЦЕНТРАЦІЄЮ 1:1 ЕЛЕКТРОЛІТУ

О.І. Гордієнко¹, М.О. Баранник², Є.О. Гордієнко^{1,3}

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, 61015, Харків, Україна

²Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, 61002, Харків, Україна

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

Надійшла до редакції 26 травня 2015 року

Прийнята 19 червня 2015 року

Процес бактеріальної адгезії зазвичай обговорюється в термінах моделі двоступеневої сорбції. У цій моделі, бактерії на першому кроці швидко прикріплюються до поверхні слабкими фізичними взаємодіями, тоді як на другому кроці відбувається безповоротний молекулярний і клітинний адгезійний процес. Важливим чинником, що впливає на адгезійні процеси, є фізико-хімічні характеристики середовища, зокрема присутність в ньому одновалентних катіонів. Метою даної роботи є оцінка ролі електростатичної складової у міжклітинній взаємодії в середовищах з різною концентрацією 1:1 електроліту на першому оборотному етапі адгезії. Порівняння експериментальних даних щодо адгезії лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини та теоретично визначених дебаївського радіусу і поверхневого потенціалу еритроцитів у досліджених розчинах показало, що зміна показника адгезії в наших експериментах при зменшенні іонної сили розчину повністю узгоджується з передбаченнями теорії ДЛФО.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: адгезія, теорія ДЛФО, еритроцити, *Streptococcus thermophilus*, електростатичні взаємодії, дебаївський радіус, поверхневий потенціал.

РОЛЬ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В АДГЕЗИИ *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* НА ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА В СРЕДАХ С РАЗЛИЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ 1:1 ЭЛЕКТРОЛИТА

О.И. Гордиенко¹, М.А. Баранник², Е.О. Гордиенко^{1,3}

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, 61015, Харків, Україна

²Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, 61002, Харків, Україна

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

Процесс бактериальной адгезии обычно обсуждается в терминах модели двухступенчатой сорбции. В этой модели, бактерии на первом этапе быстро прикрепляются к поверхности слабыми физическими взаимодействиями, тогда как на втором происходит необратимый молекулярный и клеточный адгезионный процесс. Важным фактором, влияющим на адгезивные процессы, являются физико-химические характеристики среды, в частности присутствие в ней одновалентных катионов. Целью данной работы является оценка роли электростатической составляющей в межклеточном взаимодействии на первом обратимом этапе адгезии. Сравнение экспериментальных данных по адгезии лактобактерий *S. thermophilus* на эритроцитах человека и теоретически определенных дебаевского радиуса и поверхностного потенциала эритроцитов в исследованных растворах показало, что изменение показателя адгезии в наших экспериментах при уменьшении ионной силы раствора полностью согласуется с предсказаниями теории ДЛФО.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: адгезия, теория ДЛФО, эритроциты, *Streptococcus thermophilus*, электростатические взаимодействия, дебаевский радиус, поверхностный потенциал.

THE ROLE OF ELECTROSTATIC INTERACTIONS IN THE *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* ADHESION ON HUMAN ERYTHROCYTES IN MEDIA WITH DIFFERENT 1:1 ELECTROLYTE CONCENTRATION

O.I. Gordiyenko¹, M.O. Barannyk², E.O. Gordiyenko^{1,3}

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Pereyaslavskaya str., Kharkiv, 61015, Ukraine

²National University of Pharmacy, 53 Pushkinskaya str., Kharkiv, 61002, Ukraine

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

The process of bacterial adhesion is usually discussed in terms of the two-stage sorption model. According to the model, at the first stage the bacteria fastly attaches to the surface by weak physical interactions, while at the second stage irreversible molecular and cellular adhesion process takes place. An important factor, influencing the adhesion processes, is physical-chemical characteristics of the medium, in particular, the presence of monovalent cations therein. The aim of this work is to assess the role of electrostatic component of the intercellular interactions at the first reversible stage of adhesion. Comparison of experimental data of adhesion of lactobacilli *S. thermophilus* on human erythrocytes and theoretical definition of the Debye radius and the erythrocytes surface potential in the experimental solutions showed that with decreasing ionic strength of the solution the change in the adhesion index in our experiments is fully in line with the theory DLVO predictions.

KEY WORDS: adhesion, DLVO theory, erythrocytes, *Streptococcus thermophilus*, electrostatic interactions, Debye radius, surface potential.

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ

Процес бактеріальної адгезії зазвичай обговорюється в термінах моделі двоступеневої сорбції, вперше запропонованої Маршаллом [1]. У цій моделі, бактерії на першому кроці швидко прикріплюються до поверхні слабкими фізичними взаємодіями, здійснюючи в основному оборотне прикріплення, тоді як на другому кроці відбувається безповоротний молекулярний і клітинний адгезійний процес, і формуються агрегати, стійкі до будь-якого відмивання або обробки [2]. Тобто через якийсь час адгезійний зв'язок між бактерією і поверхнею субстрату, посилюється, переводячи процес у безповоротний стан. Вважається, що перша стадія прикріплення є дуже важливою і безумовно впливає на кінцевий результат. Бактерії можуть мати численні адгезини для різних субстратів, зазвичай лектини або лектиноподібні білки або вуглеводи, частини поверхневих полімерних структур, які включають капсули, ворсинки або пілі. Проте, в багатьох роботах стверджувалось, що ці структурні особливості мають менше значення на початкових стадіях процесу прикріплення [3, 4]. Отже, важливим чинником, що впливає на адгезивні процеси, є фізико-хімічні характеристики середовища, зокрема присутність в ньому одно- та двохвалентних катіонів.

Повна сила взаємодії двох поверхонь за теорією ДЛФО включає ван-дер-ваальсове притягання та сили подвійного електричного шару. Потенціал ван-дер-ваальсової взаємодії практично не залежить від змін концентрації електроліту і рН, і в першому наближенні може вважатися постійним. На малих відстанях сили Ван-дер-Ваальса перевищують відштовхування подвійного електричного шару, оскільки вони залежать від відстані за степеневим законом ($W \approx -\frac{1}{D^n}$), тоді як енергія взаємодії подвійного електричного шару при $D \rightarrow 0$ залишається скінченною або повільно зростає. В залежності від концентрації електроліту і щільності поверхневого заряду енергія взаємодії може мати різну залежність від відстані між поверхнями. Між сильно зарядженими поверхнями в розбавленому електроліті (великий дебаївський радіус) спостерігається сильне далеко діюче відштовхування, яке досягає максимуму (енергетичного бар'єра) на деякій відстані, як правило, між 1 і 4 нм. В більш концентрованому розчині електроліту перед бар'єром з'являється достатньо глибокий так званий дальній потенціальний мінімум, як правило, далі 3 нм (мінімум енергії при контакті називається ближнім (потенціальним) мінімумом). В той же час слід зазначити, що такі види взаємодій, як стеричні та структурні, стають ефективними лише на близьких відстанях (< 2 нм). Не дивлячись на те, що термодинамічно рівноважним може бути знаходження часток в ближньому потенціальному мінімумі, енергетичний бар'єр може бути таким високим, що частки будуть не здатні подолати його за розумний час. В такому випадку частки (клітини) будуть або знаходитись в дальньому мінімумі, або роз'єднуються і залишаться диспергованими в розчині. Характерна відстань дальнього мінімуму у розчинах з концентраціями, близькими до фізіологічних, становить від 1 до 3

нм. Такі відстані цілком достатні для специфічних взаємодій між клітинами [5]. Таким чином, тривале знаходження взаємодіючих клітин в дальньому потенціальному мінімумі може привести до утворення специфічного зв'язку між адгезинами та лігандами.

В попередніх роботах [6, 7] ми показали, що адгезія лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини залежала від концентрації хлориду натрію в середовищі і була максимальною за її фізіологічного значення. Метою даної роботи є оцінка ролі електростатичної складової у міжклітинній взаємодії на першому оборотному етапі адгезії.

МАТЕМАТИЧНА МОДЕЛЬ

Рівняння Пуасона-Больцмана визначає потенціал Ψ , електричне поле $E = \frac{\partial \Psi}{\partial x}$ і концентрацію протиіонів ρ в будь-якій точці x між поверхнями [5]:

$$\frac{d^2 \Psi}{dx^2} = -\frac{ze\rho}{\varepsilon\varepsilon_0} = -\left(\frac{ze\rho_0}{\varepsilon\varepsilon_0}\right)e^{\frac{ze\Psi}{kT}} \quad (1)$$

де Ψ - електростатичний потенціал (мВ), ρ - числова щільність іонів з валентністю z в точці x між поверхнями (м^{-3}), ε_0 - діелектрична проникність вакууму ($\text{Кл}^2\text{Дж}^{-1}\text{м}^{-1}$), ε - відносна діелектрична проникність середовища, k - стала Больцмана (ДжК^{-1}), T - абсолютна температура (К).

Щільність протиіонів ρ на поверхні при цьому визначається за формулою [5]:

$$\rho_0 = \rho_\infty + \frac{\sigma^2}{2\varepsilon\varepsilon_0 kT} \quad (2)$$

де ρ_0 - щільність протиіонів на поверхні, а ρ_∞ - щільність в об'ємному розчині.

За цією формулою концентрація протиіонів на поверхні залежить тільки від поверхневої щільності заряду σ і концентрації протиіонів в об'ємному розчині. Отже, навіть для ізолюваної поверхні (тобто двох поверхонь, що знаходяться далеко одна від одної $\rho_\infty \rightarrow 0$) величина ρ_0 ніколи не може бути меншою за $\frac{\sigma^2}{2\varepsilon\varepsilon_0 kT}$.

Розглянемо розподіл іонів поблизу ізолюваної поверхні в контакт з розчином електроліту. Якщо записати повну щільність заряду в будь-якій точці x як $\sum_i z_i e \rho_{xi}$ а повну концентрацію іонів (числову щільність) як $\sum_i \rho_{xi}$, то, розподіл Больцмана (1) для іонів i в точці x має вигляд

$$\rho_{xi} = \rho_{\infty i} e^{\frac{z_i e \Psi_x}{kT}}, \quad (3)$$

а на поверхні, при $x=0$, значення щільності ρ і потенціалу Ψ зв'язані відношенням

$$\rho_{0i} = \rho_{\infty i} e^{\frac{z_i e \Psi_0}{kT}}, \quad (4)$$

де $\rho_{\infty i}$ - концентрація i -тих іонів в об'ємі розчину (при $x = \infty$), де $\Psi_\infty = 0$.

Наприклад, для розчину Na^+Cl^- , можна записати

$$\begin{aligned} [\text{Na}^+]_x &= [\text{Na}^+]_\infty e^{-\frac{e\Psi_x}{kT}} & [\text{Na}^+]_0 &= [\text{Na}^+]_\infty e^{-\frac{e\Psi_0}{kT}} \\ [\text{Cl}^-]_x &= [\text{Cl}^-]_\infty e^{+\frac{e\Psi_x}{kT}} & [\text{Cl}^-]_0 &= [\text{Cl}^-]_\infty e^{+\frac{e\Psi_0}{kT}} \end{aligned} \quad (5)$$

де величини у квадратних дужках, наприклад $[\text{Na}^+]$, виражені в деяких зручних

одинацях концентрації, наприклад в М (1 М = 1 моль/літр і відповідає концентрації $\rho = 6,022 \times 10^{26} \text{ м}^{-3}$).

Повна концентрація іонів біля ізольованої поверхні зі щільністю заряду σ за формулою (2) становить:

$$\sum_i \rho_{0i} = \sum_i \rho_{\infty i} + \frac{\sigma^2}{2\epsilon\epsilon_0 kT} \quad (6)$$

Звідки можна отримати співвідношення між щільністю поверхневого заряду σ і поверхневим потенціалом Ψ_0 .

$$\sigma^2 = 2\epsilon\epsilon_0 kT \left(\sum_i \rho_{0i} - \sum_i \rho_{\infty i} \right) \quad (7)$$

Для еритроцитів щільність поверхневого заряду $\sigma = -1,31 \cdot 10^{-2} \text{ Кл/м}^2$ [8]. Або $1,31 \cdot 10^{-2} \text{ Кл} \cdot \text{м}^{-2} / 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ Кл} = 0,82 \cdot 10^{17} \text{ зар/м}^2 = 0,082 \text{ зар/нм}^2$, тобто 1 елементарний заряд на $12,2 \text{ нм}^2$. Враховуючи, що площа поверхні еритроцита становить $\sim 140 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2$ (або $14 \cdot 10^7 \text{ нм}^2$) маємо $\sim 10^7$ зарядів на поверхні еритроцитів.

Для такої поверхневої щільності заряду при 37°C , знаходимо

$$\frac{\sigma^2}{2\epsilon\epsilon_0 kT} = \frac{1716 \times 10^{-7}}{60647,775 \times 10^{-34}} = 0,0283 \times 10^{27} \text{ м}^{-3} = 0,047 \text{ М}.$$

Для 1,1-валентного електроліту, такого, як хлорид натрію, концентрація іонів на поверхні еритроцитів ϵ

$$[Na^+]_0 + [Cl^-]_0 = 0,047 + [Na^+]_\infty + [Cl^-]_\infty = 0,047 + 2[Na^+]_\infty = 0,047 + 2[NaCl] \quad (8)$$

де $[NaCl]$ – об'ємна молярна концентрація солі. На поверхні в основному знаходяться протиіони (тобто Na^+ , якщо поверхня заряджена негативно) і їх надмірна концентрація на поверхні у порівнянні з розчином.

Співвідношення між щільністю поверхневого заряду σ і поверхневим потенціалом Ψ_0 для розчину $NaCl$ отримуємо підставляючи рівняння (4) в (6):

$$\begin{aligned} \sigma^2 &= 2\epsilon\epsilon_0 kT \left(\sum_i \rho_{0i} - \sum_i \rho_{\infty i} \right) = 2\epsilon\epsilon_0 kT \left\{ [Na^+]_\infty e^{-\frac{e\Psi_0}{kT}} + [Cl^-]_\infty e^{+\frac{e\Psi_0}{kT}} - [Na^+]_\infty - [Cl^-]_\infty \right\} = \\ &= 2\epsilon\epsilon_0 kT \left\{ [Na^+]_\infty \left(e^{-\frac{e\Psi_0}{kT}} + e^{+\frac{e\Psi_0}{kT}} - 2 \right) \right\} = 2\epsilon\epsilon_0 kT \left\{ [NaCl] \times \left(e^{-\frac{e\Psi_0}{kT}} + e^{+\frac{e\Psi_0}{kT}} \right) - 2[NaCl] \right\} \end{aligned} \quad (9)$$

Підставляючи значення щільності поверхневого заряду для еритроцитів людини $\sigma = -1,31 \cdot 10^{-2} \text{ Кл/м}^2$ [8] маємо:

$$\sigma^2 = 2\epsilon\epsilon_0 kT [Na^+]_\infty \left(e^{-\frac{e\Psi_0}{kT}} + e^{+\frac{e\Psi_0}{kT}} - 2 \right) = (1,31 \times 10^{-2})^2$$

$$\sigma^2 = 1,7161 \times 10^{-4} = (60647,775 \times 10^{-34} \times 6,022 \times 10^{26}) [NaCl] \times \left(e^{-\frac{\Psi_0}{26,7}} + e^{+\frac{\Psi_0}{26,7}} - 2 \right) =$$

$$= 3650220,9 \times 10^{-8} [NaCl] \left(e^{-\frac{\Psi_0}{26,7}} + e^{+\frac{\Psi_0}{26,7}} - 2 \right) =$$

$$= 36,52 \times 10^{-4} [NaCl] \left(e^{-\frac{\Psi_0}{26,7}} + e^{+\frac{\Psi_0}{26,7}} \right) - 73,04 \times 10^{-4} \times [NaCl]$$

$$\begin{aligned}
 1,7161 \times 10^{-4} + 73,04 \times 10^{-4} \times [NaCl] &= 36,52 \times 10^{-4} \times 2[NaCl] \times \frac{e^{-\frac{\psi_0}{26,7}} + e^{+\frac{\psi_0}{26,7}}}{2} = \\
 &= 73,04 \times 10^{-4} \times [NaCl] \times \cosh \frac{\psi_0}{26,7} \\
 \cosh \frac{\psi_0}{26,7} &= \frac{1,7161 + 73,04 \times [NaCl]}{73,04 \times [NaCl]} \quad (10)
 \end{aligned}$$

Концентрації NaCl в наших експериментах щодо впливу іонної сили на показник адгезії становили: 0,15 М, 0,1 М, 0,05 М, 0,025 М. Для цих концентрацій маємо:

- для 0,15 М NaCl:

$$\begin{aligned}
 \cosh \frac{\psi_0}{26,7} &= \frac{1,7161 + 73,04 \times [0,15]}{73,04 \times [0,15]} = 1,16 \\
 \frac{\psi_0}{26,7} &= -0,55 \\
 \psi_0 &= -14,7
 \end{aligned}$$

- для 0,1 М NaCl:

$$\begin{aligned}
 \cosh \frac{\psi_0}{26,7} &= \frac{1,7161 + 73,04 \times [0,1]}{73,04 \times [0,1]} = 1,235 \\
 \frac{\psi_0}{26,7} &= -0,69 \\
 \psi_0 &= -18,4
 \end{aligned}$$

- для 0,05 М NaCl:

$$\begin{aligned}
 \cosh \frac{\psi_0}{26,7} &= \frac{1,7161 + 73,04 \times [0,05]}{73,04 \times [0,05]} = 1,47 \\
 \frac{\psi_0}{26,7} &= -0,95 \\
 \psi_0 &= -25,4
 \end{aligned}$$

- для 0,025 М NaCl:

$$\begin{aligned}
 \cosh \frac{\psi_0}{26,7} &= \frac{1,7161 + 73,04 \times [0,025]}{73,04 \times [0,025]} = 1,94 \\
 \frac{\psi_0}{26,7} &= -1,29 \\
 \psi_0 &= -34,4
 \end{aligned}$$

Поверхневий потенціал був розрахований за припущення, що щільність

поверхневих зарядів у розчинах NaCl з іонною силою, що знижувалась, залишається незмінною. Це припущення підтверджується нашими даними щодо зв'язування альціанового синього еритроцитами, яке вірогідно не відрізнялось у досліджених розчинах [7].

Концентрації ρ_{0i} індивідуальних іонів на поверхні можна обчислити за формулою (4), підставляючи розраховані значення поверхневого потенціалу для наших розчинів. Отже для нашого випадку:

$$[Na^+]_0 = [Na^+]_{\infty} e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} \quad [Cl^-]_0 = [Cl^-]_{\infty} e^{+\frac{e\psi_0}{kT}}$$

де $[Na^+]_0$, $[Cl^-]_0$ – концентрація іонів натрію/хлору на поверхні еритроцитів, $[Na^+]_{\infty}$, $[Cl^-]_{\infty}$ – концентрація іонів в об'ємному розчині.

Тоді для 0,15 М NaCl при температурі 37°C маємо:

$$[Na^+]_0 = 0.15 \times e^{\frac{\psi_0}{kT}} = 0.15 \times e^{\frac{14.7}{26.7}} = 0.26(M)$$

$$[Cl^-]_0 = 0.15 \times e^{\frac{-14.7}{26.7}} = 0.086(M)$$

Для 0,1 М NaCl:

$$[Na^+]_0 = 0.1 \times e^{\frac{\psi_0}{kT}} = 0.1 \times e^{\frac{18.4}{26.7}} = 0.199(M)$$

$$[Cl^-]_0 = 0.1 \times e^{\frac{-18.4}{26.7}} = 0.05(M)$$

Для 0,05 М NaCl:

$$[Na^+]_0 = 0.05 \times e^{\frac{\psi_0}{kT}} = 0.05 \times e^{\frac{25.4}{26.7}} = 0.129(M)$$

$$[Cl^-]_0 = 0.05 \times e^{\frac{-25.4}{26.7}} = 0.019(M)$$

Для 0,025 М NaCl:

$$[Na^+]_0 = 0.025 \times e^{\frac{\psi_0}{kT}} = 0.025 \times e^{\frac{34.4}{26.7}} = 0.09(M)$$

$$[Cl^-]_0 = 0.025 \times e^{\frac{-34.4}{26.7}} = 0.00687(M)$$

Як і очікувалось, повна концентрація всіх іонів у поверхні в точності збігається зі значеннями, отриманими за формулами (6, 8).

Для малих величин потенціалу, приблизно менше 25 мВ, що справедливо у випадку еритроцитів, рівняння Грема (7) спрощується до вигляду

$$\sigma = \varepsilon \varepsilon_0 \kappa \psi_0 \quad (11)$$

де

$$\kappa = \left(\frac{\sum \rho_{\infty i} e^2 z_i^2}{\varepsilon \varepsilon_0 kT} \right)^{\frac{1}{2}} M^{-1} \quad (12)$$

Отже, потенціал стає пропорційним щільності поверхневого заряду.

Це співвідношення привело до виникнення поняття дифузного подвійного електричного шару, що описує іонну атмосферу поблизу зарядженої поверхні з характерним масштабом або «товщиною» $1/\kappa$, яка називається дебаївським радіусом екранування. Величина дебаївського радіуса залежить тільки від властивостей рідини і не залежить від властивостей поверхні, таких, як її заряд або потенціал.

Величина дебаївського радіусу у водних розчинах NaCl становить:

$$\frac{1}{\kappa} = \frac{(\epsilon\epsilon_0 kT)^{\frac{1}{2}}}{\left\{(\rho_{Na} e^2 z_{Na}^2 + \rho_{Cl} e^2 z_{Cl}^2) \times N_A \times 10^3\right\}^{\frac{1}{2}}} \quad (13)$$

де ρ_i – щільність іонів (м^{-3}); z_i – заряд і-ого іону (для NaCl $z_i = \pm 1$); e – величина елементарного заряду; N_A – число Авогадро. Множення на $N_A \cdot 10^3$ для переходу у вираженні концентрації від шт/м³ до Моль/л.

Тоді в 1:1 електроліті, наприклад NaCl:

$$\frac{1}{\kappa} = \frac{\{80 \times 8.854 \times 10^{-12} \times 1.381 \times 10^{-23} \times 298(310)\}^{\frac{1}{2}}}{1.602 \times 10^{-19} \times (2\rho_{Na})^{\frac{1}{2}} \times 6.022 \times 10^{23} \times 10^3}$$

$$\text{Для температури } t=37^\circ\text{C (310 K): } \frac{1}{\kappa} = \frac{0.313}{([NaCl])^{\frac{1}{2}}} \quad (14)$$

Розраховані за формулою (14) значення дебаївського радіусу, а також за формулою (10) поверхневі потенціали еритроцитів в розчинах з різною концентрацією хлориду натрію подані в таблиці 1.

Таблиця 1

Поверхневі потенціали еритроцитів та дебаївські радіуси в розчинах з різною концентрацією NaCl

Концентрація NaCl, М	Індекс адгезії [7]	Кількість зв'язаного барвника альціанового синього еритроцитами, нг/10 ⁶ ер. [7]	Поверхневий потенціал, мВ	Дебаївський радіус при 37°C, нм
0.15	2.21 ± 0.87	220.8 ± 4	-14.7	0.81
0.1	1.44 ± 0.94*	228.2 ± 7.7	-18.4	0.99
0.05	1.52 ± 0.85*	226.8 ± 9.8	-25.4	1.40
0.025	0.95 ± 0.63*	226.8 ± 9.3	-34.4	1.98

* – дані вірогідно відрізняються від даних для контролю, $p < 0,001$.

Кореляція між значеннями індексу адгезії та дебаївським радіусом становить $r=0,864$.

Кореляція між значеннями індексу адгезії та поверхневим потенціалом становить $r=0,88$.

ВИСНОВКИ

Таким чином, порівняння експериментальних даних щодо адгезії лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини та теоретично визначених дебаївського радіусу і поверхневого потенціалу еритроцитів у досліджених розчинах показало, що зміна показника адгезії в наших експериментах при зменшенні іонної сили розчину повністю узгоджується з передбаченнями теорії ДЛФО. Отже, в даному випадку, визначальним чинником, що впливав на зміну адгезії лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини в розчинах з різними концентраціями хлориду натрію, були електростатичні взаємодії на першому, оборотному етапі адгезії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Marshall K.C. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces / K.C. Marshall, R. Stout, R. Mitchell // J. Gen. Microbiol. – 1971. – V. 68. – P. 337–348.
2. Carnazza S. New advances in cell adhesion Technology / S. Carnazza // Nanoparticles and Nanodevices in Biological Applications, Lecture Notes in Nanoscale science and technology / Stefano Bellucci (Ed.) – V4. – New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009. – V. 4. – P. 69 – 130. – ISBN 978–3–540–70943–5.
3. An Y.H. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces / Y.H. An, R.J. Friedman // J. Biomed. Mat. - 1998. – V. 43. – P. 338–348.
4. van Loosdrecht M.C.M. Hydrophobic and electrostatic parameters in bacterial adhesion / M.C.M. van Loosdrecht, J. Lyklema, W. Norde, A.J.B. Zehnder // Aquatic Sci. – 1990. – V. 52. – P.103–113.
5. Israelachvili J. Intermolecular and Surface forces / J. Israelachvili // 3rd ed. – Burlington: Academic Press, 2011. – 674 p. – ISBN 978 – 0–12–375182–9.
6. Анікеєва М.О. Вплив катіонів Ca^{2+} і Mg^{2+} на поверхневий заряд еритроцитів і лактобактерій *S. thermophilus* та їх адгезійну взаємодію / М.О. Анікеєва, С.Л. Розанова, С.Є. Коваленко, О.І. Гордієнко, Є.О. Гордієнко // Доповіді Національної академії наук України. – 2015. – №1. – С.159–165. / Anikjejeva M.O. Vplyv kationiv Ca^{2+} і Mg^{2+} na poverhnevuj zarjad erytrocytiv i laktobakterij *S. thermophilus* ta i'h adgezijnu vzajemodiju / М.О. Anikjejeva, S.L. Rozanova, S.Є. Kovalenko, O.I. Gordijenko, Je.O. Gordijenko // Dopovidi Nacional'noi' akademii' nauk Ukraïny. – 2015. – №1. – S. 159–165.
7. Anikieieva M.O. Surface charge of erythrocytes and lactobacilli *S. thermophilus* and their intercellular adhesion depend on the concentration of bivalent cations / M.O. Anikieieva, S.L. Rozanova, S.Ye.Kovalenko, I.F. Kovalenko, O.I. Gordiyenko, E.O. Gordiyenko // Journal of Adhesion Science and Technology. – 2015. – V.29, №10. – P.1039 – 1045.
8. Petelska A. D. The effect of contrast medium SonoVue on the electric charge density of blood cells/ A.D. Petelska, J.R. Janica, J.Kotynska, U.Łebkowska, Z.A. Figaszewski // J. Membrane Biol. – 2012. – V.245. – P. 15–22.

УДК 576.524

РОЛЬ ЕЛЕКТРОСТАТИЧНИХ ВЗАЄМОДІЙ У АДГЕЗІЇ *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* НА ЕРИТРОЦИТАХ ЛЮДИНИ В СЕРЕДОВИЩАХ З РІЗНОЮ КОНЦЕНТРАЦІЄЮ 2:1 ЕЛЕКТРОЛІТУ

О.І. Гордієнко¹, М.О. Баранник², Є.О. Гордієнко^{1,3}

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, 61015, Харків, Україна

²Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, 61002, Харків, Україна

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

Надійшла до редакції 28 травня 2015 року

Прийнята 18 червня 2015 року

У моделі двоступеневої сорбції на першому кроці здійснюється в основному оборотне прикріплення, тоді як на другому відбувається безповоротний молекулярний і клітинний адгезійний процес. Важливим чинником, що впливає на адгезійні процеси, є фізико-хімічні характеристики середовища, зокрема присутність в ньому двохвалентних катіонів. У даній роботі оцінювалась роль електростатичної складової у міжклітинній взаємодії в середовищах з різною концентрацією 2:1 електроліту на першому оборотному етапі адгезії та імовірність подальшого утворення специфічного зв'язку. Визначальну роль в міжклітинному адгезійному процесі на першому етапі відіграють електростатичні взаємодії. Отримані експериментальні результати та теоретичні розрахунки параметрів електростатичної взаємодії вчергове підтвердили прийнятність моделі двоступеневої сорбції та теорії ДЛФО для описання міжклітинної адгезії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: адгезія, теорія ДЛФО, еритроцити, *Streptococcus thermophilus*, електростатичні взаємодії, дебаївський радіус, поверхневий потенціал.

РОЛЬ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В АДГЕЗИИ *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* НА ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА В СРЕДАХ С РАЗЛИЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ 2:1 ЭЛЕКТРОЛИТА

О.И. Гордиенко¹, М.А. Баранник², Е.О. Гордиенко^{1,3}

¹Институт проблем кробиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, 61015, Харьков, Украина

²Национальный фармацевтический университет, ул. Пушкинская, 53, 61002, Харьков, Украина

³Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, 61022, Харьков, Украина

В модели двухэтапной сорбции на первом этапе осуществляется в основном обратимое приращение, тогда как на втором происходит необратимый молекулярный и клеточный адгезивный процесс. Важным фактором, влияющим на адгезивные процессы, являются физико-химические характеристики среды, в частности присутствие в ней двухвалентных катионов. В данной работе оценивалась роль электростатической составляющей в межклеточном взаимодействии в средах с различной концентрацией 2:1 электролита на первом обратимом этапе адгезии и вероятность дальнейшего возникновения специфической связи. Определяющую роль в межклеточном адгезивном процессе играют электростатические взаимодействия. Полученные экспериментальные результаты и теоретические расчеты параметров электростатического взаимодействия в очередной раз подтвердили приемлемость модели двухэтапной сорбции и теории ДЛФО для описания межклеточной адгезии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: адгезия, теория ДЛФО, эритроциты, *Streptococcus thermophilus*, электростатические взаимодействия, дебаевский радиус, поверхностный потенциал.

THE ROLE OF ELECTROSTATIC INTERACTIONS IN THE *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* ADHESION ON HUMAN ERYTHROCYTES IN MEDIA WITH DIFFERENT 2:1 ELECTROLYTE CONCENTRATION

O.I. Gordiyenko¹, M.O. Barannyk², E.O. Gordiyenko^{1,3}

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Pereyaslavskaya str., Kharkiv, 61015, Ukraine

²National University of Pharmacy, 53 Pushkinskaya str., Kharkiv, 61002, Ukraine

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

In the two-stage sorption model at the first stage is mostly reversible attachment, while at the second irreversible stage molecular and cellular adhesion processes take place. An important factor, influencing the adhesion processes, is physical-chemical characteristics of the medium, in particular, the presence of divalent cations therein. The aim of this work is to assess the role of electrostatic component of the intercellular interactions in media with different 2:1 electrolyte concentration at the first reversible stage of adhesion and probability of further occurrence of specific binding. Electrostatic interactions play a decisive role in intercellular adhesion process. The obtained experimental results and theoretical calculations of the electrostatic interaction parameters once again confirmed the acceptability of a two-stage model of sorption and DLVO theory to describe a cell-cell adhesion.

KEY WORDS: adhesion, DLVO theory, erythrocytes, *Streptococcus thermophilus*, electrostatic interactions, Debye radius, surface potential.

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ

Адгезія є складним процесом, на який впливають як взаємодії, обумовлені фізичними чинниками, так і специфічні біологічні взаємодії, що відбуваються на молекулярному рівні. Процес адгезії зазвичай обговорюється в термінах моделі двоступеневої сорбції, вперше запропонованої Маршаллом [1]. У цій моделі клітини на першому кроці прикріплюються до поверхні іншої клітини слабкими фізичними взаємодіями, здійснюючи в основному оборотне прикріплення, тоді як на другому кроці відбувається безповоротний молекулярний і клітинний адгезійний процес, і формуються агрегати, стійкі до будь-якого відмивання або обробки [2].

Розглянемо чинники, що впливають на процес адгезії між двома клітинами на першому етапі. Найважливішими силами далекої дії між тілами в рідинах є ван-дер-ваальсові та електростатичні. На малих відстанях (менших 1-3 нм) частіше за все домінують сольватні та інші типи стеричних сил. Потенціал ван-дер-ваальсової взаємодії практично не залежить від змін концентрації електроліту і рН, і в першому наближенні може вважатися постійним. Енергія ван-дер-ваальсових взаємодій між двома поверхнями на одиницю площі поверхні становить [3]:

$$W(D) = -\frac{A}{12kD^2}, \quad (1)$$

де A – константа Гамакера (без урахування запізнювання), D – відстань між поверхнями.

Ван-дер-ваальсові сили, що діють між амфіфільними структурами, частіше за все невеликі через наступні причини. По-перше, константа Гамакера двох вуглеводневих фаз, що взаємодіють через прошарок води, відносно мала і знаходиться в інтервалі $(4-7) \times 10^{-21}$ Дж. Можна очікувати, що для біологічних мембран ця величина буде трохи більшою через наявність в їх структурі білків. По-друге, рівняння (1) можна застосовувати до бішарів або мембран, якщо тільки відстань між ними менше 3 нм. Якщо вона є більшою, то константа Гамакера перестає бути постійною і зменшується зі збільшенням D внаслідок ефекту запізнювання, а також того, що товщина бішарів скінченна. В результаті, якщо зазор між бішарами досягає 10 нм, то реальна сила взаємодії між ними в два рази менше, ніж розрахована за рівнянням (1) (в якому не враховується запізнювання). І головне, якщо в розчині присутній електроліт, то константа A зменшується додатково внаслідок екранування зарядів, відповідно падає внесок статичного члена $A_{v=0}$ в константу Гамакера, що відповідає за індукційну та орієнтаційну взаємодію [3]. Так, наприклад, в розчині NaCl з концентрацією 0,15 М, де відстань Дебая $\kappa^{-1} = 0,8$ нм, внесок статичного члена, який обумовлює приблизно половину величини взаємодії без запізнювання, практично зникає уже при $D=1,5$ нм. Було виміряно залежність сил Ван-дер-Ваальса між двома незарядженими ліпідними бішарами в розчинах різних солей. В діапазоні від 1 до 4 нм константа Гамакера становила 7×10^{-21} Дж в чистій воді, і 3×10^{-21} Дж – в децимолярному розчині NaCl, що

узгоджується з кількісною оцінкою ефекту екранування взаємодії іонами електроліту. Отже, ван-дер-ваальсові сили, що діють між бішарами та мембранами, достатньо слабкі, особливо у присутності солі, а їх радіус дії не перевищують 15 нм, за межами якого ними взагалі можна знехтувати [3].

Оскільки клітини несуть сумарний негативний електричний заряд вони мають тенденцію відштовхуватись одна від одної електростатичними силами. Проте, ці сили суттєво екрануються іонами в середовищі, що розділяє клітини; для фізіологічних середовищ відстань екранування Дебая є порядку кількох нм. Крім того, більшість зарядів з'являється через іонізацію груп на клітинній поверхні. Наприклад, на еритроцитах більшість зарядів знайдена на карбоксильних групах сіалових кислот поверхневих глікопротеїнів. Ці групи розташовані на деякій значній відстані (≤ 10 нм) від ліпідного бішару плазматичної мембрани [4].

Сили відштовхування подвійного електричного шару, на відміну від ван-дер-ваальсова притягання, значно більш чутливі до типу і концентрації електроліту, рН і поверхневої щільності заряду (або поверхневого потенціалу). Незалежно від механізму виникнення заряду, поверхневий заряд завжди скомпенсований зарядом протиіонів, одна частина яких зв'язана, як правило, оборотно з поверхнею і утворює шар Штерна або шар Гельмгольца, а інша знаходиться в тепловому русі поблизу поверхні та утворює дифузний подвійний електричний шар. Наявність двовалентних катіонів викликає кардинальні зміни поверхневого потенціалу і розподілу протиіонів біля негативно зарядженої поверхні. Показано, що навіть при постійній поверхневій щільності заряду порівняно мала добавка двовалентних іонів суттєво знижує величину поверхневого потенціалу Ψ_0 . Величина Ψ_0 великою мірою визначається двовалентними катіонами, якщо їх концентрація перевищує 3% від концентрації одновалентних іонів. Більше того, навіть якщо концентрація Ca^{2+} в об'ємі розчину набагато менше концентрації Na^+ , концентрація Ca^{2+} на поверхні може бути вищою. При високих концентраціях двовалентні іони часто вступають в хімічні зв'язки з негативно зарядженими групами на поверхні, тим самим знижуючи щільність поверхневого заряду σ і ще більше зменшуючи поверхневий потенціал Ψ_0 , так що в багатьох випадках поверхні виявляються повністю нейтралізованими ($\sigma \rightarrow 0$, $\Psi_0 \rightarrow 0$) у присутності мілімолярних концентрацій Ca^{2+} [3].

В залежності від концентрації електроліту і щільності поверхневого заряду енергія взаємодії може мати різну залежність від відстані між поверхнями. Між сильно зарядженими поверхнями в розбавленому електроліті (великий дебаївський радіус) спостерігається сильне далеко діюче відштовхування, яке досягає максимуму (енергетичного бар'єра) на деякій відстані, як правило, між 1 і 4 нм. В більш концентрованому розчині електроліту перед бар'єром з'являється достатньо глибокий так званий дальній потенціальний мінімум, як правило, далі 3 нм (мінімум енергії при контакті називається ближнім потенціальним мінімумом). Не дивлячись на те, що термодинамічно рівноважним може бути знаходження часток в ближньому потенціальному мінімумі, енергетичний бар'єр може бути таким високим, що частки будуть не здатні подолати його за розумний час. В такому випадку частки (клітини) будуть або знаходитись в дальньому мінімумі, або роз'єднуються і залишаться диспергованими в розчині. Характерна відстань дальнього мінімуму у розчинах з концентраціями, близькими до фізіологічних, становить за даними деяких авторів від 1 до 3 нм [3]. За розрахунками інших авторів вторинні мінімуми були оцінені по розділенню клітин ≤ 7 нм [4]. Такі відстані цілком достатні для специфічних взаємодій між клітинами. Таким чином, тривале знаходження взаємодіючих клітин в дальньому

потенціальному мінімумі може привести до утворення специфічного зв'язку між адгезинами та лігандами.

МАТЕМАТИЧНА МОДЕЛЬ

Розглянемо розподіл іонів поблизу ізольованої поверхні в контакт з розчином електроліту. Якщо записати повну щільність заряду в будь-якій точці x як $\sum_i z_i e \rho_{xi}$, а повну концентрацію іонів (числову щільність) як $\sum_i \rho_{xi}$, то розподіл Больцмана для іонів i в точці x має вигляд

$$\rho_{xi} = \rho_{\infty i} e^{\frac{z_i e \psi_x}{kT}} \quad (2)$$

а на поверхні, при $x = 0$, значення щільності ρ і потенціалу Ψ зв'язані відношенням

$$\rho_{0i} = \rho_{\infty i} e^{\frac{z_i e \psi_0}{kT}}, \quad (3)$$

де $\rho_{\infty i}$ - концентрація іонів i в об'ємі розчину (при $x = \infty$), де $\Psi_{\infty} = 0$.

Наприклад, для розчину, що містить $\text{Na}^+\text{Cl}^- + \text{Ca}^{2+}\text{Cl}_2^-$, можна записати

$$\begin{aligned} [\text{Na}^+]_x &= [\text{Na}^+]_{\infty} e^{\frac{e\psi_x}{kT}}, & [\text{Na}^+]_0 &= [\text{Na}^+]_{\infty} e^{\frac{e\psi_0}{kT}}, \\ [\text{Ca}^{2+}]_x &= [\text{Ca}^{2+}]_{\infty} e^{-\frac{2e\psi_x}{kT}}, & [\text{Ca}^{2+}]_0 &= [\text{Ca}^{2+}]_{\infty} e^{-\frac{2e\psi_0}{kT}}, \\ [\text{Cl}^-]_x &= [\text{Cl}^-]_{\infty} e^{+\frac{e\psi_x}{kT}}, & [\text{Cl}^-]_0 &= [\text{Cl}^-]_{\infty} e^{+\frac{e\psi_0}{kT}} \end{aligned} \quad (4)$$

де величини у квадратних дужках, наприклад $[\text{Na}^+]_x$, виражені в деяких зручних одиницях концентрації, наприклад в М (1М = 1моль/літр і відповідає концентрації $\rho = 6,022 \times 10^{26} \text{ м}^{-3}$).

Повна концентрація іонів біля ізольованої поверхні зі щільністю заряду σ становить [3]:

$$\sum_i \rho_{0i} = \sum_i \rho_{\infty i} + \frac{\sigma^2}{2\varepsilon\varepsilon_0 kT} \quad (5)$$

де ε_0 - діелектрична проникність вакууму ($\text{Кл}^2 \text{Дж}^{-1} \text{м}^{-1}$), ε - відносна діелектрична проникність середовища, k - стала Больцмана (ДжК^{-1}); T - абсолютна температура (К); $\rho_{i\infty}$ - щільність іонів в об'ємному розчині (м^{-3}).

Співвідношення між щільністю поверхневого заряду σ і поверхневим потенціалом Ψ_0 для суміші електролітів $\text{NaCl} + \text{CaCl}_2$ отримуємо з формули (5):

$$\begin{aligned} \sigma^2 &= 2\varepsilon\varepsilon_0 kT \left(\sum_i \rho_{0i} - \sum_i \rho_{\infty i} \right) = \\ &= 2\varepsilon\varepsilon_0 kT \left\{ [\text{Na}^+]_{\infty} e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} + [\text{Ca}^{2+}]_{\infty} e^{-\frac{2e\psi_0}{kT}} + [\text{Cl}^-]_{\infty} e^{+\frac{e\psi_0}{kT}} - [\text{Na}^+]_{\infty} - [\text{Ca}^{2+}]_{\infty} - [\text{Cl}^-]_{\infty} \right\} \end{aligned} \quad (6)$$

Оскільки $[\text{Cl}^-]_{\infty} = [\text{Na}^+]_{\infty} + 2[\text{Ca}^{2+}]_{\infty}$, цей вираз можна записати у вигляді:

$$\sigma^2 = 2\varepsilon\varepsilon_0 kT \left\{ [\text{Na}^+]_{\infty} \left(e^{-\frac{e\psi_0}{kT}} + e^{+\frac{e\psi_0}{kT}} - 2 \right) + [\text{Ca}^{2+}]_{\infty} \left(e^{-\frac{2e\psi_0}{kT}} + 2e^{+\frac{e\psi_0}{kT}} - 3 \right) \right\}, \quad (7)$$

Тоді кінцевий результат запишеться у вигляді:

$$\sigma = (8\varepsilon\varepsilon_0 kT)^{\frac{1}{2}} \sinh\left(\frac{e\Psi_0}{2kT}\right) \left\{ [Na^+]_{\infty} + [Ca^{2+}]_{\infty} \left(2 + e^{-\frac{e\Psi_0}{kT}} \right) \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (8)$$

або при 37°C, де концентрації $[NaCl] = [Na^+]_{\infty}$, и $[CaCl_2] = [Ca^{2+}]_{\infty}$, виражені в одиницях М, щільність заряду σ в Кл/м² і потенціал Ψ_0 в мВ:

$$\sigma = 0.119 \sinh\left(\frac{\Psi_0}{53.4}\right) \left\{ [NaCl] + [CaCl_2] \left(2 + e^{-\frac{\Psi_0}{26.7}} \right) \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (9)$$

Рівняння (8), відоме як рівняння Грема, дозволяє обчислити значення поверхневого потенціалу Ψ_0 , якщо відома величина щільності поверхневого заряду σ , після чого концентрації ρ_0 індивідуальних іонів на поверхні можна розрахувати за формулами (3) або (4).

Для еритроцитів щільність поверхневого заряду $\sigma = -1.31 \cdot 10^{-2}$ Кл/м² [5]. Або $1.31 \cdot 10^{-2}$ Кл·м⁻² / $1,602 \cdot 10^{-19}$ Кл = $0,82 \cdot 10^{17}$ зар/м² = $0,082$ зар/нм², тобто 1 елементарний заряд на 12,2 нм². В наших роботах [6,7], було показано що уведення в середовище навіть невеликих концентрацій кальцію приводить до зменшення поверхневого заряду. Для концентрації CaCl₂ $0,9 \cdot 10^{-3}$ М зменшення поверхневого заряду становило ~18%, для концентрацій $1,8 \cdot 10^{-3}$ М, $2,7 \cdot 10^{-3}$ М, $3,6 \cdot 10^{-3}$ М ~11%. Отже будемо вважати, що в першому розчині $\sigma \approx 1,074 \cdot 10^{-2}$ Кл/м², в інших - $\sigma \approx 1.166 \cdot 10^{-2}$ Кл/м².

Комп'ютерне обчислення поверхневого потенціалу еритроцитів в ізотонічному розчині NaCl з додаванням указаних концентрацій CaCl₂ (близьких до концентрацій в плазмі крові) за формулою (9) дають наступні величини:

0,15 М NaCl + $0,9 \cdot 10^{-3}$ М CaCl ₂	$\Psi_0 = -12,2$ мВ
0,15 М NaCl + $1,8 \cdot 10^{-3}$ М CaCl ₂	$\Psi_0 = -13,2$ мВ
0,15 М NaCl + $2,7 \cdot 10^{-3}$ М CaCl ₂	$\Psi_0 = -13,1$ мВ
0,15 М NaCl + $3,6 \cdot 10^{-3}$ М CaCl ₂	$\Psi_0 = -13,0$ мВ

для 0,15 М NaCl розрахований поверхневий потенціал становив $\Psi_0 = -14,7$ мВ.

Отримавши значення поверхневого потенціалу, за рівняннями (4) можна розрахувати концентрацію іонів на поверхні еритроцитів.

Тоді для 0,15 М NaCl при температурі 37°C маємо:

$$[Na^+]_0 = 0.15 \times e^{\frac{\Psi_0}{kT}} = 0.15 \times e^{\frac{14.7}{26.7}} = 0.26(M)$$

$$[Cl^-]_0 = 0.15 \times e^{\frac{-14.7}{26.7}} = 0.086(M)$$

Для розчину 0,15 М NaCl + $0,9 \cdot 10^{-3}$ М CaCl₂:

$$[Na^+]_0 = 0.15 \times e^{\frac{\Psi_0}{kT}} = 0.15 \times e^{\frac{12.2}{26.7}} = 0.237(M)$$

$$[Ca^{2+}]_0 = 0.9 \times 10^{-3} \times e^{\frac{12.2}{26.7}} = 1.42 \times 10^{-3}(M)$$

$$[Cl^-]_0 = (0.15 + 0.0018) \times e^{\frac{-12.2}{26.7}} = 0.096(M)$$

Для розчину 0,15 М NaCl + $1,8 \cdot 10^{-3}$ М CaCl₂:

$$[Na^+]_0 = 0.15 \times e^{\frac{\Psi_0}{kT}} = 0.15 \times e^{\frac{13.17}{26.7}} = 0.246(M)$$

$$\begin{aligned} [Ca^{2+}]_0 &= 1.8 \times 10^{-3} \times e^{\frac{13.17}{26.7}} = 2.95 \times 10^{-3} (M) \\ [Cl^-]_0 &= (0.15 + 0.0036) \times e^{\frac{-13.17}{26.7}} = 0.094 (M) \end{aligned}$$

Для розчину 0,15 М NaCl + 2,7 · 10⁻³ М CaCl₂:

$$\begin{aligned} [Na^+]_0 &= 0.15 \times e^{\frac{\psi_0}{kT}} = 0.15 \times e^{\frac{13.07}{26.7}} = 0.245 (M) \\ [Ca^{2+}]_0 &= 2.7 \times 10^{-3} \times e^{\frac{13.07}{26.7}} = 4.40 \times 10^{-3} (M) \\ [Cl^-]_0 &= (0.15 + 0.0054) \times e^{\frac{-13.07}{26.7}} = 0.095 (M) \end{aligned}$$

Для розчину 0,15 М NaCl + 3,6 · 10⁻³ М CaCl₂:

$$\begin{aligned} [Na^+]_0 &= 0.15 \times e^{\frac{\psi_0}{kT}} = 0.15 \times e^{\frac{12.97}{26.7}} = 0.244 (M) \\ [Ca^{2+}]_0 &= 3.6 \times 10^{-3} \times e^{\frac{12.97}{26.7}} = 5.85 \times 10^{-3} (M) \\ [Cl^-]_0 &= (0.15 + 0.0072) \times e^{\frac{-12.97}{26.7}} = 0.097 (M) \end{aligned}$$

Дебаївський радіус можна визначити з формули [3]

$$\frac{1}{\kappa} = \left(\frac{\varepsilon \varepsilon_0 kT}{\sum \rho_{\infty i} e^2 z_i^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (10)$$

Бачимо, що величина дебаївського радіусу залежить тільки від властивостей розчину і не залежить від властивостей поверхні, таких, як її заряд або потенціал. Для наших концентрацій CaCl₂ від 0,9 мМ до 3,6 мМ в 0,15 М NaCl дебаївський радіус становитиме

$$\begin{aligned} \frac{1}{\kappa} &= \frac{(\varepsilon \varepsilon_0 kT)^{\frac{1}{2}}}{\left(\rho_{Na} e^2 z_{Na}^2 + \rho_{Cl} e^2 z_{Cl}^2 + \rho_{Ca} e^2 z_{Ca}^2 + 2\rho_{Cl} e^2 z_{Cl}^2 \right)^{\frac{1}{2}}} = \\ &= \frac{(\varepsilon \varepsilon_0 kT)^{\frac{1}{2}}}{e \{2[Na] + 6[Ca]\}^{\frac{1}{2}} \times (N_A \times 10^3)^{\frac{1}{2}}} = \frac{0.443}{\{0.3 + 6[Ca]\}^{\frac{1}{2}}} \end{aligned}$$

при [Ca] = 0,9 · 10 ⁻³ М	→ 1/κ = 0,80 нм
при [Ca] = 1,8 · 10 ⁻³ М	→ 1/κ = 0,79 нм
при [Ca] = 2,7 · 10 ⁻³ М	→ 1/κ = 0,79 нм
при [Ca] = 3,6 · 10 ⁻³ М	→ 1/κ = 0,78 нм
при [Ca] = 0 в 0,15 М NaCl	→ 1/κ = 0,81 нм

Таблиця 1

Вплив концентрації CaCl_2 в середовищі на поверхневий потенціал еритроцитів, концентрацію Ca^{2+} на їх поверхні та радіус Дебая

Концентрація Ca^{2+} 10^{-3} М	Індекс адгезії, А [6]	Кількість зв'язаного АВ еритроцитами, нг/ 10^6 ер.[6]	Поверхневий потенціал, мВ	Дебаївський радіус при 37°C , нм	Концентрація Ca^{2+} на поверхні еритроцита, 10^{-3} М
0.00	2.21 ± 0.87	220.8 ± 4	-14.7	0.81	0.00
0.9	$0.97 \pm 0.84^*$	$180.98 \pm 11.5^+$	-12.2	0.80	1.42
1.8	$1.57 \pm 0.96^*$	$195.1 \pm 6.3^+$	-13.2	0.79	2.95
2.7	$1.4 \pm 0.84^*$	$199.9 \pm 9.7^+$	-13.1	0.79	4.40
3.6	$1.17 \pm 0.86^*$	$196.3 \pm 12.5^+$	-13.0	0.78	5.85

* , + - дані вірогідно відрізняються від даних для контролю, $p < 0,01$

Бачимо, що дебаївський радіус змінюється в наших розчинах з додаванням CaCl_2 не дуже суттєво. Концентрація іонів кальцію на поверхні еритроцитів при порівняно невеликому потенціалі перевищує його концентрацію в об'ємному розчині $\sim 1,6$ разів. В той же час концентрації іонів натрію та хлору на поверхні еритроцитів несуттєво відрізняються від таких для 0,15 М розчину NaCl . Отже, з розрахованих величин найбільше змінюється поверхневий потенціал клітин та концентрація кальцію біля поверхні еритроцитів.

При оцінці імовірності адгезії лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини в залежності від концентрації іонів Ca^{2+} візьмемо до уваги вплив іонів Ca^{2+} на силу електростатичного відштовхування клітин та на імовірність встановлення специфічного адгезійного зв'язку внаслідок зв'язування цих іонів зі специфічними рецепторами, що викликає їх інактивацію. Тобто, слідом за [4] будемо вважати, що утворення адгезійного зв'язку між двома клітинами, здійснюється у два етапи. Щоб оцінити ступінь імовірності використовується поняття комплексу зіткнення. У цьому підході реакція концептуально розділяється на два кроки. На першому етапі реагенти просто зустрічаються (стикаються) один з одним, тобто вони дифундують на достатньо близьку відстань, щоб дозволити другий етап реакції. В нашому випадку першим (оборотним) етапом реакції будемо вважати наближення клітин до відстані дальнього потенціального мінімуму.

Таким чином реакція, може бути написана як



Вважатимемо, що клітини формують комплекс зіткнення кожного разу, коли вони відокремлені відстанню зіткнення D_{AB} , тобто відстанню дальнього потенціального мінімуму.

У наближенні Дерягіна [3] сила взаємодії між двома сферами може бути виражена через енергію взаємодії на одиницю площі двох плоских поверхонь на відстані D .

$$F(D) \approx 2\pi \left(\frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2} \right) W(D) \quad (12),$$

де W – вільна енергія взаємодії.

Ця формула застосовна до будь-якого типу закону сили, режиму притягання, відштовхування або перемінної взаємодії, якщо радіус взаємодії та відстань D набагато менше, ніж радіуси сфер. У випадку взаємодії клітин на відстані \sim дальнього мінімуму (3-4 нм) ця вимога виконується. Якщо одна сфера є дуже великою, так що $R_2 \gg R_1$,

отримуємо $F(D) = 2\pi R_1 W(D)$, що відповідає граничному випадку сфери біля плоскої поверхні. Діаметр лактобактерій *S. thermophilus* становить ~ 1 мкм, тоді як діаметр еритроцита становить $\sim 7-8$ мкм. Крім ми можемо прийняти указане наближення, оскільки, хоча форма еритроцита є достатньо складною, більшу частину його поверхні можна вважати плоскою по відношенню до майже сферичних клітин *S. thermophilus* (тобто радіус кривизни поверхні еритроцита « радіусу кривизни лактобактерій »).

За малих потенціалів поверхні, менше ніж приблизно 25 мВ, що цілком відповідає нашому випадку, формули для енергії та сили взаємодії спрощуються. Для сфери біля плоскої поверхні сила електростатичного відштовхування

$$F \approx 2\pi R \epsilon \epsilon_0 \kappa \psi_0^2 e^{-\kappa D} = \frac{2\pi R \sigma^2 e^{-\kappa D}}{\kappa \epsilon \epsilon_0} \quad (13)$$

В цих рівняннях ψ_0 і σ пов'язані виразом $\sigma = \epsilon \epsilon_0 \kappa \psi_0$, яке справедливо за малих потенціалів.

Вирази (12,13) для сили взаємодії двох подвійних електричних шарів є точними тільки на відстанях між поверхнями, більших приблизно одного дебаївського радіуса, що як показано нашими розрахунками (Табл.1) справедливо для взаємодії клітин на відстані дальнього мінімуму і більше. Ми бачимо, що взаємодія подвійного електричного шару між сферичною частинкою та поверхнею експоненціально зменшується з відстанню, причому характерним масштабом затухання є дебаївський радіус екранування.

Отже, імовірність наближення клітин *S. thermophilus* до еритроцитів на відстань дальнього мінімуму є обернено пропорційною силі електростатичного відштовхування:

$$P_1 \sim \frac{1}{F} = \frac{1}{(2\pi R \epsilon \epsilon_0 \kappa \psi_0^2 e^{-\kappa D})} = \frac{A}{\kappa \psi_0^2 e^{-\kappa D}} \quad (14)$$

де $A = \frac{1}{2\pi R \epsilon \epsilon_0}$. Приймаємо $D \approx 4$ нм [3], $R \approx 0,5$ мкм $= 0,5 \cdot 10^{-6}$ м (радіус клітин *S. thermophilus*).

У багатьох випадках при зміні властивостей розчину ні σ , ні ψ_0 не залишаються постійними. Так відбувається через те, що лише у виняткових випадках іонізовані групи на поверхні дисоційовані повністю, і, як правило, вони частково нейтралізовані при зв'язуванні відповідних іонів з розчину. Наприклад, в нашому випадку з негативно зарядженими рецепторами на поверхні еритроцитів зв'язуються іони кальцію. Тоді рівноважна концентрація рецепторів на поверхні задається виразом:



Концентрацію кальцію на поверхні позначаємо як і раніше $[\text{Ca}^{2+}]_0$, концентрацію або поверхневу щільність не зв'язаних з Ca^{2+} рецепторів на поверхні як $[\text{Re}^{2-}]_0$ і щільність зв'язаних з Ca^{2+} рецепторів як $[\text{ReCa}]_0$. Величина $[\text{Re}^{2-}]_0$ пов'язана з σ співвідношенням $\sigma = -b[\text{Re}^{2-}]_0$, де b частка рецепторів, що відповідають за адгезію з лактобактеріями, відносно всіх негативно заряджених груп на поверхні еритроцитів. $b\sigma_0 = N$ – вихідна поверхнева щільність рецепторів, а a - частка не зв'язаних з Ca^{2+} рецепторів. Величину a беремо з наших експериментальних даних щодо зміни поверхневого заряду в розчинах з додаванням 2:1 електроліту CaCl_2 за зв'язуванням катіонного фарбника (табл.1).

Тоді імовірність встановлення адгезійного зв'язку з бактеріальною клітиною, що знаходиться на відстані дальнього потенціального мінімуму буде пропорційна кількості не зв'язаних с кальцієм рецепторів

$$P_2 \sim \alpha b \sigma_0 = \alpha N \quad (16)$$

Отже імовірність встановлення специфічного адгезійного зв'язку з урахуванням імовірності наближення клітин до відстані дальнього потенціального мінімуму становитиме

$$P = P_1 \times P_2 \sim \frac{\alpha NA}{\kappa \psi_0^2 e^{-\kappa D}} \sim \frac{\alpha NA}{\kappa \psi_0^2 e^{-4\kappa}} \quad (17)$$

В таблиці 2 зведені експериментальні та розраховані нами теоретично дані, прийняті для обчислення імовірності установаження специфічного адгезійного зв'язку між *S. thermophilus* та еритроцитами людини.

Таблиця 2

Вплив концентрації CaCl_2 в середовищі на поверхневі характеристики еритроцитів та імовірність утворення специфічного адгезійного зв'язку

Концентрація Ca, 10^{-3} М	α	κ , nm^{-1}	Ψ_0 , мВ	P, відносні одиниці
0.0	1	1.23	-14.7	1
0.9	0.82	1.25	-12.2	0.51
1.8	0.89	1.26	-13.2	0.62
2.7	0.89	1.27	-13.1	0.58
3.6	0.89	1.28	-13.0	0.54

Для графічної ілюстрації та порівняння експериментальних даних по визначенню індексу адгезії та теоретично розрахованої імовірності утворення специфічного адгезійного зв'язку результати представлені показані на рис. 1.

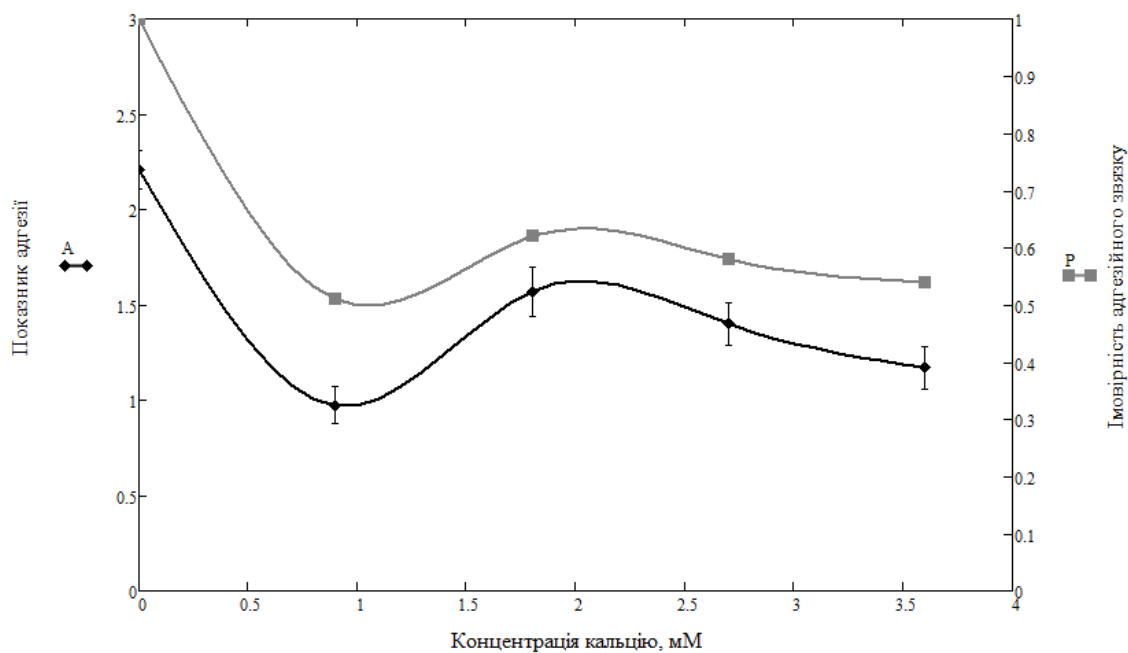


Рис.1. Показник адгезії (◆) та імовірність утворення специфічного зв'язку (■) між лактобактеріями *S. thermophilus* та еритроцитами людини в залежності від концентрації CaCl_2

З поданих на рисунку даних видно, що отримані величини показника адгезії лактобактерій *S. thermophilus* на еритроцитах людини адекватно пояснюються запропонованою моделлю.

ВИСНОВКИ

Як ми і припускали в попередніх роботах [6,7], отримані залежності показника адгезії від концентрації Ca^{2+} в середовищі можна пояснити блокуванням специфічних рецепторів зв'язування двовалентними катіонами. В той же час визначальну роль в міжклітинному адгезійному процесі також відіграють електростатичні взаємодії. Отримані експериментальні результати та теоретичні розрахунки параметрів електростатичної взаємодії вчергове підтвердили прийнятність моделі двоступеневої сорбції та теорії ДЛФО для описання міжклітинної адгезії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Marshall K.C. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces / K.C. Marshall, R. Stout, R. Mitchell // J. Gen. Microbiol. – 1971. - V.68. - P. 337–348.
2. Carnazza S. New advances in cell adhesion Technology / S. Carnazza // Nanoparticles and Nanodevices in Biological Applications, Lecture Notes in Nanoscale science and technology / Stefano Bellucci (Ed.) – V4. – New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009. – V. 4. – P. 69 – 130. – ISBN 978–3–540–70943–5.
3. Israelachvili J. Intermolecular and Surface forces / J. Israelachvili // 3rd ed. – Burlington: Academic Press, 2011. – 674 p. – ISBN 978 – 0–12–375182–9.
4. Bell G.I. Models for the specific adhesion of cells to cells / G.I. Bell // Science. – 1978. – V. 200. – P.618–627.
5. Petelska A. D. The effect of contrast medium SonoVue on the electric charge density of blood cells/ A.D. Petelska, J.R. Janica, J.Kotynska, U.Lebkowska, Z.A. Figaszewski //J. Membrane Biol. – 2012. – V.245. – P.15–22.
6. Anikieieva M.O. Surface charge of erythrocytes and lactobacilli *S. thermophilus* and their intercellular adhesion depend on the concentration of bivalent cations / M.O. Anikieieva, S.L. Rozanova, S.Ye.Kovalenko, I.F. Kovalenko, O.I. Gordiyenko, E.O. Gordiyenko // Journal of Adhesion Science and Technology. – 2015. – V.29, №10. – P.1039-1045.
7. Анікеєва М.О. Вплив катіонів Ca^{2+} і Mg^{2+} на поверхневий заряд еритроцитів і лактобактерій *S. thermophilus* та їх адгезійну взаємодію / М.О. Анікеєва, С.Л. Розанова, С.Є. Коваленко, О.І. Гордієнко, Є.О. Гордієнко // Доповіді Національної академії наук України. – 2015. – №1. – С.159–165. / Anikjejeva M.O. Vplyv kationiv Ca^{2+} і Mg^{2+} na poverhnevuj zarjad erytrocytiv i laktobakterij *S. thermophilus* ta i'h adgezijnu vzajemodiju / M.O. Anikjejeva, S.L. Rozanova, S.Je. Kovalenko, O.I. Gordijenko, Je.O. Gordijenko // Dopovidi Nacional'noi' akademii' nauk Ukrai'ny. – 2015. – №1. – S.159–165.

УДК 577.322

НАНОКОМПОЗИТНІ МАТЕРІАЛИ НА ОСНОВІ ГІДРОКСИПАТИТУ ТА АЛЬГІНАТУ НАТРІЮ: СИНТЕЗ І ХАРАКТЕРИСТИКА**О.О. Мартинюк^{1*}, Л.Б. Суходуб², Л.Ф. Суходуб¹**¹Сумський державний університет МОН України, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007, Україна;

e-mail: martinyuk2010@yandex.ua

²ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечнікова АМН України», вул. Пушкінська, 14/16, м. Харків, 61057, Україна

Надійшла до редакції 10 червня 2015 року

Прийнята 29 червня 2015 року

Дана робота присвячена розробці та оптимізації методу синтезу апатит-біополімерних наноструктурованих композитних матеріалів для медичного використання з різним співвідношенням полімерної (альгінат натрію, АН) та неорганічної (гідроксиapatит, ГА) фаз та дослідженню їх властивостей. Методами ІЧ-Фур'є спектроскопії, рентгенівської дифрактометрії та просвічуючої електронної мікроскопії (ПЕМ) охарактеризовані склад, структура та морфологія зразків. Визначені пористість, ступінь набухання та *in vitro* реакція на біоактивність у фізіологічному розчині отриманих композитів. Інструментальними методами підтверджено формування в присутності альгінату натрію фази гідроксиapatиту голчатої структури із середнім розміром кристалітів 23 нм з одночасним утворенням біополімерної матриці за рахунок взаємодії позитивно заряджених іонів кальцію (Ca^{2+}) і негативно заряджених карбоксильних груп (COO^-). Зміна рН фізіологічного розчину в присутності досліджуваних зразків свідчить про їх біоактивність.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: наноккомпозити, гідроксиapatит, альгінат натрію, рентгенівська дифрактометрія, ІЧ спектроскопія, просвічуюча мікроскопія.

NANOCOMPOSITE MATERIALS BASED ON HYDROXYAPATITE AND SODIUM ALGINATE: SYNTHESIS AND CHARACTERISTICS**O.O. Martynuk^{1*}, L.F. Sukhodub¹, L.B. Sukhodub²**¹Sumy State University MES of Ukraine, Rimsky-Korsakov St., 2, Sumy, 40007, Ukraine;²SI "Institute of Microbiology and Immunology, the Mechnikov I.I. AMS of Ukraine", Pushkinska St., 14/16, Kharkiv, 61057, Ukraine

This work is devoted to the development and optimization of the synthesis method of nanostructured biopolymer-apatite composite materials for medical applications with different ratios of polymer (sodium alginate, SA) and inorganic (hydroxyapatite, HA) phases and research their properties. Composition, structure and morphology of the samples by FTIR spectroscopy, X-ray diffraction and transmission electron microscopy (TEM) were characterized. Porosity, degree of swelling and *in vitro* response on bioactivity in physiological solution obtained composites were determined. The formation in the presence of sodium alginate hydroxyapatite phase with needle structure and average crystallite size 23 nm with simultaneous formation biopolymer matrix due to the interaction of positively charged calcium ions (Ca^{2+}) and negatively charged carboxyl groups (COO^-) by instrumental method was confirmed. The pH changing of physiological solution in the presence of samples testifies their bioacti.

KEY WORDS: nanocomposites, hydroxyapatite, sodium alginate, x-ray diffraction, infrared spectroscopy, transmission microscopy.

НАНОКОМПОЗИТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИПАТИТА И АЛЬГИНАТ НАТРИЯ: СИНТЕЗ И ХАРАКТЕРИСТИКА**О.О. Мартинюк^{1*}, Л.Ф. Суходуб¹, Л.Б. Суходуб²**¹Сумской государственной университет МОН Украины, ул. Римского-Корсакова, 2, г. Сумы, 40007, Украина;²ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечнікова АМН України», ул. Пушкінська, 14/16, г. Харків, 61057, Україна

Данная работа посвящена разработке и оптимизации метода синтеза апатит-биополімерных наноструктурированных композитных материалов для медицинского использования с различным соотношением полимерной (альгінат натрия, АН) и неорганической (гідроксиapatит, ГА) фаз и

исследованию их свойств. Методами ИК-Фурье спектроскопии, рентгеновской дифрактометрии и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) охарактеризованы состав, структура и морфология образцов. Определены пористость, степень набухания и *in vitro* реакция на биоактивность в физиологическом растворе полученных композитов. Инструментальными методами подтверждено формирование в присутствии альгината натрия фазы гидроксиапатита игольчатой структуры со средним размером кристаллитов 23 нм с одновременным образованием биополимерной матрицы за счет взаимодействия положительно заряженных ионов кальция (Ca^{2+}) и отрицательно заряженных карбоксильных групп (COO^-). Изменение pH физиологического раствора в присутствии исследуемых образцов свидетельствует об их биоактивности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нанокompозиты, гидроксиапатит, альгинат натрия, рентгеновская дифрактометрия, ИК спектроскопия, просвечивающая микроскопия.

Дослідження, розробка та виробництво матеріалів для медичних імплантатів є актуальною проблемою сучасного медичного матеріалознавства впродовж останнього десятиліття. Багато наукових робіт присвячено розробці та оптимізації методик отримання кальцій-фосфатних матеріалів із заданим складом та властивостями, близькими до нативної кісткової тканини. Розробки матеріалів на основі нанокристалічних фосфатів кальцію проводять у двох напрямках: нанокристалічна кераміка та композиційні матеріали з біополімерними матрицями, армованими наночастинками фосфатів.

Загальновідомо, що кісткова тканина людини (КТЛ) являє собою складний композиційний матеріал з організованою на декількох рівнях мікроструктурою, що володіє унікальними механічними властивостями. Основними складовими кісткової тканини є колаген типу I $\sim 20\%$, мінеральна фаза – кальцій дефіцитний ГА ($\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$) $\sim 60\%$, вода $\sim 9\%$, неколагенові білки $\sim 3\%$, залишок – полісахариди, ліпіди [1]. ГА – найбільш відповідний керамічний матеріал, який може бути використаний в якості заміни дефектних кісток і зубів завдяки його біосумісності, біоактивності, остеокондуктивності, нетоксичності [2-5].

Біологічний апатит формується за допомогою утворення зародків кристалізації на макромолекулах колагену і їх подальшого зростання за рахунок іонного транспорту та осадження з рідини організму [6]. Кристали ГА мають форму пластинок довжиною $\sim 40-60$ нм, шириною $\sim 20-30$ нм і товщиною $\sim 1,5-5$ нм та орієнтовані паралельно осі колагенової фібрили. Нанокристали ГА володіють двома найважливішими для фізіології кісткової тканини якостями: знаходяться в динамічній рівновазі з біологічним оточенням в циклі ремоделювання (резорбції / мінералізації) і виявляють високий рівень механічних властивостей [7]. Нанокристалічний ГА має підвищену здатність адсорбувати білки, необхідні для життєдіяльності клітин, володіє вибірковістю по відношенню до функцій клітин, що утворюють кісткову і фіброзну тканини [8].

Оскільки природна кісткова тканина є композиційним матеріалом, що складається з ГА, колагену та інших білків, то значні перспективи для підвищення механічних властивостей ГА-кераміки, призначеної для виготовлення кісткових імплантатів, має принцип формування композиційних структур з великою кількістю клінічних застосувань [9-11]. Таким чином, формування нанорозмірних частинок ГА у полімерному скефолді наближує за структурою отримані матеріали до КТЛ та сприяє їх більш ефективній імплантації. В якості органічної складової був обраний альгінат натрію – природний аніонний полімер, отриманий переробкою бурих морських водоростей, який володіє високою біосумісністю зі сполучною тканиною, низькою токсичністю, здатністю підсилювати регенеративні процеси при загоюванні ран, здатністю біодеградувати з утворенням сполук, що мають хемотаксисну активність до фіброblastів та остеобlastів [12, 13].

Композитні матеріали для медичного використання в залежності від призначення можуть бути виготовлені в різних лікарських формах (гелі, суспензії, порошки, гранули), які залежать, в тому числі, від вмісту біополімеру. Тому метою даної роботи було створення наноструктурованих апатит-біополімерних композитів з різним співвідношенням органічної та неорганічної компонент, дослідження їх властивостей і вивчення впливу полімеру на формування кристалів кальцій-фосфатної фази.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріали

Кальцій нітрат тетрагідрат ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), гідрофосфат амонію ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), гідроксид амонію (NH_4OH) класифікації «ХЧ», «Мерск»; натрію альгінат (Е401) молекулярною масою 15 кДа, Китай.

Синтез ГА/АН композитів

При синтезі були використані водні розчини 0,167 М кальцій нітрату тетрагідрату (Р1) та 0,1 М гідрофосфату амонію (Р2). Альгінат натрію розчиняли в $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ в сушильній шафі при температурі 37°C протягом 1 доби (Р3). Для утворення композиту розчин Р1 додавали по краплях до суміші Р3. Реакцію синтезу проводили при температурі 80°C, значення рН=12 реакційної суміші досягали додаванням 25 % водного розчину NH_4OH . Суміш зберігали при температурі навколишнього середовища (27°C) протягом 24 годин, після чого утворений осад багаторазово промивали дистильованою водою до рН~7,4 та відділяли за допомогою центрифуги. Отримували гелеподібну субстанцію вологістю 90 %. Для подальших досліджень продукт висушували при 37°C та прожарювали при 900°C протягом 1 години з подальшим подрібненням. Було підготовлено 5 типів зразків з наступним масовим співвідношенням ГА до натрію альгінату: 4:1 (зразок №1), 3:2 (зразок №2), 1:1 (зразок №2), 2:3 (зразок №4), 4:1 (зразок №5). Розрахунок проводили виходячи із кількості теоретично утворюваного ГА в результаті реакції синтезу. Для проведення аналізу з використанням інструментальних досліджень було підготовлено по три зразка кожного типу, а результати аналізів усереднені.

Структурні дослідження

Структура отриманих зразків була визначена методом рентгенівської дифракції на автоматизованому дифрактометрі ДРОН-3 (НПП «Буревестник», Росія). Система автоматизації ДРОН заснована на мікропроцесорному контролері, який забезпечує управління гоніометром ГУР-8 та передачу даних в цифровому вигляді на ПК. При дослідженні використовувалось випромінювання $\text{CuK}\alpha$ (довжина хвилі 0,154 нм), фокус по Бреґу-Брентано- 2θ (2θ – брегівський кут). Величини струму та напруги складали 20 мА та 40 кВ відповідно. Дослідження зразків проводилося в режимі безперервної реєстрації (швидкість 4°/хв.), діапазон кутів 2θ від 10° до 60°. Результати експерименту передаються безпосередньо в програмний пакет підтримки експерименту DifWin-1 (ТОО «Эталон ПТЦ») для попередньої обробки. Ідентифікація кристалічних фаз проводилась за допомогою картотеки JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards).

Розміри кристалітів розраховували за формулою Шеррера:

$$L = \frac{K\lambda}{\beta_m \cos\theta},$$

де L – розмір кристаліту, K – коефіцієнт форми (приймаємо $K = 1$), β_m – інтегральна ширина профілю дифракційної лінії.

Рівень мікрореформацій ε вимірюється як зміна міжплощинної відстані досліджуваного зразка у порівнянні з еталоном, в якому мікрореформації відсутні. Якщо фізичне розширення дифракційних ліній відбувається лише через мікрореформації кристалічної решітки, то рівень мікрореформацій визначається за наступною формулою:

$$\varepsilon = \frac{\beta_n}{4 \operatorname{tg} \theta},$$

де β_n – інтегральна ширина дифракційного профілю, фізичне розширення в якому відбувається лише через мікрореформації кристалічної решітки.

Просвічуюча електронна мікроскопія

Електронно-мікроскопічні дослідження структури і фазового складу зразків проводилось з використанням просвічуючого електронного мікроскопу ПЕМ-125К (ВАТ «Selmi», Україна) при роботі у світлопольному та мікродифракційному режимі без введеної селекторної діафрагми. Прискорююча напруга складала 90 кВ.

Для розміщення об'єктів у предметній площині об'єктивної лінзи ПЕМ використовувались опорні сітки з міді (30×30 мкм) та нікелю (50×50 мкм). Оскільки об'єкти мали розміри менші за отвори сітки, вони розміщувались на тонких, прозорих для електронів, суцільних плівках вуглецю товщиною 20 нм. Дані зразки наносились на опорну сітку з плівкою вуглецю, попередньо закріплену в об'єктотримачі, завдяки диспергації суспензії ультразвуковим методом. Суспензія отримувалась методом розчинення гелю (порошку) дистильованою водою.

ІЧ спектроскопія

Спектри ГА/АН композитів були отримані за допомогою інфрачервоної спектроскопії (ІЧ). Дослідження проводили на інфрачервоному спектрометрі на основі Фур'є перетворення Agilent Cary 63 FTIR (компанія Agilent Technologies, США), в якому застосовується сучасний метод ідентифікації молекулярних сполук і їх кількісного аналізу. Промені від ІЧ-джерела світла проходять через зразок і падають на детектор, який вимірює поглинання світла зразком. Величина поглинання дозволяє точно ідентифікувати молекулярну структуру зразка та визначити кількість речовини в суміші. Спектри поглинання були виміряні в діапазоні $4000\text{-}500 \text{ см}^{-1}$.

In vitro дослідження

Біоактивність досліджуваних зразків визначали за зміною значення рН фізіологічного розчину (SBF), який за складом та концентрацією компонентів наближений до сировотки крові людини: Na^+ – 142 мМ, K^+ – 5 мМ, Mg^{2+} – 1,5 мМ, Ca^{2+} – 2,5 мМ, Cl^- – 148,8 мМ, HCO_3^- – 4,2 мМ, HPO_4^{2-} – 1,0 мМ, SO_4^{2-} – 0,5 мМ, рН=7,4 [14]. Зразки композитів однакової маси були занурені в розчин SBF об'ємом 5 мл та витримані в термошафі з постійною температурою 37°C протягом 7 днів. Вимірювання рН здійснювалося щоденно за допомогою рН-метра рН-150МІ.

Вимірювання пористості та набухання композитів

Для визначення пористості отриманих композитних матеріалів зразок масою m_0 поміщали в мірний циліндр з відомим об'ємом етанолу (V_1) і витримували протягом

30 хв. Об'єм етанолу з зануреним зразком відповідає V_2 . Потім зразок, в пори якого проник етанол, витягували з циліндра, зважували (m_1) і визначали об'єм спирту, що залишився (V_3).

Пористість (Π) розраховували за формулою [15]:

$$\Pi = \frac{m_1 - m_0}{\rho_{em} \cdot (V_2 - V_3)} \cdot 100\%$$

де $\rho_{ет}$ – густина етанолу.

Рівноважний ступінь набухання композитних матеріалів вивчали ваговим методом. Для цього висушені зразки заливали надлишком фізіологічного розчину і ставили в термошафу при заданій температурі. Через 24 години зразки діставали, фільтрувальним папером видаляли надлишок рідини з поверхні та зважували з точністю до четвертого знаку.

Розрахунок рівноважного ступеня набухання Q проводили за формулою:

$$Q = \frac{m - m_0}{m_0}$$

де m_0 – маса сухого зразку, г; m – маса зразку, що набухнув до рівноважного стану, г.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Рентгенофазовий аналіз

Рентгенограми ГА/АН композитів, висушених при 37°C, наведені на рис. 1. Рентгенівські спектри підтверджують формування кристалітів гідроксиапатиту в присутності альгінату. Всі піки на рентгенівських дифрактограмах зразків №1-4 (a-d) ідентифікуються як стехіометричний ГА № 9-432 згідно з базою даних JCPDS, окрім зразку №5 (e), в якому із-за низького ступеню кристалічності, в результаті впливу альгінату натрію, відсутня чітка ідентифікація піків і його скоріше можна віднести до аморфного кальцій фосфату.

Значення мікродеформацій та розмір кристалітів, розрахований за допомогою рівняння Шеррера, наведені в таблиці 1. Мікродеформації зразків № 1-4 майже не відрізняються між собою, окрім зразка №5, в якому вказана величина збільшується в 2 рази в площині (112). Розмір кристалітів ГА зменшується із збільшенням кількості альгінату, введеного в реакційну систему при синтезі. Крім того, у всіх зразках спостерігається зміщення базового піку високої інтенсивності (211) для чистого ГА до більш високого значення 2θ (112) тобто, від $2\theta = 31,88^\circ$ до $32,04^\circ$ для ГА у складі композиту. Це можливо через вплив стиснення полімерних матриць через міжфазні зв'язки [16]. Вказані зміни у спектрах свідчать про вплив АН на формування ГА.

Для подальшого дослідження та контролю наявності додаткових фаз зразки були прогріті при 900°C протягом 1 години, оскільки при такій температурі відбуваються процеси рекристалізації та фазового розпаду, що може призвести до утворення інших кальцій-фосфатних фаз [17]. Результати дослідження, наведені на рис. 2 та в табл. 2 показують, що єдиною фазою після прожарювання у всіх зразках був висококристалічний стехіометричний ГА (JCPDS №09-0432), але у зразку №5 ступінь кристалічності значно менший. Відпал полімеру після прожарювання призводить до збільшення середнього розміру кристалітів від 23 до 68 нм в зразках № 1-4 та від 18 до 39 нм в зразку №5. Для порівняння, після прожарювання при 900°C чистого ГА,

синтезованого без полімеру, середній розмір кристалітів складає 23 нм. Таке збільшення розмірів кристалітів свідчить про більш високий ступінь агломерації наночастинок, утворених при синтезі ГА в присутності полімеру, завдяки їх високій реакційній здатності. Середнє значення мікродеформацій у зразках, синтезованих в присутності полімеру (№1-5) складає 0,0025 та є значно меншим в порівнянні зі значенням мікродеформації чистого ГА, яке становить 1,197 [17].

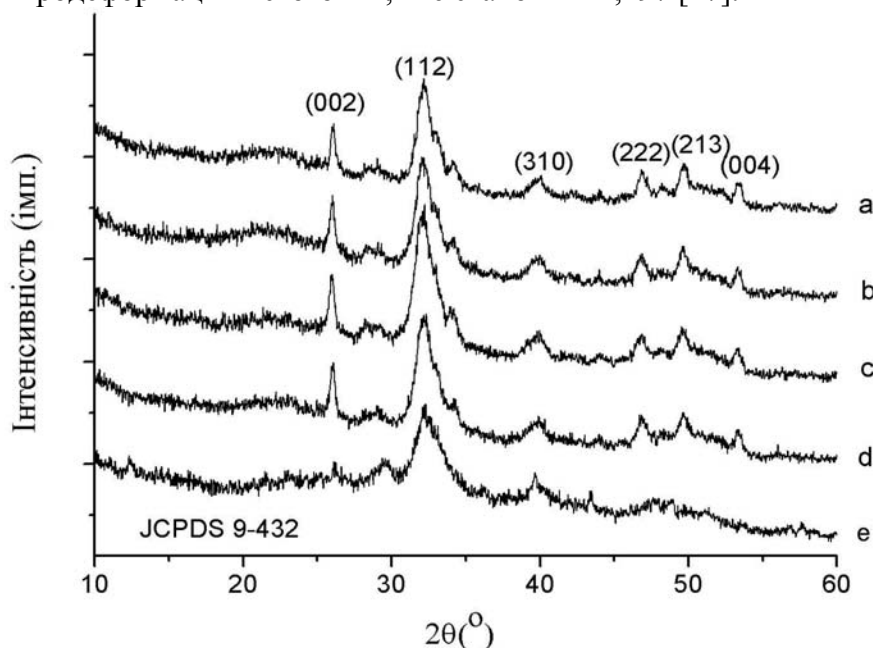


Рис. 1. Рентгенограми зразків ГА/АН 4:1 (а), ГА/АН 3:2 (b), ГА/АН 1:1 (с), ГА/АН 2:3 (d), ГА/АН 1:4 (е), висушених за температури 37 °С

Таблиця 1
Розміри кристалітів ГА в композитному матеріалі ГА/АН, висушених при 37°С

Зразок	Індекс Міллера	Розмір кристалітів за Шеррером, нм	Мікродеформації, $\cdot 10^3$
ГА/АН 4:1 (№ 1)	(002)	28	0,006
	(112)	9	0,015
ГА/АН 3:2 (№ 2)	(002)	23	0,007
	(112)	9	0,015
ГА/АН 1:1 (№ 3)	(002)	22	0,007
	(112)	12	0,011
ГА/АН 2:3 (№ 4)	(002)	25	0,007
	(112)	7	0,019
ГА/АН 1:4 (№ 5)	(002)	18	0,009
	(112)	5	0,026

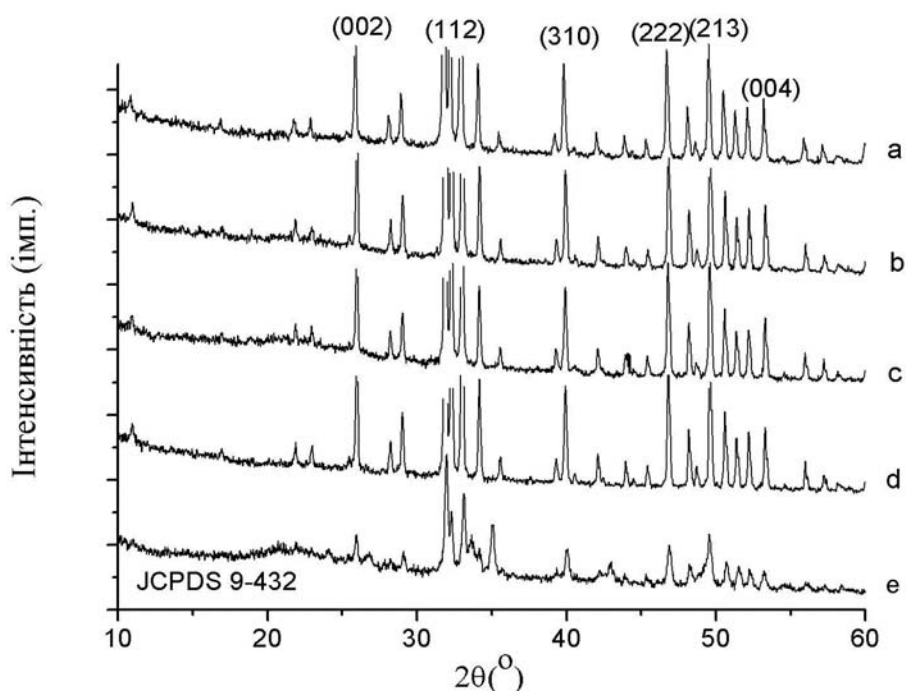


Рис. 2. Рентгенограми зразків ГА/АН 4:1 (а), ГА/АН 3:2 (b), ГА/АН 1:1 (с), ГА/АН 2:3 (d), ГА/АН 1:4 (е), після відпалу за температури 900°C

Таблиця 2

Розміри кристалітів ГА після відпалу зразків при 900°C протягом 1 години

Зразок	Індекс Міллера	Розмір кристалітів за Шеррером, нм	Мікродеформації, $\cdot 10^3$
ГА/АН 4:1 (№ 1)	(002)	68	0,0025
	(112)	51	0,0027
ГА/АН 3:2 (№ 2)	(002)	66	0,0026
	(112)	53	0,0026
ГА/АН 1:1 (№ 3)	(002)	67	0,0025
	(112)	52	0,0026
ГА/АН 2:3 (№ 4)	(002)	63	0,0027
	(112)	51	0,0027
ГА/АН 1:4 (№ 5)	(002)	39	0,0044
	(112)	34	0,004

Інфрачервона спектроскопія

ІЧ спектри альгінату натрію та композитних матеріалів зображені на рис.3. Чистий альгінат представлений двома характеристичними абсорбційними смугами з вершинами при 1592 см^{-1} , що відповідає асиметричним валентним коливанням COO^- груп, та 1406 см^{-1} , що відноситься до симетричних валентних коливань COO^- груп, та

перекриваються з коливаннями С-Н зв'язків в метилових групах. С-Н коливання також спостерігаються при 2923 cm^{-1} . Адсорбційна смуга з піком 1026 cm^{-1} та невеликими «плечами» при 1082 cm^{-1} та 1128 cm^{-1} відповідає С-О-С коливанням, С-О та ОН коливанням у вторинних спиртових групах відповідно. Коливання 1298 cm^{-1} відповідає коливанням С-О карбосильних кислот. Широка смуга біля 3192 cm^{-1} належить валентним коливанням ОН груп [18].

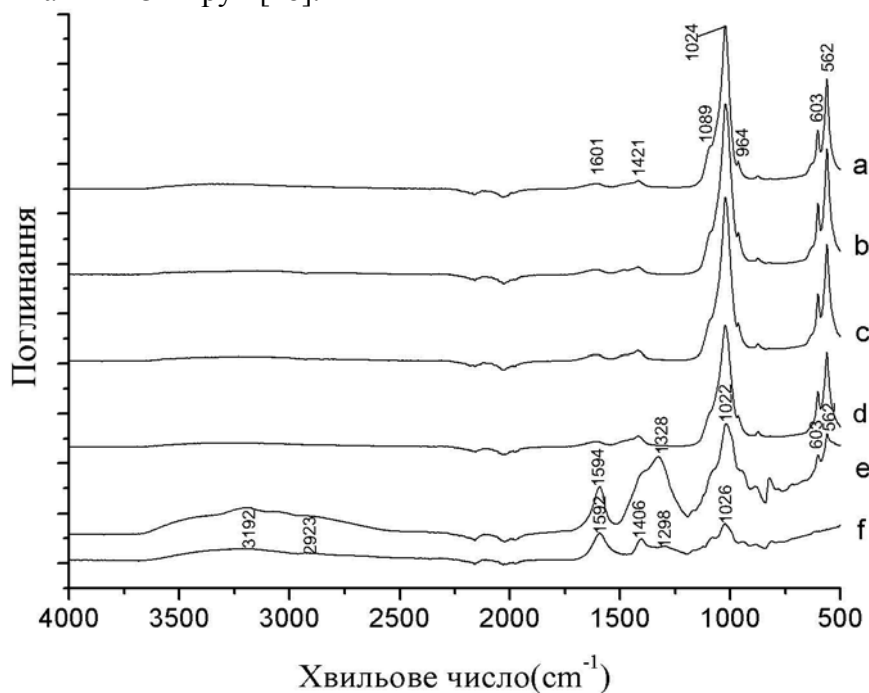


Рис. 3. ІЧ спектри ГА/АН 4:1 (а), ГА/АН 3:2 (б), ГА/АН 1:1 (с), ГА/АН 2:3 (д), ГА/АН 1:4 (е), АН (ф)

У всіх зразках синтезованого композитного матеріалу ГА/АН з'являються нові піки коливань груп PO_4^{3-} : антисиметричні коливання ν_4 при $562, 603\text{ cm}^{-1}$ [19] та симетричні коливання ν_1 при 964 cm^{-1} [20], які перекриваються з смугою С-О-С коливань альгінату та ν_3 асиметричними коливаннями Р-О ($1039\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$) [11]. Про це свідчить «плече» при 1089 cm^{-1} . Інтенсивність піків при $1022\text{-}1024\text{ cm}^{-1}$ значно зростає у всіх спектрах композиту ГА/АН порівняно зі спектром чистого альгінату, а інтенсивність коливань COO^- груп (1592 та 1406 cm^{-1}) значно знизилась зі зсувом в бік менших хвильових довжин у спектрах a,b,c,d. Коливання у спектрі зразка з найбільшим вмістом альгінату (е) є близькими до спектру чистого альгінату. Однак, коливання при 1592 cm^{-1} у спектрі чистого альгінату, які відповідають асиметричним коливанням COO^- груп, виявилися зсунутими до 1594 cm^{-1} та більш інтенсивними у спектрі композитного матеріалу. Відбувся зсув адсорбційної смуги С-О-С коливань з 1026 cm^{-1} до 1020 cm^{-1} , інтенсивність цих коливань зростає втричі. Пік 1406 cm^{-1} у чистому альгінаті є зсунутим до 1328 cm^{-1} у випадку композиту, його інтенсивність та ширина також значно збільшилися порівняно зі спектром чистого альгінату. Інтенсивність піків, які відповідають коливанням фосфатних груп $562, 603\text{ cm}^{-1}$ навпаки знизилась. Останній факт свідчить про зменшення долі кальцій фосфатної сполуки у композитному матеріалі та значний вплив альгінату на формування та ступінь росту кристалів ГА.

Зсув та збільшення інтенсивності основних коливань у спектрі композитного матеріалу свідчить про формування хімічних зв'язків між мінеральною фазою та

органічною компонентою шляхом взаємодії між позитивним зарядом іонів кальцію та негативним зарядом карбоксильних груп в альгінаті натрію [21]. Наявність міжмолекулярної взаємодії між неорганічним мінералом та хімічним ланцюгом альгінату в полімерному середовищі забезпечує контрольовану нуклеацію та ріст кристалітів неорганічної фази [22], що і підтверджується результатами аналізу методом рентгенівської дифракції.

Провічуюча електронна мікроскопія

Зображення ПЕМ зразків № 1-5 наведені на рис. 4.

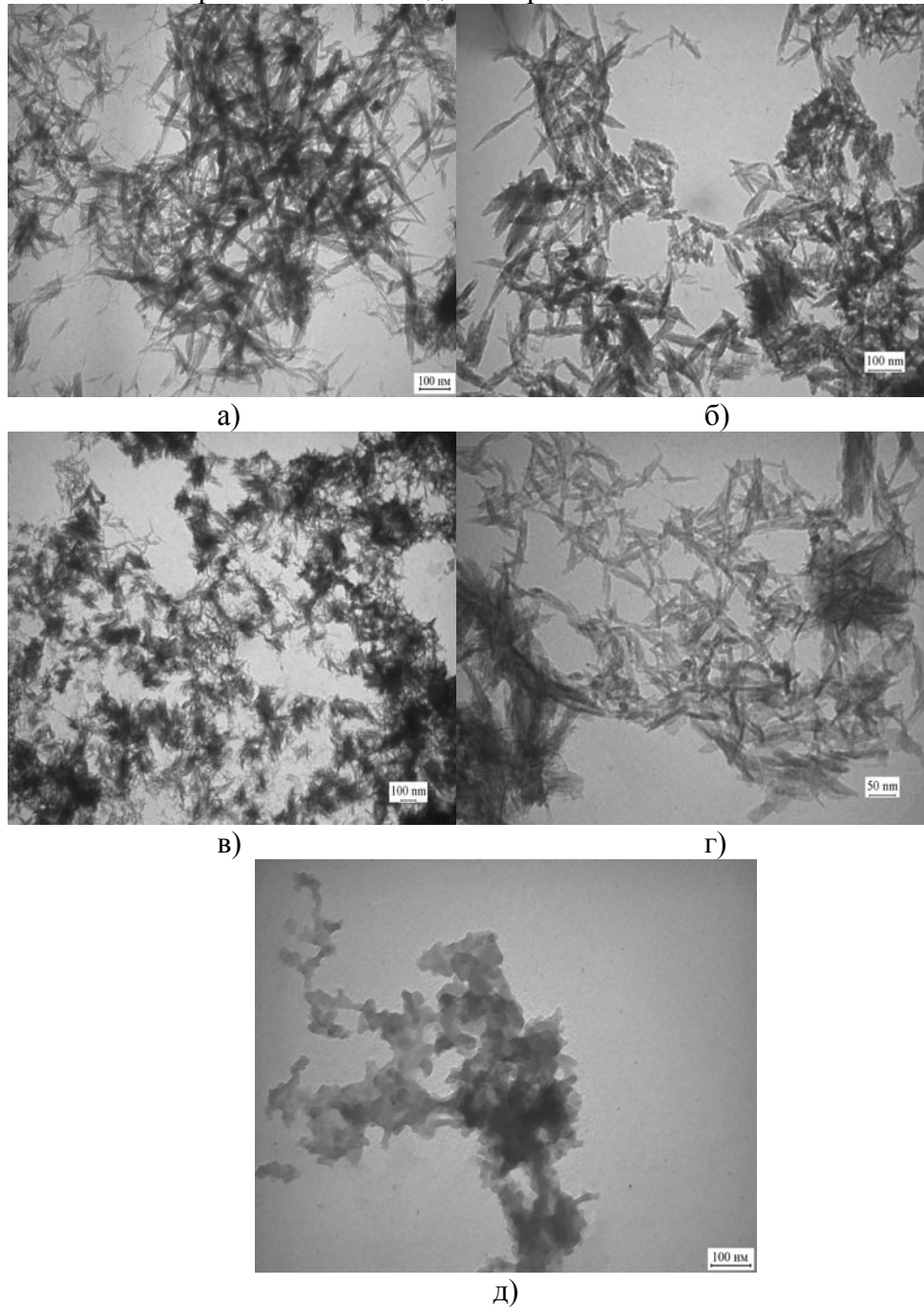


Рис. 4. ПЕМ зображення водних суспензій ГА/АН 4:1 (а), ГА/АН 3:2 (б), ГА/АН 1:1 (в), ГА/АН 2:3 (г), ГА/АН 1:4 (д)

Знімки ПЕМ демонструють голчасту структуру частинок гідроксиапатиту у складі композитного матеріалу у зразках № 1-4 (рис. 4 а-г). Збільшення кількості полімеру при синтезі (рис. 4 д) призводить до зміни форми кристалітів, утворення наночастинок ГА, оточених полімерною оболонкою. Із зображень ПЕМ видно, що зі збільшенням вмісту альгінату натрію в реакційній суміші під час синтезу композитного матеріалу відбувається зменшення розміру частинок від 120 нм (№ 1) до 50 нм (№ 4). ПЕМ зразка № 5 з найбільшим вмістом альгінату демонструє зміну форми і зменшення розмірів кристалітів ГА.

Дослідження біоактивності *in vitro*

Вивчення біоактивності *in vitro* ГА/АН композитів (рис. 5) було проведено шляхом дослідження зміни рН розчину SBF, в якому знаходились зразки біокompозитного матеріалу протягом 7 днів. Початкове значення рН фізіологічного розчину складало 7,46. Дослідження показали, що значення рН контрольного розчину SBF (без композитного матеріалу) залишалось сталим протягом всього періоду спостереження. У присутності експериментальних зразків протягом перших трьох діб відбувалося зниження рН розчину SBF з поступовим підвищенням цього значення з четвертої доби і до кінця спостереження. Очевидно, зниження рН відбувається в результаті формування ГА на поверхні зразка з іонів Ca^{2+} та OH^- , присутніх в розчині SBF. Після збіднення розчину на вказані іони відбувається зворотній процес розчинення утвореного кальцій-фосфату. При цьому відбувається зв'язування іонів H^+ з іонами PO_4^{3-} , що призводить до збільшення значення рН середовища [23]. Даний факт підтверджує високу біоактивність ГА/АН композитного матеріалу у фізіологічному середовищі.

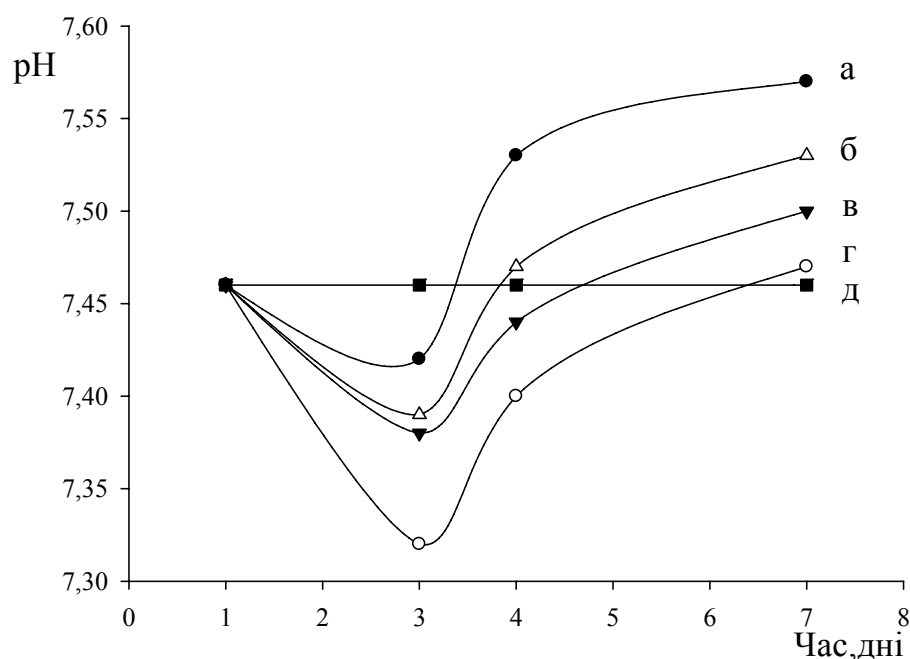


Рис. 5. Дослідження біоактивності композиційних матеріалів *in vitro*: а) зразок ГА/АН 4:1, б) зразок ГА/АН 3:2, в) зразок ГА/АН 2:3, г) зразок ГА/АН 1:1, д) розчин SBF

Пористість та набування композитів

Було проведено вивчення ступеня набування та пористості досліджуваних зразків № 1-4 (табл. 3). Зразок № 5 не був досліджений, оскільки знаходився у вигляді

стабільної емульсії з рівномірним розподілом дисперсної фази (наночастинки ГА) у дисперсійному середовищі. Даний факт не дозволив підготувати тверду форму зразка для дослідження вказаних характеристик.

Таблиця 3

Значення пористості та набухання синтезованих композитних матеріалів

Зразок	Пористість, %	Набухання, %
ГА/АН 4:1 (№ 1)	83±0,38*	105±0,33
ГА/АН 3:2 (№ 2)	41±0,28	117±0,42
ГА/АН 1:1 (№ 3)	38±0,36	130±0,57
ГА/АН 2:3 (№ 4)	35±0,43	221±0,39

* відмінності статистично значимі ($p \leq 0,05$).

Набухання отриманих зразків відбувається за рахунок полімеру та пористості матеріалу. Виходячи з даних таблиці можна сказати, що більшу частку в набухання зразків ГА/АН 3:2, ГА/АН 1:1, ГА/АН 2:3 вносить полімерна складова, оскільки ступінь набухання в декілька раз перевищує пористість матеріалу, окрім зразка ГА/АН 4:1, набухання якого в більшій мірі відбувається за рахунок пористості. Серед усіх досліджених зразків найвищим ступенем набухання володіє зразок ГА/АН 2:3 за рахунок найбільшого вмісту полімеру. Отриманий результат зменшення пористості у зразках зі збільшенням вмісту альгінату є прогнозований, оскільки дослідженню пористості проводилось на виготовлених у кубічній формі та висушених при 37°C зразках, а доданий полімер надає висушеному зразку більш щільної структури.

ВИСНОВКИ

В даній роботі були синтезовані апатит-біополімерні наноструктуровані композитні матеріали для медичного використання з різним співвідношенням полімерної (альгінат натрію) та неорганічної (гідроксиапатит) фаз. Рентгенівські спектри підтверджують формування кристалітів гідроксиапатиту в присутності альгінату натрію, розмір яких зменшується із збільшенням кількості альгінату, введеного в реакційну систему при синтезі. Вивчення морфології синтезованих нанокompозитів показало утворення кристалітів ГА голчатої форми з розміром частинок від 50 (№ 4) до 120 (№ 1) нм. У випадку зразка № 5 відбувається утворення наночастинок ГА (розмір кристалітів < 20 нм) в полімерній оболонці, які знаходяться у вигляді стабільної емульсії. Методами рентгенівської дифракції та ІЧ спектроскопії підтверджено міжмолекулярну взаємодію між ГА і АН. Наявність міжмолекулярної взаємодії між неорганічним мінералом та хімічним ланцюгом альгінату забезпечує контрольовану нуклеацію та ріст кристалітів неорганічної фази. Про біоактивність утворених композитних матеріалів свідчить зміна рН розчину SBF із досліджуваними зразками. Дослідження пористості та ступеня набухання показує, що зі збільшенням вмісту полімерної складової пористість композитних матеріалів зменшується, а ступінь набухання збільшується. Це дослідження являє собою платформу для подальших досліджень ГА/АН композитів для біомедичних застосувань.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Materials in particulate form for tissue engineering. Applications in bone / G.A. Silva, O.P. Coutinho, P. Ducheyne, R.L. Reis // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2007. – V. 1., № 2. – P. 97–109.
2. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite / R. Murugan, S. Ramakrishna // Biomaterials. – 2004. – V. 25. – P. 3829–3835.
3. Sacrificial bonds heal bone. Nature / J. Currey // Biomaterials. – 2001. – V. 414. – P. 699–708.

4. Reassessment of long-term use of dense HA as dental implant: case report / M. Ogiso // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 1998. – V. 43, № 3. – P. 318–320.
5. Biomimetically synthesized polymer-hydroxyapatite sheet like nano-composite / S. Nayar, A.K. Pramanick, B.K. Sharma, G. Das, B. Ravi Kumar, A. Sinha // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2008. – V. 19, № 1. – P. 301–304.
6. Relationships between polyphosphate chemistry, biochemistry and apatite biomineralization / S.J. Omelon, M.D. Grynpsas // *Chem. Rev.* – 2008. – V. 108. – P. 4694–4715.
7. Hydroxyapatite / bioactive glass films produced by a sol–gel method: in vitro behavior / N.C. Koseoglu, A. Buyukaksoy, A.Y. Oral, M.H. Aslan // *Adv. Eng. Mater.* – 2009. – V. 11, № 11. – P. B194– B199.
8. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools / H. Liu, T.J. Webster // *Biomaterials*. – 2007. – V. 28, № 2. – P. 354– 369.
9. Development of nano-sized hydroxyapatite reinforced composites for tissue engineering scaffolds / J. Huang, Y. Wan Lin, X. Wei Fu, S.M. Best [et al.] // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2007. – V. 18. – P. 2151–2157.
10. Performance of adhesive bone cement containing hydroxyapatite particles / S. Morita, K. Furuya, K. Ishihara, N. Nakabayashi // *Biomaterials*. – 1998. – V. 19. – P. 1601–1606.
11. Synthesis and characterization of grafted nanohydroxyapatites using functionalized surface agents / S. Haque, I. Rehman, J.A. Darr // *Langmuir*. – 2007. – V. 23. – P. 6671–6676.
12. Hydroxyapatite-alginate biocomposite promotes bone mineralization in different length scales in vivo / F.L. DePaula, I.C. Barreto, M.H. Rocha-Leao [et al.] // *Frontiers of Materials Science in China*. – 2009. – V. 3. – P. 145–153.
13. Synthesis and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite / collagen / alginate composite / S.M. Zhang, F.Z. Cui, S.S. Liao, Y. Zhu, L. Han // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2003. – V. 14. – P. 641–645.
14. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W / T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 1990. – V. 24. – P. 721-734.
15. Chemical synthesis and characterization of hydroxyapatite (HAp)-poly (ethylene co vinyl alcohol) (EVA) nanocomposite using a phosphonic acid coupling agent for orthopedic applications / N. Pramanik, S. Mohapatra, P. Bhargava [et al.] // *Mater. Sci. Eng. C*. – 2009. – V. 29. – P. 228–236.
16. Development of nanocomposites based on hydroxyapatite/sodium alginate: synthesis and characterization / M. Rajkumar, N. Meenakshisundaram, V. Rajendran // *Materials Characterization*. – 2011. – V. 62, N 5. – P. 469–479.
17. Структурні та субструктурні особливості апатит-біополімерних композитів: порівняння даних рентгенівської дифракції та просвічуючої електронної мікроскопії з електронною дифракцією / В.М. Кузнецов, Л.Б. Суходуб, Л.Ф. Суходуб // *Журнал нано- та електронної фізики*. – 2014. – Т. 6, № 4. – С. 04039-1-04039-6. / Strukturni ta substrukturni osoblivosti apatit-biopolimernih kompozitiv: porivnjannja danih rentgeniv's'koї difrakcii ta prosvichujuchoї elektronnoї mikroskopii z elektronnoju difrakcieju / V.M. Kuznecov, L.B. Suhodub, L.F. Suhodub // *Zhurnal nano- ta elektronnoї fiziki*. – 2014. – Т. 6, № 4. – С. 04039-1-04039-6.
18. Mineralization of Chitosan scaffolds with nano-apatite by double diffusion technique / I. Manjubala, S. Sheler, Jorg Bossert, Klaus D. Jandt // *Acta biomaterialia*. – 2006. – V. 2, № 1. – P. 75-84.
19. A novel ordered nanohydroxyapatite coating electrochemically deposited on titanium substrate / R. Hu, C.J. Lin, H.Y. Shi // *J. Biomed. Mater. Res. A*. – 2007. – V. 80. – P. 687–692.
20. An alternative chemical route for the synthesis and thermal stability of chemically enriched hydroxyapatite / D. Choi, P.N. Kumta // *J. Am. Ceram. Soc.* – 2006. – V. 89. – P. 444–449.
21. In situ processing and properties of nanostructured hydroxyapatite/alginate composite / L. Wang, Y. Li, C. Li // *J. Nanopart. Res.* – 2009. – V. 11. – P. 691–699.
22. The crystallization of hydroxyapatite in the presence of sodium alginate / P. Malkaj, E. Pierri, E. Dalas // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2005. – V. 16. – P. 733–737.
23. Synthesis and characterization of hydroxyapatite/b-tricalcium phosphate nanocomposites using microwave irradiation / A. Farzadi, M. Solati-Hashjin, F. Bakhshi, A. Aminian // *Ceramics International*. – 2011. – V. 37. – P. 65 – 71.

УДК 546.65-022.532:5773352.5

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ОРТОВАНАДАТОВ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ И ОКСИДА ЦЕРИЯ НА БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В МИТОХОНДРИЯХ ГЕПАТОЦИТОВ

Аверченко Е.А.^{1*}, Кавок Н.С.¹, Никитченко Ю.В.², Клочков В.К.¹,
Малюкина М.Ю.¹, Климов С.А.¹, Ткачева Е.Н.³, Ефимова С.Л.¹

¹ Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины, пр. Ленина 60, Харьков, 61001, Украина
Тел: +380573410332

e-mail: averchenko@isma.kharkov.ua

² Научно-исследовательский институт биологии ХНУ им. В.Н. Каразина, пл. Свободы 4, Харьков, 61077, Украина

³ Одесский национальный политехнический университет, пр. Шевченко 1, Одесса, 165044, Украина

Поступила в редакцию 12 мая 2015 года

Принята 25 мая 2015 года

Исследованы особенности влияния новосинтезированных наночастиц (НЧ) на основе редкоземельных элементов, а именно ортованадатов и оксида церия, с различными геометрическими параметрами на митохондриальный потенциал ($\Delta\Psi_m$) и процессы дыхания и окислительного фосфорилирования печени. Снижение $\Delta\Psi_m$ под воздействием НЧ ортованадатов и CeO_2 (1-2 нм), а так же уровня АТФ в изолированных митохондриях свидетельствует о том, что энергетические процессы в митохондриях являются мишенью при действии НЧ. Наибольший ингибирующий эффект проявляли экстремальные сферические (ортованадатные и CeO_2 размером 1-2 нм) частицы, и только CeO_2 размером 8-10 нм не оказывал негативного влияния на все исследуемые показатели.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: редоксактивные наночастицы, митохондриальный потенциал, митохондриальное дыхание.

ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК НА ОСНОВІ ОРТОВАНАДАТІВ РІДКІСНОЗЕМЕЛЬНИХ ЕЛЕМЕНТІВ ТА ОКСИДУ ЦЕРІЮ НА БІОЕНЕРГЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ В МІТОХОНДРІЯХ ГЕПАТОЦИТІВ

Аверченко К.А.^{1*}, Кавок Н.С.¹, Нікітченко Ю.В.², Клочков В.К.¹, Малюкіна М.Ю.¹, Клімов С.А.¹,
Ткачева О.М.³, Єфімова С.Л.¹

¹ Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України, пр. Леніна 60, Харків, 61001, Україна

² Науково-дослідний інститут біології ХНУ ім. В.Н. Каразіна, пл. Свободи 4, Харків, 61077, Україна

³ Одеський національний політехнічний університет, пр. Шевченка 1, Одеса, 65044, Україна

Досліджено особливості впливу новосинтезованих наночастинок (НЧ) на основі рідкісноземельних елементів, а саме ортованадатів та оксиду церію, з різними геометричними параметрами на митохондриальний потенціал ($\Delta\Psi_m$) та процеси дихання та окисного фосфорилування печінки. Зниження $\Delta\Psi_m$ під впливом НЧ ортованадатів та CeO_2 (1-2 нм), а також рівня АТФ в ізольованих митохондріях свідчить про те, що енергетичні процеси в митохондріях є мішенню при дії НЧ. Найбільший пригнічуючий ефект демонстрували екстремалі сферичні (ортованадатні та CeO_2 розміром 1-2 нм) частинки, і тільки CeO_2 із розміром 8-10 нм не виявив негативного впливу на всі досліджені показники.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: редоксактивні наночастинок, митохондриальний потенціал, митохондриальне дихання.

INFLUENCE OF RARE-EARTH BASED ORTHOVANADATE NANOPARTICLES AND CERIUM OXIDE ON BIOENERGETIC PROCESSES IN MITOCHONDRIA OF HEPATOCYTES

Averchenko K.A.¹, Kavok N.S.¹, Nikitchenko Yu.V.², Klochkov V.K.¹, Malyukina M.Yu.¹, Klimov S.A.¹,
Tkacheva E.N.³, S.L. Yefimova¹

¹ Institute for Scintillation Materials National Academy of Sciences of Ukraine, 60 Lenin Ave., Kharkiv, 61001, Ukraine

² Research institute of Biology V.N. Karazin National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61077, Ukraine

³ Odessa national polytechnic university, 1 Shevchenko Ave., Odessa, 65044, Ukraine

The features of influence of newly synthesized nanoparticles (NPs) based on the rare earth elements, namely orthovanadates and cerium oxide, with the different geometrical parameters on the mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) and respiration and oxidative phosphorylation of the liver were investigated. Reduction of $\Delta\Psi_m$, as well as the ATP level in isolated mitochondria under influence of orthovanadates and CeO₂ (1-2 nm) NPs suggests that energy processes in the mitochondria are the target of the action of NPs. The highest inhibitory effect was shown by ekstrasmall spherical (orthovanadate and CeO₂ of 1-2 nm) particles and only CeO₂ with sizes of 8-10 nm have no a negative influence on all investigated parameters.

KEY WORDS: redoxactive nanoparticles, mitochondrial potential, mitochondrial respiration.

Наночастицы (НЧ) на основе редкоземельных элементов (РЗЭ) имеют значительный потенциал для биомедицинского применения [1]. Была продемонстрирована возможность их использования для различных биологических целей, охватывающих различные области молекулярной и клеточной биологии в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Наличие оптических свойств НЧ, легированных РЗЭ, может быть использовано для получения различных типов изображений [2,3]. Перспективные фотофизические свойства таких НЧ включают в себя высокую фотостабильность, отсутствие мерцания, узкие эмиссионные линии, большие времена жизни. К преимуществам НЧ этой группы относятся также относительная нетоксичность, способность находиться в водных растворах в коллоидном состоянии и легкость функционализации, которая позволяет провести сочетание наноразмерного носителя с различными биологически активными молекулами и функциональными группами. Сообщалось о получении многофункциональных ванадатных НЧ, легированных РЗЭ, которые могут использоваться в качестве люминесцентных зондов, оксидантных сенсоров с пространственно-временным измерением, и контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии [4].

Особое внимание уделяется изучению редоксактивности НЧ. С управляемой редоксактивностью связывают перспективу использования НЧ на основе РЗЭ в качестве оксидантных сенсоров [5] или в качестве ловушек свободных радикалов [6]. Особое внимание исследователей привлекает диоксид церия. Нестехиометрия церия в нанокристаллическом состоянии дает возможность его участия в различных окислительно-восстановительных процессах, в частности, в инактивации некоторых из наиболее токсичных активных форм кислорода (АФК), таких как пероксид водорода, супероксидный и нитроксильный радикалы. Однако некоторыми исследователями выявлен ряд отрицательных эффектов НЧ данного типа – цитотоксических и проапоптических [7,8]. Более того, указывается, что токсические эффекты НЧ оксида церия могут реализоваться через развитие оксидативного стресса. Необходимо также учитывать роль АФК в регуляции физиологических и биохимических процессов. Они выполняют функцию меж- и внутриклеточных мессенджеров, регуляторов и составляющих метаболических процессов, являясь самым первым и наиболее мобильным звеном в адаптационной перестройке организма при экстремальных воздействиях. Поэтому влияние редоксактивных НЧ может приводить к изменениям или даже нарушениям тех или иных звеньев регуляторного механизма.

Свободные радикалы играют важную роль в транспорте электронов в дыхательной цепи. Интеграция редоксактивных НЧ в процессы переноса электронов может сопровождаться нарушениями функционального состояния митохондрий, приводить к окислительному дисбалансу и клеточной гибели. Митохондрии являются целевыми органеллами и главной токсической мишенью даже при воздействии НЧ, демонстрирующих в различных системах антиоксидантные свойства. При этом цитотоксичность реализуется через митохондриальную недостаточность, связанную с открытием митохондриальной поры, митохондриальной деполяризацией и

торможением синтеза АТФ на ранней стадии, окислению восстановленного глутатиона (GSH) и тиоловых групп белков, и перекисного окисления липидов через окислительный стресс на более позднем этапе [9].

Характеристики, которые определяют реакционную активность наноматериалов – это их размер, химический состав, методы получения и синтеза, наличие функциональных химических групп на поверхности, форма и радиус кривизны поверхности, ее гетерогенность и наличие пор, гидрофильность/гидрофобность. В биологических системах действие всех этих составляющих дополняется особенностями биологических реакций, и оценка редоксактивности НЧ и индуцированных изменений окислительного баланса в живых системах должна проводиться на разных структурных уровнях и в динамике развития процесса. Митохондриальный потенциал ($\Delta\Psi_m$) является показателем не только митохондриальной активности, но и функционального состояния клеток в целом. Установление взаимосвязи между редоксактивностью НЧ и их способностью изменять $\Delta\Psi_m$, а значит и процессы клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования и степень их сопряжения, необходимо для решения вопроса о механизмах действия НЧ на митохондриальные процессы и разработки стратегии управляемого воздействия частиц. Применение наноматериалов с управляемой редоксактивностью для восстановления окислительного гомеостаза имеет значительные перспективы для коррекции состояний, связанных с окислительным дисбалансом.

В данной работе исследовалась способность редоксактивных НЧ на основе ортованадатов редкоземельных элементов различной формы и размеров – сферической, веретеноподобной и стержнеподобной, а так же CeO_2 сферической формы, с размерами 1-2 нм и 8-10 нм, влиять на $\Delta\Psi_m$ гепатоцитов, интенсивность дыхания и окислительного фосфорилирования в изолированных митохондриях печени крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез водных растворов ортованадатов редкоземельных элементов $n\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (Re = Gd, Y, La) и оксида церия был выполнен согласно методам, описанным ранее [2, 3, 10]. Сферические НЧ размером 1-2 нм имеют состав $\text{Gd}_{0,6-0,8}\text{Y}_{0,1-0,3}\text{VO}_4:\text{Eu}^{3+}_{(0,1)}$, веретеноподобные (25×8 нм) – $\text{Gd}_{0,9}\text{VO}_4:\text{Eu}^{3+}_{(0,1)}$, стержнеподобные (57×6-8 нм) – $\text{La}_{0,9}\text{VO}_4:\text{Eu}^{3+}_{(0,1)}$.

Известно, что НЧ в биологических матриксах имеют тенденцию к агрегации, поэтому было проведено исследование влияния среды инкубации клеток (среда ИГЛА, с 10% эмбриональной сывороткой, pH=7,4) на распределение НЧ по размерам и ζ -потенциал с помощью прибора ZetaPALS/BI-MAS (Brookhaven Instruments Corporation, США). Распределение НЧ по размерам определяли методом динамического рассеяния света (ДРС) (длина волны излучения лазера 659 нм) при угле рассеяния 90°. Измерения проводили в специальной полистирольной кювете (BI-SCP). Перед началом измерений исследуемые растворы термостатировали при температуре 25°C. При концентрации НЧ в исследуемых растворах 0,05 г/л, значения ζ -потенциала НЧ в среде ИГЛА незначительно снижаются за счет содержащихся в среде неорганических электролитов [10]. Изменений распределения фракций по размерам и коагуляции НЧ в среде ИГЛА не наблюдалось.

Флуоресцентный анализ клеток был выполнен с помощью JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarboxyanine iodide), как описано в [10,11]. Гепатоциты были выделены из печени крыс – самцов популяции Вистар с массой тела 180-200 г согласно методу, описанному ранее [12] и в соответствии с Международными принципами «Европейской конвенции о защите позвоночных

животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986), одобренными III Национальным конгрессом Украины по биоэтике (Киев, 2007). Инкубацию клеток с красителем JC-1 (10^{-6} М) проводили в среде Игла рН=7,4 при концентрации $5 \cdot 10^5$ кл/мл не менее 60 мин. Затем 50 мкл исходного раствора НЧ (с концентрацией 1 г/л) соответствующего типа добавили к соответствующему образцу и инкубировали в течение 24 ч. При этом конечная концентрация НЧ в инкубационной среде составила 0,05 г/л. Наблюдение и фотографирование клеток осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа Olympus IX71 (Токуо, Japan) и цифровой камеры Olympus C-5060 (Токуо, Japan). Для мономеров красителя JC-1 полоса возбуждения составляла 450-490 нм, полоса люминесценции 500 нм и выше. Для агрегатов эти параметры составляли – 510-560 нм и 570 нм и выше, соответственно. Оценивали интегральную яркость клеток, нормализованную по отношению к фону. Данные усреднены из ~ 25-30 клеток на подложке для каждого исследованного образца. Результаты выражены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего из 4-5 независимых экспериментов.

Выделение митохондрий печени. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования [13] в модификации [14] из гомогената печени (соотношение навески ткани и объема среды выделения – 1:7). Состав среды выделения: 0,3 М сахараза, 1 мМ трилон Б, 10 мМ трис-НСl, рН=7,4. Фракцию МХ получали с одной или двумя промывками в среде выделения без трилона Б; в этой же среде суспендировали и конечный осадок. После выделения изолированные митохондрии (с концентрацией белка $41,89 \pm 0,85$ мг/мл,) ресуспендировали в 0,1 М трис-буфере, рН=7,4. Затем были добавлены НЧ (с конечной концентрацией в образцах – 0,05 г/л), и образцы инкубировались при 25°C в течение 20 мин., после чего были помещены в лед. Инкубация митохондрий с НЧ при 25°C в течение 20 необходима для развития эффектов частиц. Необходимо отметить, что никаких отличий в функциональном состоянии митохондрий между контрольными образцами (без НЧ), пребывавшими при 25°C 20 мин., и контрольными образцами также без НЧ, которые находились на льду в течение всего эксперимента, не наблюдалось.

Измерение люминол - зависимой хемилюминесценции (ХЛ) проводилось так же, как описано в [15]. Реакционная среда содержала реактив Фентона: 0,05 М трис-буфер рН=7,4, 50 мкМ люминол, 10 мкМ Fe^{2+} . Реакция активировалась 1,35 мМ пероксидом водорода. Спектры ХЛ измерялись с помощью хемилуминометра Lum-5773 (Россия). Светосумму и интенсивность вспышки ХЛ измеряли в течение 5 мин.

Полярографическое измерение дыхания и окислительного фосфорилирования. Дыхание митохондрий определяли с помощью закрытого кислородного электрода Кларка [15] в термостатируемой ячейке (30°C) в реакционной среде следующего состава: 150 мМ сахараза, 75 мМ КСl, 10 мМ KH_2PO_4 , 2 мМ $MgCl_2$, 10 мМ трис-НСl, рН=7,4, 0,6 – 1,2 мг белка в 1 мл. Субстраты окисления, глутамат+малат, вносили в концентрациях по 4 мМ. Концентрация вносимого АДФ составляла 400 мкМ. Дополнительные добавки в полярографическую ячейку в зависимости от типа измеряемой активности: ЭГТА – 1 или 2 мкМ, БСА (обезжиренный, V фракция) – 1 мг/мл. По кривым потребления кислорода рассчитывали скорости дыхания митохондрий в метаболических состояниях 2 и 3 по Чансу (V_2 и V_3), дыхательный контроль (ДК, V_3/V_2).

Определение уровня АТФ. АТФ определяли с помощью экзогенных гексогеназы и глюкозо-6-фосфата по методу [16], описанному в [17].

Определение содержания белка. Содержание белка в исследуемых образцах определяли по методу Бредфорда [18].

В случае измерения ХЛ, уровня АТФ и полярографических исследований данные усреднены из 5 идентичных повторов для каждого исследованного образца. Результаты выражены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего из 4-5 независимых экспериментов.

Необходимо отметить, что при проведении всех вышеперечисленных экспериментов каждый вариант воздействия сравнивали со своим контролем. Результаты статистически обработаны с помощью программного обеспечения Statistika v. 5.0 (StatSoft, США) и Origin 6.1 (Origin Lab Corporation, США), используя t-критерий Стьюдента. Полученные результаты статистически значимо отличаются при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в наших экспериментах с помощью ХЛ мы показали, что, в зависимости от микроокружения, НЧ демонстрируют различные эффекты [19]. В абиотической системе все частицы в независимости от материала, формы и размера демонстрируют антирадикальную активность. В биотических же системах (гомогенат печени или изолированные гепатоциты) экстрамалые НЧ – сферические ортованадатные и CeO_2 размером 1-2 нм – активируют дополнительную генерацию свободных радикалов и пероксидацию липидов, и только CeO_2 8-10 нм сохраняет антирадикальную активность. Поскольку митохондрии являются основным источником и основной целью АФК [20], ожидаемо, что способность НЧ стимулировать или угнетать интенсивность свободнорадикальных процессов так же будет фактором их влияния на митохондриальную функцию.

С помощью ХЛ мы обнаружили, что в изолированных митохондриях сферические ортованадатные НЧ проявляют прооксидантный эффект (Рис. 1). Мы предполагаем, что благодаря экстремальным размерам данные НЧ непосредственно взаимодействуют с мембраной митохондрий, и, повреждая её, вызывают дисфункцию митохондриальных пор, синтеза АТФ, что приводит к нарушениям в балансе производимых митохондриями АФК.

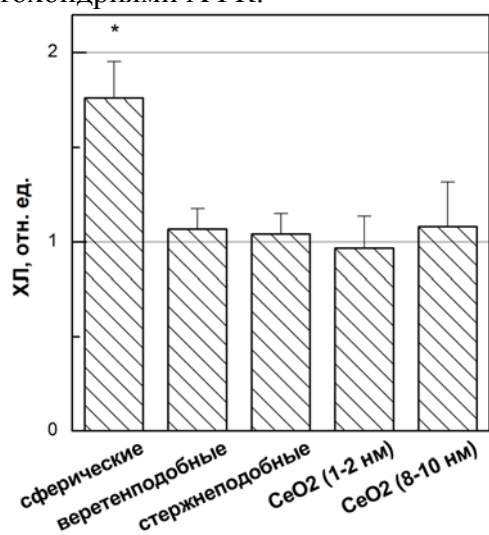


Рис. 1. Воздействие НЧ на изолированные митохондрии по показателю ХЛ (* $p < 0.05$ по сравнению с контролем)

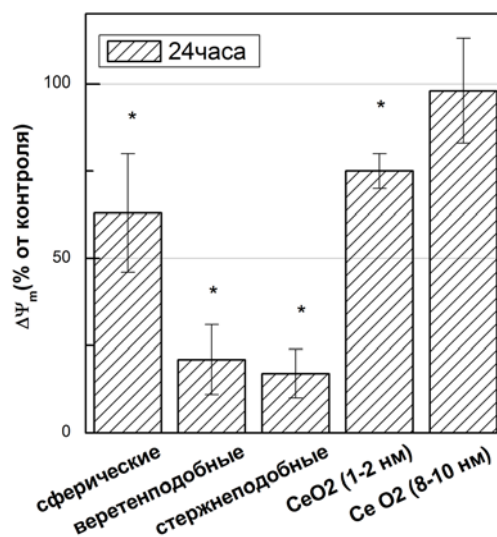


Рис. 2. Изменение митохондриального потенциала при воздействии НЧ через 24 ч (* $p < 0.05$ по сравнению с контролем)

Дальнейшее исследование влияния НЧ на митохондриальный потенциал с помощью JC-1 показало, что через 24 ч. наблюдается значительное падение флуоресценции J-агрегатов (Рис. 2), что свидетельствует о снижении энергизации мембраны митохондрий, следствием чего может быть аномальная продукция АФК и развитие окислительного дисбаланса в клетках. В случае экстремальных частиц CeO_2 также происходило падение $\Delta\Psi_m$, но в отличие от всех типов ортованадатных НЧ, значительно менее выраженное.

Для более детального изучения механизма действия НЧ исследовали их влияние непосредственно на процессы дыхания изолированных митохондрий. Определяли следующие показатели: ДК, который представляет собой соотношение скорости фосфорилирующего дыхания в состоянии V_3 и скорости субстратного дыхания в состоянии V_2 , и характеризует степень сопряжения процессов дыхания и окислительного фосфорилирования, а так же уровень АТФ в митохондриях после воздействия НЧ.

В данных экспериментальных условиях при действии сферических ортованадатных НЧ наблюдалось лишь незначительное снижение ДК (Рис. 3 а). Это объясняется относительно одинаковым по степени ингибированием скоростей V_2 и V_3 частицами данного типа (по сравнению с контролем V_2 снижается в 2,5 раза, а V_3 – почти в 3,5 раза). Веретеноподобные и стержнеподобные частицы не оказывали существенного влияния на ДК. CeO_2 размером 8-10 нм также не влияет на ДК. Однако при воздействии всех типов НЧ ортованадатов и малых частиц CeO_2 уровень АТФ в митохондриях снижен (Рис. 3 б), причем больше всего это снижение выражено у экстремальных сферических частиц – ортованадатов и CeO_2 .

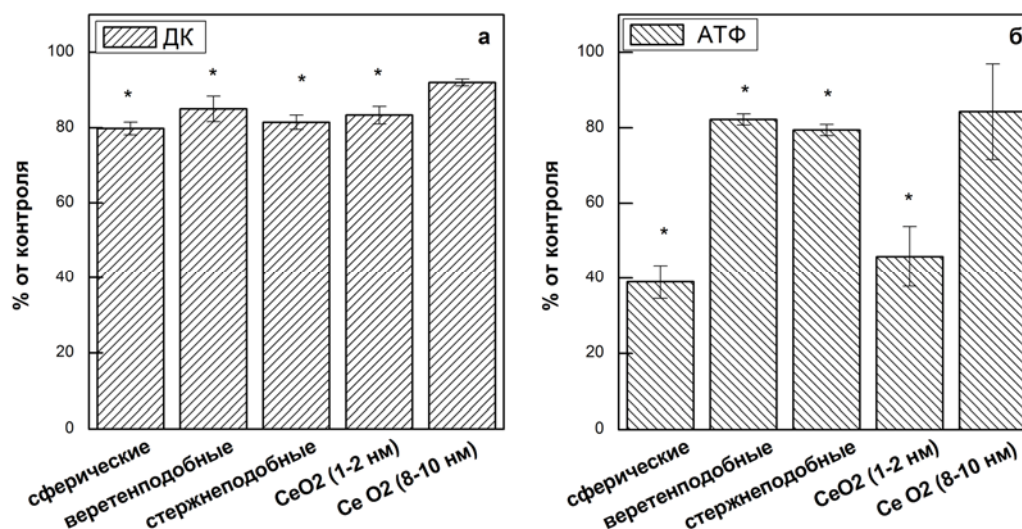


Рис. 3. Влияние НЧ на основные показатели изолированных митохондрий: а - дыхательный контроль; б - концентрация АТФ (* $p < 0.05$ по сравнению с контролем)

Наблюдаемые эффекты могут быть связаны с редоксактивностью НЧ и их способностью непосредственно вмешиваться в электрон-транспортные процессы в качестве ловушек или генераторов свободных радикалов. Также в случае ванадатных частиц эффект может быть обусловлен частичным высвобождением из кристаллов анионов ванадата и их структурным сходством с ионами фосфата. Ванадат – ингибитор дыхательной цепи митохондрий, окисляющих глутамат и сукцинат, а также может быть конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы и митохондриальных АТФаз

[21,22]. Для малых сферических частиц, как ортованадатов, так и диоксида церия, нельзя исключать также возможности проникновения в митохондрии, механического повреждения мембран вследствие их малых размеров и высокой склонности к агрегации.

То, что почти все НЧ, за исключением CeO_2 размером 8-10 нм, подавляют митохондриальное дыхание, подтверждают данные, полученные с помощью зонда JC-1 и свидетельствуют о том, что биоэнергетические процессы в митохондриях являются мишенью при действии исследуемых НЧ.

ВЫВОДЫ

Наибольшее подавление $\Delta\Psi_m$ клеток и процессов дыхания изолированных митохондрий происходит в разной степени при воздействии исследуемых НЧ, исключая диоксид церия размером 8-10 нм. Супрессирующий эффект ортованадатных НЧ на $\Delta\Psi_m$ может частично определяться влиянием ионов, которые высвобождаются с поверхности частиц при метаболических превращениях в клетках, и сходством фосфатов и ванадатов, а в эффектах в случае CeO_2 , наоборот, значение может иметь способность к образованию комплексов с фосфатами. Найденные регуляторные особенности действия НЧ на митохондриальную активность являются основанием и важным шагом для следующих этапов исследования частиц с целью их медицинского применения в качестве диагностических агентов или компонентов лекарственных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bouzigues C. Biological applications of rare-earth based nanoparticles / C. Bouzigues, Th. Gacoïn, A. Alexandrou // ACS Nano. – 2011. – V. 5 (11). – P. 8488-8505.
2. Характеристики зольей $n\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (Re = La, Gd, Y, Sm) с наночастицами разной формы и размеров. В.К. Клочков, А.В. Григорова, О.О. Седых, [и др.] // ЖПС. – 2012. – 79(5). – С. 738-742. /Harakteristiki zolej $n\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (Re = La, Gd, Y, Sm) s nanochasticami raznoj formy i razmerov. V.K. Klochkov, A.V. Grigorova, O.O. Sedyh, [i dr.] // ZhPS. – 2012. – 79 (5). – S. 738-742.
3. The influence of agglomeration of nanoparticles on their superoxide dismutase-mimetic activity / V.K. Klochkov, A.V. Grigorova, O.O. Sedyh, Y.V. Maljukin // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2012. - V. 409 – P. 176-182.
4. Multifunctional rare-Earth vanadate nanoparticles: luminescent labels, oxidant sensors, and MRI contrast agents / M. Abdesselem, M. Schoeffel, I. Maurin, [et al] // ASC Nano. – 2014. – V. 8 (11). – P. 11126-37.
5. Single europium-doped nanoparticles measure temporal pattern of reactive oxygen species production inside cells / D. Casanova, C. Bouzigues, T. Nguyen, [et al] // Nat Nanotechnol. – 2009. – V. 4. – P. 581-585.
6. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective / D. Schubert, R. Dargusch, J. Raitano, S.W. Chan // Biochem Biophys Res Commun. – 2006. – V. 342 (1). – P. 86-91.
7. Cerium dioxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human peripheral blood monocytes / S. Hussain, F. Al-Nsour, A. Rice, [et al] // ASC Nano. - 2012. – V. 6 (7). – P. 5820-5829.
8. Cytotoxic effects of hydroxylated fullerenes on isolated rat hepatocytes via mitochondrial dysfunction / Y. Nakagawa, T. Suzuki, H. Ishii, [et al] // Arch Toxicol. – 2011. – V. 85. – P. 1429-1440.
9. Lanthanide phosphate nanorods as inorganic fluorescent labels in cell biology research / P. Ranjan, Bh. Resham, P. Sujata, [et al] // Clinical chemistry. – 2007. – V. 53(11) – P. 2029-2031.
10. Mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) changes in single rat hepatocytes: The effect of orthovanadate nanoparticles doped with rare-earth elements / N.S. Kavok, K.A. Averchenko, V.K. Klochkov, [et al] // European Physical Journal: E Soft Matter and Biological Physics. – 2014. – V. 37 (12). – P. 127.
11. The energy-state of the hepatocytes of satiated rats, isolated with the use of EDTA and vibration / A.Yu. Petrenko, V.P. Grishuk, A.N. Sukach, [et al] // Biochemistry (Moscow). – 1989. – V. – 54 (12). – P. 1952-1955.
12. Interaction of Ca^{2+} with endoplasmic reticulum of rat liver: a standart procedure for the isolation of microsomes / S. A. Kamatch, K. A. Narayan // Anal. Biochem. – 1972. – V. – 48 (1). – P. 53 – 61.
13. Возрастные перестройки структурно-функционального состояния мембранных редокс-систем: автореф. дис. на соискание научн. степени докт. биол. наук: спец. 03.00.02 «Биофизика» / В. В. Лемешко. – Минск, 1983. – 36 с. / Vozrastnye perestrojki strukturno-funkcional'nogo sostojanija membrannyh redoks-

- sistem: avtoref. dis. na soiskanie nauchn. stepeni dokt. biol. nauk: spec. 03.00.02 «Biofizika» / V. V. Lemeshko. – Minsk, 1983. – 36 s.
14. Хемилюминесцентная диагностика свободнорадикальных процессов в абиотической системе и в клетках печени в присутствии наночастиц на основе редкоземельных элементов $n\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (Re = Gd, Y, La) и CeO_2 / Е.А. Аверченко, Н.С. Кавок, В.К. Клочков, Ю.В. Малюкин // Журнал прикладной спектроскопии. – 2014. Вып. – 81 (5). – С. 754-760. / Hemiljuminiscentnaja diagnostika svobodnoradikal'nyh processov v abioticheskoj sisteme i v kletkah pecheni v prisutstvii nanochastic na osnove redkozemel'nyh jelementov $n\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (Re = Gd, Y, La) i CeO_2 / E.A. Averchenko, N.S.Kavok, V.K. Klochkov, Ju.V. Maljukin // Zhurnal prikladnoj spektroskopii. – 2014. Vyp. – 81(5). – S. 754-760.
 15. Скулачев В.П. Аккумуляция энергии в клетке / В. П. Скулачев. – М.: Наука, 1969. – 440 с. / Skulachev V. P. Akkumuljacija jenerгии v kletke / V. P. Skulachev. – M.: Nauka, 1969. – 440 s.
 16. Lamprecht W., Trautschold I. / Methods of enzymatic analysis // W. Lamprecht, I. Trautschold - New York: Acad. Press., 1965. – P. 543-551.
 17. Методы биохимических исследований / [под ред. М.И. Прохоровой]. – Л.: ЛГУ, 1982. – 272 с. / Metody biokhimicheskikh issledovanij / [pod red. M.I. Prohorovoj]. – L.: LGU, 1982. – 272 s.
 18. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding / M.M. Bradford // Analytical Biochemistry – 1976. – V. 72. – P. 248-254.
 19. Aluminium oxide nanoparticles induce mitochondrial-mediated oxidative stress and alter the expression of antioxidant enzymes in human mesenchymal stem cells / A.A. Alshatwi, P.V. Subbarayan, E. Ramesh, [et al] // Food Addit. Contam. Part A: Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. – 2013. – V. 30 (1). – P. 1–10.
 20. Действие аналогов фосфата – арсената и ванадата – на мембранный потенциал митохондрий / Е.А. Либерман, О.Л. Мякотина, Л.М. Цофина // Биологические мембраны. – 1987. – Вып. 4 (11). – С. 1216-1220. / Dejstvie analogov fosfata – arsenata i vanadata – na membrannyj potencial mitohondrij / E. A. Liberman, O. L. Mjakotina, L. M. Cofina // Biologicheskie membrany. – 1987. – Vyp. 4(11). – S. 1216-1220.
 21. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds / D.C. Crans, J.J. smee, E. Gaidamauskas, L. Yang // Chem. Reviews – 2004. – V. – 104 (2). – P. 849-902.
 22. Interaction of vanadate with respiratory chain of rat liver and wheat seedling mitochondria / J.Z. Byczkowski, L. Zychlinski, J. Tluczkiewicz // Int. J. Biochem. – 1979. – V. 10. – P. 1007-1011.

УДК 616-006.04

**ВИБІР ПО ROC-КРИВИМ ВИРІШУВАЛЬНИХ ПРАВИЛ ДЛЯ
ДІАГНОСТИЧНИХ ТЕСТІВ****Л.В. Батюк***Харківський національний медичний університет, пр. Леніна, 4, Харків 61022, Україна
e-mail: liliya-batyuk@mail.ru*

Надійшла до редакції 9 червня 2015 року

Прийнята 26 червня 2015 року

Запропонована і обґрунтована модель вибору по ROC-кривим вирішувальних правил для діагностичних тестів та оптимальних значень діагностичних показників медико-біологічної інформації. Для оцінки якості прогнозування діагностичного тесту використовувалися стандартні критерії: чутливість і специфічність моделі, при цьому розраховувалися інтервали цих параметрів в умовах, коли кількість вірних діагнозів досягала максимуму, чутливість тесту дорівнювала специфічності, чутливість тесту в декілька разів перевершувала його специфічність. Для оцінки значущості факторних ознак і порівняння прогностичних характеристик моделей використовували метод побудови ROC-кривих та математичне моделювання. Знайдено оптимальне значення діагностичного показника при якому чутливість тесту дорівнює його специфічності. Проведена адаптація моделі до вирішення ситуації коли чутливість тесту більша за його специфічність.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ROC-крива, діагностичний тест, математична модель, чутливість тесту, специфічність тесту.

ВЫБОР ПО ROC-КРИВЫМ РЕШАЮЩИХ ПРАВИЛ ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТОВ**Л.В. Батюк***Харьковский национальный медицинский университет, пр. Ленина, 4, Харьков 61022, Украина*

Предложена и обоснована модель выбора по ROC-кривым решающих правил для диагностических тестов и оптимальных значений диагностических показателей медико-биологической информации. Для оценки качества прогнозирования диагностического теста использовались стандартные критерии: чувствительность и специфичность модели, при этом рассчитывались интервалы этих параметров в условиях, когда количество верных диагнозов достигало максимума, чувствительность теста была равна специфичности, чувствительность теста в несколько раз превосходила его специфичность. Для оценки значимости факторных признаков и сравнения прогностических характеристик моделей использовали метод построения ROC-кривых и математическое моделирование. Найдено оптимальное значение диагностического показателя, при котором чувствительность теста равна его специфичности. Проведена адаптация модели к решению проблемы, когда чувствительность теста больше его специфичности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ROC-кривая, диагностический тест, математическая модель, чувствительность теста, специфичность теста.

**DIAGNOSTIC TESTS' DECISION-MAKING RULES BASED UPON ANALYSIS OF ROC-
CURVES****L.V. Batyuk***Kharkiv National Medical University, 4 Lenina ave., 61022 Kharkiv, Ukraine*

In this paper we propose the model which substantiates diagnostics decision making based on the analysis of Receiver Operating Characteristic curves (ROC-curves) and predicts optimal values of diagnostic indicators of biomedical information. To assess the quality of the test result prediction the standard criteria of the sensitivity and specificity of the model were used. Values of these criteria were calculated for the cases when the sensitivity of the test was greater than specificity by several times, when the number of correct diagnoses was maximal, when the sensitivity of the test was equal to its specificity and the sensitivity of the test was several times greater than the specificity of the test. To assess the significance of the factor characteristics and to compare the prognostic characteristics of models we used mathematical modeling and plotting the ROC-curves. The optimal value of the diagnostic indicator was found to be achieved when the sensitivity of the test is equal to its specificity. The model was adapted to solve the case when the sensitivity of the test is greater than specificity of the test.

KEY WORDS: ROC-curve, the diagnostic test, the mathematical model, the sensitivity of the test, the specificity of the test.

Правильність або помилковість прийняття рішення лікарем залежить від отриманої інформації. Кожному з станів пацієнта відповідає функція розподілу результатів досліджуваного медичного тесту. Сучасна медична діагностика вимагає врахування значної кількості складових: спадкових генетичних факторів, середовища, вік та умови життя пацієнта та ін. [1-4]. Часто виявляється, що отримана інформація не завжди є достатньою умовою для зняття невизначеності (неконкретності, нечіткості) у виборі подальшої методики лікування, наприклад, недосвідчений лікар здатен коректно поставити діагноз менш ніж в 45% випадків на етапі діагностики, що пов'язано з тим, що деякі захворювання можна чітко диференціювати лише на певній стадії [5, 1]. Невірний діагноз шкодить здоров'ю пацієнта, і як результат, – неефективне використання людських та економічних ресурсів. Тому дуже актуальним є підбір вирішувальних правил, які допоможуть за доступними діагностичними тестами найбільш ефективним чином прийняти рішення і вибрати оптимальне лікування [6, 7, 8].

При визначенні якості тих чи інших діагностичних тестів все частіше використовується методика побудови так званих ROC-кривих (англ. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve) [9]. ROC-криві дозволяють серед тестів, що мають однакове діагностичне призначення, визначити такі, що мають переваги за критеріями чутливості та специфічності [10]. При побудові ROC-кривих визначають чутливість та специфічність тесту при різних значеннях показника (вирішувального правила), за яким досліджуваний об'єкт відноситься до однієї з двох альтернативних сукупностей (наприклад, сукупність здорових та сукупність хворих). Разом з тим, відкритим залишається питання про визначення оптимальних для використання (за тими чи іншими критеріями) значень на ROC-кривих. Мета роботи – проаналізувати питання інформативності ROC-кривих стосовно визначення вирішувальних правил та визначити для цих правил оптимальні значення діагностичних показників.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для оцінки значущості факторних ознак і порівняння прогностичних характеристик моделей використовували метод побудови ROC-кривих [11, 12] та математичне моделювання шляхом вибору точки дотику [13]. ROC-крива показує потужність діагностичного тесту, при використанні якого на вертикальну вісь проектується ймовірність істинно-позитивного результату тесту (чутливість), на горизонтальну – ймовірність помилково-позитивного результату (специфічність).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Спочатку з'ясуємо питання про те, як знайти точку ROC-кривої, у якій кількість вірних діагнозів досягає максимуму.

Нехай $Ч$ – чутливість тесту, $С$ – його специфічність, N_1 – обсяг вибірки “хворі”, N_2 – обсяг вибірки “здорові”, n – загальна кількість вірних діагнозів. Тоді

$$n = n_1 + n_2 = Ч \cdot N_1 + С \cdot N_2, \quad (1)$$

де n_1 та n_2 – кількості істинно-позитивних та істинно-негативних діагнозів.

ROC-криві – це графіки залежності величини $Ч$ від величини $X = 1 - С$. Для отримання чисельного значення клінічної значущості тесту, а також для порівняння

двох тестів, використовується показник AUROC (Area Under Receiver Operator Curve) – площа під кривою. Чим точніше тест, тим ближче площа під кривою до 1,0. В умовах, коли результати тесту пояснюються випадковістю, площа під кривою буде дорівнювати 0,5 [9]. Якщо прогностична система дуже чутлива, то зростає частота помилково-позитивних результатів (гіпердіагностика), а якщо специфічна (на шкоду чутливості), то збільшується частка помилково-негативних результатів. У систем, що забезпечують якісний прогноз, характеристичні криві витягнуті у бік верхнього лівого кута графіка (тобто відрізняються великою площею), а точка поділу розташовується в області перегину графіка в лівому верхньому кутку (рис.1). Позначимо цю залежність $\mathcal{C} = f(X)$, а вираз (1) перепишемо у вигляді

$$n = \mathcal{C} \cdot N_1 + (1 - X) \cdot N_2 = f(X) \cdot N_1 + (1 - X) \cdot N_2. \quad (2)$$

Вираз (2) визначає функціональну залежність n від X . Величина n досягає максимуму тоді, коли похідна n по X дорівнює нулю, тобто $n' = 0$. Знайдемо цю похідну

$$n' = f'(X) \cdot N_1 - N_2.$$

Тоді з умови $n' = 0$ випливає, що

$$f'(X) = \frac{N_2}{N_1}.$$

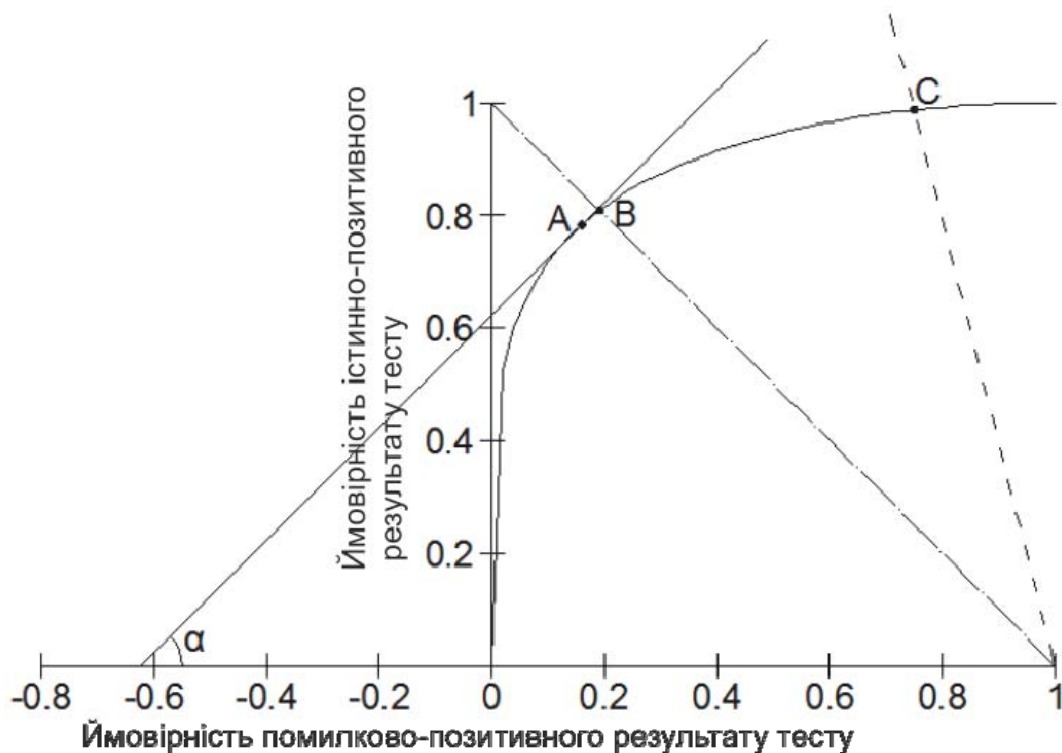


Рис. 1. ROC-крива для діагностичних тестів.

Значення похідної у певній точці графіку функціональної залежності, як відомо, чисельно дорівнює тангенсу кута, який утворює дотична до графіка функціональної залежності у цій точці з віссю абсцис. Якщо цей кут позначити α , то

$$\operatorname{tg}\alpha = f'(X) = \frac{N_2}{N_1}.$$

На рисунку суцільна пряма – це дотична до ROC-кривої, а точка дотику (точка А) – це саме та точка, у якій загальна кількість вірних діагнозів є максимальною, що може слугувати одним із вирішувальних правил для оцінювання чутливості, специфічності і прогностичної цінності позитивного і негативного результатів ефективності діагностичного тесту. На жаль, на практиці це виконується рідко, так як підвищення чутливості тесту неминуче буде супроводжуватися втратою його специфічності і, навпаки, підвищення специфічності тесту пов'язане зі зниженням його чутливості. Звідси випливає висновок: щоб створити оптимальну діагностичну систему, потрібно знайти компроміс між показниками чутливості і специфічності.

Розглянемо тепер штрих-пунктирну пряму на рис. 1. Ця пряма задовольняє рівнянню $Ч + X = 1$. Перетворюючи це рівняння легко з'ясувати, що в цьому випадку $Ч = С$. Це означає, що точка перетину ROC-кривої з штрих пунктирною лінією (точка В) є тим значенням на ROC-кривій, при якому чутливість тесту дорівнює його специфічності.

Разом з тим, досить ймовірною є ситуація, в якій лікар бажатиме, щоб чутливість тесту була в декілька (наприклад, m) разів більша за специфічність. Такій умові відповідає залежність $Ч = m(1 - X)$, графік якої при $m = 4$ показаний штриховою лінією. Точка перетину цієї лінії з ROC-кривою (точка С) дає відповідне значення тесту.

ВИСНОВКИ

Знайдені реальні розрахункові значення ROC-кривих, за допомогою яких можливо здійснити первинну обробку та аналіз наявних даних, оскільки найбільш важливі для лікарів-клініцистів висновки робляться зазвичай на основі саме первинного аналізу. Запропоновані вирішувальні правила для діагностичного тесту між показниками чутливості і специфічності, що визначають якість прогнозу. Знайдено визначення оптимального значення діагностичного показника, при якому чутливість тесту дорівнює його специфічності. Проведена адаптація моделі до вирішення ситуації коли чутливість тесту більша за його специфічність. Отриманий показник має сенс використовувати для порівняння прогностичних здібностей декількох діагностичних тестів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Рак в Україні, 2011–2012. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби: Бюл. Нац. канцерреєстру України. (2013). Київ, 2013. 14 (28). / Rak v Ukraini, 2011–2012. Zahvorjivanist', smertnist', pokaznyky dijal'nosti onkologichnoi' sluzhby. Bjul. Nac. kancerrejestru Ukrainy [Text]. – Kyi'v, 2013. – № 14 (28).
2. Plsek, P. E. The challenge of complexity in health care / P. E. Plsek, T. Greenhalgh // BMJ. - 2001. - V. 323 (7313). - P. 625-628.
3. Симанков В. С. Системный анализ и современные информационные технологии в медицинских системах поддержки принятия решений / В. С. Симанков, А. А. Халафян . - Москва: Бином Пресс, 2009. - 362 с. /Simankov V. S. Sistemyj analiz i sovremennye informacionnye tehnologii v medicinskih sistemah podderzhki prinjatija reshenij / V. S. Simankov, A. A. Halafjan . - Moskva: Binom Press, 2009. - 362 s./

4. Effects of computerized clinical decision support systems on practitioner performance and patient outcomes: a systematic review / A. X. Garg, N. K. Adhikari, H. McDonald [et al.] // JAMA. - 2005. - V. 293 (10). - P. 1223-38.
5. Wasyluk H. Support of diagnosis of liver disorders based on a causal Bayesian network model. Medical Science Monitor / H. Wasyluk, A. Onisko, M. J. Druzdzal // Medical Science Monitor. - 2001. - V. 7 (1). - P. 327-332.
6. Leape L. L. Error in medicine / L. L. Leape // JAMA. - 1994. - V. 272. - P. 1851-1857.
7. Carayon P. Patient Safety: The Role of Human Factors and Systems Engineering / P. Carayon, K. E. Wood // Stud. Health Technol. Inform. - 2010. - V. 153. - P. 23-46.
8. Vincent C. Framework for analyzing risk and safety in clinical medicine / C. Vincent, S. Taylor-Adams, V. Stanhope // BMJ. - 1998. - V. 316 (7138). - P. 1154-1157.
9. Fawcett T. An introduction to ROC analysis / T. Fawcett // Institute for the Study of Learning and Expertise, Pattern Recognition Letters. - 2006. - V. 27. - P. 861-874.
10. Петри А. Наглядная статистика в медицине / А. Петри, К. Сэбин; [пер. с англ. В. П. Леонова]. - Москва: ГЭОТАРМЕД, 2003. - 144с. /Petri A. Nagljadnaja statistika v medicine / A. Petri, K. Sjebin; [per. s angl. V. P. Leonova]. - Moskva: GJeOTARMED, 2003. - 144с./
11. Файнзильберг Л.С. Гарантированная оценка эффективности диагностических тестов на основе усиленного ROC-анализа / Л. С. Файнзильберг, Т. Н. Жук // Управляющие системы и машины. - 2009. - Т. 5. - С. 3-13. /Fajnzil'berg L.S. Garantirovannaja ocenka jeffektivnosti diagnosticheskikh testov na osnove usilenного ROC-analiza / L. S. Fajnzil'berg, T. N. Zhuk // Upravljajushhie sistemy i mashiny. - 2009. - T. 5. - S. 3-13./
12. Fawcett T. ROC Graphs: Notes and Practical Considerations for Researches / T. Fawcett. - Kluwer Acad. Publ., 2004. - 56 p.
13. Власов В. В. Эффективность диагностических исследований / В. В. Власов. - Москва: Медицина, 1988. - 245 с. /Vlasov V. V. Jefferktivnost' diagnosticheskikh issledovanij / V. V. Vlasov. - Moskva: Medicina, 1988. - 245 с./

Наукове видання

“Біофізичний вісник”

Вип. 33(1)

Збірник наукових праць

Укр. рос. та англ. мовами.

Комп’ютерне верстання Горобченко О.О.

Підписано до друку 03.07.2015. Формат 60×84 1/8.
Папір офсетний. Друк ризографічний.
Ум. друк. арк. 6,07. Обл.-вид. арк. 7,06. Тираж 100 пр.

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

Надруковано: ХНУ імені В.Н.Каразіна
61022, Харків, майдан Свободи, 4, тел. 705-24-32
Свідоцтво суб’єкта видавничої справи ДК № 3367 від 13.01.09

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Contributions written in English, Ukrainian or Russian should be sent to the Editorial Office in duplicate with electronic version as an attached file via e-mail biofiz-visnyk@karazin.ua.

By submitting a paper for publication in Biophysical Bulletin the authors imply that the material neither has been published previously nor has been submitted for publication elsewhere and that the authors have obtained all the necessary authority for publication. A manuscript should be typed in single spacing on good quality white paper (A4 format), one side only. Use the MS Word with following options 12 points Times New Roman font, text justified. Left and right margins should be 2.5 cm, upper margin should be 3.5 cm, and bottom one should be 2 cm. All pages should be numbered serially on the backside in pencil.

Mathematical and chemical symbols, equations, and formulae should be inserted in the text by computer means (MathType). Figures should be computer-generated with printed symbols labeling axes (use Origin, Mathcad et al for plotting) and should be inserted into a MS Word file as files of *.emf, *.wmf, *.jpg, *.jpeg, *.png format. The font size of figure legends should be 9 points. Formulae, tables, figures should be numbered consecutively using Arabic numerals, e.g. (1), Table 1, Fig 1.

Layout of the Manuscript

Insert UDK in the first line on the left of a first page (11 pt, Italic). Leave one line blank. The title of the paper should appear in capital letters (12 pt, bold, centered) on the fifth line. After one blank line type initials and surnames of the authors (12 pt, bold, centered). On the next line type affiliations and full addresses including e-mail addresses of the authors (10 pt, Italic, centered). Then, place the date of the paper submission month, day, year (10 pt, centered).

After one blank line place abstract (10 pt) of the paper, which should contain 1,000-1,200 symbols. The abstract should contain the brief overview of the problem; method used in the paper, and main results and conclusions. The word "Abstract" should be omitted. On the next line type 5-8 key words (10 pt, the heading "**KEY WORDS**" should be typed in bold capital letters in the beginning of the line) The text of the abstract and key words should be indented 0,5 cm from the left and right margins.

Leave one blank line and provide all mentioned below in English and after one blank line in Ukrainian (or Russian depending on the language of the manuscript). This should include: title of the paper in capital letters (10 pt, bold, centered) on the next line type initials and surnames of the authors (10 pt, bold, centered). On the next line type affiliations and full addresses including e-mail addresses of the authors (10 pt, Italic, centered). Then, place the date of the paper submission month, day, year (10 pt, centered). On the next line place abstract (10 pt) of the paper, which should contain 1,000-1,200 symbols. The word "Abstract" should be omitted. On the next line type 5-8 key words (10 pt, the heading "**KEY WORDS**" should be typed in bold capital letters in the beginning of the line) The text of the abstract and key words should be indented 0,5 cm from the left and right margins.

Then, leave one blank line before starting to type the text of the paper with following options 12 points Times New Roman font, text justified. The first line of each paragraph should be indented 0,75 cm from the left margin. It is recommended to divide the text into following sections introduction (heading of this section should be omitted), **MATERIALS AND METHODS** (obligatory for experimental studies), **RESULTS AND DISCUSSION**, **CONCLUSIONS** (headings of sections should appear in capital letters and be centered). For theoretical studies 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. Sections may be subdivided in subsections, if necessary. Subsection Headings are centered and should be bold and capitalized. Leave one blank line after every section or subsection. After headings of sections and subsections a point should be omitted. Any acknowledgement regarding support, such as names of the foundations and grant numbers should be included at the end of the text after one blank line. References to the literature should be cited in the text consecutively by Arabic numerals in square brackets. The citation of unpublished papers is prohibited. A full list of the references should be given at the end of the manuscript as a separate section according to the following pattern:

1. Pelzer G. Oxidation-reduction processes occurring in secondary ion mass spectrometry and fast atom bombardment of glycerol solutions / G. Pelzer, E. De Pauw, J. Marien // J. Phys. Chem. – 1984. – V. 88, N 21. – P. 5065–5068.
2. Photocatalytic degradation of methylene blue on nanocrystalline TiO₂: Surface mass spectrometry of reaction intermediates / H. Gnaser, M. R. Savina, W. F. Calaway [et al.] // Int. J. Mass Spectrom. – 2005. – V. 245, N 1-3. – P. 61–67.
3. Israelachvili J. Intermolecular and Surface forces / J. Israelachvili. – [3rd ed.]. – Burlington: Academic Press, 2011. – 674 p. – ISBN 978 – 0–12–375182–9.

Please, pay attention to compact organization of the manuscript.

Manuscripts that do not correspond to the instructions above will not be considered for publication.