

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

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

# Біофізичний Вісник

117

# Biophysical Bulletin

2017

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

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 37 (1) Issue**

Заснований 1998 р.

Founded in 1998

**Харків 2017 Kharkiv**

Журнал публікує статті, які містять оригінальні результати розв'язання фізико-математичних проблем, що відносяться до біологічних систем різного рівня організації, методами сучасної біології, фізики та математичного моделювання.

Для науковців, викладачів, аспірантів, студентів, що працюють у галузі біофізики та суміжних областях.

Журнал є фаховим виданням у галузі фізико-математичних та біологічних наук (Наказ МОН України № 1328 від 21.12.2015 р.).

The journal publishes articles that contain original results of physical and mathematical problems related to biological systems of various complexity levels solved with the help of modern life sciences methods and computer simulation.

Затверджено до друку рішенням Вченої ради Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна (протокол № 12 від 29 серпня 2017 р.).

#### Редакційна колегія:

головний редактор –

**Горбенко Г.П.** – д.ф.-м.н., проф., ХНУ імені В.Н. Каразіна

заступник головного редактора –

**Катрич В.О.** – д.ф.-м.н., проф., ХНУ імені В.Н. Каразіна

відповідальний секретар –

**Берест В.П.** – к.ф.-м.н., доц., ХНУ імені В.Н. Каразіна

**Баранник С.О.** – д.ф.-м.н., проф., ХНУ імені В.Н. Каразіна

**Бондаренко В.А.** – д.б.н., проф., ХНУ імені В.Н. Каразіна

**Веселовський М.С.** – д.б.н., проф., акад. НАН України,

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця, м. Київ

**Говорун Д.М.** – д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України, ІМБГ

НАН України, м. Київ

**Делігеоргієв Т.** – PhD., проф., Софійський університет, Софія,

Болгарія

**Доманов Є.О.** – PhD., завідувач відділу біофізики шкіри,

L'Oréal, Париж, Франція

**Доран О.** – PhD., проф., Університет Західної Англії, Бристоль,

Велика Британія

**Карачевцев В.О.** – д.ф.-м.н., проф.,

ФТІНТ ім. Б.І. Веркіна НАН України

**Кірілова Є.** – PhD., доцент, Даугавпілський університет,

Даугавпілс, Латвія

**Кнігавко В.Г.** – д.б.н., проф., ХНМУ

**Корнелюк О.І.** – д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України,

ІМБІГ НАН України, м. Київ

**Косевич М.В.** – д.ф.-м.н., с.н.с., ФТІНТ ім. Б.І. Веркіна

НАН України

**Малєєв В.Я.** – д.ф.-м.н., проф., ІРЕ ім. О.Я. Усикова

НАН України

**Мартиненко О.В.** – д.ф.-м.н., проф.,

ХНУ імені В.Н. Каразіна

**Осецький О.І.** – д.ф.-м.н., проф. ІПКіК НАН України

**Перський С.Е.** – д.б.н., проф., ХНУ імені В.Н. Каразіна

**Семенов М.О.** – д.ф.-м.н., проф.,

ІРЕ ім. О.Я. Усикова НАН України

**Сибірний А.А.** – д.б.н., проф., акад. НАН України,

Інститут біології клітини, м. Львів

**Сорокін В.О.** – д.ф.-м.н., проф.,

ФТІНТ ім. Б.І. Веркіна НАН України

**Стойка Р.С.** – д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України,

Інститут біології клітини, м. Львів

**Суходуб Л.Ф.** – д.ф.-м.н., проф., чл.-кор. НАН України,

Сумський державний університет

**Толсторуков М.С.** – Ph.D., Масачусетський загальноклі-

нічний госпіталь, Бостон, США

**Трусова В.М.** – д.ф.-м.н., проф., ХНУ імені В.Н. Каразіна

**Шестопалова Г.В.** – д.ф.-м.н., проф.,

ІРЕ ім. О.Я. Усикова НАН України

**Шкорбатов Ю.Г.** – д.б.н., проф., ХНУ імені В.Н. Каразіна

#### Editorial Board:

Editor-in-Chief –

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

Vice Editor-in-Chief –

**V.A. Katrich** – Dr. Sci., Prof., V.N. Karazin KhNU

Executive Secretary –

**V.P. Berest** – PhD., Associate Prof., V.N. Karazin KhNU

**E.A. Barannik** – Dr. Sci., Prof., V.N. Karazin KhNU

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

**N.S. Veselovsky** – Dr. Sci., Prof., academician of NASU,

Bogomoletz Institute of Physiology of NASU, Kiev

**D.M. Govorun** – Dr. Sci., Prof., corresponding member

of NASU, IMBG NASU, Kiev

**T. Deligeorgiev** – PhD., Prof., University of Sofia,

Sofia Bulgaria

**Ye.A. Domanov** – PhD., Head of Skin Biophysics Unit

at L'Oréal R&I, Région de Paris, France

**O. Doran** – PhD., Professor, University of the West of

England, Bristol, UK

**V.A. Karachevtsev** – Dr. Sci., Prof.,

B. Verkin ILTPI NASU

**E. Kirilova** – PhD., Associate Prof., Daugavpils

University, Daugavpils, Latvia

**V.G. Knigavko** – Dr. Sci., Prof., KhNMU

**A.I. Kornelyuk** – Dr. Sci., Prof., corresponding member

of NASU, IMBG NASU, Kiev

**M.V. Kosevich** – Dr. Sci., PI, B. Verkin ILTPI NASU

**V.Ya. Maleev** – Dr. Sci., Prof., O.Ya. Usikov IRE NASU

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

**A.I. Osetski** – Dr. Sci., Prof., IPC&C NASU

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

**M.A. Semenov** – Dr. Sci., Prof., O.Ya. Usikov IRE NASU

**A.A. Sybirny** – Dr. Sci., Prof., academician of NASU,

Institute of Cell Biology, Lviv

**V.A. Sorokin** – Dr. Sci., Prof., B. Verkin ILTPI NASU

**R.S. Stoika** – Dr. Sci., Prof., corresponding member of

NASU, Institute of Cell Biology, Lviv

**L.F. Sukhodub** – Dr. Sci., Prof., corresponding member of

NASU, Sumy State University, Sumy

**M.Ye. Tolstorukov** – Ph.D., Department of Molecular

Biology, Massachusetts General

Hospital, Boston, USA

**V.M. Trusova** – Dr. Sci., Prof., V.N. Karazin KhNU

**A.V. Shestopalova** – Dr. Sci., Prof.,

O.Ya. Usikov IRE NASU

**Yu.G. Shkorbatov** – Dr. Sci., Prof., V.N. Karazin KhNU

Технічна група: к.ф.-м.н. Горобченко О.О., Жигалова Н.М.

Technical Board: Dr. O.O. Gorobchenko, N.M. Zhigalova

Адреса редакційної колегії:

Address:

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

Department of Molecular and Medical Biophysics  
School of Radio Physics, Biomedical Electronics and Computer Systems

Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна

V.N. Karazin Kharkiv National University

майдан Свободи, 4,

4 Svobody Sq.,

61022 м. Харків, Україна

Kharkiv 61022 Ukraine

тел. / phone: +38 057 7075576

факс / fax: +38 057 7544746

e-mail: biofiz-visnyk@karazin.ua

http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk

Статті пройшли внутрішнє та зовнішнє рецензування.

Свідоцтво про державну реєстрацію КВ № 11007 від 17.02.2006

© Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, оформлення, 2017

**ЗМІСТ****БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ**

- В.Г. Книгавко, Е.Б. Радзишевская, М.А. Бондаренко, О.В. Зайцева, О.П. Мещерякова**  
Математическое моделирование образования вторых опухолей и оценка распределения в человеческой популяции генов, повреждение которых обуславливает возникновение онкологического заболевания 5-8

**МЕДИЧНА ФІЗИКА**

- Л.А. Булавін, Ю.Ф. Забашта, О.В. Мотолига, С.П. Сенчуров**  
Аналіз стійкості методів томографічної реконструкції рентгенівських медичних зображень 9-15

**МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ**

- D.M. Glibitskiy, O.A. Gorobchenko, O.T. Nikolov, A.V. Shestopalova, M.A. Semenov**  
Characterization of zigzag patterns on the surface of bovine serum albumin films 16-29

**МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА**

- В.С. Шелковский, М.В. Косевич, О.А. Боряк, В.Г. Зобнина, А.М. Плохотниченко**  
Редокс-взаимодействия с аминокислотой цистеином как один из возможных механизмов биологического действия метиленового синего 30-41

**БІОФІЗИКА КЛІТИНИ**

- О.К. Пакулова, В.К. Клочков, Н.С. Кавок, И.А. Костина, А.С. Сопотова, В.А. Бондаренко**  
Влияние наночастиц на основе редкоземельных элементов на осмотическую адаптацию эритроцитов 42-50

**CONTENTS****BIOPHYSICS OF COMPLEX SYSTEMS**

- V.G. Knigavko, E.B. Radzisheskaya, M.A. Bondarenko, O.V. Zaytseva, O.P. Meshcheryakova**  
Mathematical modeling of the second tumors formation and estimation of the distribution of the anti-oncogenes among humans 5-8

**MEDICAL PHYSICS**

- L.A. Bulavin, Y.F. Zabashta, O.V. Motolyha, S.P. Senchurov**  
Analysis of stability of tomographic reconstruction of X-ray medical images 9-15

**METHODS OF BIOPHYSICAL INVESTIGATIONS**

- D.M. Glibitskiy, O.A. Gorobchenko, O.T. Nikolov, A.V. Shestopalova, M.A. Semenov**  
Characterization of zigzag patterns on the surface of bovine serum albumin films 16-29

**MOLECULAR BIOPHYSICS**

- V.S. Shelkovsky, M.V. Kosevich, O.A. Boryak, V.G. Zobnina, A.M. Plokhotnichenko**  
Redox interactions of methylene blue with cysteine amino acid as a possible mechanism of biological action of the dye 30-41

**CELL BIOPHYSICS**

- O.K. Pakulova, V.K. Klochkov, N.S. Kavok, I.A. Kostina, A.S. Sopotova, V.A. Bondarenko**  
Effect of rare-earth-based nanoparticles on the erythrocyte osmotic adaptation 42-50

УДК 577.3:616-006:575.17:519.221.25

**МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ВТОРЫХ ОПУХОЛЕЙ И ОЦЕНКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ГЕНОВ, ПОВРЕЖДЕНИЕ КОТОРЫХ ОБУСЛОВЛИВАЕТ ВОЗНИКНОВЕНИЕ ОНКОЛОГИЧЕСКОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ****В.Г. Книгавко, Е.Б. Радзишевская, М.А. Бондаренко, О.В. Зайцева,  
О.П. Мещерякова***Харьковский национальный медицинский университет, пр. Науки, 4, 61022, Харьков, Украина*e-mail: [vknigavko@gmail.com](mailto:vknigavko@gmail.com)

Поступила в редакцию 12 января 2017 года

Принята 20 февраля 2017 года

Актуальность работы обусловлена тем, что онкологические заболевания представляют собой значимый фактор смертности людей, причем во всем мире онкологическая заболеваемость возрастает. Вследствие этого изучение процесса канцерогенеза вообще и образования вторых опухолей в частности является важной задачей. Целью работы является изучение закономерностей образования у онкологических больных вторых опухолей. Такое изучение должно лечь в основу решения ряда иных важных задач, в частности, оценки распределения в человеческой популяции генов (а-генов), повреждение которых является одним из важнейших факторов канцерогенеза. Для достижения цели работы используются методы вероятностного математического моделирования изучаемых процессов. В результате проведенных исследований созданы математические модели, позволяющие оценить такие вероятности: 1) образования опухоли у больного к некоторому возрасту, если ранее у этого больного к определенному возрасту образовалась первая опухоль; 2) образования у больного двух опухолей к определенному возрасту. Кроме того, предложенная модель позволяет использовать статистику вторых опухолей для уточнения параметров модели канцерогенеза. Сказанное позволяет сделать вывод о том, что вероятностное математическое моделирование позволяет проводить оценку ряда важных количественных характеристик процесса канцерогенеза.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** канцерогенез, вторые опухоли, повреждения генов, математическое моделирование, функция распределения, оценка распределения а-генов в популяции.

**MATHEMATICAL MODELING OF THE SECOND TUMORS FORMATION AND ESTIMATION OF THE DISTRIBUTION OF THE ANTI-ONCOGENES AMONG HUMANS****V.G. Knigavko, E.B. Radzishevskaya, M.A. Bondarenko, O.V. Zaytseva,****O.P. Meshcheryakova***Kharkiv National Medical University, 4 Nauky Ave., 61022 Kharkiv, Ukraine*

The relevance of the work is caused by the fact the cancer is a significant factor in human mortality, and cancer incidence is increasing worldwide. As a consequence, the study of the process of carcinogenesis in general and Second tumors, in particular, is an important issue for medical physics. The aim of this study was to uncover the regularities of the secondary tumors formation in cancer patients. Such a study should enable the solution of a number of related problems, viz. estimation of the distribution of the a-genes among humans, which damage seems to be one of the most essential factors of carcinogenesis. To achieve the aim of the study the probabilistic mathematical modeling was employed, resulting in the generation of the mathematical models, capable of estimating such probabilities: 1) probability of the second tumor formation in a patient at some age, provided that the first tumor is formed in this patient at certain age; 2) probability of two tumors formation in a patient at certain age. Furthermore, the proposed models enable employment of the statistics of the second tumors to refine the parameters of the carcinogenesis model. In conclusion, the probabilistic mathematical modeling allows evaluation of a number of important quantitative characteristics of the carcinogenesis.

**KEY WORDS:** carcinogenesis, second tumors, genes damages, mathematic modeling, distribution function, evaluation of a-genes distribution in the population.

**МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ УТВОРЕННЯ ДРУГИХ ПУХЛИН І ОЦІНКА РОЗПОДІЛУ В ЛЮДСЬКІЙ ПОПУЛЯЦІЇ ГЕНІВ, ПОШКОДЖЕННЯ ЯКИХ ОБУМОВЛЮЄ ВИНИКНЕННЯ ОНКОЛОГІЧНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ**

**В.Г. Книгавко, Є.Б. Радзішевська, М.А. Бондаренко, О.В. Зайцева,  
О.П. Мещерякова**

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

Актуальність роботи обумовлена тим, що онкологічні захворювання є значимим фактором смертності людей, причому в усьому світі онкологічна захворюваність зростає. Внаслідок цього вивчення процесу канцерогенезу взагалі та утворення других пухлин зокрема є важливою задачею. Метою роботи є вивчення закономірностей утворення у онкологічних хворих других пухлин. Таке вивчення може бути основою для вирішення ряду інших важливих завдань, зокрема, оцінки розподілу в людській популяції генів (а-генів), пошкодження яких є одним із найважливіших факторів канцерогенезу. Для досягнення мети роботи використовуються методи імовірнісного математичного моделювання досліджуваних процесів. В результаті проведених досліджень створено математичні моделі, що дозволяють оцінити такі ймовірності: 1) ймовірність утворення пухлини у хворого до деякого віку, якщо раніше у цього хворого до певного віку утворилася перша пухлина; 2) ймовірність утворення у хворого двох пухлин до певного віку. Крім того, запропонована модель дозволяє використовувати статистику других пухлин для уточнення параметрів моделі канцерогенезу. Сказане вище дозволяє зробити висновок про те, що ймовірнісне математичне моделювання дозволяє проводити оцінку ряду важливих кількісних характеристик процесу канцерогенезу.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** канцерогенез, другі пухлини, пошкодження генів, математичне моделювання, функція розподілу, оцінка розподілу а-генів в популяції.

### **ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ**

Образование вторых опухолей представляет собой важное, но все еще недостаточно изученное явление, вызывающее в настоящее время значительный интерес [1, 2]. При этом термин «вторые опухоли» применяется к опухолям, которые возникли после появления первой опухоли, но не являются следствием возникновения этой первой опухоли. Целью работы является изучение закономерностей образования у онкологических больных вторых опухолей.

Научный интерес представляют такие проблемы: 1) оценка вероятности образования опухоли у больного к некоторому возрасту, если ранее у этого больного к определенному возрасту образовалась первая опухоль; 2) оценка вероятности образования второй опухоли при некотором возрасте индивида; 3) возможность использовать статистику вторых опухолей для уточнения распределения в человеческой популяции определенного количества тех генов, повреждение которых обуславливает возникновение онкологического заболевания (далее эти гены будем называть а-генами); использование статистики вторых опухолей для уточнения параметров модели канцерогенеза.

### **МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ**

Рассмотрим и обсудим эти проблемы. Образование злокачественной опухоли – это случайное событие, характеризуемое его вероятностью. Пусть  $t$  – это возраст индивида. Здесь и далее под возрастом индивида будем понимать возраст, отсчитываемый от момента зачатия. Для популяции людей величина  $t$  является случайной величиной. Наиболее полной характеристикой этой случайной величины является ее функция распределения. Пусть  $F(t_1)$  – это функция распределения возраста образования первой опухоли, а  $F(t_2)$  – функция распределения времени образования второй опухоли.

Укажем сначала, чему равна вероятность образования двух опухолей при возрасте пациента  $t_2$ . Обозначим эту вероятность  $F_d$ . Легко понять, что эта вероятность равна квадрату вероятности возникновения второй опухоли в возрасте  $t_2$ , то есть  $F_d = (F(t_2))^2$ .

Иными словами, событие, состоящее в том, что к возрасту  $t_2$  появилась вторая опухоль – это событие, означающее, что к этому возрасту уже образовались и первая, и вторая опухоль и, если нас интересует вероятность этого события безотносительно того, когда образовалась первая опухоль, то мы должны вычислить квадрат функции  $F(t_2)$ .

Теперь определим вероятность образования второй опухоли в возрасте  $t_2$  при том условии, что первая опухоль образовалась в возрасте  $t_1$ . Легко понять, что эта вероятность равна такому произведению:  $F(t_1) \cdot F(t_2)$ .

Малигнизация клеток является следствием мутационных процессов, причем считается, что образованию злокачественных опухолей препятствуют два гена супрессора (BRCA1 и BRCA2) [3] и шесть генов репарации ДНК, в частности эксцизионной, рекомбинационной и др. Далее будем называть эти гены а-генами. Также предполагается, что малигнизация клетки с последующим образованием злокачественной опухоли обусловлена повреждением всех указанных генов. Вместе с тем понятно, что генотип случайно выбранного индивида может содержать разное количество (от одного до восьми) указанных генов. Это, в свою очередь, означает, что математические выражения для указанных функций распределения зависят от числа неповрежденных а-генов.

Пусть  $k$  число неповрежденных а-генов в генотипе индивида.

Тогда и формула, используемая для вычисления функции распределения возраста образования опухоли, зависит от величины  $k$ .

Вследствие этого для величины  $F(t)$  для индивида с числом неповрежденных генов, равным  $k$ , в дальнейшем надо использовать такое обозначение:  $F_k(t)$ .

Пусть  $p_k$  – вероятность найти в популяции индивида, в генотипе которого содержится  $k$  генов.

В работе [4] приведены системы уравнений, позволяющих получить оценку величин  $p_k$ . Вместе с тем, точность этой оценки неизвестна и уточнение ее является важной задачей.

При наличии достаточного количества статистических данных касательно возрастов больных при образовании злокачественных опухолей можно предложить следующий способ оценки распределения а-генов в человеческой популяции.

Введем обозначения.

Пусть  $n$  – объем выборки;

$i$  – номер элемента выборки;

$v_i$  – эмпирическая вероятность возникновения у человека онкологического заболевания в возрасте  $t_i$ ;

$F_{i,k}$  – вероятность (модельная) возникновения у человека онкологического заболевания на  $i$ -м году жизни при изначальном количестве а-генов в генотипе, равном  $k$ ;

$p_k$  – искомая вероятность найти в популяции индивида с изначальным числом а-генов, равным  $k$ .

Теперь можно записать такую систему уравнений:

$$v_1 = p_1 F_{1,1} + p_2 F_{1,2} + p_3 F_{1,3} + p_4 F_{1,4} + p_5 F_{1,5} + p_6 F_{1,6} + p_7 F_{1,7} + p_8 F_{1,8}$$



...

$$v_i = p_1 F_{i,1} + p_2 F_{i,2} + p_3 F_{i,3} + p_4 F_{i,4} + p_5 F_{i,5} + p_6 F_{i,6} + p_7 F_{i,7} + p_8 F_{i,8}$$

...

$$v_n = p_1 F_{n,1} + p_2 F_{n,2} + p_3 F_{n,3} + p_4 F_{n,4} + p_5 F_{n,5} + p_6 F_{n,6} + p_7 F_{n,7} + p_8 F_{n,8}$$

где  $n$  – объем выборки.

Получающаяся система уравнений является переопределенной. Решая численно эту систему уравнений, можно получить оценки величин  $v_i$ . Аналогичные вычисления могут быть проделаны и для вторых опухолей.

Таким образом, предлагаемая методика оценки распределения а-генов в популяции с использованием статистики как первых, так и вторых опухолей, позволяет получить по две оценки для каждого значения величины  $k$ . Понятно, что, в общем случае эти оценки отличаются друг от друга, поскольку статистические данные всегда содержат случайную погрешность. Но если определить средние значения этих оценок для каждого значения  $k$ , то получим оценку с меньшим доверительным интервалом, т.е. более точную оценку. Это обуславливает целесообразность уточнения оценки вышеуказанного распределения с использованием информации о вторых опухолях.

### ВЫВОДЫ

Если известна функция распределения возраста возникновения злокачественной опухоли, то для вторых опухолей можно рассчитать функцию распределения двух опухолей (первой и второй) и функцию распределения второй опухоли при условии, что известен возраст возникновения первой опухоли.

Кроме того, используя статистику образования первой и второй опухолей можно уточнить распределение в человеческой популяции а-генов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Treatment of squamous cell carcinoma of the uterine cervix with radiation therapy alone: long-term survival, late complications, and incidence of second cancers / T. Ota, N. Takeshima, T. Tabata et al. // Br. J. Cancer. – 2007. – Vol. 97. – P. 1058–1062.
2. Vogel V. Identifying and screening patients at risk of second cancers / V. Vogel // Cancer Epidemiology Biomarkers Prev. – 2006. – V. 11, N 15. – P. 12–15.
3. Палійчук О. В. Рак яєчника: сімейний раковий синдром та клінічне значення тестування мутацій у генах BRCA1 та BRCA2 / О. В. Палійчук, Л. З. Поліщук // Онкологія. – 2016. – Т. 18, № 1. – С. 20-26. / Polijchuk O.V. Rak jajechnyka: simejnyj rakovyj syndrome ta klinichne znachennja testuvannja mutatsij u genah BRCA1 ta BRCA2 / O.V. Polijchuk, L.Z. Polischuk // Onkologija. – 2016. – Т.18, № 1. – С. 20-26.
4. Математическое моделирование распределения в человеческой популяции генов, повреждение которых обуславливает возникновение онкологических заболеваний / М.А. Бондаренко В.Г. Книгавко, Н.А. Гордиенко та ін. // Біофізичний вісник. – 2016, № 35(1). – С. 5 -9. / Matematicheskoe modelirovanie raspredelenija v chelovecheskoj populyatsii genov, povrezhdenie kotoryh obuslovlivaet vzniknovenie onkologicheskikh zabolevanij / M.A. Bondarenko, V.G. Knigavko, N.O. Gordiyenko ta in. // Biofizichnij visnik. – 2016, N 35(1). – S. 5-9.

УДК 577.0:616-073.756.8

## АНАЛІЗ СТІЙКОСТІ МЕТОДІВ ТОМОГРАФІЧНОЇ РЕКОНСТРУКЦІЇ РЕНТГЕНІВСЬКИХ МЕДИЧНИХ ЗОБРАЖЕНЬ

**Л.А. Булавін, Ю.Ф. Забашта, О.В. Мотолига, С.П. Сенчуров**

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, просп. Глушкова 2 А, м. Київ, Україна*

e-mail: [oleksandr.motolyha@gmail.com](mailto:oleksandr.motolyha@gmail.com)

Надійшла до редакції 28 лютого 2017 року

Прийнята 11 квітня 2017 року

Задача реконструкції зображень в рентгенівській комп'ютерній томографії зводиться до розв'язку інтегрального рівняння або системи алгебраїчних рівнянь для дискретного випадку. Задача є некоректною через невідповідність кількості рівнянь та кількості невідомих та через наявність похибки у експериментально вимірних даних. Тому задача пошуку кращого методу реконструкції в томографії є відкритою, всі наявні методи дають наближений результат. У статті проведено порівняння двох методів реконструкції: оберненого проєціювання та варіаційного. Порівняння виконано за допомогою чисельного експерименту, ціллю якого було отримання залежності між похибкою зображення і похибкою експерименту. Встановлено, що на відміну від варіаційного методу зображення, отримане методом оберненого проєціювання, нестійке: для нього відсутня збіжність наближеного зображення до точного при наближенні похибки експерименту до нуля. Варіаційний метод показав гарні результати реконструкції, незважаючи на малу кількість проєкцій та наявність в них похибки.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** рентгенівська комп'ютерна томографія, метод оберненого проєціювання, варіаційний метод.

## АНАЛИЗ УСТОЙЧИВОСТИ ТОМОГРАФИЧЕСКОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ РЕНТГЕНОВСКИХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗОБРАЖЕНИЙ

**Л.А. Булавин, Ю.Ф. Забашта, А.В. Мотолыга, С.П. Сенчуров**

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, просп. Глушкова 2 А, г. Киев, Украина*

Задача реконструкции изображений в рентгеновской компьютерной томографии сводится к решению интегрального уравнения или системы алгебраических уравнений для дискретного случая. Задача является некорректной из-за несоответствия количества уравнений и количества неизвестных и из-за наличия погрешности в экспериментально измеренных данных. Поэтому задача поиска лучшего метода реконструкции в томографии является открытой, все имеющиеся методы дают приближенный результат. В статье проведено сравнение двух методов реконструкции: обратного проецирования и вариационного. Сравнение выполнено с помощью численного эксперимента, целью которого было получение зависимости между погрешностью изображения и погрешностью эксперимента. Установлено, что в отличие от вариационного метода изображение, полученное методом обратного проецирования, неустойчиво: для него отсутствует сходимость приближенного изображения к точному при приближении погрешности эксперимента к нулю. Вариационный метод показал хорошие результаты реконструкции, несмотря на малое число проекций и наличие погрешности в них.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** рентгеновская компьютерная томография, метод обратного проецирования, вариационный метод.

## ANALYSIS OF STABILITY OF TOMOGRAPHIC RECONSTRUCTION OF X-RAY MEDICAL IMAGES

**L.A. Bulavin, Y.F. Zhabashita, O.V. Motolyha, S.P. Senchurov**

*Taras Shevchenko National University of Kyiv, 2 A Glushkova Ave., Kyiv, Ukraine*

Slice reconstruction in X-ray computed tomography is reduced to the solution of integral equations, or a system of algebraic equations in discrete case. It is considered to be an ill-posed problem due to the inconsistencies in the number of equations and variables and due to errors in the experimental data. Therefore, determination of the best method of the slice reconstruction is of great interest. Furthermore, all available methods give approximate results. The aim of this article was two-fold: i) to compare two methods of image reconstruction, viz. inverse projection and variation, using the numerical experiment; ii) to obtain the relationship between image accuracy and experimental error. It appeared that the image

obtained by inverse projection is unstable: there was no convergence of the approximate image to the accurate one, when the experimental error reached zero. In turn, the image obtained by variational method was accurate at zero experimental error. Finally, the latter showed better slice reconstruction, despite the low number of projections and the experimental errors.

**KEY WORDS:** X-ray computed tomography, inverse projection method, variational method.

У сучасній медичній фізиці одна з ключових ролей належить рентгенівській комп'ютерній томографії. Як відомо [1], її задача полягає в отриманні зображення структури досліджуваного об'єкту за даними про поглинання ним рентгенівського випромінювання. Ця задача формулюється наступним чином:

Інтенсивність  $I_\phi(x')$  випромінювання, що пройшло крізь досліджуваний об'єкт, записують у вигляді:

$$I_\phi(x') = I_\phi^0(x') \exp\left(-\int \mu(x, y) dy'\right), \quad (1)$$

де  $I_\phi^0(x')$  – інтенсивність рентгенівського випромінювання до об'єкту,  $\mu(x, y)$  – просторовий розподіл коефіцієнта послаблення рентгенівського випромінювання на певному перерізі об'єкту. При цьому рентгенівський пучок напрямлений паралельно осі  $y'$ ,  $\phi$  – кут між осями  $x$  та  $x'$ .

Проекція об'єкту  $\lambda_\phi(x')$  визначається співвідношенням [2]:

$$\lambda_\phi(x') = -\ln \left[ \frac{I_\phi(x')}{I_\phi^0(x')} \right] = \int \int_{-\infty}^{\infty} \mu(x, y) \delta(x \cos \phi + y \sin \phi - x') dx dy, \quad (2)$$

де  $\delta(x \cos \phi + y \sin \phi - x')$  – дельта функція.

Функція  $\mu(x, y)$  є шуканим томографічним зображенням, вона описує просторовий розподіл інтенсивностей поглинання рентгенівського випромінювання речовиною. Отримання цієї функції за значеннями експериментально вимірної функції  $\lambda_\phi(x')$  є цілком томографії. Ця задача називається реконструкцією рентгенівської томограми за проекціями та зводиться до розв'язку інтегрального рівняння (2).

### ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ

Оскільки функція  $\lambda_\phi(x')$  визначається з експерименту, вона є наближеною, отже, розв'язуючи рівняння (2), ми можемо отримати лише наближену функцію  $\mu(x, y)$ .

Позначимо через  $\mu_0(x, y)$  точне значення функції  $\mu(x, y)$  і введемо похибку  $\delta_\mu$  наближеної функції  $\mu(x, y)$

$$\delta_\mu = \rho_\mu(\mu, \mu_0), \quad (3)$$

де  $\rho_\mu(\mu, \mu_0)$  – відстань між згаданими функціями. Можливе використання різних метрик, в наших експериментах ми будемо користуватись гільбертовим метричним простором.

Позначимо через  $\lambda_{0\phi}(x')$  функцію, отриману в результаті підстановки  $\mu_0(x, y)$  в рівняння (2), і введемо похибку  $\delta_\lambda$  наближеної функції  $\lambda_\phi(x')$ , визначивши її рівнянням:

$$\delta_\lambda = \rho_\lambda(\lambda_\phi, \lambda_{0\phi}), \quad (4)$$

де  $\rho_\lambda$  – відстань між функціями  $\lambda_\phi$  та  $\lambda_{0\phi}$ .

Похибка експерименту  $\Delta$  представляє собою верхню межу значень  $\delta_\lambda$ , що описується нерівністю

$$\delta_\lambda \leq \Delta. \quad (5)$$

Як відомо [3], за наближений розв'язок рівняння (2) варто розглядати розв'язок  $\mu_\Delta$ , стійкий до малих змін функції  $\lambda_\phi(x')$ . Цю вимогу записують у вигляді:

$$\lim_{\Delta \rightarrow 0} \delta_\mu = 0. \quad (6)$$

На сьогодні, для реконструкції переважно використовується метод оберненого проєціювання [4]. Для цієї ж цілі може бути використаний варіаційний метод [3]. Ціллю даної статті є перевірка на стійкість розв'язків рівняння (2), отриманих цими методами. Цю задачу ми будемо вирішувати за допомогою чисельного експерименту. Щоб зробити це, потрібно, перш за все, пристосувати варіаційний метод для реконструкції зображення.

### ЗАСТОСУВАННЯ ВАРІАЦІЙНОГО МЕТОДУ ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦІЇ ЗОБРАЖЕНЬ

Представимо рівняння (2) в операторному вигляді

$$A\mu = \lambda. \quad (7)$$

При використанні варіаційного методу [3] за наближений розв'язок рівняння (2) приймається функція  $\mu_\Delta(x, y)$ , що задовольняє рівняння

$$A^* A\mu + \alpha\mu = A^* \lambda, \quad (8)$$

де  $A^*$  – оператор, спряжений з оператором  $A$ ,  $\alpha$  – коефіцієнт регуляризації, що має бути визначений з рівняння:

$$\rho^2(A\mu_\Delta, \lambda) = \Delta^2, \quad (9)$$

де  $\rho(Z, Z')$  – відстань між функціями  $Z$  та  $Z'$ .

Перепишемо рівняння (2) у вигляді:

$$\iint K(x', \phi; x, y) \mu(x, y) dx dy = \lambda(x', \phi). \quad (10)$$

Відповідно маємо:

$$A^* A\mu = \iint \bar{K}(x, y; X, Y) \mu(X, Y) dXdY, \quad (11)$$

де прийнято позначення

$$\bar{K}(x, y; X, Y) = \iint K(x', \phi; x, y) K(x', \phi; X, Y) dx' d\phi. \quad (12)$$

Праву частину рівняння (8) записуємо у вигляді:

$$A^* \lambda = \iint K(x', \phi; x, y) \lambda(x', \phi) dx' d\phi. \quad (13)$$

Рівність (5) набуває вигляду:

$$\iint dx' d\phi \left[ \iint K(x', \phi; x, y) \mu_\Delta(x, y) dx dy - \lambda(x', \phi) \right]^2 = \Delta^2. \quad (14)$$

Виконаємо наближену заміну  $\delta$ -функції в рівнянні:

$$\delta(x \cos \phi + y \sin \phi - x') \approx A \exp \left[ -\frac{(x \cos \phi + y \sin \phi - x')^2}{2h^2} \right], \quad (15)$$

де  $h$  – ширина рентгенівського променя. Константу  $A$  визначаємо з рівняння:

$$\int_{\Gamma} \delta dS = 1, \quad (16)$$

де  $\Gamma$  – лінія, перпендикулярна пучку.

Величину  $dS$  розраховуємо з рівняння:

$$y = a + x \tan \phi, \quad (17)$$

отримуючи

$$dS = dx(1 + tg\phi)^{\frac{1}{2}}. \quad (18)$$

Після підстановки (15), (17), (18) у (16) і інтегрування маємо:

$$A = \frac{1}{h\sqrt{2\pi\cos\phi}}. \quad (19)$$

Рівняння (2), після заміни  $\delta$ -функції виразом (15) приймає вигляд (10) з ядром:

$$K(x', \phi, ; x, y) = \frac{1}{h\sqrt{2\pi\cos\phi}} \exp\left[-\frac{(x\cos\phi + y\sin\phi - x')^2}{2h^2}\right]. \quad (20)$$

Згідно з (8), (11-13), для невідомої функції  $\mu(x, y)$  ми отримуємо рівняння:

$$\begin{aligned} & \iint dXdY \left\{ \iint dx'd\phi \frac{1}{h\sqrt{2\pi\cos\phi}} \exp\left[-\frac{(x\cos\phi + y\sin\phi - x')^2}{2h^2}\right] \times \right. \\ & \times \exp\left[-\frac{(X\cos\phi + Y\sin\phi - x')^2}{2h^2}\right] \left. \right\} \mu(X, Y) + \alpha\mu(X, Y) = \\ & = \iint dx'd\phi \frac{1}{2h\sqrt{2\pi\cos\phi}} \exp\left[-\frac{(x\cos\phi + y\sin\phi - x')^2}{2h^2}\right] \lambda(x', \phi). \end{aligned} \quad (21)$$

Рівняння (14) згідно з (20) може бути записане як:

$$\iint dx'd\phi \left\{ \iint \frac{1}{h\sqrt{2\pi\cos\phi}} \exp\left[-\frac{(X\cos\phi + Y\sin\phi - x')^2}{2h^2}\right] \times \mu_{\Delta}(X, Y) dXdY - \lambda(x', \phi) \right\} = \Delta^2. \quad (22)$$

Таким чином, співвідношення (8-9) варіаційного методу у випадку їх використання для реконструкції в томографії приймають вигляд (21-22).

### МЕТОДИКА І РЕЗУЛЬТАТИ ЧИСЕЛЬНОГО ЕКСПЕРИМЕНТУ

Програма експерименту являє собою послідовність наступних етапів.

- 1) Вибираємо математичний фантом з відомим розподілом інтенсивностей  $\mu_0(x, y)$ .
- 2) Користуючись виразом (2), розраховуємо значення  $\lambda_{\phi}(x')$  для цього фантому.

Позначимо його як  $\lambda_{0\phi}(x')$ . Для спрощення розрахунків обрано таку саму дискретизацію, як у фантому: 32 по координаті  $x'$  та використано 32 проєкції.

- 3) "Псуємо" функцію  $\lambda_{0\phi}(x')$ , вводячи замість неї деяку наближену функцію  $\lambda_{\Delta\phi}(x')$  із заданою похибкою  $\Delta$ , яку розраховуємо за допомогою виразу (4).

4) Підставляємо значення функції  $\lambda_{\Delta\phi}$  в інтегральне рівняння (2), вирішуємо його, отримуємо функцію  $\mu_{\Delta}$  відповідну функції  $\lambda_{\Delta\phi}$ .

- 5) Розраховуємо похибку  $\delta_{\mu}$ , використовуючи формулу (3).

Нами було вибрано фантом Шепа-Логана, який традиційно використовується при перевірці ефективності методів реконструкції [5]. Фантом наближено моделює переріз голови людини.

Розрахунки з використанням оберненого проєціювання були виконанні стандартними програмами.

При використанні варіаційного методу проведено дискретизацію задачі: інтеграли у виразах (21-22) замінено на суми, в результаті чого інтегральне рівняння (21) було зведено до системи алгебраїчних рівнянь. При цьому, оператор  $A$  замінено матрицею.

Розмір фантому складав  $32 \times 32$  пікселі, відповідно розмірність матриці  $A$  дорівнювала  $1024 \times 1024$ .



Рис. 1. Фантом Шепа-Логана.

При розрахунку відстані  $\rho$  між функціями, вважалося, що останні є елементами гільбертового метричного простору. Досліджувався інтервал похибок  $\Delta \in [0; 0.2]$ .

Для кожного з вибраних значень  $\Delta$  розраховувався параметр регуляризації  $\alpha$ . Для довільно вибраного значення  $\alpha$  розв'язувалась система алгебраїчних рівнянь, що замінювала інтегральне рівняння (21), далі отриманий розв'язок  $\mu_\Delta$  підставлявся у вираз (22) і обчислювалась різниця  $R = \rho^2(A\mu_\Delta, \lambda_\Delta \phi)$ . Підбиралось таке значення  $\alpha_{\min}$ , яке відповідало мінімуму цієї різниці. Відповідне йому  $\mu_\Delta$  і приймалося як розв'язок системи рівнянь.

Процедура знаходження параметра регуляризації проілюстрована на рис. 2, де представлена залежність  $R(\alpha)$  для  $\Delta = 0,1$ . Згідно з цим графіком параметр регуляризації у даному випадку дорівнює  $\alpha = 2 \times 10^{-5}$ .

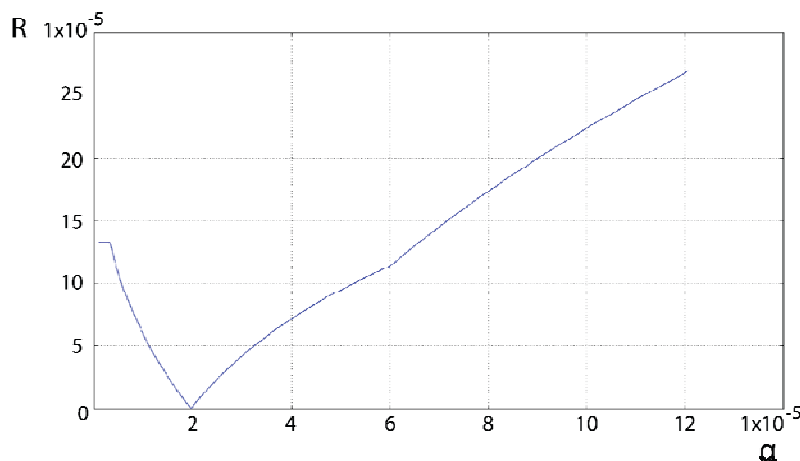


Рис. 2. Визначення параметра регуляризації.

Рис. 3 показує, який вигляд мають реконструйовані фантоми при застосуванні обох згаданих методів. На рис. 4 представлено екваторіальні перерізи реконструйованих фантомів. На рис. 5 приведено залежність  $\delta_\mu$  від  $\Delta$  для кожного із застосованих методів реконструкції. Цей графік є відповіддю на поставлене у статті питання. Як бачимо з даного рисунку, умова збіжності не виконується у випадку використання методу оберненого проєціювання і виконується для варіаційного методу. Іншими словами, зображення, отримане методом оберненого проєціювання, нестійке на відміну від стійкого зображення, отриманого варіаційним методом.

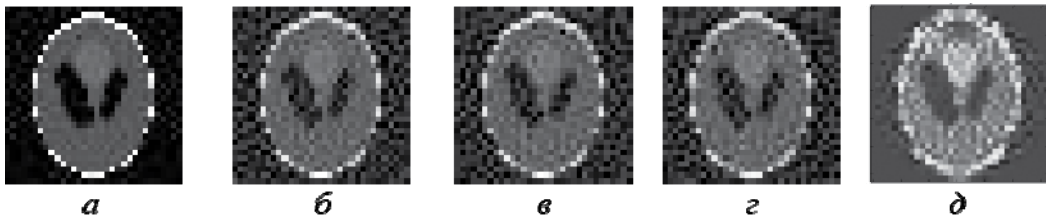


Рис. 3. Результати реконструкції отримані варіаційним методом для різних значень похибки  $\Delta$ :  $a - 0,02$ ,  $b - 0,05$ ,  $v - 0,1$ ,  $z - 0,15$ , а також методом оберненого проєціювання ( $d$ ).

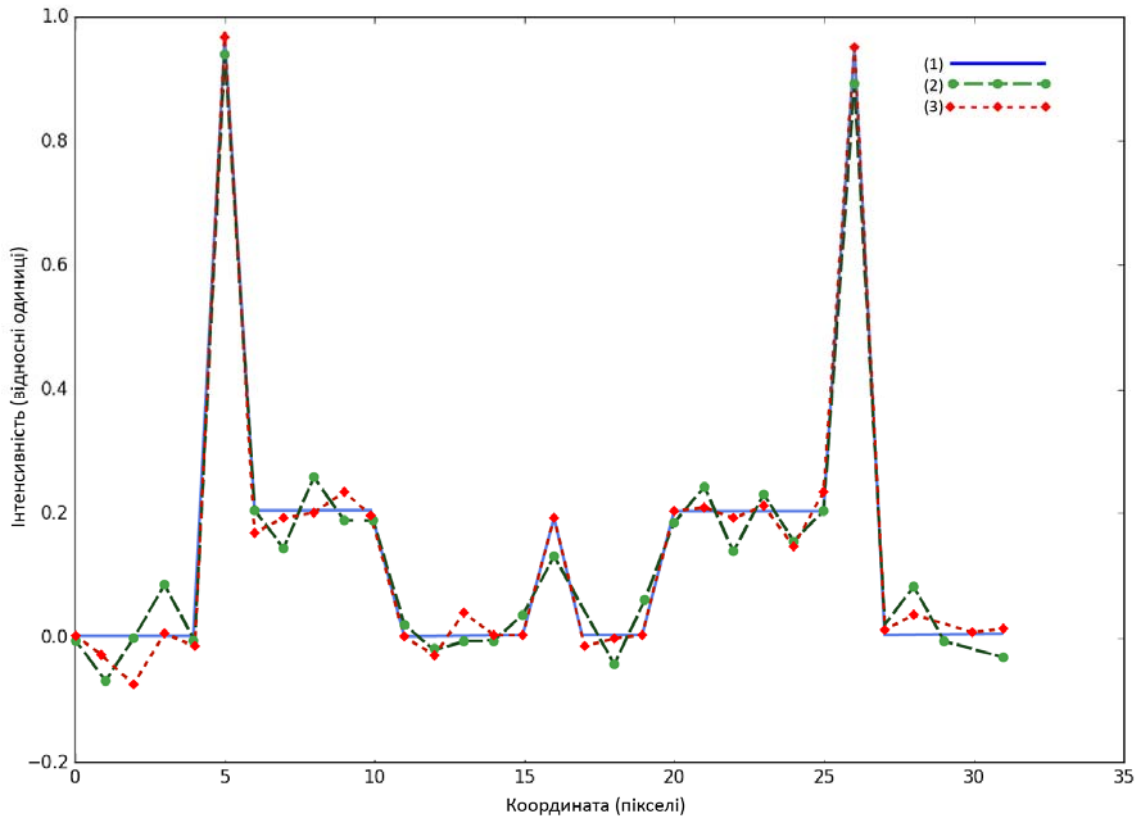


Рис. 4. Екваторіальний переріз оригінального (1) та реконструйованого фантому методом оберненого проєціювання (2) та варіаційним методом (3).

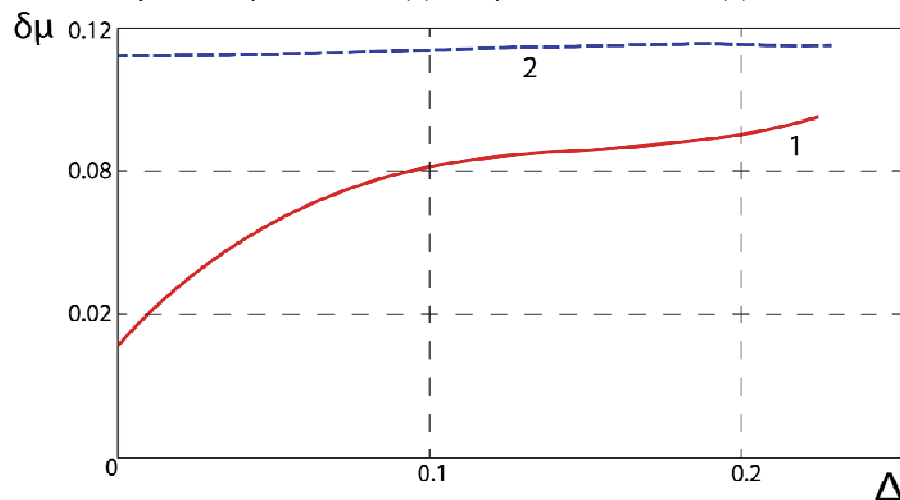


Рис. 5. Залежність похибки реконструйованого зображення  $\delta_\mu$  від похибки експерименту  $\Delta$ . При використанні варіаційного методу (1), та методу оберненого проєціювання (2).

## ВИСНОВКИ

Головний результат виконаного в даній статті дослідження полягає у встановленні того факту, що зображення, отримане методом оберненого проєціювання, є нестійким. На нашу думку, цей факт не може залишатись поза увагою фахівців, адже саме метод оберненого проєціювання найбільш широко застосовується в сучасних комп'ютерних томографах.

Реконструювання зображень – це розв'язок відповідного інтегрального рівняння. Нестійкість цього розв'язку проявляється у появі значних флуктуацій. По відношенню до зображення це означає, що останнє стає сильно зашумленим.

Чому ж тоді виявлена нами нестійкість не заважала дотепер використанню метода оберненого проєціювання? Як показано у цій статті, це відбувалось завдяки тому, що похибка реконструйованого зображення приблизно дорівнювала похибці експерименту. Усі ж спроби зменшити похибку експерименту при збереженні для реконструкції метода оберненого проєціювання обов'язково призведуть до появи зашумленості.

У даній роботі встановлено, що цю проблему можна вирішити, застосувавши при реконструкції варіаційний метод. В цьому випадку при наближенні похибки експерименту до нуля, результат реконструкції збігається до точного. Але тут ми стикаємось з новою проблемою: реалізація цього методу пов'язана зі значно більшим числом обчислювальних операцій і майже невиконувана для реальних об'ємів даних.

На нашу думку, вихід із ситуації, що склалася, можливий за допомогою компромісу: за рахунок використання в методі оберненого проєціювання ідеї регуляризації, притаманної варіаційному методу. Це тема наступної статті, над якою працюють автори.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Buzug Thorsten M. Computed Tomography / Thorsten M. Buzug. – Berlin: Springer-Verlag, 2008. – 522 p. – ISBN 978-3-540-39408-2.
2. Deans Stanley. The Radon Transform and Some of its Applications / S. Deans. – New York : Wiley, 1983. – 304 p. – ISBN 978-0-486-46241-7.
3. Tikhonov Andrey Nikolayevich. Solution of Ill-posed Problems / A. Tikhonov, V. Arsenin. – Washington: Winston and Sons, 1977. – 272 p. – ISBN 978-0-470-99124-4.
4. Herman G. T. Fundamentals of computerized tomography: Image reconstruction from projection, 2nd edition / G. Herman. – London : Springer, 2009. – 300 p. – ISBN 978-1-84628-723-7.
5. Shepp Larry. The Fourier Reconstruction of a Head Section / L. Shepp, B. Logan // IEEE Transactions on Nuclear Science. – 1974. – NS-21. – P. 21-43.



UDC 577.32+544.023.26+004.932.2

**CHARACTERIZATION OF ZIGZAG PATTERNS  
ON THE SURFACE OF BOVINE SERUM ALBUMIN FILMS****D.M. Glibitskiy<sup>1</sup>, O.A. Gorobchenko<sup>2</sup>, O.T. Nikolov<sup>2</sup>, A.V. Shestopalova<sup>1</sup>,  
M.A. Semenov<sup>1</sup>**<sup>1</sup> *O. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of the National Academy of Sciences of Ukraine,  
12, Acad. Proskura St., 61085, Kharkiv 61022, Ukraine*<sup>2</sup> *V.N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv 61022, Ukraine*e-mail: [dima.glib@gmail.com](mailto:dima.glib@gmail.com)

Submitted May 18, 2017

Accepted June 1, 2017

Analysis of the patterns formed during the drying of biological fluids is employed for research and diagnosis in medicine and agriculture. Saline solutions of native proteins and DNA are characterized by zigzag patterns, which could be quantitatively described using the specific length of zigzags  $L_{\text{specific}}$ . The aim of this study was to analyze a wide number of characteristics in order to identify those most sensitive to the effects of various physical and chemical factors on the protein structure. We examined the films prepared from salt solutions of bovine serum albumin (BSA) under varying conditions, viz.: a proportional change in the concentration of the components, substitution of NaCl with NaF and NaBr, temperature treatment, gamma irradiation, and addition of trivalent iron and biologically active flavin mononucleotide. The results revealed that the distribution of zigzag segment lengths was approximately lognormal, and the distribution of angles between the segments was approximately logistic. Two parameters appeared to be the most informative, viz. the average length of the segments, mainly depending on  $\text{Cl}^-$  concentration, and the number of segments, depending on:  $\text{Cl}^-$  concentration, concentration of the non-aggregated (but not necessarily unfragmented) protein, and the excess concentration of ions and low molecular weight compounds.

**KEY WORDS:** BSA, film, zigzag patterns, texture, statistical distribution.**АНАЛІЗ ХАРАКТЕРИСТИК ЗИГЗАГОПОДІБНИХ ПАТЕРНІВ  
НА ПОВЕРХНІ ПЛІВОК БИЧАЧОГО СИРОВАТКОГО АЛЬБУМІНУ****Д.М. Глибицький<sup>1</sup>, О.О. Горобченко<sup>2</sup>, О.Т. Ніколов<sup>2</sup>, А.В. Шестопалова<sup>1</sup>, М.О. Семенов<sup>1</sup>**<sup>1</sup> *Інститут радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України,  
вул. Ак. Проскури 12, м. Харків, 61085, Україна*<sup>2</sup> *Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, пл. Свободи 4, м. Харків, 61022, Україна*

Аналіз патернів, що формуються при висиханні біологічних рідин, використовується для досліджень і діагностики в медицині і сільському господарстві. Для сольових розчинів нативних білків і ДНК характерні зигзагоподібні патерни, які можна кількісно описати за допомогою питомої довжини зигзагів  $L_{\text{specific}}$ . У даній роботі ми аналізуємо розширений ряд характеристик цих патернів з метою виявити найбільш чутливі до дії різних фізичних і хімічних факторів на структуру білка. Були розглянуті плівки, отримані з сольових розчинів бичачого сироваткового альбуміну (BSA) при пропорційній зміні концентрації компонентів, заміні NaCl на NaF і NaBr, температурній обробці, гамма-опроміненні, а також додаванні тривалентного заліза і біологічно активної речовини – флавінмононуклеотида. Було визначено, що розподіл довжин сегментів зигзагів має близький до логнормального характер, а розподіл кутів між сегментами – близький до логістичного. Дані показали, що найбільш інформативними є два параметри: середня довжина сегментів, яка переважно залежить від концентрації  $\text{Cl}^-$ , і кількість сегментів, яка залежить від концентрації  $\text{Cl}^-$ , концентрації неагрегованого білка (але не обов'язково нефрагментованого), а також від надлишкової концентрації іонів і низькомолекулярних сполук.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** BSA, плівка, зигзагоподібні патерни, текстура, статистичний розподіл.

## АНАЛИЗ ХАРАКТЕРИСТИК ЗИГЗАГОПОДОБНЫХ ПАТТЕРНОВ НА ПОВЕРХНОСТИ ПЛЕНОК БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

Д.М. Глибичкий<sup>1</sup>, О.А. Горобченко<sup>2</sup>, О.Т. Николов<sup>2</sup>, А.В. Шестопалова<sup>1</sup>, М.А. Семёнов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт радиофизики и электроники им. А. Я. Усикова НАН Украины,  
ул. Ак. Проскуры 12, г. Харьков, 61085, Украина

<sup>2</sup> Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы 4, г. Харьков, 61022, Украина

Анализ паттернов, формирующихся при высыхании биологических жидкостей, используется для исследований и диагностики в медицине и сельском хозяйстве. Для солевых растворов нативных белков и ДНК характерны зигзагоподобные паттерны, которые можно количественно описать с помощью удельной длины зигзагов  $L_{\text{specific}}$ . В данной работе мы анализируем расширенный ряд характеристик этих паттернов с целью выявить наиболее чувствительные к действию различных физических и химических факторов на структуру белка. Были рассмотрены пленки, полученные из солевых растворов бычьего сывороточного альбумина (БСА) при пропорциональном изменении концентрации компонентов, замене NaCl на NaF и NaBr, температурной обработке, гамма-облучении, а также добавлении трехвалентного железа и биологически активного вещества – флавиномононуклеотида. Было определено, что распределение длин сегментов зигзагов имеет близкий к логнормальному характер, а распределение углов между сегментами – близкий к логистическому. Данные показали, что наиболее информативными являются два параметра: средняя длина сегментов, которая преимущественно зависит от концентрации  $\text{Cl}^-$ , и количество сегментов, которое зависит от концентрации  $\text{Cl}^-$ , концентрации неагрегированного белка (но не обязательно нефрагментированного), а также от избыточной концентрации ионов и низкомолекулярных соединений.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** БСА, пленка, зигзагоподобные паттерны, текстура, статистическое распределение.

Drying biofluids and saline solutions of biomolecules are known for their ability to form patterns on the substrate surface, the specific form of which depends, in particular, on the structural state of biomolecules [1-4]. This fact has found practical application in some research and diagnostic methods of medicine and agriculture: the study of the interaction of biomolecules [5], the diagnosis of the patient's blood condition [6-10], the analysis of the quality of wheat grains [11, 12] and carrot roots [13, 14].

An important factor determining the practical applicability of such methods is the ability to numerically characterize the patterns formed on the substrate. Such a numerical characteristic is useful for assessing the degree and nature of the changes in the test sample compared to the control.

Depending on the type of pattern or texture, various authors offered such evaluation criteria as: the number of optical density fluctuations [9] or the brightness distribution of the digital image [11] in circular sections of different diameters; the fractal dimension of Minkowski [5] and the local connected fractal dimension of the image [12]; parameters of gray-scale histograms at several scales [13-15]; the structural and spectral characteristics of an image region as a function of time [10].

In previous studies we found that zigzag (hexagonal) patterns [16-19], similar to those observed in [20, 21], are formed on films obtained from saline solutions of native DNA or protein. For a quantitative description of this type of texture, we introduced the value  $L_{\text{specific}}$ , which corresponds to the total length of zigzag patterns per unit area.  $L_{\text{specific}}$  has random character due to the chaotic nature of the drying process and depends on the salt concentration, the biopolymer concentration, the conditions of solution preparation and drying (temperature, humidity, substrate material and roughness), as well as the properties of the biopolymer, salt and solvent.

As a result of significant physical or chemical influences that disrupt the structure of the biopolymer, zigzag patterns on the dried films are not formed ( $L_{\text{specific}} = 0$ ). However, it is often difficult to identify reliable differences between smaller levels of exposure due to a significant variance in the values of  $L_{\text{specific}}$  within the same dose of exposure [17, 18]. In this regard, the purpose of the current study was to analyze the extended series of characteristics

of zigzag patterns on the surface of BSA films, including the parameters of their statistical distributions, and to find which ones are the most sensitive to the action of various physical and chemical factors.

### MATERIALS AND METHODS

The analysis was carried out on the basis of data obtained during the previous experiments [18, 19, 22, 23]. The films were obtained from saline BSA solutions via vacuum drying at 40 °C in 20x20x1 mm<sup>3</sup> glass cells. Each film was photographed (using a Meopta microscope and a Logicfox LF-PC011 webcam) in 100 positions uniformly distributed over the cell area, and segments of zigzag patterns were marked on each photograph (using custom software). The data was analyzed and plotted using numpy, scipy and matplotlib libraries.

### RESULTS AND DISCUSSION

Zigzag patterns (Fig. 1) are presumably the result of crystallization in alternating crystallographic directions [20, 24].

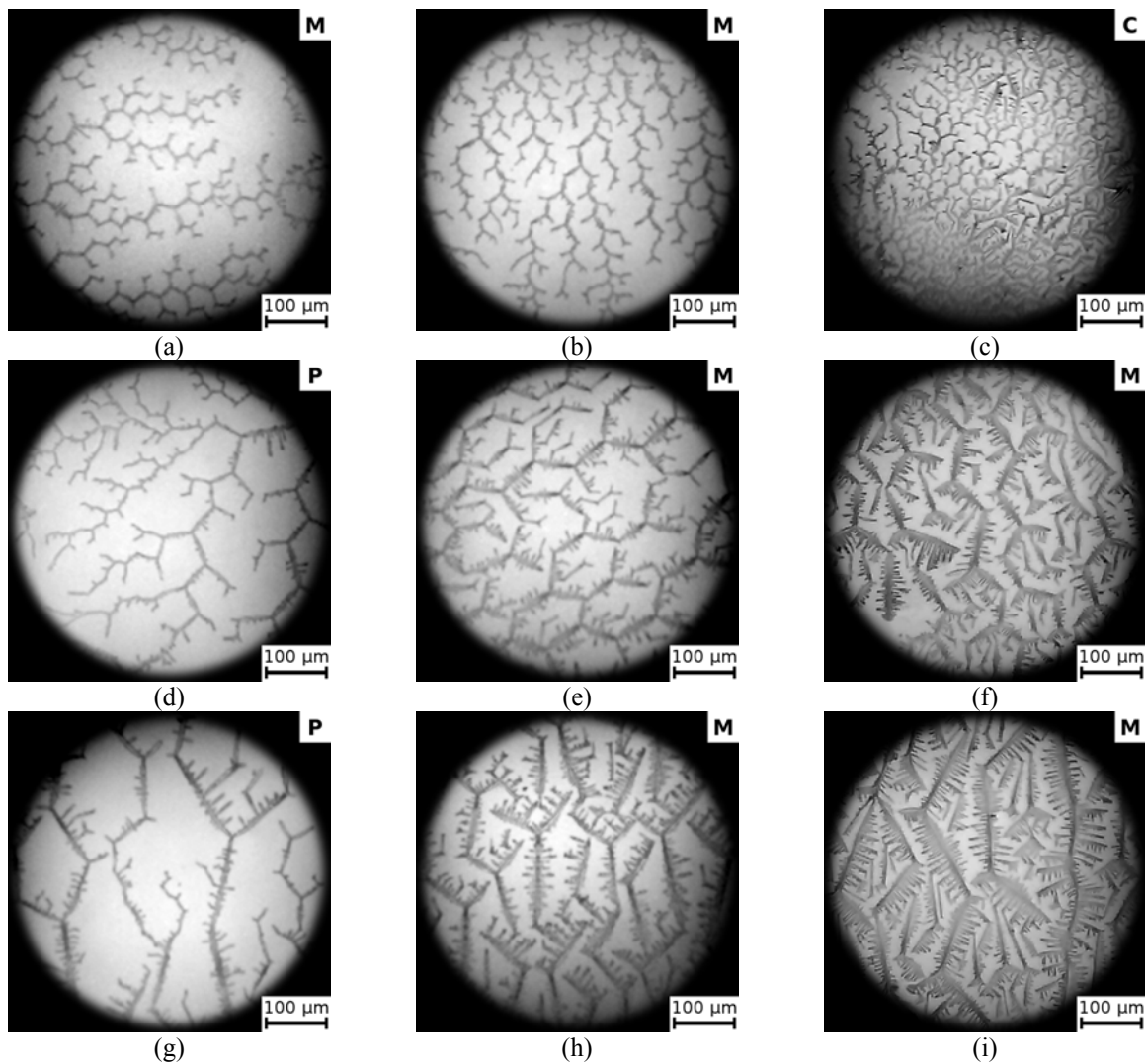


Fig. 1. Photos of zigzag patterns on the surface of BSA films with different segment lengths, pattern density and angles between segments: (a), (b), (c): low, medium and high density patterns for small segment lengths; (d), (e), (f): similarly for medium segment lengths; (g), (h), (i): similarly for long segment lengths. All films were obtained from control solutions; the letter in the upper right corner of each photo indicates whether the photo was taken in the center of the film (C), on the periphery (P), or between the center and the periphery (M).

They consist of connected linear segments of length  $L_i$ , each pair of which is at an angle  $\alpha_{i,j}$  ( $i, j$  are neighboring segments) to each other. Another important characteristic is the density of patterns (i.e. how densely they cover the surface of the film). Fig. 1 shows photographs illustrating the variability of these parameters for films obtained from identical BSA solutions under identical conditions.

The films obtained in our experiments have an area of  $20 \times 20 \text{ mm}^2$ . The photographs of the patterns (100 photographs for each film) together cover about 10% of the film area, which gives a sufficient sample for estimating the statistical distributions of zigzag characteristics.

Fig. 2 shows the characteristic histograms of the distributions of zigzag segment lengths and of angles between the segments. Via curve fitting, it was found that the typical distribution of segment lengths is closest to the lognormal distribution (which, presumably, corresponds to the model of multiplicative growth [25]), and the typical distribution of angles is closest to the logistic distribution.

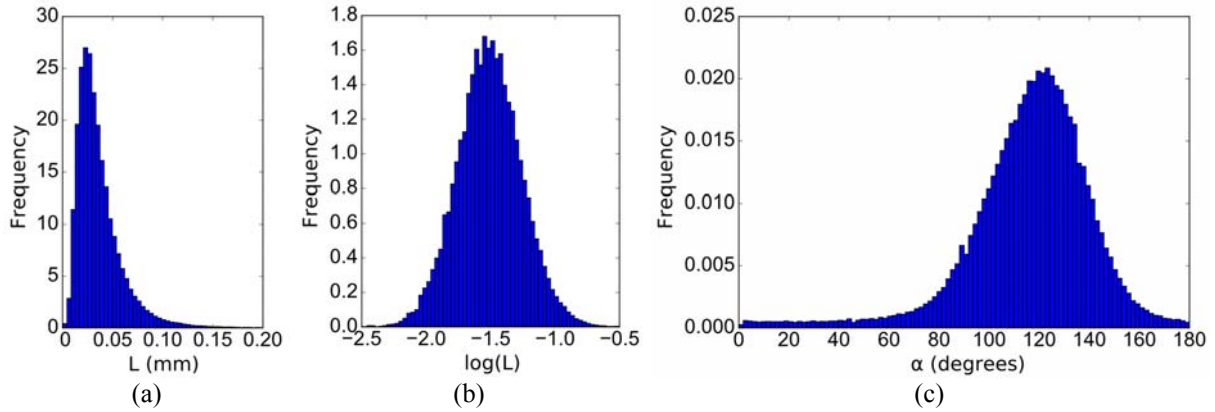


Fig. 2. Distributions of segment lengths in linear (a) and logarithmic (b) scales, and of angles between zigzag segments (c). The histograms were created from the aggregated data of all films analyzed in the paper.

Preliminary analysis has shown that the most informative in one or more series of experiments are the values of  $L_{\text{count}}$  (total number of zigzag segments),  $L_{\text{sum}}$  (total length of segments),  $L_{\text{mean}}$  (mean segment length),  $\alpha_{\text{mean}}$  (mean angle between segments), as well as shape parameters of fitted functions of Burr<sup>XII</sup> [26]

$$\text{Burr}^{12}(x, c, d) = c \cdot d \cdot x^{c-1} \cdot (1 + x^c)^{-d-1}, \quad (1)$$

and Inverse Weibull [27]

$$\text{InvWeibull}(x, c) = c \cdot x^{-c-1} \cdot e^{-x^{-c}}, \quad (2)$$

where  $x$  is the independent variable (segment length in our case), and  $c, d$  are the shape parameters of the distributions.

In addition to these characteristics, the median, standard deviation, skewness and kurtosis of the distributions, as well as parameters of Log-Normal, Johnson  $S_U$ , Generalized Logistic and Exponentially modified Gaussian fitted functions were also considered. However, they did not prove to be informative at describing zigzag patterns, and so will be omitted.

The value of  $L_{\text{specific}}$  (the specific length of zigzags), which was used in our previous publications [17-19, 22, 23], is proportional to  $L_{\text{sum}}$ :

$$L_{\text{specific}} = \frac{L_{\text{sum}}}{N_{\text{photos}} \cdot S_{\text{microscope}}}, \quad (3)$$

where  $N_{\text{photos}}$  is the number of photographs (100), and  $S_{\text{microscope}}$  is the area of the film visible under the microscope ( $0.414 \text{ mm}^2$ ). As such, we will not mention it further.

$L_{\text{sum}}$ ,  $L_{\text{count}}$  and  $L_{\text{mean}}$  relate to each other as

$$L_{mean} = L_{sum} / L_{count} \quad (4)$$

with  $L_{sum}$  and  $L_{count}$  in most cases having nearly identical dependence on the degree of exposure to a physical or chemical factor. Due to this, plots of  $L_{sum}$  will be presented only in a number of cases.

The behavior of the abovementioned characteristics in the corresponding series of experiments is analyzed below. The most illustrative dependencies are shown in the figures.

### ***Proportional change in component concentration***

In this experiment, the concentration of BSA (1 mg/ml) and NaCl (40 mM/l) was doubled compared to the normally used concentration (0.5 mg/ml BSA, 20 mM/l NaCl).  $L_{count}$  (Fig. 3, a),  $L_{sum}$  and  $\alpha_{mean}$  (Fig. 3, b) remained in the range of the values for the 100% concentration.  $L_{mean}$  (Fig. 3, c) at a doubled concentration does not go beyond the limits of the values observed at the usual concentration, but on average is much higher. For the 200% concentration, the Burr<sup>XII</sup> C parameter (Fig. 3, d) is smaller than for the 100% concentration (the decrease of Burr<sup>XII</sup> C corresponds to the distribution "stretching" and shifting towards larger values).

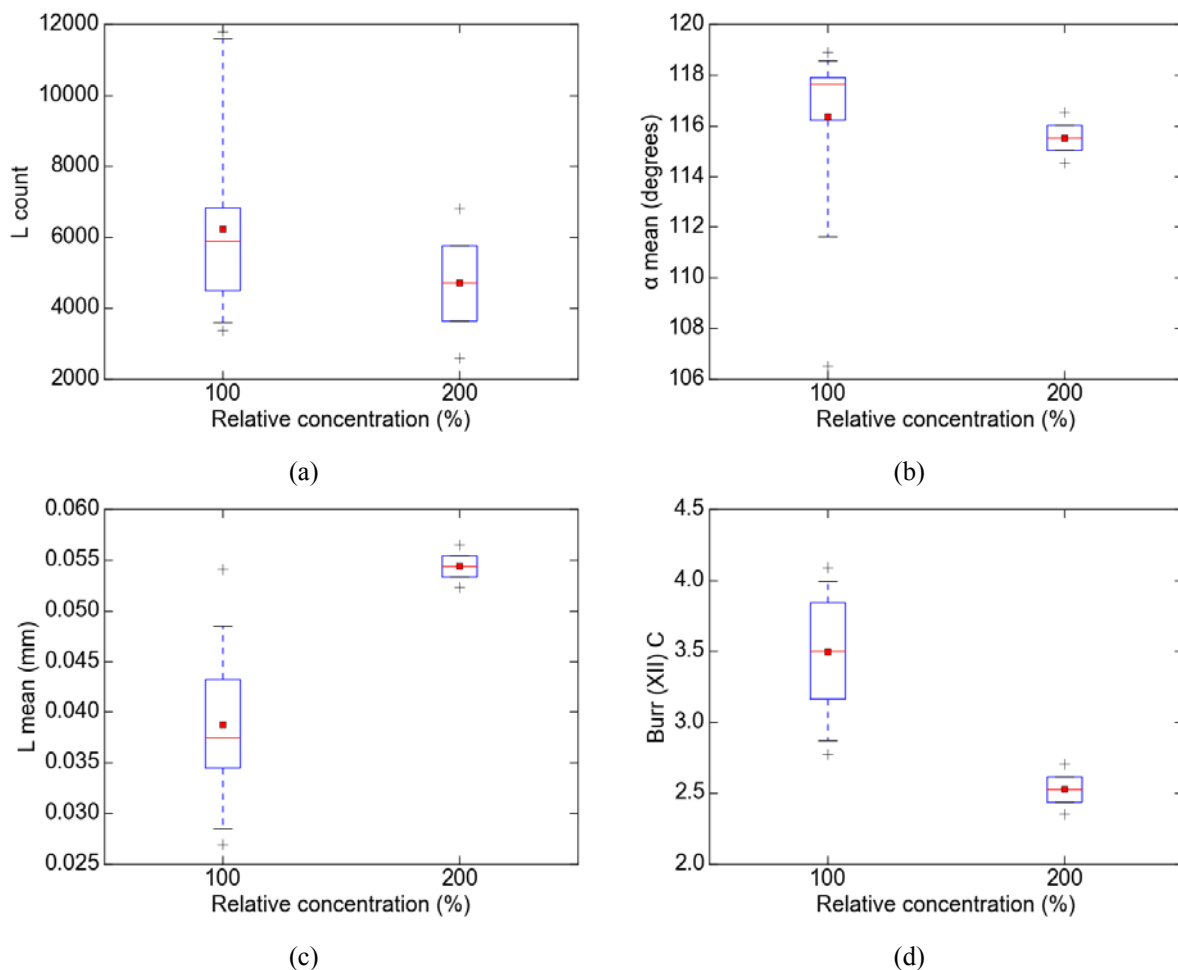


Fig. 3. Pattern characteristics at standard and doubled concentration of components of the biopolymer solution: (a) number of zigzag segments; (b) average angle between zigzag segments; (c) average length of zigzag segments; (d) shape parameter C of the Burr<sup>XII</sup> distribution. Box plot notation: boxes correspond to 25 and 75 percentiles, dotted lines correspond to 5 and 95 percentiles, crosses correspond to minimum and maximum values, horizontal lines correspond to medians, and squares correspond to mean values. Control: 18 films; 200% concentration: 2 films.

With an increase in the concentration of salt and protein, the average length of segments and the spread of segment lengths increase. Based on the model described in [20], it can be assumed that a higher concentration of components allows the crystal to grow for a longer time in one direction.

### *Substituting $Cl^-$ with $Br^-$ and $F^-$*

In this experiment [18], it was investigated whether zigzags can form when chlorine ions are partially or completely replaced by other halides (bromine or fluorine). The concentration of salts varied from 20 to 0 mM/l for NaCl and from 0 to 20 mM/l for NaBr and NaF, respectively.

Replacing sodium chloride with sodium bromide resulted in the following (Fig. 4, a, c, e): up to 4 mM/l NaBr,  $L_{count}$  and  $L_{sum}$  stay in the range of control values; at 8 mM/l NaBr, they noticeably decrease; at 16 mM/l NaBr and more, zigzags are not formed.  $\alpha_{mean}$ ,  $L_{mean}$  and the parameters of fitted functions do not go beyond the range of values for control.

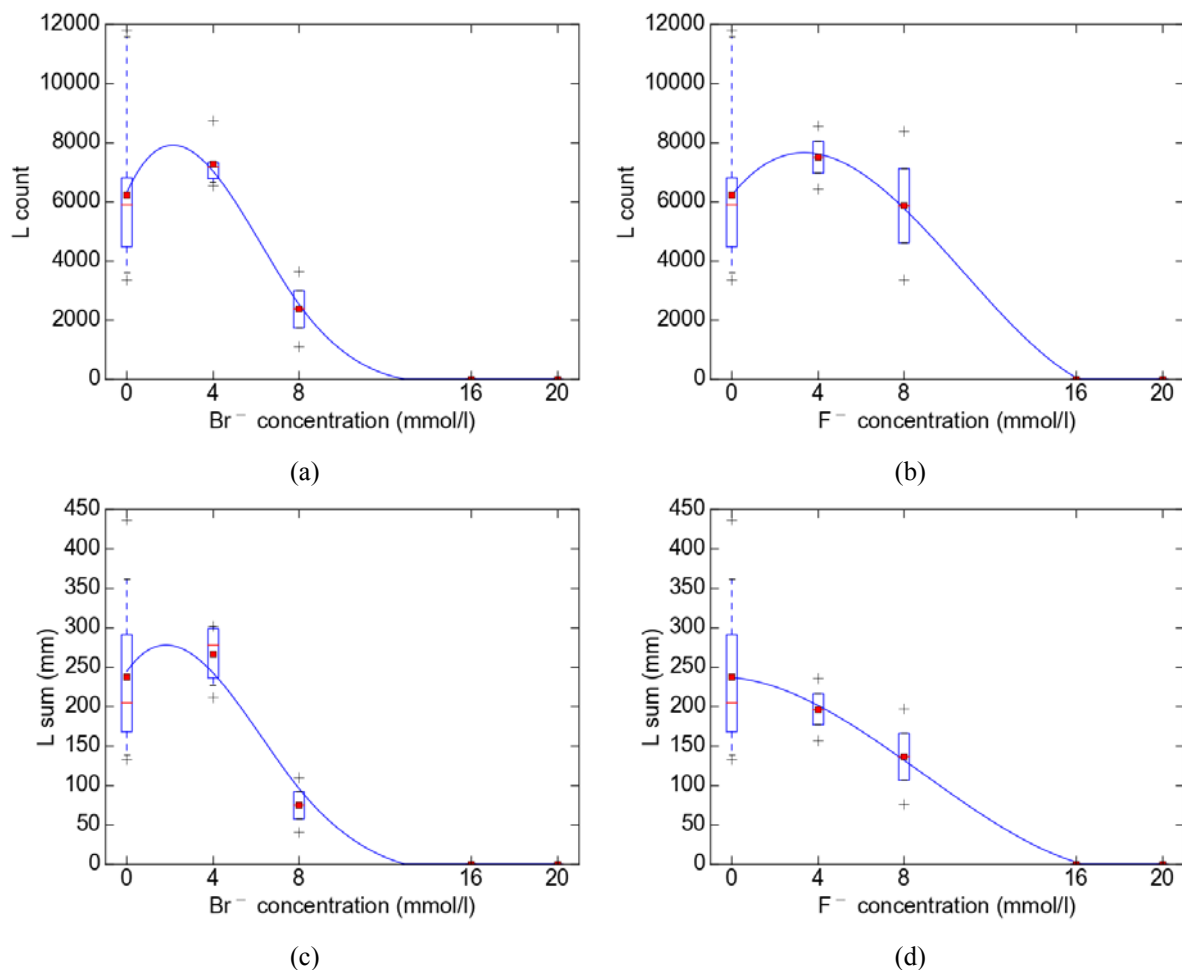


Fig. 4. Pattern characteristics when NaCl is replaced by NaBr (a, c) and NaF (b, d): (a), (b) number of zigzag segments; (c), (d) total length of zigzag segments. Box plot notation: boxes correspond to 25 and 75 percentiles, dotted lines correspond to 5 and 95 percentiles, crosses correspond to minimum and maximum values, horizontal lines correspond to medians, and squares correspond to mean values. Control: 18 films; 4 mM/l  $Br^-$ : 5 films; 8 mM/l  $Br^-$ : 2 films; 16 mM/l  $Br^-$ : 1 film; 20 mM/l  $Br^-$ : 2 films; 4 mM/l  $F^-$ : 2 films; 8 mM/l  $F^-$ : 2 films; 16 mM/l  $F^-$ : 1 film; 20 mM/l  $F^-$ : 2 films.

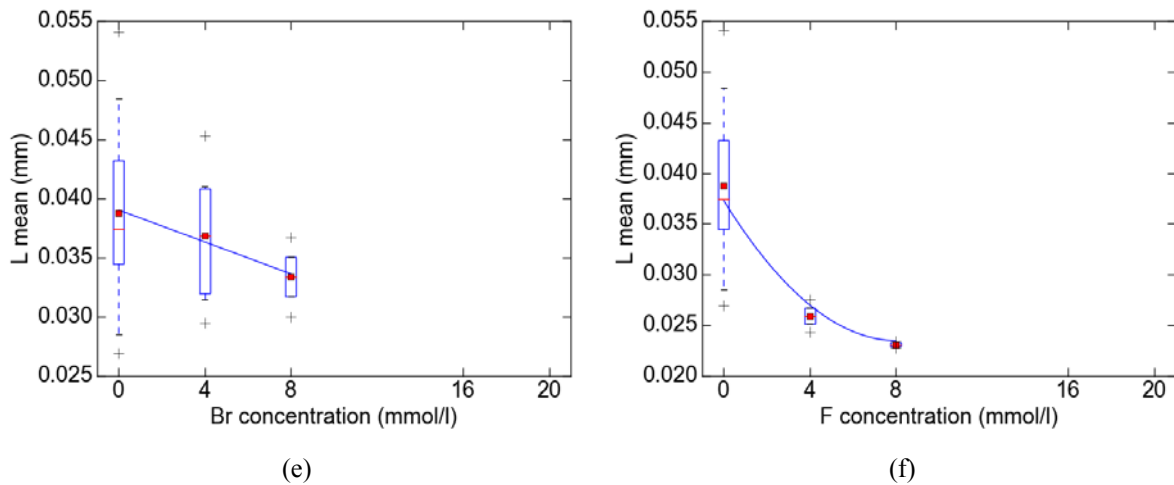


Fig. 4 (continuation). Pattern characteristics when NaCl is replaced by NaBr (e) and NaF (f): (e), (f) average length of zigzag segments. Box plot notation: boxes correspond to 25 and 75 percentiles, dotted lines correspond to 5 and 95 percentiles, crosses correspond to minimum and maximum values, horizontal lines correspond to medians, and squares correspond to mean values. Control: 18 films; 4 mM/l  $\text{Br}^-$ : 5 films; 8 mM/l  $\text{Br}^-$ : 2 films; 4 mM/l  $\text{F}^-$ : 2 films; 8 mM/l  $\text{F}^-$ : 2 films.

Replacing sodium chloride with sodium fluoride resulted in the following (Fig. 4, b, d, f): up to 8 mM/l NaF,  $L_{\text{count}}$  values are in the range of control values; up to 8 mM/l NaF  $L_{\text{sum}}$  tends to decrease, but the ranges of its values are at least partly overlapping. At 16 mM/l NaF and more, zigzags are not formed.  $\alpha_{\text{mean}}$  tends to decrease, but does not go beyond the extreme values of control.  $L_{\text{mean}}$  decreases with increasing NaF concentration, and the ranges of its values at 0, 4 and 8 mM/l NaF practically do not overlap.

At 4 mM/l  $\text{Cl}^-$  (20% of the usual concentration) and below, zigzags do not form, which indicates a high specificity of the zigzag aggregation mode to the physical parameters of the anions (size, surface charge, etc.).  $\text{Br}^-$  and  $\text{F}^-$  also influence the conformation of BSA and have a lower degree of hydration than  $\text{Cl}^-$  (which affects electrostatic interactions) [18].  $\text{Br}^-$  and  $\text{F}^-$  themselves do not create conditions for the formation of zigzag patterns, but their presence has different effects: at 8 mM/l  $\text{Br}^-$ , the number of zigzag segments markedly decreases, while  $\text{F}^-$  noticeably reduces the average length of zigzag segments.

#### ***Heat treatment of BSA solutions***

In this experiment [18], solutions of BSA with NaCl were heated to 45, 70 and 95 °C to find out what contribution the structural state of the protein makes to the formation of zigzag patterns. The values of  $L_{\text{count}}$  (Fig. 5, a) and  $L_{\text{sum}}$  for 20 and 45 °C are in the same range, at 70 °C they decrease considerably, and at 95 °C zigzags are not formed. The values of  $\alpha_{\text{mean}}$  for 20 and 45 °C are in the same range, and at 70 °C they increase (Fig. 5, b).  $L_{\text{mean}}$  practically does not change at different temperatures (Fig. 5, c). At 70 °C, the Burr<sup>XII</sup> C parameter (Fig. 5, d) decreases compared to 20 and 45 °C.

At 60 °C, BSA begins to unfold and form primary aggregates, at 70 °C it forms primary and secondary aggregates, and at 80 °C it forms aggregates of large size [28]. Since at 70 °C the amount of zigzags is noticeably reduced, and at 95 °C they are completely absent, it can be unequivocally asserted that protein aggregation disrupts the conditions for the formation of zigzag patterns. Also, at 70 °C, compared to the control, the mean angle between the  $\alpha_{\text{mean}}$  segments slightly increases and scatter of segment lengths increases (which is reflected in the reduced Burr<sup>XII</sup> C), but the average length  $L_{\text{mean}}$  remains almost the same. These observations suggest that the state of the biopolymer mainly affects the number of zigzag segments, and the concentration of chlorine mainly affects the length of the segments.

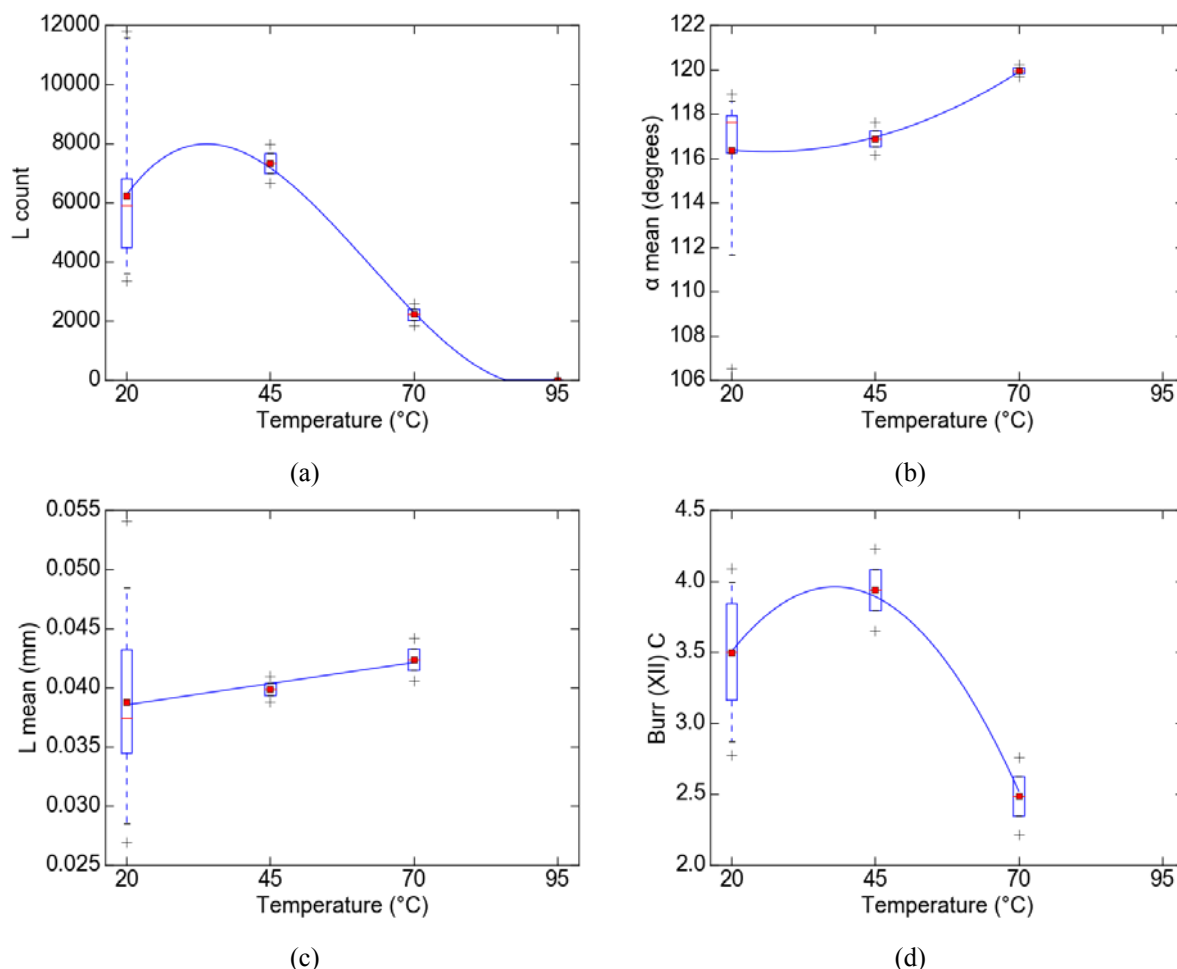


Fig. 5. Patterns characteristics after the temperature treatment of the biopolymer solution: (a) number of zigzag segments; (b) average angle between zigzag segments; (c) average length of zigzag segments; (d) shape parameter C of the Burr<sup>XII</sup> distribution. Box plot notation: boxes correspond to 25 and 75 percentiles, dotted lines correspond to 5 and 95 percentiles, crosses correspond to minimum and maximum values, horizontal lines correspond to medians, and squares correspond to mean values. Control: 18 films; 45 °C: 2 films; 70 °C: 2 films; 90 °C: 2 films.

### ***Gamma irradiation of BSA solutions by <sup>60</sup>Co***

In this experiment [22], solutions of BSA with NaCl were subjected to gamma irradiation in 0.16 – 12000 Gy dose range.  $L_{\text{count}}$  (Fig. 6, a) and  $L_{\text{sum}}$  for the intermediate doses have both values close to zero, and values that fall in the confidence interval of the control; from a statistical point of view, doses of 1 – 2000 Gy are practically indistinguishable. Only at 12000 Gy zigzags completely cease to form.  $\alpha_{\text{mean}}$  and  $L_{\text{mean}}$  (Fig. 6, b, c) vary in approximately the same range at all doses. Parameters of the fitted functions, for example, Burr<sup>XII</sup> C (Fig. 6, d), also have too large variations to distinguish intermediate doses.

Gamma irradiation leads to the formation of free radicals in solution, which cause protein fragmentation. According to the data of SDS-PAGE (dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), polypeptide chain breaks down at doses up to 1 kGy, and at 5 kGy or higher fragments of the destroyed protein begin to form large molecular weight aggregates [29]. Specifically, doses up to 0.2 kGy damage 10-20% of BSA [30]; at 1 kGy, 50-60% of BSA is damaged [30], and even at 2.5 kGy some amount of undamaged BSA still remains [31]. In our case, the ionizing radiation changes the number of zigzag segments, but the average length  $L_{\text{mean}}$ , angles ( $\alpha_{\text{mean}}$ ) and other distribution parameters are practically independent of the dose. At 12 kGy (aggregation of protein fragments), zigzags never form, but in the dose



range of 1 – 2000 Gy (protein destruction), the amount of zigzags on a given film can turn out to be anything from near-zero to the amount typical for the control. This suggests that, unlike the formation of aggregates, biopolymer fragmentation does not have unambiguous effect on the formation of zigzag patterns.

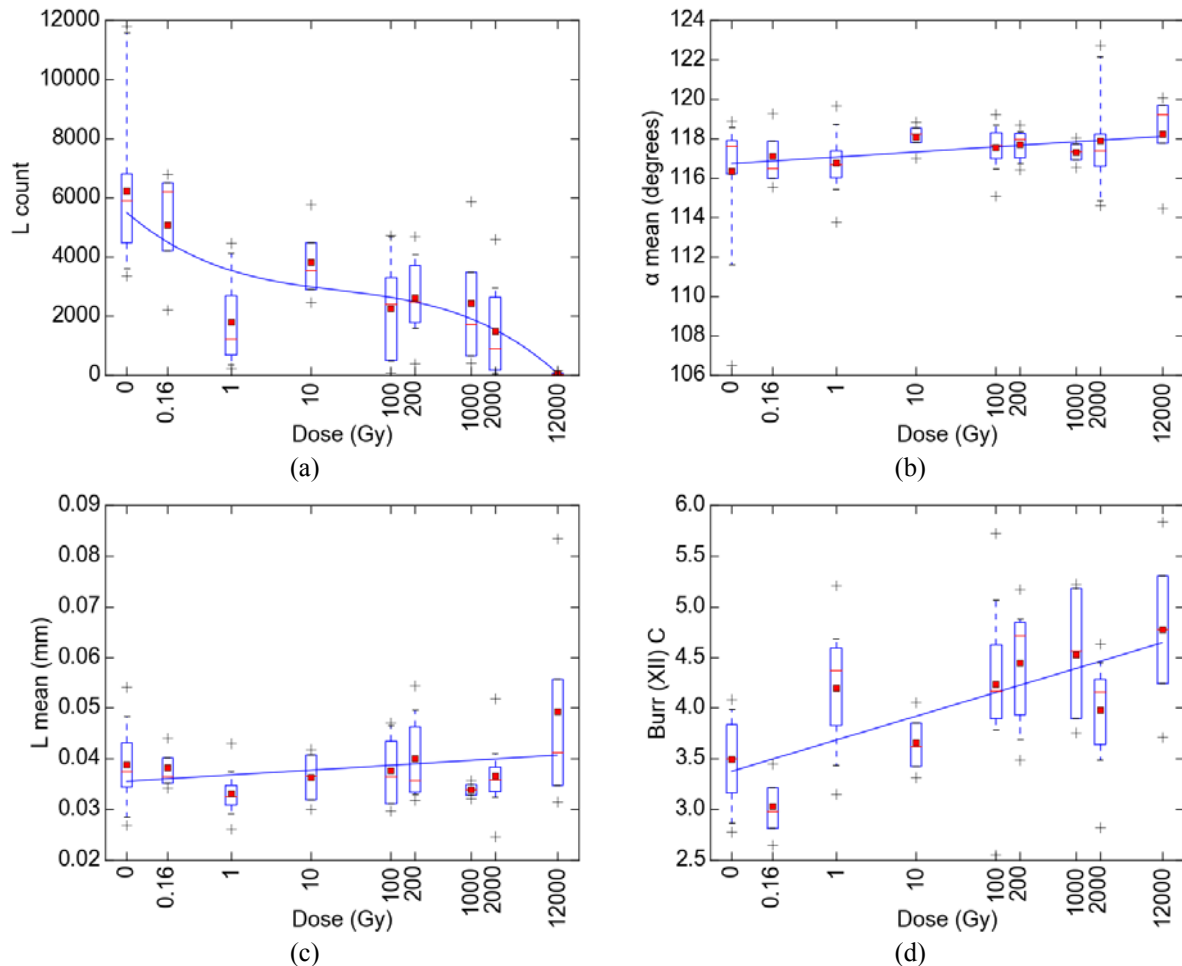


Fig. 6. Pattern characteristics after gamma irradiation of the biopolymer solution: (a) number of zigzag segments; (b) average angle between zigzag segments; (c) average length of zigzag segments; (d) shape parameter C of the Burr<sup>XII</sup> distribution. Box plot notation: boxes correspond to 25 and 75 percentiles, dotted lines correspond to 5 and 95 percentiles, crosses correspond to minimum and maximum values, horizontal lines correspond to medians, and squares correspond to mean values. Control: 18 films; 0.16 Gy: 3 films; 1 Gy: 12 films; 10 Gy: 4 films; 100 Gy: 8 films; 200 Gy: 6 films; 1 kGy: 4 films; 2 kGy: 10 films; 12 kGy: 4 films.

#### ***Addition of FeCl<sub>3</sub> to BSA solutions***

In this experiment [19], FeCl<sub>3</sub> salt in the concentration range of 0.05 – 0.4 mM/l was added to the solutions of BSA with NaCl.  $L_{\text{sum}}$  and  $L_{\text{count}}$  (Fig. 7, a, b) up to 0.15 mM/l of FeCl<sub>3</sub> stay in the range of control values, but starting from 0.2 mM/l they noticeably decrease. When FeCl<sub>3</sub> concentration reaches 0.3 mM/l, the probability of zigzag formation decreases even more, and starting from 0.4 mM/l of FeCl<sub>3</sub> zigzags stop forming completely. For  $\alpha_{\text{mean}}$  and  $L_{\text{mean}}$  (Fig. 7, c, d), there is no evident dependence on the concentration of FeCl<sub>3</sub>. The parameters of the fitted functions also behave in a manner similar to either  $L_{\text{count}}$  or  $L_{\text{mean}}$ .

If FeCl<sub>3</sub> is added to the BSA solution, the number of zigzag segments ( $L_{\text{count}}$ ) changes, but no dependence of distribution parameters on the iron concentration is observed.  $L_{\text{count}}$  has several very distinct areas: up to 0.15 mM/l FeCl<sub>3</sub>,  $L_{\text{count}}$  is in the range of control values and even has an upward tendency; between 0.2 and 0.25 mM/l FeCl<sub>3</sub>, the amount of zigzags is

markedly reduced and varies in approximately the same range; at 0.3 mM/l,  $L_{\text{count}}$  decreases again, and at 0.4 mM/l  $\text{FeCl}_3$  zigzags cease to form. At the moment, we find it difficult to hypothesize what could be the cause of such a threshold effect. According to the data of [32], even at a 50:1 concentration ratio, only 0.79 mole of  $\text{Fe}^{3+}$  binds to 1 mole of BSA, and this does not cause obvious changes in the secondary structure of BSA. It might be that, upon reaching a certain concentration of  $\text{FeCl}_3$ , another morphology with a higher growth rate becomes possible, which, according to the hypothesis of [33], will lead to the suppression of other types of patterns.

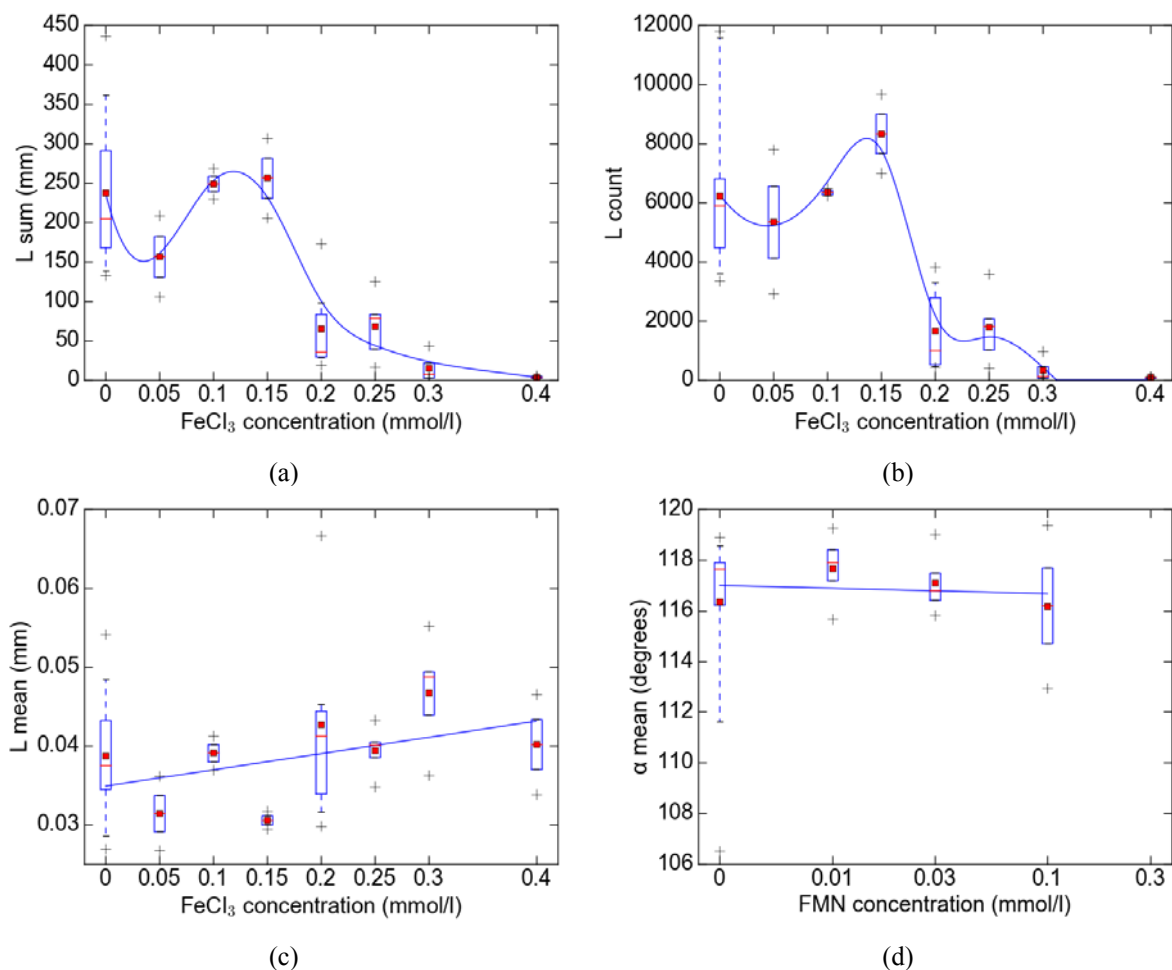


Fig. 7. Pattern characteristics when  $\text{FeCl}_3$  is added to the biopolymer solution: (a) total length of zigzag segments; (b) number of zigzag segments; (c) average length of zigzag segments; (d) average angle between zigzag segments. Box plot notation: boxes correspond to 25 and 75 percentiles, dotted lines correspond to 5 and 95 percentiles, crosses correspond to minimum and maximum values, horizontal lines correspond to medians, and squares correspond to mean values. Control: 18 films; 0.05 mM/l  $\text{FeCl}_3$ : 2 films; 0.1 mM/l  $\text{FeCl}_3$ : 2 films; 0.15 mM/l  $\text{FeCl}_3$ : 2 films; 0.2 mM/l  $\text{FeCl}_3$ : 7 films; 0.25 mM/l  $\text{FeCl}_3$ : 5 films; 0.3 mM/l  $\text{FeCl}_3$ : 5 films; 0.4 mM/l  $\text{FeCl}_3$ : 2 films.

#### **Addition of flavin mononucleotide to BSA solutions**

In this experiment [23], flavin mononucleotide (FMN) in the concentration range of 0.01 – 0.3 mM/l was added to the solutions of BSA with NaCl.  $L_{\text{count}}$  (Fig. 8, a) and  $L_{\text{sum}}$  at 0.01 mM/l still fall within the range of control values, but 0.03 mM/l of FMN already significantly inhibits the formation of zigzag patterns. At 0.3 mM/l, zigzags completely cease to form.  $\alpha_{\text{mean}}$  and  $L_{\text{mean}}$  (Fig. 8, d, c) remain approximately in the range of control values. The parameter Inverse Weibull C (Fig. 8, b) increases with the increase of FMN concentration (the

growth of Inverse Weibull C corresponds to the distribution "shrinkage" and shifting towards larger values).

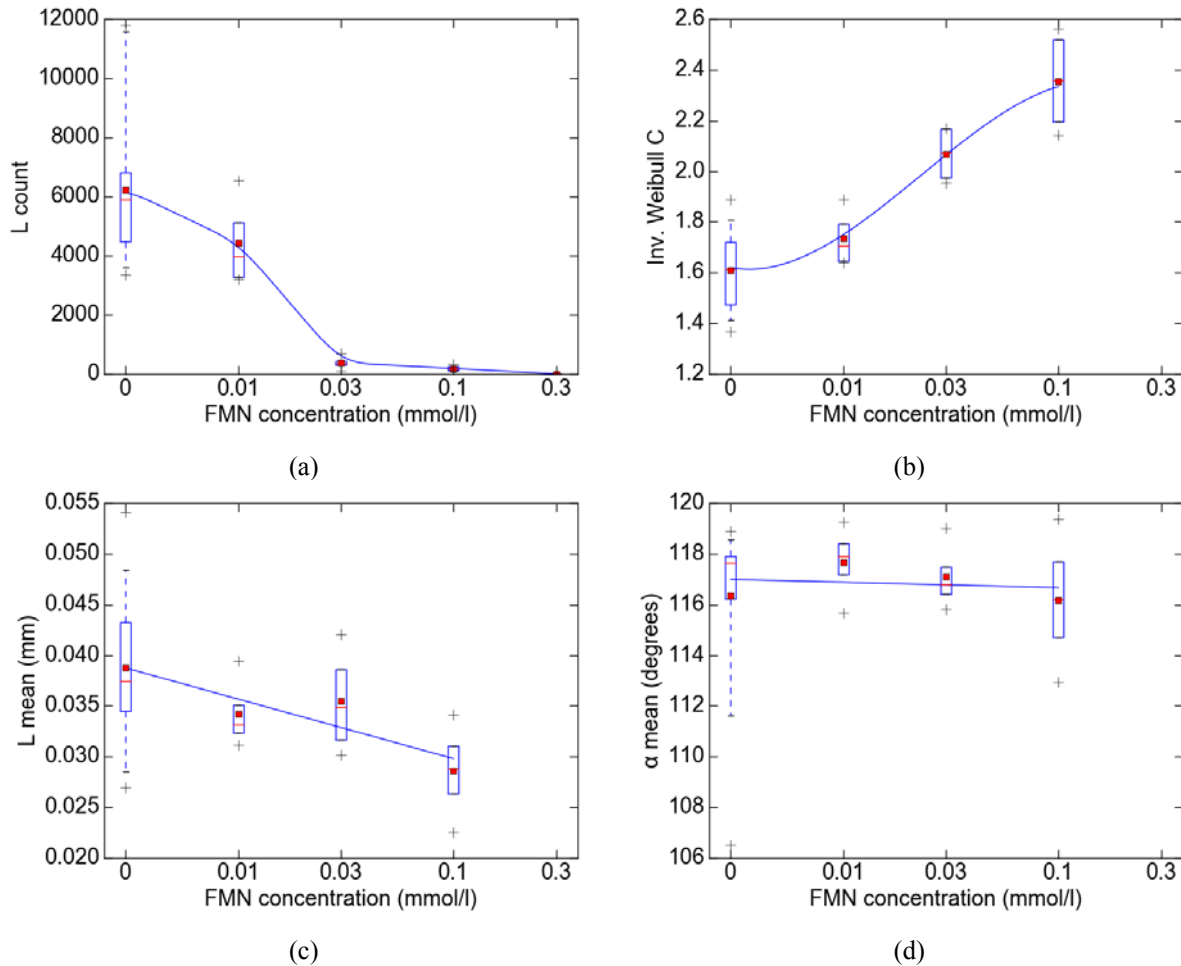


Fig. 8. Pattern characteristics when flavin mononucleotide is added to the biopolymer solution: (a) number of zigzag segments; (b) shape parameter C of the Inverse Weibull distribution; (c) average length of zigzag segments; (d) average angle between zigzag segments. Box plot notation: boxes correspond to 25 and 75 percentiles, dotted lines correspond to 5 and 95 percentiles, crosses correspond to minimum and maximum values, horizontal lines correspond to medians, and squares correspond to mean values. Control: 18 films; 0.01 mM/l FMN: 4 films; 0.03 mM/l FMN: 4 films; 0.1 mM/l FMN: 4 films; 0.3 mM/l FMN: 4 films.

Addition of 0.01 mM/l FMN does not shift the characteristics of zigzag patterns beyond the range of control values. However, starting from 0.03 mM/l, the number of segments and the spread of segment lengths are sharply reduced. Average segment lengths ( $L_{\text{mean}}$ ) and angles between segments ( $\alpha_{\text{mean}}$ ) practically do not change. According to the studies [34-36], HSA and BSA form complexes with riboflavin (RF), flavin adenine dinucleotide (FAD) and FMN at a ratio of 1:1 and with high binding constants; in [36] it was also shown that, in the presence of RF, BSA conformation changes and its hydration increases. This agrees with the results obtained by spectroscopy and microwave dielectrometry for solutions of FMN with BSA [23]. In our case, at 0.01 mM/l FMN, the number of FMN molecules is 1.3 times the number of BSA molecules, and at 0.03 mM/l it is 4 times the number of BSA molecules. It can be assumed that the conditions for the formation of zigzag patterns are violated by the presence of free FMN, but not by the binding of FMN to BSA.

Table 1 summarizes the effect of the factors studied in this paper on the values of  $L_{\text{count}}$  and  $L_{\text{mean}}$ . The behavior of these characteristics is compared to the structural state of the protein according to the published data.

Table 1

Effect of certain physical and chemical factors on the  $L_{\text{count}}$  and  $L_{\text{mean}}$  characteristics of films obtained from saline solutions of BSA in various experiments

Experiment	Effect on $L_{\text{count}}$ and $L_{\text{mean}}$	Structural state of the protein
Doubling the concentration of BSA and NaCl	$L_{\text{mean}}$ increases with increasing concentration	Not violated
Replacing $\text{Cl}^-$ with $\text{Br}^-$ or $\text{F}^-$	Starting at 8 mM/l $\text{Br}^-$ , $L_{\text{count}}$ decreases; starting at 4 mM/l $\text{F}^-$ , $L_{\text{mean}}$ decreases	Not violated [37]
Heat treatment	$L_{\text{count}}$ decreases at 70 °C (formation of aggregates) and becomes 0 at 95 °C (large aggregates)	Denaturation and aggregation of the protein [28]
Irradiation by $^{60}\text{Co}$	In the 1 – 2000 Gy range (destruction of the protein) $L_{\text{count}}$ varies from almost zero to the typical values for control; at 12 kGy (aggregation) $L_{\text{count}}$ is equal to 0	Up to 1 kGy: protein fragmentation [29]; starting from 5 kGy: aggregation of fragments [29]; at 2.5 kGy some amount of undamaged BSA still remains [31]
Addition of $\text{FeCl}_3$	Up to 0,15 mM/l $\text{FeCl}_3$ , $L_{\text{count}}$ stays in the range of control values, at 0,2 mM/l and 0,3 mM/l it decreases in discrete manner, and becomes 0 at 0,4 mM/l	$\text{Fe}^{3+}$ does causes no obvious changes in the secondary structure of BSA [32]
Addition of flavin mononucleotide	$L_{\text{count}}$ is significantly reduced in the presence of an excess amount of FMN not bound to the protein	Flavin derivatives lead to a change in the conformation and an increase in the hydration of BSA [36]

An additional observation, which is valid for all experiments, is that all the considered characteristics have a significant spread. It can be caused both by insufficient accuracy of the control of experimental conditions (the degree of purity of the cuvettes, the homogeneity of the solution, the inclination of the cuvette during drying), and by the chaotic character of the process of texture formation. The authors of [14, 15] consider the latter to be the case, as they also report low reproducibility and high variability of the results of the method of biocrystallization. According to their analysis, the crystallization stage is the primary source of the variability of results.

## CONCLUSIONS

A number of characteristics of zigzag patterns, which form on films of dried BSA solutions, were analyzed in this paper. It was determined that the most informative among the characteristics considered are the number of zigzag segments  $L_{\text{count}}$  and their average length  $L_{\text{mean}}$ , and the least informative is the average angle between segments. Other parameters either correlate with  $L_{\text{count}}$  or  $L_{\text{mean}}$ , or do not exhibit any dependence on the strength of the investigated factors. The data suggest that  $L_{\text{mean}}$  mainly depends on the chlorine concentration, whereas  $L_{\text{count}}$  is sensitive to any violations in the conditions of zigzag formation. These violations occur, in particular, at low chlorine concentrations, at protein

aggregation (but not necessarily at fragmentation), and also in the presence of an excess amount of low molecular weight compounds (ligands) and ions not associated with the protein in the solution. Clarification of the role of these factors in the process of zigzag formation, accounting for other types of patterns and finding more efficient and reproducible methods for obtaining films will be the directions of our further research.

#### REFERENCES

1. Yahno T. A. Drops of biological fluids, drying on a solid substrate: the dynamics of morphology, mass, temperature and mechanical properties / T. A. Yahno, V. V. Kazakov, O. A. Sanin, A. G. Sanin, V. G. Yahno // *Zh. Tekh. Fiz.* – 2010. – Vol. 80. – P. 17–23.
2. Yakhno T. A. Sodium chloride crystallization from drying drops of albumin–salt solutions with different albumin concentrations / T. A. Yakhno // *Tech. Phys.* – 2015. – Vol. 60. – P. 30–37.
3. Yakhno T. A. Complex Pattern Formation in Sessile Droplets of Protein-Salt Solutions with Low Protein Content. What Substance Fabricates These Patterns? / T. A. Yakhno // *Phys. Chem.* – 2011. – Vol. 1. – P. 10–13.
4. Markevich V. E. Methods of wedge dehydration of biological fluids / V. E. Markevich, E. A. Kirilenko, V. A. Petrashenko, T. U. Zablotskaya, T. A. Bilokon // *Morphologia.* – 2014. – Vol. 8. – P. 113–117.
5. Gorza F. D. S. Morphological Analysis and Interaction of Chlorophyll and BSA / F. D. S. Gorza, G. C. Pedro, T. F. Trescher, R. J. da Silva, J. R. Silva, N. C. de Souza // *BioMed. Res. Int.* – 2014. – Vol. 2014. – Article ID 872701. – P. 1–6.
6. Shabalin V. N. The markers of malignant growth in the morphological picture of human biological fluids / V. N. Shabalin, S. N. Shatokhina // *Questions of Oncology.* – 2010. – Vol. 56, Issue 3. – P. 293–300.
7. Chen R. Blood drop patterns: Formation and applications / R. Chen, L. Zhang, D. Zang, W. Shen // *Advances in Colloid and Interface Science.* – 2016. – Vol. 231. – P. 1–14.
8. Zablotskaya T. U. Analysis of the main processes and types of structures in the dehydration of biological fluids / T. U. Zablotskaya // *Electromech. and energy-saving systems.* – 2010. – Vol. 4 (12). – P. 92–95.
9. Elizarov A. I. The method of quantitative evaluation of images with central symmetry on the example of the facies of biological fluids / A. I. Elizarov, T. U. Zablotskaya // *Bull. of KSPU.* – 2007. – Vol. 1 (42). – Part 1. – P. 8–13.
10. Killeen A. A. Protein Self-Organization Patterns in Dried Serum Reveal Changes in B-Cell Disorders / A. A. Killeen, N. Ossina, R. C. McGlennen, S. Minnerath, J. Borgos, V. Alexandrov, A. Sarvazyan // *Mol. Diag. Ther.* – 2006. – Vol. 10, Issue 6. – P. 371–380.
11. Kokornaczyk M. Organic wheat quality from a defined Italian field-trial / M. Kokornaczyk, J. Kahl, M. Roose, N. Busscher, A. Ploeger // 16th IFOAM Organic World Congress : book of abstracts, 16–20 June 2008, Modena, Italy. – Mode of access : [http://orgprints.org/11732/1/Kokornaczyk\\_11732\\_rev.doc](http://orgprints.org/11732/1/Kokornaczyk_11732_rev.doc).
12. Kokornaczyk M. O. Self-Organized Crystallization Patterns from Evaporating Droplets of Common Wheat Grain Leakages as a Potential Tool for Quality Analysis / M. O. Kokornaczyk, G. Dinelli, I. Marotti, S. Benedettelli, D. Nani, L. Betti // *The Scientific World JOURNAL.* – 2011. – Vol. 11. – P. 1712–1725.
13. Andersen J.-O. Computerised image analysis of biocrystallograms originating from agricultural products / J.-O. Andersen, C. B. Henriksen, J. Laursen, A. A. Nielsen // *Computers and Electronics in Agriculture.* – 1999. – Vol. 22. – P. 51–69.
14. Busscher N. Standardization of the Biocrystallization Method for Carrot Samples / N. Busscher, J. Kahl, J.-O. Andersen, M. Huber, G. Mergardt, P. Doesburg, M. Paulsen, A. Ploeger // *Biol. Agriculture and Horticulture.* – 2010. – Vol. 27. – P. 1–23.
15. Kahl J. First tests of standardized biocrystallization on milk and milk products / J. Kahl, N. Busscher, P. Doesburg, G. Mergardt, M. Huber, A. Ploeger // *Eur. Food Res. Technol.* – 2009. – Vol. 229. – P. 175–178.
16. Patent 110130 Ukraine, IPC12 C09K 19/38, G01N 33/48, G01N 21/956. Method for the estimation of substance effect on biopolymers / G. M. Glibitskiy, D. M. Glibitskiy ; owner is A. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of the National Academy of Sciences of Ukraine. – № a201312123, appl. 16.10.2013 ; publ. 25.11.2015, bull. № 22. – 7 p.
17. Patent 111769 Ukraine, IPC12 G01N 21/898, G01N 21/956, C09K 19/38, G01N 33/48. Method for the estimation of substance effect on biopolymers / G. M. Glibitskiy, D. M. Glibitskiy ; owner is A. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of the National Academy of Sciences of Ukraine. – № a201408411, appl. 25.11.2014 ; publ. 10.06.2016, bull. № 11. – 8 p.
18. Glibitskiy G. M. Textures on the surface of BSA films with different concentrations of sodium halides and water state in solution / G. M. Glibitskiy, D. M. Glibitskiy, O. A. Gorobchenko, O. T. Nikolov, A. D. Roshal, M. A. Semenov, A. I. Gasan // *Nanoscale Res. Lett.* – 2015. – Vol. 10, Issue 1. – P. 155–164.

19. Glibitskiy D. M. Textures of BSA films with iron and copper ions / D. M. Glibitskiy, G. M. Glibitskiy, M. A. Semenov, A. V. Shestopalova // *Biophys. Bull.* – 2016. – Vol. 35, Issue 1. – P. 21–27.
20. Raz E. New periodic morphologies observed during dendritic growth of ammonium chloride crystals in thin layers / E. Raz, S. G. Lipson, E. Ben-Jacob // *J. of Crystal Growth.* – 1991. – Vol. 108. – P. 637–646.
21. Mougín K. Complex Pattern Formation in Drying Dispersions / K. Mougín, H. Haidara // *Langmuir.* – 2002. – Vol. 18. – P. 9566–9569.
22. Gorobchenko O. A. Effect of gamma irradiation of protein solution on the formation of film textures / O. A. Gorobchenko, O. T. Nikolov, D. M. Glibitskiy, A. D. Roshal, A. V. Shestopalova, M. A. Semenov, G. M. Glibitskiy // *Nanotechnology and nanomaterials : Int. res. and practice conf. : book of abstracts, 26–29 August 2015, Lviv (Ukraine).* – Lviv, 2015. – P. 386.
23. Glibitskiy D. M. Effect of flavin mononucleotide on the texture of BSA films / D. M. Glibitskiy, O. A. Gorobchenko, O. T. Nikolov, A. M. Zibarov, A. D. Roshal, M. A. Semenov, G. M. Glibitskiy // *Nanotechnology and nanomaterials : Int. res. and practice conf. : book of abstracts, 24–27 August 2016, Lviv (Ukraine).* – Lviv, 2016. – P. 132.
24. Liu X.-Y. Nucleation-limited aggregation of crystallites in fractal growth / X.-Y. Liu, M. Wang, D.-W. Li, C. S. Strom, P. Bennema, N.-B. Ming // *J. of Crystal Growth.* – 2000. – Vol. 208. – P. 687–695.
25. Mitzenmacher M. A Brief History of Generative Models for Power Law and Lognormal Distributions / M. Mitzenmacher // *Internet Mathematics.* – 2003. – Vol. 1, No. 2. – P. 226–251.
26. Burr I. W. Cumulative frequency functions / I. W. Burr // *Ann. Math. Stat.* – 1942. – Vol. 13, Issue 2. – P. 215–232.
27. Gusmao F. R. S. de. The generalized inverse Weibull distribution / F. R. S. de Gusmao, E. M. M. Ortega, G. M. Cordeiro // *Stat. Papers.* – 2011. – Vol. 52. – P. 591–619.
28. Borzova V. A. Kinetics of Thermal Denaturation and Aggregation of Bovine Serum Albumin / V. A. Borzova, K. A. Markossian, N. A. Chebotareva, S. Yu. Kleymenov, N. B. Poliansky, K. O. Muranov, V. A. Stein-Margolina, V. V. Shubin, D. I. Markov, B. I. Kurganov // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11, Issue 4. – Mode of access : <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0153495>.
29. Cho Y. S. Effect of  $\gamma$ -Irradiation on the Molecular Properties of Bovine Serum Albumin and  $\beta$ -Lactoglobulin / Y. S. Cho, K. B. Song // *J. Biochem. Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 33, No. 2. – P. 133–137.
30. Mishra K. Protective effect of ferulic acid on ionizing radiation induced damage in bovine serum albumin / K. Mishra, H. Ojha, S. Kallepalli, A. Alok, K. N. Chaudhury // *Int. J. Radiat. Res.* – 2014. – Vol. 12, Issue 2. – P. 113–121.
31. Akhavan A. Radiation synthesis and characterization of protein stabilized gold nanoparticles / A. Akhavan, H. R. Kalhor, M. Z. Kassaee, N. Sheikh, M. Hassanlou // *Chem. Eng. J.* – 2010. – Vol. 159. – P. 230–235.
32. Xu X. Oxygen-dependent oxidation of Fe(II) to Fe(III) and interaction of Fe(III) with bovine serum albumin, leading to a hysteretic effect on the fluorescence of bovine serum albumin / X. Xu, L. Zhang, D. Shen, H. Wu, Q. Liu // *J. Fluoresc.* – 2008. – Vol. 18, Issue 1. – P. 193–201.
33. Ben-Jacob E. The formation of patterns in non-equilibrium growth / E. Ben-Jacob, P. Garik // *Nature.* – 1990. – Vol. 343. – P. 523–530.
34. Sengupta A. Comparative study of flavins binding with human serum albumin: a fluorometric, thermodynamic, and molecular dynamics approach / A. Sengupta, W. D. Sasikala, A. Mukherjee, P. Hazra // *Chemphyschem.* – 2012. – Vol. 13, Issue 8. – P. 2142–2153.
35. Zhang Y. Flavin-sensitized photo-oxidation of lysozyme and serum albumin / Y. Zhang, H. Görner // *Photochem. Photobiol.* – 2009. – Vol. 85, Issue 4. – P. 943–948.
36. Guo X. J. Spectroscopic investigation of the interaction between riboflavin and bovine serum albumin / X. J. Guo, X. D. Sun, S. K. Xu // *J. of Mol. Structure.* – 2009. – Vol. 931, Issue 1. – P. 55–59.
37. Wang G. Binding mechanism of halide ions to bovine serum albumin and hemoglobin: investigated by ion selective-electrode / G. Wang, W. Tang, X. Hao, C. Yan, Y. Lu // *J. Biophys. Chem.* – 2011. – Vol. 2 (3). – P. 194–201.

УДК 577.32:66.094.1:543.51

**РЕДОКС-ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С АМИНОКИСЛОТОЙ ЦИСТЕИНОМ КАК ОДИН ИЗ ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО****В.С. Шелковский<sup>1</sup>, М.В. Косевич<sup>1,2</sup>, О.А. Боряк<sup>1</sup>, В.Г. Зобнина<sup>1</sup>,  
А.М. Плехотниченко<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина

Национальной академии наук Украины, пр. Науки 47, Харьков, 61103, Украина

<sup>2</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы 4, Харьков, 61022, Украина

e-mail: shelkovsky@ilt.kharkov.ua

Надійшла до редакції 26 травня 2017 року

Прийнята 2 червня 2017 року

Одним из актуальных направлений исследований, связанных с разработкой способов борьбы с нейродегенеративными заболеваниями, является поиск веществ-ингибиторов агрегации определенных белков, нарушающей функционирование нервных клеток. В рамках молекулярно-биофизической проблемы установления молекулярных механизмов действия фармакологических препаратов, на модельной системе *in vitro* проведено исследование редокс-взаимодействия метиленового синего как перспективного препарата для предотвращения болезни Альцгеймера с его потенциальной мишенью – аминокислотой цистеином, входящей в состав активного участка Тау-белков. С помощью вторично-эмиссионной масс-спектрометрической методики идентифицирован единственный продукт прямого окисления цистеина метиленовым синим – цистин, образующийся путем формирования дисульфидного мостика между двумя молекулами цистеина. Предполагается, что подобная модификация остатков цистеина в составе Тау-белков меняет их структуру, что может препятствовать их последующей агрегации. Кислородсодержащие продукты окисления цистеина не обнаружены. Показано, что восстановление метиленового синего в ходе реакции переводит его в лейко-форму, которая также рассматривается в качестве агента в терапии нейродегенеративных заболеваний.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** молекулярные механизмы, метиленовый синий, цистеин, цистин, дисульфидные мостики, Тау-белки, болезнь Альцгеймера, вторично-эмиссионная масс-спектрометрия.

**РЕДОКС-ВЗАЄМОДІЯ З АМІНОКИСЛОТОЮ ЦИСТЕЇНОМ ЯК ОДИН З МОЖЛИВИХ МЕХАНІЗМІВ БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЬОГО****В.С. Шелковський<sup>1</sup>, М.В. Косевич<sup>1,2</sup>, О.А. Боряк<sup>1</sup>, В.Г. Зобніна<sup>1</sup>,  
О.М. Плехотніченко<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України, пр. Науки, 47,  
Харків, 61103, Україна<sup>2</sup>Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, пл. Свободи 4, Харків, 61022, Україна

Одним з актуальних напрямів досліджень, пов'язаних із розробкою засобів боротьби з нейродегенеративними захворюваннями, є пошук речовин-інгібіторів агрегації певних білків, яка порушує функціонування нервових клітин. В межах молекулярно-біофізичної проблеми встановлення молекулярних механізмів дії фармакологічних препаратів, на модельній системі *in vitro* проведено дослідження редокс-взаємодії метиленового синього, як перспективного препарату для запобігання хвороби Альцгеймера, з його потенційною мішенню – амінокислотою цистеїном, що входить до складу активної ділянки Тау-білків. За допомогою вторинно-емісійної мас-спектрометричної методики ідентифіковано єдиний продукт прямого окислення цистеїну метиленовим синім – цистин, що утворюється шляхом формування дисульфідного містка між двома молекулами цистеїну. Ймовірно, що подібна модифікація залишків цистеїну в складі Тау-білків змінює їх структуру, що може запобігати їх наступній агрегації. Кисеньвмісні продукти окислення цистеїну не виявлено. Показано, що відновлення метиленового синього у ході реакції переводить його у лейко-форму, котра також розглядається як агент в терапії нейродегенеративних захворювань.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** молекулярні механізми, метиленовий синій, цистеїн, цистин, дисульфідні містки, Тау-білки, хвороба Альцгеймера, вторинно-емісійна мас-спектрометрія.

**REDOX INTERACTIONS OF METHYLENE BLUE WITH CYSTEINE AMINO ACID AS A POSSIBLE MECHANISM OF BIOLOGICAL ACTION OF THE DYE****V.S. Shelkovsky<sup>1</sup>, M.V. Kosevich<sup>1,2</sup>, O.A. Boryak<sup>1</sup>, V.G. Zobnina<sup>1</sup>, A.M. Plokhotnichenko<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, 47 Nauky Ave., Kharkiv, 61103, Ukraine*<sup>2</sup>*V.N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine*

Design of the inhibitors of the pathogenic protein aggregation, associated with the neural cell damage, is of great importance for the therapy of the neurodegenerative diseases. In this work redox interactions of methylene blue as a potential drug against Alzheimer's disease with its potential target – cysteine of the active site of Tau proteins, have been studied *in vitro*, in order to establish the molecular mechanism of methylene blue biological action. First, a single product of direct oxidation of cysteine by methylene blue, viz. cystine, possessing a disulfide bridge between two cysteine molecules, has been detected by mass spectrometry. Such modification of cysteine residues was suggested to affect secondary structure of Tau-proteins, hampering amyloid fibril formation. Notably, we failed to detect any oxygen-containing products of cysteine oxidation. Finally, reduction of methylene blue in the above reaction resulted in the formation of its leuco form, which could be also considered as a potential drug in the therapy of neurodegenerative diseases.

**KEY WORDS:** molecular mechanisms, methylene blue, cysteine, cystine, disulphide bridges, Tau-proteins, Alzheimer's disease, secondary emission mass spectrometry.

Данное исследование посвящено установлению результатов редокс-взаимодействия красителя метиленового синего с аминокислотой цистеином как одного из предполагаемых механизмов биологического действия данного красителя, рассматриваемого, в частности, при разработке лекарственных препаратов против нейродегенеративной болезни Альцгеймера.

Увеличение продолжительности жизни в связи с успехами в профилактике и лечении инфекционных и сердечнососудистых заболеваний обусловило новый вызов поиска методов борьбы с геронтологическими и нейродегенеративными проблемами, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона [1, 2]. Проблема усугубляется демографическими показателями повышения относительного количества пожилых людей в развитых странах. Причем благосостояние, рациональное питание и здоровый образ жизни личности не являются профилактикой этих заболеваний, о чем свидетельствуют примеры таких известных политических деятелей как Рональд Рейган и Маргарет Тэтчер. Неутешительные статистические данные свидетельствуют о том, что в настоящее время болезнью Альцгеймера страдает несколько миллионов человек, что влечет за собой значительные затраты на лечение [2, 3]. Оценки и прогнозы соответствующих медицинских организаций показывают [4], что нахождение эффективных способов борьбы с болезнью Альцгеймера к 2025 году позволит только в США сэкономить на здравоохранение до 220 миллиардов долларов в год. В связи с этим на решение данной проблемы брошены значительные научные силы и ресурсы – издается более десятка специализированных журналов, например, *Journal of Alzheimer's Disease* [5], работает международное научное общество «Alzheimer's Association» [6], регулярно проводятся научные конференции. Количество цитирований некоторых основополагающих работ по этой проблеме, например [7], достигает нескольких тысяч.

Для выбора стратегии борьбы с нейродегенеративными заболеваниями в рамках различных биологических и медицинских дисциплин ведется поиск причин и факторов, вызывающих нарушения, на уровне организма в целом, клеток и отдельных биомолекул, поскольку для создания соответствующих лекарственных средств необходимо определить мишени для их действия в организме. В задачи молекулярной биофизики входит установление молекулярных механизмов взаимодействия лекарственных препаратов с их молекулярными мишенями.



Поскольку изучению биомолекулярных процессов, сопровождающих болезнь Альцгеймера [7], и разработке соответствующих фармакологических препаратов посвящено множество публикаций, часть из которых все еще носит дискуссионный характер, мы отметим лишь те статьи, на основе которых была выбрана молекулярно-биофизическая задача для данного исследования.

Среди выявленных к настоящему времени возможных причин возникновения и развития болезни Альцгеймера является повреждение нервных клеток или волокон за счет нарушения структуры и функционирования двух видов белков: бета-амилоидного пептида А $\beta$  и Тау-белка (tau protein) [8, 9]. Поскольку в последнее время сформировалось мнение, что предложенные препараты, мишенью которых являются бета-амилоиды, не проявили ожидавшуюся от них эффективность [8, 9], внимание исследователей переключилось на Тау-белки как более уязвимую терапевтическую мишень [10-16].

Тау-белок принадлежит к группе белков, ассоциированных с микротрубочками нейронов (microtubule-associated protein tau, МАРТ) [17-19]. Нарушения, связанные с Тау-белками, называют таупатиями. При болезни Альцгеймера и некоторых других избыточно фосфорилированные (гиперфосфорилированные) Тау-белки теряют связь с белками тубулинами на поверхности микротрубочек, чем нарушают стабилизацию их структуры. Высвободившиеся молекулы Тау-белков начинают ассоциировать друг с другом, образуя ряд агрегационных форм: свернутые токсичные олигомерные формы, плотно упакованные парные спиральные филаменты (нити) (paired helical filaments) и, далее, нерастворимые нейрофибриллярные клубки (neurofibrillary tangles, NFTs). Последние, накапливаясь внутриклеточно, нарушают нормальное функционирование пораженных нейронов, что в конечном итоге, приводит к дегенерации и гибели нервных клеток.

Соответственно, искомые лекарственные вещества должны определенным образом воздействовать на агрегацию Тау-белков – либо предотвращать ее, либо разрушать агрегаты (tau aggregation inhibitors, ТАИ). [10, 13, 15, 20, 21]. (Альтернативный подход ингибирования одной или нескольких протеинкиназ, фосфорилирующих Тау-белок [16], не относится к теме данного исследования).

Установлено, что Тау-белок стабилизирует микротрубочки, связываясь с ними через четыре так называемых тубулин-связывающих домена R1-R4 [19]; эти же домены Тау-белков задействованы в их агрегации в парные филаменты (олигомерные формы) [22]. Блокировка этих доменов должна препятствовать агрегации. Было высказано предположение [23-25], что находящиеся в этих доменах два редокс-активных аминокислотных остатка цистеина (С291, С322) являются подходящей мишенью для модификации. Не так давно появились сообщения [26] об экспериментальном подтверждении этой гипотезы.

Среди низкомолекулярных соединений, способных воздействовать на Тау-белки [9, 26-28], испытывается катионный краситель метиленовый синий (Methylene Blue, МВ, называемый также methylthioninium, МТ, и methylthioninium chloride, МТС) [29-31], который, благодаря своим оптическим и редокс-свойствам, находит широкое применение в различных областях фармакологии, биомедицины и нанотехнологии [32, 33]. Также проверяется эффективность производных МВ – его лейкоформы (leuco MB, LMB) [34-36] и азуров [26].

Ряд зарубежных фирм, в частности TauRx Therapeutics [37] проводят испытания (во второй и третьей фазах) препаратов на основе МВ [11] (под названием Rember<sup>®</sup>) и его лейкоформы (LMTX<sup>®</sup>, "TRx0237") [34].

Что касается установления молекулярных механизмов действия метиленового синего и родственных ему соединений на Тау-белки то, несмотря на наличие ряда работ по этой теме [9, 21, 24-27], полученные в них данные противоречивы и обсуждение носит в основном спекулятивный характер на уровне обсуждения возможных путей взаимодействия. Так, рассматриваются возможности невалентных и ковалентных взаимодействий [14]. Невалентные взаимодействия заключаются во встраивании малых молекул между формирующимися олигомерами Тау-белков, что должно препятствовать их дальнейшей агрегации в нерастворимые нейрофибриллярные клубки. Ковалентные взаимодействия состоят в редокс-реакциях молекул препаратов с определенной выше мишенью – двумя остатками цистеина в тубулин-связывающих доменах Тау-белков. При этом возможны два варианта модификации цистеина: это либо блокировка каждого из остатков путем окисления, либо окислительная реакция с образованием внутри- или межмолекулярной сшивки – дисульфидного мостика. Исследование таких процессов с помощью масс-спектрометрических методик к настоящему времени не проводилось, за исключением одного сообщения [26], результаты которого не вызывают доверия по следующей причине. Авторы работы [26] проводили поиск продуктов окисления отдельных молекул цистеина (R-SH), которые, как предполагалось, должны представлять собой кислородсодержащие производные вида R-SOH, R-SOON, R-SO<sub>2</sub>OH, с использованием метода масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением растворов (электроспрей); однако в приводимом в статье масс-спектре не содержались молекулярные ионы перечисленных соединений, а заключения делались на основе косвенных данных.

Среди экспериментальных методов молекулярно-биологических и биофизических исследований в последнее время разработаны мягкоионизационные масс-спектрометрические методики для изучения механизмов действия биологически активных веществ и фармакологических препаратов на модельном молекулярном уровне [38-40]. Благодаря развитию и совершенствованию масс-спектрометрических методик, значительный прогресс достигнут в такой сравнительно новой области науки как протеомика [41]. В связи с превалированием в недавнем прошлом интереса к бета-амилоидной модели нейродегенеративных процессов, большинство протеомных масс-спектрометрических исследований в этой области были направлены на изучение именно бета амилоидов [42-49]; тау-белкам уделялось меньше внимания [50, 51]. На уровне малых молекул активно разрабатывались масс-спектрометрические подходы к изучению окислительно-восстановительных свойств редокс-активных веществ [52-54], в частности редокс-активных красителей [55, 56] и метиленового синего в их числе [57, 58]. При использовании методов вторично-ионной масс-спектрометрии (ВИМС), бомбардировки быстрыми атомами (ББА), матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) нами установлены особенности редокс-превращений метиленового синего в зависимости от метода воздействия и окружающей среды [59-65].

Из всего вышесказанного следует, что молекулярный механизм действия метиленового синего до сих пор не установлен, в основном, по причине сложности многокомпонентной системы и неоднозначности путей взаимодействия. В связи с этим представляется логичным начать поиск с модельной системы на мономерном уровне и с использованием масс-спектрометрического метода, позволяющего однозначно идентифицировать компоненты смесей. Таким образом, целью данной работы явилось установление результатов редокс-взаимодействия метиленового синего с аминокислотой цистеином как одного из предполагаемых молекулярных механизмов его фармакотерапевтического действия.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Материалы*

В работе использовали препараты метиленового синего производства ОАО «Витамины» (Умань, Украина) и аминокислоты цистеина производства «Реахим», (Российская Федерация).

Для приготовления растворов использовали деионизированную воду и пластиковую посуду.

В качестве жидкой матрицы для БА исследований использовали глицерин (Sigma, Германия).

### *Редокс-взаимодействие метиленового синего с цистеином*

Для получения концентрационных и временных зависимостей редокс-реакций между метиленовым синим и цистеином готовили водные растворы компонентов с разными концентрационными соотношениями и выдерживали в течение суток с периодическим контролем состояния системы. Для масс-спектрометрических исследований готовили образцы, содержащие однопроцентный раствор ( $3,2 \cdot 10^{-2}$  М) метиленового синего и цистеин в ряду концентраций  $88 \cdot 10^{-2}$  М,  $44 \cdot 10^{-2}$  М и  $22 \cdot 10^{-2}$  М. В связи с использованием в спектрофотометрических исследованиях растворов с более низкой, чем для масс-спектрометрии, общей концентрацией веществ, готовили также систему с  $1,1 \cdot 10^{-4}$  М метиленового синего и  $90 \cdot 10^{-4}$  М цистеина. Осуществление реакции наблюдали визуально по постепенному обесцвечиванию раствора и контролировали инструментально методом спектрофотометрии.

### *Оптическая спектроскопия*

Спектры поглощения в УФ и видимом диапазоне получали на двухлучевом спектрофотометре Hitachi 356 (Япония), в кварцевой кювете 10 мм, при спектральной ширине щели 2 нм. Для получения временных зависимостей спектры водного раствора смеси метиленового синего ( $1,1 \cdot 10^{-4}$  М) и цистеина ( $9 \cdot 10^{-3}$  М) записывали с интервалами от десятков минут до нескольких часов.

### *Масс-спектрометрия*

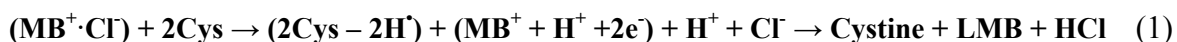
Масс-спектры с БА в режиме положительных ионов регистрировали с помощью секторного магнитного масс-спектрометра МИ-1201Э (НПО «SELMi», Сумы, Украина). В качестве бомбардирующего газа использовали аргон; энергия первичного пучка составляла 4,0 кэВ. В качестве жидкой матрицы для исследуемых веществ использовали глицерин. Переход в режим ВИМС путем отключения опции нейтрализации пучка ионов аргона не приводил к качественным изменениям получаемых масс-спектров.

При пробоподготовке равные объемные части глицериновой матрицы и обесцвеченных водных растворов метиленового синего и цистеина с различными концентрационными соотношениями смешивали для того, чтобы в исследуемом образце сохранялись указанные исходные концентрации красителя и аминокислоты после испарения воды из образца в форвакуумной системе масс-спектрометра. Альтернативно, бесцветные кристаллы, осажденные из реакционной смеси, перерастворяли в глицериновой матрице. Каплю образца объемом 5 мкл наносили на стандартную алюминиевую подложку. БА масс-спектры записывали в течение первых 5-10 минут после начала бомбардировки. При извлечении образца из вакуумной камеры по окончании эксперимента капля раствора оставалась бесцветной, что свидетельствовало об отсутствии реакций в объеме образца в данных экспериментальных условиях. В контрольных БА/ВИМС масс-спектрах образцов чистого цистеина наблюдался интенсивный пик протонированной аминокислоты; пики в массовой области ожидаемого продукта редокс-реакции (240-245 а.е.м.) находились на уровне фона.

Обработку БАА масс-спектров редокс-активных соединений проводили в соответствии с разработанными нами ранее подходами [59-61, 64, 65].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Окислительно-восстановительная реакция цистеина с органической солью метиленовым синим ( $\text{MB}^+\cdot\text{Cl}^-$ ) как окислителем, приводящая к шивке двух молекул цистеина (Cys) в цистин посредством образования дисульфидного мостика, а также лейкоформы LMB, имеет следующий вид:



О прохождении такой реакции в системе (цистеин – метиленовый синий) свидетельствует обесцвечивание водного раствора вследствие перехода метиленового синего в бесцветную лейкоформу [66]. Концентрационные и временные параметры взаимодействия показывают, что уменьшение интенсивности окрашивания системы проходит более активно с увеличением концентрации цистеина и прогрессирует во времени. Наблюдаемые визуально изменения количественно измерялись методом спектроскопии поглощения в видимом и УФ диапазонах (Рис. 1).

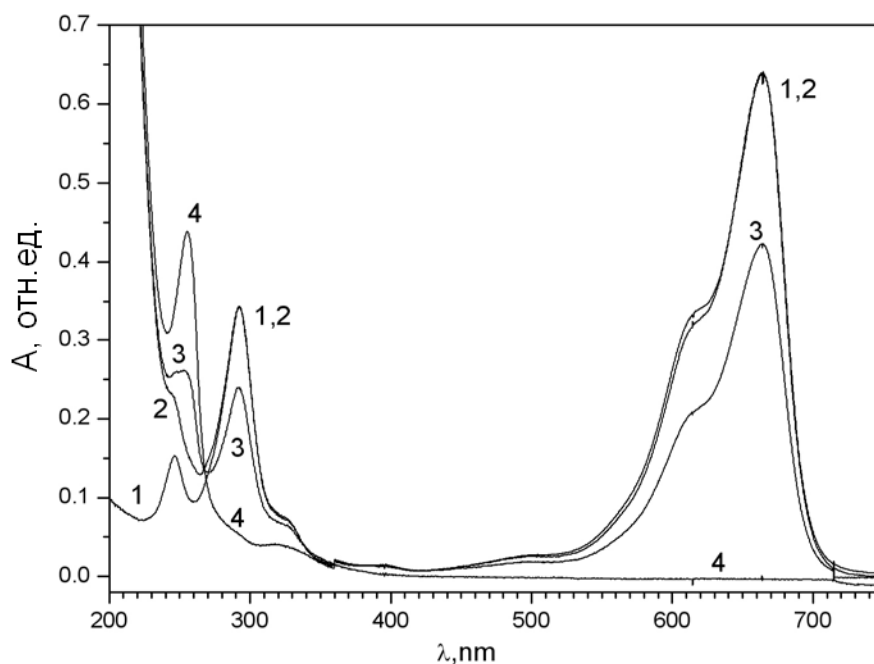


Рис. 1. Изменения спектров поглощения в зависимости от времени взаимодействия в смеси (метиленовый синий - цистеин). Линия 1 - спектр водного раствора контрольного образца метиленового синего,  $C_{\text{MB}}=1,1 \cdot 10^{-4}$  М. Линии 2-4 - спектры того же раствора после добавления к нему  $9 \cdot 10^{-3}$  М цистеина, зарегистрированные через 10 мин (2), через 4 часа (3) и через 20 часов (4). Характеристические значения максимумов полос поглощения для чистого метиленового синего –  $\lambda = 663$  нм, 614 нм, 292 нм; для лейкоформы метиленового синего –  $\lambda = 256$  нм. Положение изобестической точки –  $267,5 \pm 1$  нм.

В спектре контрольного образца водного раствора  $1,1 \cdot 10^{-4}$  М метиленового синего (линия 1) зарегистрированные значения максимумов поглощения в видимом ( $\lambda = 663$  нм) и УФ ( $\lambda = 292$  нм) диапазонах соответствуют литературным данным [67-70]. В спектре системы (цистеин – метиленовый синий) (линия 2) в УФ области добавляется широкая полоса, в которой перекрываются полосы поглощения цистеина

[71] и цистина [71], что препятствует использованию данного параметра для наблюдения за динамикой образования цистина как продукта реакции (1). С увеличением времени (линии 3, 4) интенсивности полос поглощения метиленового синего уменьшаются вплоть до исчезновения (линия 4); при этом заметно возрастает полоса с  $\lambda = 256$  нм, соответствующая лейкоформе метиленового синего [69]. Отметим, что в области длины волны  $\lambda = 256$  нм происходит перекрытия полос, характерных для обоих продуктов реакции – цистина и лейкоформы метиленового синего – однако появление четко выраженного пика с максимумом на  $\lambda = 256$  нм характерно именно для лейкоформы. Примечательно, что в наборе спектров (2-4) присутствует изобестическая точка  $\lambda = 267,5 \pm 1$  нм, свидетельствующая о наличии в реакционной системе только двух превращающихся друг в друга компонентов ( $MB^+$  и  $LMB$ ), что подтверждается также отсутствием полосы с  $\lambda = 420$  нм для возможного промежуточного продукта – полувосстановленной радикальной формы  $MB^{\cdot}$  [69].

Идентификацию продуктов взаимодействия в системе (цистеин – метиленовый синий) проводили с помощью ББА масс-спектрометрии. В ББА масс-спектре (Рис. 2) присутствуют пик, соответствующий исходному компоненту системы – цистеину – в протонированной форме  $Cys \cdot H^+$ ,  $m/z$  122, и сигналы глицериновой матрицы. Основным результатом является регистрация продукта окисления цистеина – цистина – в протонированной форме  $[2Cys - 2H^+] \cdot H^+$ ,  $m/z$  241. Отметим, что сигнал нековалентного димера цистеина  $2Cys \cdot H^+$ ,  $m/z$  243 отсутствует, то есть возможные невалентные взаимодействия в данном случае не реализуются. В масс-спектре отсутствуют какие-либо сигналы, которые можно было бы интерпретировать как продукты окисления мономеров цистеина посредством присоединения от одного до трех атомов кислорода, возможность образования которых обсуждалась в работе [26].

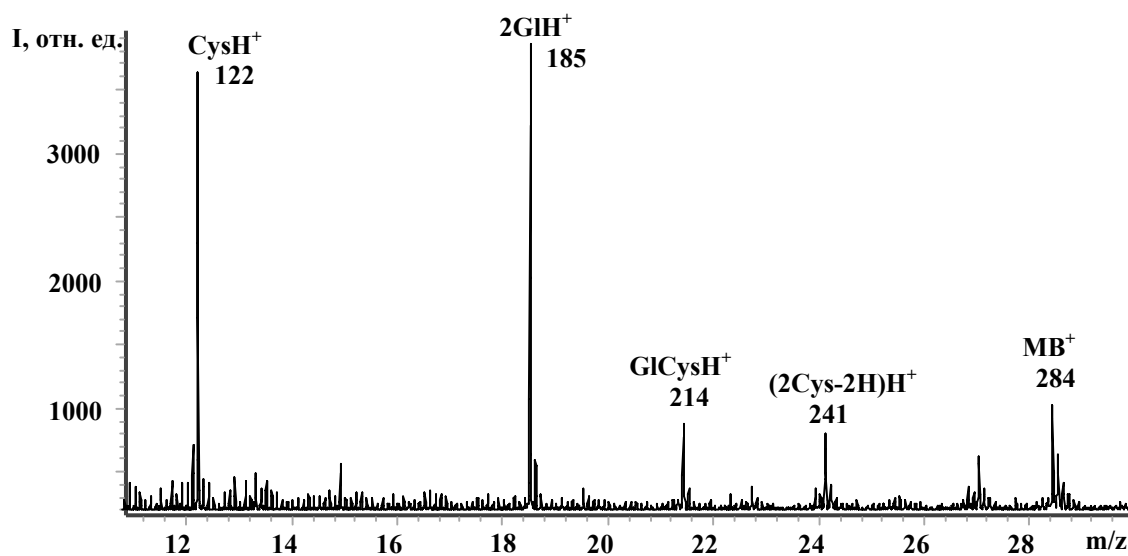


Рис. 2. ББА масс-спектр системы (цистеин – метиленовый синий). Образец – бесцветные кристаллы, осажденные из водного раствора смеси  $3,2 \cdot 10^{-2}$  М метиленового синего и  $4,4 \cdot 10^{-1}$  М цистеина, выдержанного 10 часов, растворены в глицериновой (Gl) матрице.

В области пакета пиков метиленового синего и его лейкоформы наиболее интенсивными являются пики с  $m/z$  284 и 285; пик протонированной лейкоформы отсутствует. Поскольку образец, извлеченный из прибора по окончании эксперимента,

сохранял бесцветное окрашивание и в условиях вакуума отсутствовал окислитель – кислород, можно заключить, что названный набор пиков соответствует лейкоформе метиленового синего; возможный механизм формирования таких ионов обсуждался ранее [72] и выходит за рамки данного сообщения.

Соотношение абсолютных интенсивностей пиков в области цистина и метиленового синего на Рис. 2 указывает на соответствие количеств окисленного цистеина и восстановленного метиленового синего согласно реакции (1). Масс-спектры, полученные для систем с другими соотношениями компонентов, указывают на то, что прохождение реакции требует избытка цистеина; при понижении относительной концентрации цистеина интенсивность пика, соответствующего цистину, понижается. Для разных соотношений концентраций как сразу после обесцвечивания, так и для простоявших несколько суток обесцвеченных растворов, не регистрируется с течением времени каких-либо изменений в масс-спектре. Задача данной работы состояла в установлении продуктов редокс-реакций цистеина и метиленового синего; поиск путей повышения эффективности взаимодействия и установление влияния физиологических условий требует дальнейших исследований.

Полученный результат относительно образования дисульфидных мостиков можно использовать для объяснения установленной эффективности препаратов на основе метиленового синего на ранних стадиях развития болезни Альцгеймера [11, 30]. Образование внутримолекулярных сшивок остатков цистеина в адсорбционно-активных R1-R4 участках тау-белков должно ингибировать агрегацию индивидуальных молекул тау-белков на стадии их отделения от микротрубочек нейронов. Образование межмолекулярных дисульфидных мостиков между мономерами тау-белков запускает механизм, описанный в проекте [73]: контакты поверхности двух молекул белков, связавшихся дисульфидным мостиком, при тепловом движении молекул могут приводить к нарушению их вторичной и третичной структуры – фактически разворачиванию, что делает белки в «неправильной» конформации уязвимыми для ферментов-протеаз. Протеазы разрезают полипептидную цепь на фрагменты, которые могут выводиться из клетки. Отметим, что стратегия создания дисульфидных мостиков между молекулами определенных белков используется при разработке специфических препаратов против некоторых других, в частности онкологических, заболеваний и микробных инфекций [74].

Результаты для использованной модельной системы не дают информации относительно возможности нековалентных взаимодействий метиленового синего с тау-белками в образующихся на более поздних стадиях болезни Альцгеймера нейрофибриллярных клубках, инициирующих разделение белков. Пониженная эффективность метиленового синего на такой стадии указывает на малый вклад этого механизма. В то же время возможность разделения белков в клубках ожидается от препаратов на основе лейкоформы метиленового синего [34]. Показанное в эксперименте образование бесцветной лейкоформы при взаимодействии катионного метиленового синего с цистеином дает основания для предположения о возможном дальнейшем участии лейкоформы во взаимодействиях со специфичными для нее мишенями. То есть, в принципе, в определенных условиях исходный метиленовый синий может действовать как два препарата в катионной и нейтральной форме. Лейкоформа может образовываться также при взаимодействии метиленового синего с другими серусодержащими молекулами в организме. В связи с этим возникает вопрос о причинах наблюдающейся более высокой эффективности препаратов на основе лейкоформы [37], который требует дальнейшего изучения.

## ВЫВОДЫ

На основе данных масс-спектрометрического и спектрофотометрического исследования модельной системы (аминокислота цистеин - метиленовый синий) установлен возможный молекулярный механизм действия редокс-активного агента метиленового синего при его взаимодействии с тау-белками, рассматриваемыми в качестве молекулярной мишени при терапии нейродегенеративных заболеваний.

1. Показано, что окисляющее воздействие редокс-активного красителя метиленового синего на аминокислоту цистеин состоит в образовании дисульфидного мостика между двумя молекулами цистеина, т. е. сшивки их в цистин.

2. Окисленные путем присоединения кислорода мономеры цистеина, возможность образования которых обсуждалась в литературе, не обнаружены.

3. Показанное на мономерном уровне образование дисульфидных мостиков между молекулами цистеина под воздействием метиленового синего, при его осуществлении на биополимерном уровне, может способствовать реализации ожидаемого от редокс-активного агента эффекта – препятствования агрегации тау-белков.

4. В ходе редокс-реакции метиленовый синий переходит в свою лейкоформу, которая также позиционируется в литературе перспективным лекарственным агентом.

Полученные результаты, позволившие установить сам факт протекания редокс-реакции между цистеином и метиленовым синим, а также идентифицировать продукт взаимодействия, представляют практический интерес для дальнейшего целенаправленного поиска лекарственных средств для лечения или торможения нейродегенеративных заболеваний.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alzheimer: 100 Years and Beyond / M. Jucker, K. Beyreuther, C. Haass, R. Nitsch, Y. Christen (Eds.) – Berlin: Springer, 2006. – 543 p.
2. Alzheimer disease research in the 21<sup>st</sup> century: past and current failures, new perspectives and funding priorities / F. Pistollato, E.L. Ohayon, A. Lam [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – V. 7, N 26. – P. 38999–39016.
3. 2017 Alzheimer's disease facts and figures (Alzheimer's Association Report) // *Alzheimer's & Dementia*. – 2017. – V. 13, N 4. – P. 325–373.
4. Changing the trajectory of Alzheimer's disease: How a treatment by 2025 saves lives and dollars (Alzheimer's Association Report) – Mode of access: WWW.URL: [http://alz.org/documents\\_custom/ALZ\\_Trajectory2015\\_FINAL\\_01.27.15.pdf](http://alz.org/documents_custom/ALZ_Trajectory2015_FINAL_01.27.15.pdf) – Last access: May 26, 2017. – Title from the screen.
5. The Journal of Alzheimer's Disease - Mode of access: WWW.URL: <http://www.j-alz.com/> – Last access: May 26, 2017. – Title from the screen.
6. Site: Alzheimer's Association – Mode of access: WWW.URL: <http://www.alz.org/> – Last access: May 26, 2017. – Title from the screen.
7. Selkoe D.J. The molecular pathology of Alzheimer's disease / D.J. Selkoe // *Neuron*. – 1991. – V. 6, N 4. – P. 487–498.
8. Татарникова О.Г. Бета-амилоид и Тау-белок: структура, взаимодействие и прионоподобные свойства / О.Г. Татарникова, М.А. Орлов, Н.В. Бобкова // *Усп. биол. хим.* – 2015. – Т. 55. – С. 351–390. / Tatarnikova O.G. Beta-amyloid I Tau-belok: struktura, vzaimodeistvie i prionopodobnye svojstva / O.G. Tatarnikova, M.A. Orlov, N.V. Bobkova // *Usp. biol. khim.* – 2015. – Т. 55. – С. 351–390.
9. Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies / G. Šimić, M. Babić Leko, S. Wray [et al.] // *Biomolecules*. – 2016. – V. 6, N 1. – Article ID 6, 28 p.
10. Wischik C.M. Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease / C.M. Wischik, C.R. Harrington, J.M.D. Storey // *Biochem. Pharmacol.* – 2014. – V. 88, N 4. – P. 529–539.
11. Tau aggregation inhibitor therapy: An exploratory phase 2 study in mild or moderate Alzheimer's disease / C.M. Wischik, R.T. Staff, D.J. Wischik [et al.] // *J. Alzheimer's Dis.* – 2015. – V. 44, N 2. – P. 705–720.
12. Tau-centric targets and drugs in clinical development for the treatment of Alzheimer's disease / F. Panza, V. Solfrizzi, D. Seripa [et al.] // *BioMed Res. Int.* – 2016. – V. 2016. – Article ID 3245935, 15 p.
13. Tau aggregation inhibitors: the future of Alzheimer's pharmacotherapy? / F. Panza, D. Seripa, V. Solfrizzi [et al.] // *Expert Opin. Pharmacother.* – 2016. – V. 17, N 4. – P. 457–461.

14. Guzmán-Martinez L. Tau oligomers as potential targets for Alzheimer's diagnosis and novel drugs / L. Guzmán-Martinez, G.A. Farias, R.B. Maccioni // *Front. Neurol.* – 2013. – V. 4. – Article ID 167, 6 p.
15. Takashima A. Tau aggregation is a therapeutic target for Alzheimer's disease / A. Takashima // *Curr. Alzheimer Res.* – 2010. – V. 7, N 8. – P. 665–669.
16. Badiola N. Tau phosphorylation and aggregation as a therapeutic target in tauopathies / N. Badiola, M. Suárez-Calvet, A. Lleó // *CNS Neurol. Disord.: Drug Targets.* – 2010. – V. 9, N 6. – P. 727–740.
17. *Tau Protein. Methods and Protocols* / C. Smet-Nocca (Ed.) – New York: Humana Press, 2017. – 432 p.
18. Bakota L. Tau biology and Tau-directed therapies for Alzheimer's disease / L. Bakota, R. Brandt // *Drugs.* – 2016. – V. 76, N 3. – P. 301–313.
- 19 The many faces of tau / M. Morris, S. Maeda, K. Vossel, L. Mucke // *Neuron.* – 2011. – V. 70, N 3. – P. 410–426.
20. Development of tau aggregation inhibitors for Alzheimer's disease / B. Bulic, M. Pickhardt, B. Schmidt [et al.] // *Angew. Chem., Int. Ed.* – 2009. – V.48, N 10. – P. 1740–1752.
21. Structure and mechanism of action of tau aggregation inhibitors / K. Cisek, G.L. Cooper, C.J. Huseby, J. Kuret // *Curr. Alzheimer Res.* – 2014. – V. 11, N 10. – P. 918–927.
22. Sites of tau important for aggregation populate  $\beta$ -structure and bind to microtubules and polyanions / M.D. Mukrasch, J. Biernat, M. von Bergen [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280, N 26. – P. 24978–24986.
23. Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments / Schweers O., Mandelkow E.M., Biernat J., Mandelkow E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1995. – V. 92, N 18. – P. 8463–8467.
24. 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, N 16. – P. 11024–11037.
25. Methylene blue inhibits caspases by oxidation of the catalytic cysteine / P. Pakavathkumar, G. Sharma, V. Kaushal [et al.] // *Sci. Rep.* – 2015. – V. 5, N 1. – Article ID 13730, 13 p.
26. Mechanistic basis of phenothiazine-driven inhibition of tau aggregation / E. Akoury, M. Pickhardt, M. Gajda [et al.] // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2013. – V. 52, N 12. – P. 3511–3515.
27. Structure and mechanism of action of tau aggregation inhibitors / K. Cisek, G.L. Cooper, C.J. Huseby, J. Kuret // *Curr. Alzheimer Res.* – 2014. – V. 11, N 10. – P. 918–927.
28. Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines / C.M. Wischik, P.C. Edwards, R.Y. Lai [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1996. – V. 93, N 20. – P. 11213–11218.
29. Oz M. Methylene blue and Alzheimer's disease / M. Oz, D.E. Lorke, G.A. Petroianu // *Biochem. Pharmacol.* – 2009. – V. 78, N 8. – P. 927–932.
30. Preventive methylene blue treatment preserves cognition in mice expressing full-length pro-aggregant human Tau / K. Hochgräfe, A. Sydow, D. Matenia [et al.] // *Acta Neuropathol. Commun.* – 2015. – V. 3. – Article ID 25, 22 p.
31. Preparation and characterization of methylene blue nanoparticles for Alzheimer's disease and other tauopathies / U.K. Jinwal, A. Groshev, J. Zhang [et al.] // *Curr. Drug Delivery* – 2014. – V. 11, N 4. – P. 541–550.
32. Lest we forget you - methylene blue... / R.H. Schirmer, H. Adler, M. Pickhardt, E. Mandelkow [et al.] // *Neurobiol. Aging.* – 2011. – V. 32, N 12. – P. 2325.e7–2325.e16.
33. Шелковский В.С. Использование окислительно-восстановительных и агрегационных свойств красителя метиленового синего в нанобиофизических исследованиях / В.С. Шелковский // *Біофізичний Вісник.* – 2015. – Т. 33, № 1. – С. 5–29. / Shelkovskiy V.S. Ispol'zovanie oksilitelno-vosstanovitelynyh svojstv krasitelya metilenovogo sinego v nanobiofizicheskikh issledovaniyah / V.S. Shelkovskiy // *Biofizychnyj Visnyk.* – 2015. – Т. 33, N 1. – С. 5–29.
34. Complex disposition of methylthioninium redox forms determines efficacy in tau aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease / T.C. Baddeley, J. McCaffrey, J.M. Storey [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2015. – V. 352, N 1. – P.110–118.
35. Tau-directed approaches for the treatment of Alzheimer's disease: focus on leuco-methylthioninium / D. Seripa, V. Solfrizzi, B.P. Imbimbo [et al.] // *Expert Rev. Neurother.* – 2016. – V. 16, N 3. – P. 259–277.
36. Effects of oxidized and reduced forms of methylthioninium in two transgenic mouse tauopathy models / Melis V., Magbagbeolu M., Rickard J.E. [et al.] // *Behav. Pharmacol.* – 2015. – V. 26, N 4. – P. 353–368.
37. Site: TauRx Therapeutics. Innovation in neurodegeneration – Mode of access: WWW.URL: <http://taurx.com/science/> – Last access: May 26, 2017. – Title from the screen.
38. a) Kaltashov I.A. Mass spectrometry in biophysics: conformation and dynamics of biomolecules / I.A. Kaltashov, S.J. Eyles. – Hoboken: John Wiley, 2005. – 458 p.  
b) Kaltashov I.A. Mass spectrometry in structural biology and biophysics: architecture, dynamics, and interaction of biomolecules / I.A. Kaltashov, S.J. Eyles, 2nd edition – Hoboken: John Wiley, 2012. – 289 p.



39. Mechanistic investigation of the interaction between bisquaternary antimicrobial agents and phospholipids by liquid secondary ion mass spectrometry and differential scanning calorimetry / V.A. Pashynskaya, M.V. Kosevich, A. Gomory [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2002. – V. 16, N 18. – P. 1706–1713.
40. Characterization of noncovalent complexes of antimalarial agents of the artemisinin-type and Fe(III)-heme by electrospray mass spectrometry and collisional activation tandem mass spectrometry / V.A. Pashynska, H. Van den Heuvel, M. Claeys, M.V. Kosevich M.V. // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2004. – V. 15, N. 8. – P. 1181–1190.
41. Лебедев А.Т. Основы масс-спектрометрии белков и пептидов / А.Т. Лебедев, К.А. Артеменко, Т.Ю. Самгина. – М.: Техносфера, 2012. – 176 с. / Lebedev A.T. Osnovy mass-spektrometrii belkov i peptidov / A.T. Lebedev, K.A. Artemenko, T.Yu. Samgina. – М.: Tekhnosfera, 2012. - 176 s.
42. Quantification of the brain proteome in Alzheimer's disease using multiplexed mass spectrometry / S. Musunuri, M. Wetterhall, M. Ingelsson [et al.] // *J. Proteome Res.* – 2014. – V. 13, N 4. – P. 2056–2068.
43. Liu Ya. Biomarkers in Alzheimer's disease analysis by mass spectrometry-based proteomics / Ya. Liu, H. Qing, Yu. Deng // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – V. 15, N 5. – P. 7865–7882.
44. Gu L. Sample multiplexing with cysteine-selective approaches: cysDML and cPILOT / L. Gu, A.R. Evans, R.A.S. Robinson // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2015. – V. 26, N 4. – P. 615–630.
45. Molecular mapping of Alzheimer's disease: Imaging mass spectrometry / G. Perry, A.R. Kelley, S. Bach, R.J. Castellani // *Alzheimer's Dementia.* – 2015. – V. 11, N 7. – P. 545.
46. Imaging mass spectrometry for the research of Alzheimer's disease / M. Ikegawa, T. Miyasaka, N. Kakuda, Ya. Ihara // *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* – 2016. – V. 64, N 1. – P. 17–20.
47. Differential mass spectrometry profiles of tau protein in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease, progressive supranuclear palsy, and dementia with Lewy bodies / N.R. Barthélemy, A. Gabelle, C. Hirtz [et al.] // *J. Alzheimer's Dis.* – 2016. – V. 51, N 4. – P. 1033–1043.
48. Identification of potential modifiers of Alzheimer's disease pathology by quantitative mass spectrometry and drosophila genetics / B.D. Minjarez, M.L. Valero, K.G. Calderon-Gonzalez [et al.] // *Alzheimer's Dementia.* – 2015. – V. 11, N 7. – P. P512–P513.
49. Estimation of phosphorylation level of amyloid-beta isolated from human blood plasma: ultrahigh-resolution mass spectrometry / I.A. Popov, M.I. Indeikina, S.I. Pekov [et al.] // *Mol. Biol. (Moscow).* – 2014. – V. 48, N 4. – P. 607–614.
50. Becker J.S. Studies of structure and phosphorylation of tau protein using high resolution mass spectrometry / J.S. Becker, M. Przybylski // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2007. – V.22., N7. - P. 761-765.
51. Difficulties associated with the structural analysis of proteins susceptible to form aggregates: The case of Tau protein as a biomarker of Alzheimer's disease / L. Hromadkova, R. Kupcik, B. Jankovicova [et al.] // *J. Sep. Science.* – 2016. – V. 39, N4. – P. 799–807.
52. Vekey K. Chemical reactions in fast atom bombardment mass spectrometry / K. Vekey, L.F. Zerilli // *Org. Mass Spectrom.* – 1991. – V. 26, N 11. – P. 939–944.
53. Pelzer G. Oxidation-reduction processes occurring in secondary ion mass spectrometry and fast atom bombardment of glycerol solutions / G. Pelzer, E. D. Pauw, J. Marien // *J. Phys. Chem.* – 1984. – V. 88, N 21. – P. 5065–5068.
54. Ohashi Y. Unprecedented matrix-induced reduction of flavins observed under FAB and MALDI conditions / Y. Ohashi, Y. Itoh // *Curr. Org. Chem.* – 2003. – V. 7, N 15. – P. 1605–1611.
55. Reduction of organic dyes in matrix-assisted laser desorption/ionization and desorption/ ionization on porous silicon / S. Okuno, M. Nakano, G.E. Matsubayashi // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2004. – V. 18, N 23. – P. 2811–2817.
56. Asakawa D. Study on the redox reactions for organic dyes and S-nitrosylated peptide in electrospray droplet impact / D. Asakawa, K. Hiraoka // *J. Mass Spectrom.* – 2009. – V. 44, N 4. – P. 461–465.
57. 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, N 4. – P. 231–235.
58. 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, N 3. – P. 154–156.
59. Kosevich M.V. Boryak O.A., Chagovets V.V., Shelkovsky V.S., Pokrovskiy V.A. Interactions of biologically active redox-sensitive dyes with nanomaterials: mass spectrometric diagnostics // *Nanobiphsics: Fundamen-tal and Applications* / Ed. V.A. Karachevtsev. – Singapore: Pan Stanford Publishing. 2015. – P. 179–216.
60. 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, N 1. – P. 113–123.

61. 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, N 10. – P. 1402–1412.
62. Масс-спектрометрия с лазерной десорбцией/ионизацией красителя метиленового голубого с поверхности мезопористых тонких пленок  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$  и  $\text{SiO}_2$  / Т.В. Фесенко, М.В. Косевич, Н.И. Суровцева и др. // *Масс-спектрометрия.* - 2007. - Т. 4, N 4. – С. 289–296. / *Mass-spektrometriya s lazernoj desorbciej/ionizaciej krasitelya metilenovogo golubogo s poverhnosti mezoporistykh tonkih plenok TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> i SiO<sub>2</sub> / T.V. Fesenko, M.V. Kosevich, N.I. Surovtseva i dr. // Mass-Spektrometria.* – 2007. – Т. 4, N 4. – С. 289–296.
63. 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.
64. 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, N 38. – P. 20579–20590.
65. 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, N 104. – P. 60260–60269.
66. Теренин А.Н. Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений. – Л.: Наука, 1967. – 616 с. / Terenin A.N. Fotonika molekul krasitelej i rodstvennyh organicheskikh soedinenij. – L.: Nauka, 1967. – 616 s.
67. Optical absorption of methylene blue. [Electronic resource] // Oregon Medical Lazer Center, OMLC web site - Mode of access: <http://omlc.org/spectra/mb/>. – Last access: May 26, 2017. – Title from the screen.
68. 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, N 3. – P. 214–224.
69. 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. – N 3. – P. 348–353.
70. de Tacconi N.R. Reversibility of photoelectrochromism at the  $\text{TiO}_2$ /Methylene Blue interface / N.R. de Tacconi, J. Carmona, K. Rajeshwar // *J. Electrochem. Soc.* – 1994. – V. 144, N 7. – P. 2486–2490.
71. Talrose V., Yermakov A.N., Usov A.A., Goncharova A.A., Leskin A.N., Messineva N.A., Trusova N.V., Efimkina M.V. UV/Visible Spectra // NIST Chemistry WebBook: NIST Standard Reference Database Number 69 / P.J. Linstrom, W.G. Mallard (Eds.); National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899, (retrieved May 26, 2017).
72. Парадоксальный вторично-эмиссионный масс-спектр лейкоформы красителя метиленового синего / М.В. Косевич, О.А. Боряк, В.С. Шелковский и др. // VI Всеросс. конф. “Масс-спектрометрия и её прикладные проблемы”, 12–17 октября 2015, Москва, РФ. - 2015, С. 109. / *Paradoksal'nyj vtorichno-emissionnyj mass-spektr lejkoformy kresitelya mtilenovogo sinego / M.V. Kosevich, O.A. Boryak, V.S. Shelkovskiy [et al] / VI Vseross. konf. “Mass-spektrometria i ee prikladnye problemy”, October 12-17, 2015, Moscow, RF.* – 2015, S. 109.
73. Сайт: Новости СПбГУ. Дисульфидные мостики: от биофизики белков к онкогенезу – Mode of access: WWW.URL: <http://spbu.ru/news-spsu/24083-disulfidnye-mostiki-ot-biofiziki-belkov-k-onkogenezu> – Last access: May 26, 2017. – Title from the screen. / Site: Novosti SPbGU. Disul'fidnye mostiki: ot biofoziki belkov k onkogenezu - Mode of access: WWW.URL: <http://spbu.ru/news-spsu/24083-disulfidnye-mostiki-ot-biofiziki-belkov-k-onkogenezu> – Last access: May 26, 2017. – Title from the screen.
74. Origin of anti-tumor activity of the cysteine-containing GO peptides and further optimization of their cytotoxic properties / I.I. Tyuryaeva, O.G. Lyublinskaya, I.S. Podkorytov [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. – V. 7. – Article ID 40217, 18 p.

УДК 577.359:612.111.017:546.65-022.532

**ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НА ОСМОТИЧЕСКУЮ АДАПТАЦИЮ ЭРИТРОЦИТОВ****О.К. Пакулова<sup>1</sup>, В.К. Клочков<sup>2</sup>, Н.С. Кавок<sup>2</sup>,  
И.А. Костина<sup>1</sup>, А.С. Сопотова<sup>1</sup>, В.А. Бондаренко<sup>1</sup>**<sup>1</sup> Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы 4, Харьков, 61022, Украина, e-mail: olga.pakulova@gmail.com<sup>2</sup> Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины, пр. Науки 60, Харьков, 61072, Украина

Поступила в редакцию 31 октября 2016 года

Принята 1 июня 2017 года

Уникальные характеристики наночастиц (НЧ) на основе редкоземельных элементов (РЗЭ) делают их перспективными для использования в молекулярной и клеточной биологии. Однако особенности их взаимодействия с биосистемами на разных структурных уровнях и влияние на функционирование живых клеток остаются мало изученными. В данной работе методом спектрофотометрии оценивали влияние НЧ на основе диэлектрических нанокристаллов диоксида церия и ортованадатов гадолиния и иттрия с различным форм-фактором, а также комплекса НЧ-холестерин на адаптацию эритроцитов человека к гипертоническому лизису в 4 М NaCl в различных условиях прединкубации. Показано, что изменение уровня повреждения клеток при осмотической нагрузке в присутствии НЧ зависит от геометрических параметров последних. Адаптации клеток к гипертоническому лизису способствуют как экстремальные (размером 2 нм), способные проникать сквозь плазматическую мембрану сферические НЧ CeO<sub>2</sub> и GdYVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup>, так и более крупные (8×30 нм) зерноподобные НЧ GdVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup>, адсорбируемые на поверхности мембраны, а также комплекс сферических НЧ GdYVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> с холестерином. Обнаружено также, что состав наночастиц определяет характер их стабилизирующего влияния на клетки. Так, при концентрации 0,1 г/л ортованадатные НЧ более эффективно защищают клетки от гемолиза при непродолжительной, а НЧ диоксида церия – при длительной прединкубации в сахарозно-солевой среде. Установлено, что НЧ способствуют адаптации клеток к осмотической нагрузке посредством различных механизмов – через стабилизацию мембраны при адсорбции на поверхности клеток и/или через проникновение в клетку.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** наночастицы, редкоземельные элементы, эритроциты, гипертонический лизис, осмотическая адаптация.

**ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК НА ОСНОВІ РІДКІСНОЗЕМЕЛЬНИХ ЕЛЕМЕНТІВ НА ОСМОТИЧНУ АДАПТАЦІЮ ЕРИТРОЦИТІВ****О.К. Пакулова<sup>1</sup>, В.К. Клочков<sup>2</sup>, Н.С. Кавок<sup>2</sup>, І.О. Костіна<sup>1</sup>, О.С. Сопотова<sup>1</sup>,  
В.А. Бондаренко<sup>1</sup>**<sup>1</sup> Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, пл. Свободи 4, Харків, 61022, Україна<sup>2</sup> Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України, пр. Науки 60, Харків, 61072, Україна

Унікальні характеристики наночастинок (НЧ) на основі рідкісноземельних елементів (РЗЕ) роблять їх перспективними для використання у молекулярній та клітинній біології. Однак особливості їх взаємодії з біосистемами на різних структурних рівнях та вплив на функціонування живих клітин лишаються мало вивченими. У даній роботі методом спектрофотометрії оцінювали вплив НЧ на основі діелектричних нанокристалів діоксиду церію та ортованадатів гадолінію та ітрію, з різним форм-фактором, а також комплексу НЧ-холестерин на адаптацію еритроцитів людини до гіпертонічного лізису в 4 М NaCl у різних умовах передінкубації. Показано, що зміна рівня ушкодження клітин при осмотичному навантаженні в присутності НЧ залежить від геометричних параметрів останніх. Адаптації до гіпертонічного лізису сприяють як екстремалі (розміром 2 нм) здатні проникати крізь плазматичну мембрану сферичні НЧ CeO<sub>2</sub> та GdYVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup>, так і більші (8×30 нм) зерноподібні НЧ GdVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup>, що адсорбуються на зовнішній поверхні мембрани, а також комплекс сферичних НЧ GdYVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> з холестерином. Виявлено також, що склад наночастинок визначає характер їх стабілізуючого впливу на клітини. Так, при концентрації 0,1 г/л ортованадатні НЧ більш ефективно захищають клітини від гемолізу при нетривалій, а НЧ діоксиду церію - при тривалій передінкубації в сахарозно-сольовому середовищі.

Встановлено, що НЧ сприяють адаптації клітин до осмотичного навантаження за допомогою різних механізмів - через стабілізацію мембрани при адсорбції на поверхні клітин і/або через проникнення в клітину.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** наночастинки, рідкоземельні елементи, еритроцити, гіпертонічний лізис, осмотична адаптація.

#### EFFECT OF RARE-EARTH-BASED NANOPARTICLES ON THE ERYTHROCYTE OSMOTIC ADAPTATION

O.K. Pakulova<sup>1</sup>, V.K. Klochkov<sup>2</sup>, N.S. Kavok<sup>2</sup>, I.A. Kostina<sup>1</sup>, A.S. Sopotova<sup>1</sup>,  
V.A. Bondarenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> V.N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine

<sup>2</sup> Institute for Scintillation Materials NAS of Ukraine, 60 Nauky Ave., Kharkov, 61072, Ukraine

Rare-earth-based nanoparticles (REB NPs) have been employed in molecular and cell biology due to their unique features. However, their interaction with biosystems and the influence on cell functioning are poorly understood. In this study effect of REB NPs (composed of dielectric nanocrystals of cerium dioxide and orthovanadates of gadolinium and yttrium) with different form-factor as well as REB NPs-cholesterol complexes on the adaptation of human erythrocytes to hypertonic lysis (4 M NaCl) has been evaluated spectrophotometrically. It appeared that the degree of cell damage in the presence of REP NPs under hyperosmotic conditions varied with geometric parameters of REB NPs. Specifically: i) ultra-small (2 nm) spherical CeO<sub>2</sub> or GdYVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> NPs, penetrating through the plasma membrane, ii) grain-like (8×30 nm) GdVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> NPs, adsorbed on the membrane surface, iii) and spherical GdYVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> NPs-cholesterol complexes promoted cell adaptation to hypertonic lysis. Furthermore, the composition of nanoparticles affected their stabilizing effect on the cells. E.g., orthovanadate NPs at 0.1 g/l had the highest antihemolytic activity after short preincubation, while cerium dioxide NPs showed the same effect after prolonged preincubation. In conclusion, REB NPs promoted hyperosmotic cell adaptation by the two different mechanisms, viz. membrane stabilization by the adsorption on the cell surface and/or penetration into the cell.

**KEY WORDS:** nanoparticles, rare-earth elements, erythrocytes, hypertonic lysis, osmotic adaptation.

Будущее молекулярной и клеточной биологии во многом зависит от эффективности методов визуализации клеточного ответа с пространственным и временным разрешением [1]. Новые перспективы в этих областях, как и во многих других, открылись благодаря обнаружению у наноразмерных объектов необычных физических и химических свойств, связанных с проявлением «квантовых размерных эффектов» [2]. В частности, были разработаны стабильные нанолуминофоры с низкой цитотоксичностью на основе диэлектрических нанокристаллов редкоземельных элементов (РЗЭ) [3]. Помимо оптических эффектов [4] эти НЧ обладают магнитными свойствами [5] и редоксактивностью благодаря присутствию ионов с переменной валентностью [6, 7, 8].

Известно также [9], что управление жизнедеятельностью клетки тесно связано с функционированием плазматической мембраны, в том числе осмотическими механизмами, реализуемыми с ее участием. Удобным модельным объектом для изучения осмотических эффектов благодаря простоте структуры и доступности являются эритроциты. Достаточно хорошо изучены закономерности поведения эритроцитов человека при гипертоническом стрессе, которому эти клетки подвергаются при замораживании вследствие вымораживания воды и концентрирования внеклеточного раствора, а также в физиологических условиях при почечной фильтрации крови.

Моделированием гипертонического стресса эритроцитов человека при замораживании традиционно является их перенос в 4 М раствор хлористого натрия. Эта концентрация является оптимальной, так как при большей проконтролировать концентрацию NaCl сложно из-за перенасыщения раствора, а при меньшей (3,5 М) из клеток происходит выход воды, которая разбавляет раствор NaCl, что также делает

неконтролируемыми условия эксперимента. Уровень осмотического повреждения эритроцитов в гипертонических растворах 4 М NaCl зависит от многих факторов. Особый интерес представляет возможность изменять устойчивость клеток модуляцией условий прединкубации, когда гемолиз эритроцитов имеет нелинейную зависимость от тоничности раствора [10].

С другой стороны известно, что биоактивность нанообъектов зависит от их структуры и геометрических размеров [11]. Они определяют их способность проникать через мембрану [4, 12, 13] и влиять на структуру липидного бислоя [14, 15]. Поэтому было высказано предположение, что НЧ на основе РЗЭ различного состава, размера и формы могут оказаться эффективными для регуляции осмотического поведения эритроцитов.

Устойчивость эритроцитов к резким изменениям температуры, количественного состава среды, к механическим воздействиям связана с повышенным относительно других клеток содержанием холестерина. Мы предположили, что в комплексе с холестерином [16] НЧ будут повышать резистентность эритроцитов к гипертоническому гемолизу.

Таким образом, цель нашего исследования состояла в определении влияния НЧ на основе диэлектрических нанокристаллов диоксида церия и ортованадатов гадолиния и иттрия с различным форм-фактором, а также комплекса НЧ-холестерин на адаптацию эритроцитов человека к гипертоническому лизису в 4 М NaCl в различных условиях прединкубации. Объектом служила биологическая активность НЧ РЗЭ в отношении осмотического поведения эритроцитов, что определяет возможность использования первых в качестве криозащитных агентов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эритроциты получали из крови группы А (II) здоровых мужчин доноров, которая хранилась в течение 4 дней в цитратном стабилизаторе при температуре +5°C. Непосредственно перед использованием клетки трехкратно отмывали 0,15 М раствором NaCl (в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7,4) и центрифугировали два раза в течение 3 мин, и один раз в течение 10 мин на центрифуге ОПн-3 (Украина) при 3000 об/мин с последующей аспирацией супернатанта и лейкоцитарной пленки с помощью водоструйного насоса. Полученный плотный осадок эритроцитов разбавляли в 2 раза физиологическим раствором NaCl. Полученная 40 % суспензия клеток использовалась в течение 2 часов и хранилась при 0°C.

Прединкубация клеток проводилась в изотонической сахарозно-солевой среде (7% сахарозы и 0,3% NaCl), содержащей один из видов исследуемых НЧ в концентрации 0,01, 0,05 и 0,1 г/л или в изотонической сахарозной среде (0,3 М сахарозы) с концентрацией НЧ 0,1 г/л. НЧ на основе редкоземельных элементов (рис. 1) были представлены следующими видами: сферическими НЧ  $GdYVO_4:Eu^{3+}$  размером 2 нм; зерноподобными  $GdVO_4:Eu^{3+}$  размером 8×30 нм; стержневидными  $LaVO_4:Eu^{3+}$  размером 6×40 нм; сферическими  $SeO_2$  размером 2 и 9 нм. Размеры и морфологию наночастиц твердой фазы гидрозолей оценивали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на электронном микроскопе ПЭМ 125K (Selmi, Украина) при ускоряющем напряжении 100 кВ (увеличение до ×100000).

Длительность экспозиции клеток с НЧ составляла 30, 60, 90 и 120 мин при температуре 37°C. Затем аликвоты суспензии эритроцитов переносили на 10 мин в 4 М раствор NaCl при 37°C. Выход гемоглобина из разрушенных клеток определяли в супернатанте методом спектрофотометрии на спектрофотометре СФ-4А с проточной кюветой при  $\lambda=543$  нм. За 100% принимали поглощение пробы с добавлением 0,1 %

детергента Тритон X-100.

Статистический анализ результатов, полученных в 6 повторениях при 2-х параллельных пробах в каждом, проводили с использованием непараметрического критерия Уилкоксона-Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

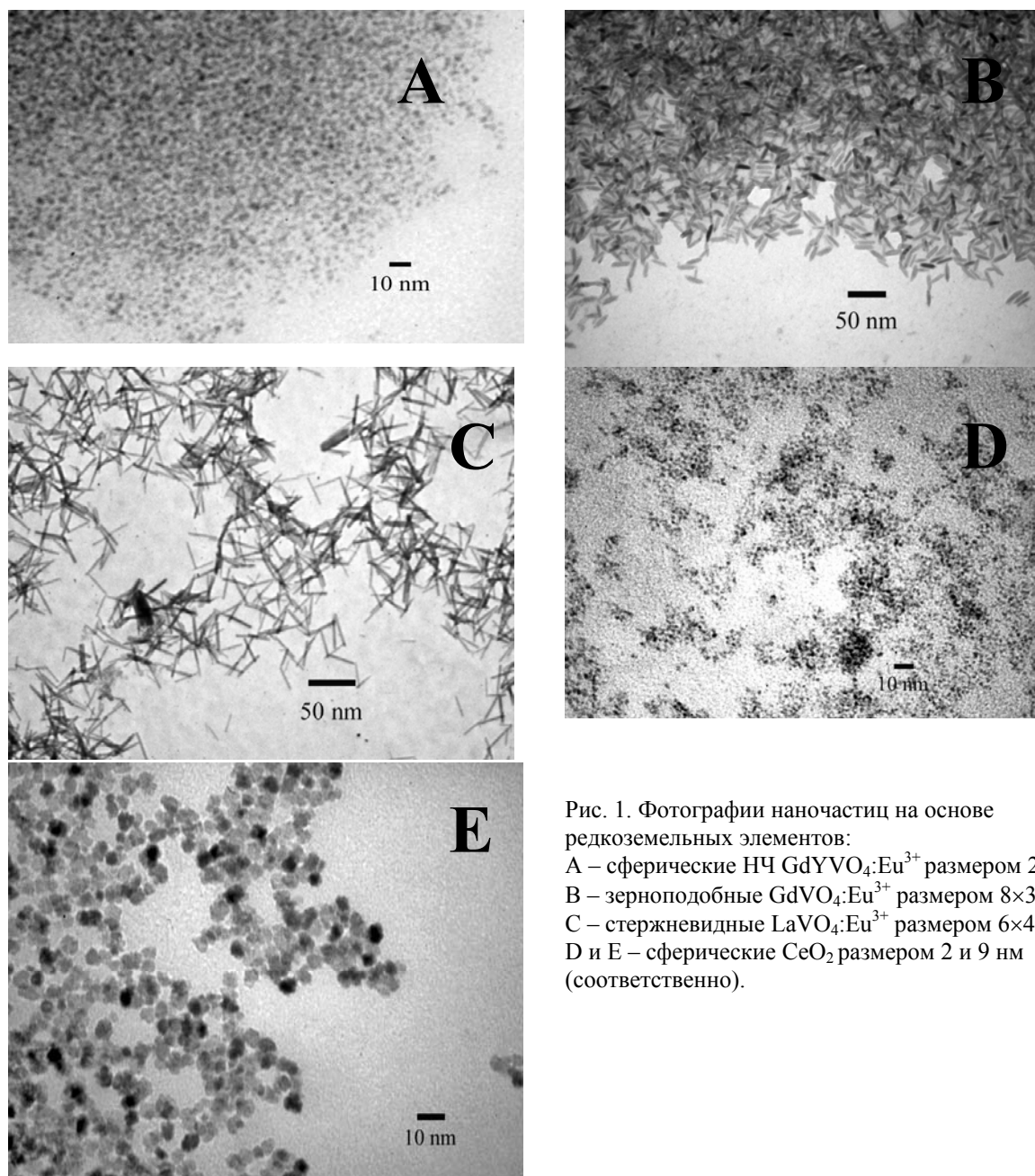


Рис. 1. Фотографии наночастиц на основе редкоземельных элементов:  
 А – сферические НЧ  $GdYVO_4:Eu^{3+}$  размером 2 нм;  
 В – зерноподобные  $GdVO_4:Eu^{3+}$  размером  $8 \times 30$  нм;  
 С – стержневидные  $LaVO_4:Eu^{3+}$  размером  $6 \times 40$  нм;  
 D и E – сферические  $CeO_2$  размером 2 и 9 нм (соответственно).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 представлены зависимости гемолиза эритроцитов в 4 М NaCl от времени предварительной инкубации в присутствии ортованадатных НЧ в разной концентрации: мелких сферических НЧ  $GdYVO_4:Eu^{3+}$  (рис. 2 А), зерноподобных  $GdVO_4:Eu^{3+}$  (рис. 2 В) и стержневидных  $LaVO_4:Eu^{3+}$  (рис. 2 С). Из кривых следует, что сферические размером 2 нм (рис. 2 А) и зерноподобные размером  $8 \times 30$  нм (рис. 2 В) НЧ способствуют адаптации эритроцитов к гипертоническому гемолизу при малом времени экспозиции – 30 и 30-60 мин (соответственно) только в сахарозно-солевой среде. Это проявляется в

достоверном снижении процента гемолизировавших клеток при концентрации 0,1 г/л мелких сферических  $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  (кривая 4 на рис. 2 А) и 0,05 г/л зерноподобных  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  НЧ (кривая 3 на рис. 2 В) по сравнению с контролем (кривые 1 на рис. 2 А и В). В присутствии стержневидных НЧ (рис. 2 С) кривые гемолиза достоверно не отличаются от контроля, что свидетельствует об отсутствии их влияния на адаптацию эритроцитов к осмотическому повреждению независимо от состава среды.

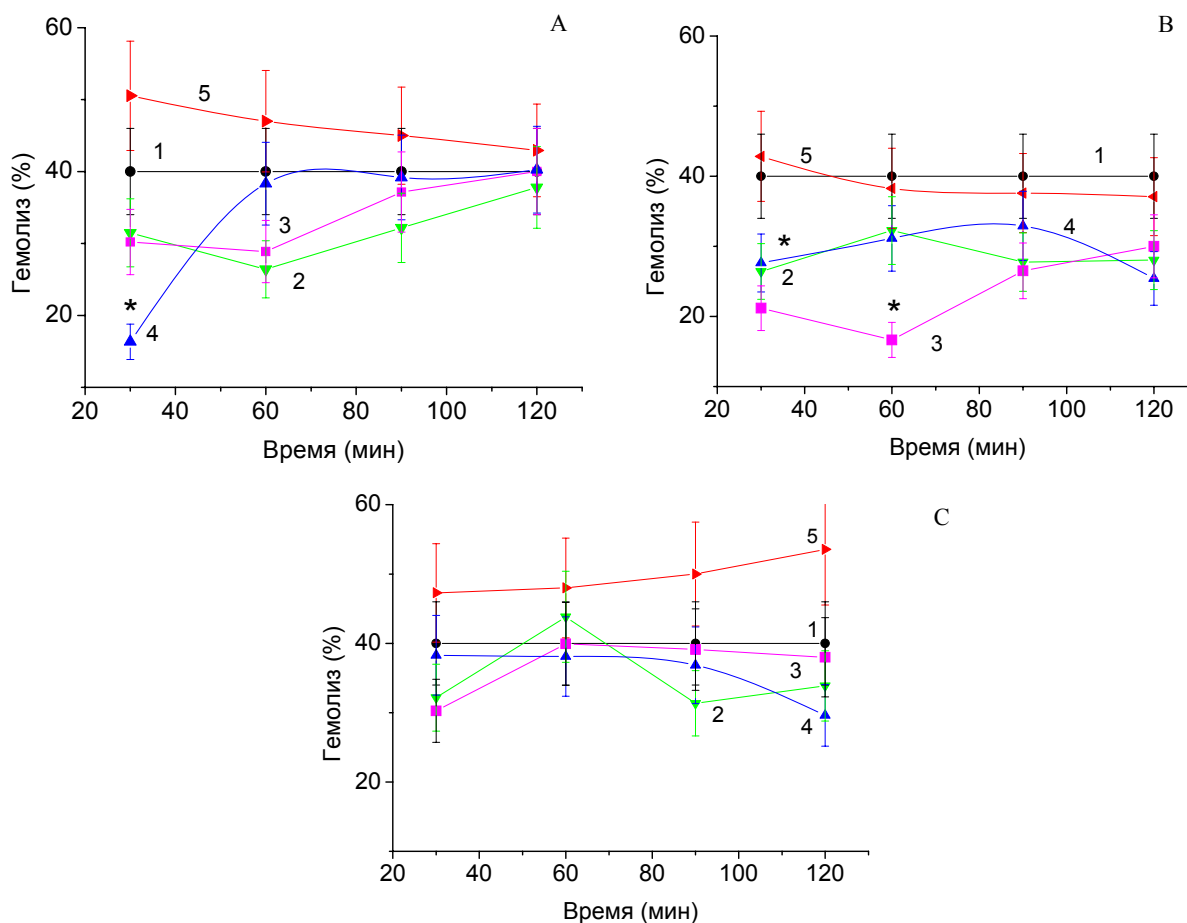


Рис. 2. Зависимость гемолиза эритроцитов в 4 М NaCl от времени предварительной инкубации в присутствии ортованадатных НЧ: А – сферических диаметром 2 нм  $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ; В – зерноподобных размером 8×30 нм  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ; С – стержневидных размером 6×40 нм  $\text{LaVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ . Кривые 1-4 демонстрируют гемолиз в изотонической сахарозно-солевой среде с концентрацией НЧ 0 г/л (контроль), 0,01 г/л, 0,05 г/л, и 0,1 г/л, соответственно. Кривая 5 показывает гемолиз в изотонической сахарозной среде при концентрации НЧ 0,1 г/л. Представлены средние значения  $\pm$  стандартные отклонения.

Протекторный эффект мелких сферических НЧ  $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  и зерноподобных  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  вероятно связан с уменьшением осмотической нагрузки на мембране, из-за их способности проникать в клетку [17]. В первом случае этот процесс может происходить быстрее (30 мин), во втором – медленнее (до 60 мин), по-видимому, благодаря большему размеру частиц. В пользу осмотического механизма говорит факт отсутствия защитного эффекта в чисто сахарозной среде и в случае присутствия в среде прединкубации непроникающих в клетки [17] стержневидных НЧ.

Время экспозиции с НЧ и их концентрация также оказывают влияние. Защитный эффект снимается при длительной экспозиции в присутствии 2 нм НЧ  $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$

независимо от концентрации и имеет тенденцию к увеличению со временем при концентрации 0,1 г/л для обоих видов крупных НЧ на основе  $\text{VO}_4$ . Последнее может свидетельствовать о включении более медленного защитного механизма другой природы, не связанного с проникновением НЧ в клетку. Ранее было показано, что зерноподобные  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  НЧ адсорбируются на поверхности клеточной мембраны [17], что может повлечь изменение структуры липидного бислоя. Вероятно, вследствие этого их эффекты не ограничиваются защитой при гипертоническом гемолизе. Они также значительно тормозят рост опухолевых клеток в опытах *in vitro*. Аналогичным, но менее выраженным эффектом обладали стержневидные НЧ [17].

Можно сделать вывод, что как размер, так и форма ортованадатных НЧ влияют на адаптацию эритроцитов к гипертоническому гемолизу. Вероятно, это обусловлено различными механизмами их взаимодействия с эритроцитами, которые проявляются по-разному в зависимости от условий. Предположительно, быстрые протекторные эффекты (характерные для мелких НЧ) связаны со способностью и скоростью проникновения НЧ через мембрану, поздние (проявляющиеся у крупных НЧ) - с изменением состояния мембраны, вероятно опосредованного модификацией ее водного окружения [14, 15].

Представляло интерес выяснить роль изменения состояния липидного бислоя во влиянии НЧ на гипертонический лизис эритроцитов. Для этого мы проводили предобработку клеток в растворе комплекса мелких сферических  $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  НЧ с холестерином. Данные отражены на рис. 3.

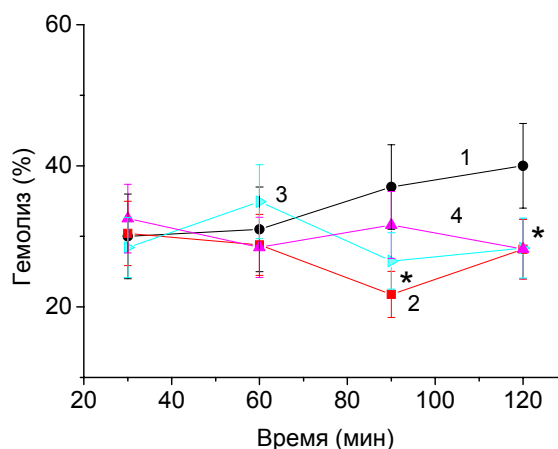


Рис. 3. Зависимость гемолиза эритроцитов в 4 М NaCl от времени предварительной инкубации в присутствии комплекса сферических НЧ  $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  размером 2 нм в концентрации 0,05 г/л с холестерином: 1 – 0 г/л (контроль); 2 – 0,011 г/л; 3 – 0,012 г/л; 4 – 0,1 г/л холестерина. Представлены средние значения  $\pm$  стандартные отклонения.

Видно, что во всех вариантах концентраций холестерина в исследуемом комплексе с НЧ и состава сред (данные по сахарозной среде не приведены) при 90 мин инкубации клетки имели меньший уровень повреждения, чем в контроле, а при 120 мин эта разница была статистически достоверной. Лучше всего защищали клетки те растворы, в которых концентрация была наименьшей. Так, в варианте с содержанием холестерина 0,011 г/л гемолиз достоверно ниже контрольного при 90 мин прединкубации (кривая 2 на рис. 3).

В отличие от самих 2 нм ортованадатных НЧ их комплекс с холестерином сохранял пониженный уровень гипертонического гемолиза эритроцитов. Однако существенного снижения повреждения, характерного для свободных НЧ в концентрации 0,1 г/л при



30 мин инкубации (рис. 2 А, кривая 4), также не зафиксировано. Такие данные можно интерпретировать следующим образом: присутствие холестерина повышает стабильность мембраны, способствуя сохранению высокого уровня адаптации клеток. Для осуществления такого эффекта достаточно минимальных концентрации холестерина (0,011 г/л) и времени инкубации (30 мин). НЧ при этом служат для доставки холестерина к мембранам независимо от состава среды.

Считается, что механизм гипертонического лизиса эритроцитов начинается с быстрой утечки воды, затем нарушается баланс ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , что приводит к изменению мембранного потенциала и внутриклеточного рН, дезорганизации липидного бислоя и цитоскелетной белковой сети, что заканчивается образованием гемолитических пор в мембране [10, 18]. Было показано, что ключевую роль в этом процессе играет структурное состояние мембраны [10]. Можно предположить, что зерноподобные НЧ и мелкие сферические НЧ в комплексе с холестерином оказывают влияние на осмотическую адаптацию клеток через их взаимодействие с бислоем, приводящее к изменению структуры мембраны [14, 15].

На следующем этапе исследования предстояло прояснить роль в исследуемом феномене состава НЧ. На рис. 4 представлены результаты осмотического лизиса эритроцитов после прединкубации с малыми - 2 нм (рис. 3 А) и большими - 9 нм (рис. 3 В) сферическими НЧ диоксида церия. Видно, что эти частицы сохраняли клетки только при длительной экспозиции (90-120 мин) и в максимальной концентрации (0,1 г/л). Т.о., несмотря на одинаковый форм-фактор НЧ разного состава существенно отличаются по влиянию на осмотическое поведение клеток. Механизмы такого различия нуждаются в исследовании.

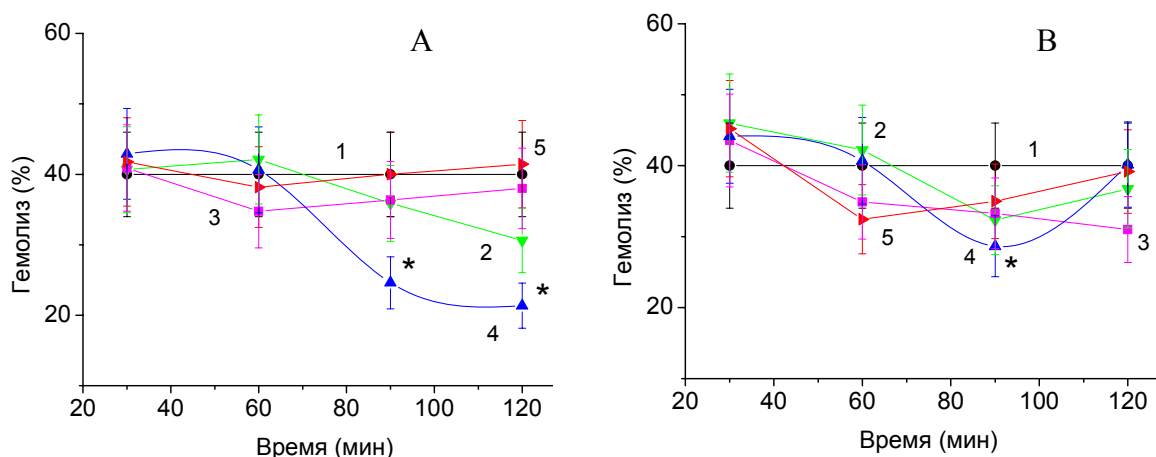


Рис. 4. Зависимость гемолиза эритроцитов в 4 NaCl от времени предварительной инкубации в присутствии сферических НЧ диоксида церия размером: А – 2 нм, В – 9 нм). Концентрации НЧ в изотонической сахарозно-солевой среде составляла: 0 г/л (кривая 1, контроль); 0,01 г/л (кривая 2); 0,05 г/л (кривая 3), 0,1 г/л (кривая 4), а в изотонической сахарозной среде – 0,1 г/л (кривая 5). Представлены средние значения  $\pm$  стандартные отклонения.

Таким образом, можно заключить, что НЧ на основе РЗЭ оказывают влияние на осмотическое поведение эритроцитов в зависимости от своих геометрических параметров, размера и состава. Защитный эффект проявили экстремальные сферические частицы (2 нм) обоих типов ( $\text{CeO}_2$  и  $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ), а также зерноподобные ортованадатные НЧ. Сферические же НЧ диоксида церия (9 нм) и стержневидные ортованадатные НЧ не оказали заметного влияния на осмотический гемолиз. Интересно отметить, что непроникающие в клетку, близкие по размерам зерноподобные

ортованадатные НЧ и НЧ диоксида церия (9 нм) различаются по эффектам. Решающими факторами здесь выступают форма и состав НЧ. Защитное влияние всех исследованных НЧ сильнее проявлялось в сахарозно-солевой среде и нарастало с увеличением их концентрации до 0,1 г/л.

На снижение гемолиза эритроцитов в гипертонической среде в случае экстремальных сферических НЧ разного состава влияла длительность инкубации. Так, ортованадатные НЧ проявляли защитный эффект на малых сроках инкубации (30 мин). Тогда как НЧ диоксида церия (2 нм) способствовали сохранности клеток при более длительной экспозиции (90-120 мин).

Важность состояния плазмалеммы для выживания клеток при гипертоническом гемолизе подтверждается значительным повышением уровня осмотической адаптации клеток в присутствии взаимодействующих с поверхностью мембраны зерноподобных НЧ, а также комплекса НЧ с холестерином.

О механизмах влияния исследованных НЧ можно сказать, что производимые эффекты могут быть частично обусловлены изменениями структуры клеточной мембраны в присутствии НЧ. Исследование структурных и функциональных ее изменений заслуживает отдельного внимания исследователей. Проникающие экстремальные сферические частицы могут защищать эритроциты от гемолиза посредством иных механизмов. Возможно, находясь внутри клетки, они способствуют поддержанию структуры внутриклеточного матрикса и задерживают выход воды. То, что защитные эффекты проявляются только в сахарозно-солевой среде и не воспроизводятся в изотонической сахарозной среде, свидетельствует о важной роли ионного баланса, обеспечиваемого буферными свойствами НЧ.

### ВЫВОДЫ

НЧ на основе РЗЭ способствуют адаптации эритроцитов к гипертоническому лизису в 4 NaCl. Стабилизирующее влияние НЧ на эритроциты зависело от их геометрических параметров, и в первую очередь размеров. Последние определяют особенности взаимодействия НЧ с мембраной, влияние на ее структуру, условия проникновения в клетку или адсорбцию НЧ на мембране. Оптимальными условиями прединкубации являются: концентрация НЧ на основе РЗЭ 0,1 г/л, изотоническая сахарозно-солевая среда и экспозиция от 30 до 60 мин для НЧ на основе ортованадатов или от 90 до 120 мин для 2 нм частиц диоксида церия.

Протекторные эффекты, наблюдаемые в присутствии комплекса ортованадатных НЧ размером 2 нм с холестерином, могут иметь практическое применение, как при исследовании гипертонического стресса эритроцитов, так и для нивелирования влияния факторов повреждения различной природы.

Таким образом, НЧ на основе РЗЭ могут применяться в качестве защитных агентов от факторов криоповреждения, связанных с повышением тоничности среды, и как носители холестерина. Широкую перспективу предоставляет возможность сочетанного использования этих НЧ как криопротекторов и с диагностической/лечебной целью.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bouzigues C. Biological applications of rare-earth based nanoparticles / Cedric Bouzigues, Thierry Gacoïn, Antigoni Alexandrou // ACS Nano. – 2011. – V. 5 (11). – P. 8488-8505.
2. Магнитные наночастицы: методы получения, строение и свойства / С. П. Губин, Ю. А. Кокшаров, Г. Б. Хомутов, Г. Ю. Юрков // Успехи химии. - 2005. - Т. - 74. - С. 539–574. / Magnitnye nanochasticy: metody polucheniya, stroenie i svojstva /S. P. Gubin, Ju. A. Koksharov, G. B. Homutov, G. Ju. Jurkov // Uspehi himii. - 2005. - Т. - 74. - С. 539–574. /
3. Клочков В. Водные коллоидные растворы наноломинофоров  $n\text{ReVO}_4\cdot\text{Eu}^{3+}$  (Re-Y, Gd, La) / В. Клочков // Наноструктурное материаловедение. – 2009. - № 2. – С. 3-8. / Klochkov V. Vodnye kolloidnye rastvory

- nanoluminoforov nReVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> (Re — Y, Gd, La) / V. Klochkov // Nanostrukturnoe materialovedenie. – 2009. - №2. – S. 3-8. /
4. Эффект специфического взаимодействия нанокристаллов GdYVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> с ядрами клеток / В.К. Клочков, Н.С. Кавок, Ю.В. Малюкин, В. П. Семиноженко // Доповіді Національної академії наук України. – 2010. – № 10. – С. 81-86. / Jeffect specificheskogo vzaimodejstvija nanokristallov GdYVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> s jadrami kletok / V. K. Klochkov, N. S. Kavok, Ju.V. Maljukin, V. P. Seminozhenko // Doporovidi Nacional'noї akademії nauk Ukraїni. – 2010. – № 10. – S. 81-86. /
  5. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges / M. Ferrari // Nat. Rev. Cancer. – 2005. – V. – 5 (3). – P. 161-171.
  6. 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. 11126-11137.
  7. 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.
  8. 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.
  9. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции / Р. Геннис ; пер с англ. – М.: Изд-во «Мир», 1997. – 624 с./Hennys R. Byomembrany: Molekulyarnaya struktura y funktsyy / R. Hennys ; per s anhl. – М.: Yzd-vo «Myr», 1997. – 624 s./
  10. Поздняков В. В. Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку : автореф. дис. на соискание научн. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.22 "Криобиология" / Владимир Владимирович Поздняков ; НАН Украины. - Харьков, 1989. - 16 с. / Vlijanie sostava i osmoljarnosti sredy na ustojchivost' jeritroцитов k osmoticheskomu i temperaturnomu shoku: avtoref. dis. na soiskanie nauchn. stepeni kand. biol. nauk: spec. 03.00.22 "Kriobiologija" / Vladimir Vladimirovich Pozdnjakov. - Har'kov, 1989. - 16 s. /
  11. Inorganic phosphate nanorods are a novel fluorescent label in cell biology/ C. Patra, R. Bhattacharya, S. Patra [et al.] // J. Nanobiotechnology. – 2006. – V. 4. – P. 11.
  12. Frhlich E. Cellular targets and mechanisms in the cytotoxic action of non-biodegradable engineered nanoparticles /E. Frhlich // Curr Drug Metab. – 2013 – V. – 14 (9). – P. 976-988.
  13. Tongtao Yue. Molecular modeling of membrane responses to the adsorption of rotating nanoparticles: promoted cell uptake and mechanical membrane rupture / Y. Tongtao , Z. Xianren, H. Fang // Soft Matter. – 2015. – V. – 11. – P. 456-465.
  14. Apatite nanoparticles strongly improve red blood cell cryopreservation by mediating trehalose delivery via enhanced membrane permeation./ M. Stefanic, K. Ward, H. Tawfik [et al.] // Biomaterials. – 2017. – V. -140. – P.138-149.
  15. Wrapping of nanoparticles by membranes. / A. Bahrami, M. Raatz, J. Agudo-Canalejo [et al.] // Adv Colloid Interface Sci. – 2014. – V. – 208. – P.214-224.
  16. Пат. 108011 Україна, МПК А61К 9/10, А61К 47/02, С07J9/00. Спосіб отримання водної дисперсії холестерину / В. К. Клочков : власник Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України. - № 2013 08642 : заявл. 09.07.2013 : опубл. 10.03.2015, Бюл. № 5. / Pat. 108011 Ukraina, МПК А61К 9/10, А61К 47/02, S07J9/00. Sposib otrymannia vodnoi dyspersii kholesterynu / V. K. Klochkov : vlasnyk Instytut stsyntyliatsiinykh materialiv NAN Ukrainy. - № 2013 08642 : zaiavl. 09.07.2013 : opubl. 10.03.2015, Biul. № 5.
  17. Способность наночастиц на основе ортованадатов к идентификации in vitro и инактивации in vivo створовых раковых клеток. / А. Н. Гольцев, Н. Н. Бабенко, Ю. А. Гаевская [и др.] // Наносистемы, наноматериали, нанотехнології. – 2013. - Т. 11., № 4. - С. 729–739. – Резюме рус., укр., англ. – Бібліогр.: с. 738. /Sposobnost' nanochastic na osnove ortovanadatov k identifikacii in vitro i inaktivacii in vivo stvolovyx rakovykh kletok. A. N. Gol'cev, N. N. Babenko, Yu. A. Gaevskaaya [i dr.] // Nanosistemi, nanomateriali, nanotexnologії. – 2013. -T. 11., № 4. - S. 729–739. Rezjume rus., ukr., angl. – Bibliogr. : s. 738. /
  18. Белоус А. Механизмы развития холодового повреждения мембран клеток / Аполлон Белоус, Валерий Бондаренко // Криобиология и криомедицина. - 1981. - № 9. - С. 3-17. / Belous A. Mehanizmy razvitija holodovogo povrezhdenija membran kletok / Apollon Belous, Valerij Bondarenko // Kriobiologija i kriomedicina. - 1981. - № 9. - P. 3-17. /

Наукове видання

“Біофізичний вісник”

Вип. 37(1)

Збірник наукових праць

Укр., рос. та англ. мовами.

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

Підписано до друку 30.08.2017. Формат 60×84 1/8.  
Папір офсетний. Друк ризографічний.  
Ум. друк. арк. 4,21. Обл.-вид. арк. 4,9. Наклад 100 пр.

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

---

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