

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

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

Біофізичний Вісник

2017

Biophysical Bulletin

2017

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ

В редакцію подається електронний варіант статті (MS Word 2007 і вище) українською, російською або англійською мовою через сайт журналу <http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk> з направленням установи і експертним висновком у вигляді відсканованих файлів.

Текст набирається на аркушах формату А4 через один інтервал. Використовується шрифт Times New Roman 12 pt, вирівнювання тексту по ширині. Поля справа і зліва по 2,5 см, зверху – 3,5 см, знизу – 2 см. Математичні та хімічні символи вводяться до тексту статті за допомогою редактора MathType або Microsoft Equation. Рисунки, придатні до репродукції, у форматі *.emf, *.wmf, *.jpg, *.jpeg, *.png вставляються до тексту в межах площі сторінки, вказаної вище. Рисунки розміщувати в межах таблиці з прозорими зовнішніми границями у першому рядку, підпис та коментарі до рисунку – у другому рядку таблиці. Графіки будуються у програмних пакетах, призначених для обробки і візуалізації наукових даних: Origin, Mathcad тощо. Використання офісного пакету MS Excel для побудови графіків не допускається. Цифри і підписи на осях та надписах повинні мати шрифт 9 pt. Підписи під рисунками друкуються шрифтом 10 pt. Формули, таблиці й рисунки нумеруються послідовно арабськими цифрами, наприклад, (1); Табл. 1; Рис. 1.

На першій сторінці зверху на першому рядку в лівому верхньому куті наводиться УДК (курсив, 11 pt). Після пропуску одного рядка, розміщується назва статті (великі літери, прямий напівжирний шрифт, 12 pt, вирівнювання по центру). Після пропуску одного рядка набираються ініціали, прізвища авторів (прямий напівжирний шрифт, 12 pt, вирівнювання по центру). На наступному рядку розміщуються повні назви й адреси установ, де виконувалась робота, адреса електронної пошти автора – контактної особи (курсив, 10 pt, вирівнювання по центру). Потім вміщується дата надходження статті до редакції: число – цифрами, місяць – прописом, рік – цифрами (шрифт прямий, 10 pt, вирівнювання по центру). На наступному рядку вміщується дата прийняття статті до друку (заповнюється редколегією).

Після пропуску одного рядка вміщуються три реферати (українською, англійською, російською мовами). Реферат мовою статті розміщується першим. Перед другим та третім рефератами з нових рядків пишуться назви статей (великими літерами, шрифт прямий, 10 pt, напівжирний, вирівнювання по центру), ініціали та прізвища авторів (шрифт прямий 10 pt, напівжирний, вирівнювання по центру), назви організацій та їх адреси (курсив 9 pt., вирівнювання по центру). Реферат повинен бути структурованим та містити наступні частини з заголовками: **Актуальність, Мета роботи, Матеріали і методи, Результати, Висновки**, які починаються з нового рядка. Слова “Реферат” і “Abstract” не пишуться. Заголовки структурних частин пишуться напівжирним шрифтом, після заголовка ставиться крапка. Текст реферату складає не менше 1800 та не більше 2000 фонетичних символів, тобто без проміжків між словами; прямий шрифт 10 pt. Реферати двома іншими мовами також повинні мати обсяг не менше 1800 на не більше 2000 фонетичних символів. На наступному рядку вміщуються 5-8 ключових слів, які розділяються між собою крапкою з комою (10 pt – перший реферат, 9 pt – другий та третій реферати). З початку рядка великими літерами, шрифт напівжирний, пишеться заголовок з двокрапкою “**КЛЮЧОВІ СЛОВА:**”. Тексти рефератів і ключові слова мають ширину на 1 см меншу, ніж основний текст (по 0,5 см з кожного боку). Реферати розділяються одним пустим рядком.

Основний текст статті наводиться після пропуску одного рядка шрифтом Times New Roman (Cyr), 12 pt. Абзаци починаються з червоного рядка (0,75 см). Рекомендується розбиття статті на такі розділи: вступ (назва розділу не пишеться), **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** (обов’язково для експериментальних робіт), **РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ, ВИСНОВКИ**. Для теоретичних робіт передбачається більш вільне розташування матеріалу, наприклад, замість розділу **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** рекомендуються розділи **ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ, МОДЕЛЬ** та ін. Розділи не нумеруються, літери великі, напівжирні, вирівнювання по центру. При необхідності розділи поділяються на підрозділи. Назви підрозділів пишуться з великої літери і виділяються напівжирним шрифтом, вирівнювання по центру. Розділи або підрозділи розділяються одним пустим рядком. Після назв розділів і підрозділів крапка не ставиться. У кінці тексту статті після пропуску одного рядка у розділі **ПОДЯКА** зазначається назва фонду, який фінансував роботу, і номер гранту. Потім розміщується розділ **КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ**, у якому автори декларують наявність фінансових або інших конфліктів інтересів, які могли вплинути на результати, інтерпретацію та висновки дослідження. Якщо немає конфлікту інтересів, так і потрібно заявити: "Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів".

Літературні посилання нумеруються в порядку цитування в тексті, номер посилання пишеться у квадратних дужках. Не допускаються посилання на неопубліковані роботи, підручники та навчальні посібники. Список літератури (шрифт 10 pt.) наводиться двічі. Перший раз розміщується за основним текстом статті, виділяється як розділ **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**, який оформлюється за вимогами ДСТУ ГОСТ 8302:2015. Другий раз список літератури наводиться англійською мовою, розміщується після першого, виділяється як розділ **REFERENCES** і оформлюється згідно з міжнародним стилем оформлення списку наукових публікацій APA. Приклади оформлення бібліографічних посилань можна подивитись на сайті журналу у розділі «Керівництва для авторів»: <http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/about/submissions#authorGuidelines>.

Рукописи оформлені не у відповідності до наведених правил не розглядатимуться!

ISSN 2075-3810

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

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

Біофізичний Вісник Biophysical Bulletin

Випуск 38 (2) 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 № 17 від 27 листопада 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

Толсторуків М.Є. – 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

Шкорбатів 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

EDITORIAL

M.V. Kosevich, V.A. Karachevtsev

Nanobiophysics: fundamental and applied aspects. New information about recent problems and progress achieved in this field (Information about 5th International conference “Nanobiophysics: Fundamental and Applied Aspects” – NBP2017) 5-11

МЕДИЧНА ФІЗИКА

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

Устойчивость изображений, получаемых в компьютерной томографии методом обратного проецирования 12-19

МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

В. М. Шкрыль

Основные принципы конфокальной микроскопии кальциевых сигналов 20-34

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

N.V. Sheykina, N.I. Bogatina

Primary physical mechanism of different magnetic fields action on roots of some plants 35-44

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

Р.В. Фафула, О.І. Мескало, Е.І. Личковський, З.Д. Воробець

Эффекты гидроген пероксида на основні кінетичні параметри гідролізу АТФ уабайнчутливою NA^+ , K^+ -АТР-азою сперматозоїдів інфертильних чоловіків 45-53

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

M.Yu. Zhitnikova, A.V. Shestopalova

Protein-DNA complexation: contact profiles in DNA grooves 54-65

МЕДИЧНА ФІЗИКА

Г.В. Камарчук, А.П. Поспелов, Д.А. Гарбуз, В.А. Гудименко,**Л.В. Камарчук, А.С. Заика, А.М. Плетнев, А.В. Кравченко**

Наноструктурные точечно-контактные сенсоры для диагностики канцерогенных штаммов бактерии *Helicobacter pylori* 66-78

CONTENTS
EDITORIAL**M.V. Kosevich, V.A. Karachevtsev**

Nanobiophysics: fundamental and applied aspects. New information about recent problems and progress achieved in this field (Information about 5th International conference “Nanobiophysics: Fundamental and Applied Aspects” – NBP2017) 5-11

MEDICAL PHYSICS**L.A. Bulavin, Y.F. Zabashta, O.V. Motolyha, S.P. Senchurov**

The stability of images taken in computed tomography by back-projection method 12-19

METHODS OF BIOPHYSICAL INVESTIGATIONS**V.M. Shkryl**

Basic principles of confocal microscopy of calcium signals 20-34

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ’ЄКТИ**N.V. Sheykina, N.I. Bogatina**

Primary physical mechanism of different magnetic fields action on roots of some plants 35-44

CELL BIOPHYSICS**R.V. Fafula, O.I. Meskalo, E.I. Lychkovskyy, Z.D. Vorobets**

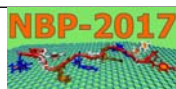
Effect of hydrogen peroxide on the main kinetic parameters of ATP hydrolysis by ouabain sensitive Na^+ , K^+ -ATP-ase in spermatozoa of infertile men 45-53

MOLECULAR BIOPHYSICS**M.Yu. Zhitnikova, A.V. Shestopalova**

Protein-DNA complexation: contact profiles in DNA grooves 54-65

MEDICAL PHYSICS**G.V. Kamarchuk, A.P. Pospelov, D.A. Harbuz, V. A. Gudimenko,****L.V. Kamarchuk, A.S. Zaika, A.M. Pletnev, A.V. Kravchenko**

Nanostructural point-contact sensors for diagnostics of carcinogenic strains of *Helicobacter pylori* 66-78



УДК 577.32

EDITORIAL

**NANOBIOPHYSICS: FUNDAMENTAL AND APPLIED ASPECTS.
NEW INFORMATION ABOUT RECENT PROBLEMS AND PROGRESS
ACHIEVED IN THIS FIELD**

(Information about 5th International conference
“Nanobiophysics: Fundamental and Applied Aspects” – NBP-2017)

M.V. Kosevich, V.A. Karachevtsev

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

e-mail: kosevich@ilt.kharkov.ua

Submitted October 12, 2017

Accepted October 16, 2017

Among new branches of natural sciences, which are currently emerging, development of a novel field of nanobiophysics was impelled by the advent of nanoscience in qualitatively new direction interfacing bionanoobjects and nanomaterials. To shape this field in Ukraine, a new series of biennial international conferences “Nanobiophysics: fundamental and applied aspects” was established in 2009 by biophysicists of B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkov) and Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kiev). After the lapse of eight years the 5th NBP-2017 conference has demonstrated significant advances in this realm of science, overviewed in the present report. About 90 scientists from 9 countries took part in the conference. They presented more than 40 lectures and about 50 poster contributions. Researchers from biophysical departments of seven academic institutes and universities of Kharkov reported remarkable achievements in studies of bionanohybrids of biopolymers and biologically active compounds with inorganic nanomaterials, conducted by varied experimental techniques and computer simulations. Biophysicists from a number of Kiev academic institutes reported experimental and theoretical characterization of biomolecular nanosystems promising for nanotechnology and biomedical applications. Impressive achievements in biophysical studies at the nano level were presented in the invited lectures of leading specialists from Estonia, France, Latvia, Slovakia, South Korea, and the People's Republic of China. The conference provided a platform for meetings of participants of international projects in the field and fruitful discussion of further international collaboration.

KEY WORDS: nanobiophysics; molecular biophysics; nanotechnology; bionanohybrids; bionanostructures.

**НАНОБІОФІЗИКА: ФУНДАМЕНТАЛЬНІ ТА ПРИКЛАДНІ АСПЕКТИ.
НОВА ІНФОРМАЦІЯ ЩОДО НАГАЛЬНИХ ПРОБЛЕМ ТА ДОСЯГНЕНЬ У ЦІЙ ЦАРИНИ
(Інформація про 5-ту міжнародну конференцію «Нанобіофізика:
фундаментальні та прикладні аспекти» НБФ-2017)**

М.В. Косевич, В.О. Карачевцев

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

Біофізика як одна із сучасних природничих наук з появою нанотехнології отримала поштовх у якісно новому напрямку поєднання біонанооб'єктів та наноматеріалів, що породило нову галузь – нанобіофізику. Для формування цього напрямку в Україні у 2009 році біофізиками Фізико-технічного інституту низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України (Харків) та Інституту фізики НАН України (Київ) була заснована серія міжнародних конференцій «Нанобіофізика: фундаментальні та прикладні аспекти». Через вісім років п'ята конференція НБФ-2017 продемонструвала значний прогрес у цій галузі науки, що становить предмет цього огляду. У конференції взяли участь 90 науковців з 9 країн світу і представили понад 40 доповідей та близько 50 стендових презентацій. Дослідники біофізичних відділів 7 академічних інститутів та університетів Харкова доповіли про суттєві досягнення у дослідженнях біонаногібридів біополімерів та біологічно активних сполук з неорганічними наноматеріалами, які проводилися різними експериментальними методами та комп'ютерним моделюванням. Біофізики академічних інститутів Києва повідомили про результати експериментальних та теоретичних досліджень біомолекулярних наносистем, перспективних для нанотехнології та біомедичних застосувань. Вражаючі досягнення біофізичних досліджень на нано-рівні були представлені у

запрошених лекціях провідних спеціалістів з Естонії, Франції, Латвії, Словаччини, Південної Кореї та Китайської Народної Республіки. Конференція забезпечила майданчик для зустрічей учасників міжнародних проектів та для продуктивного обговорення подальшого наукового співробітництва.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нанобіофізика; молекулярна біофізика; нанотехнології; біонаногібриди; біонаноструктури.

НАНОБИОФИЗИКА: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ. НОВАЯ ИНФОРМАЦИЯ ОБ АКТУАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМАХ И ДОСТИЖЕНИЯХ В ЭТОЙ ОБЛАСТИ (Информация о 5-й международной конференции «Нанобиофизика: фундаментальные и прикладные аспекты» НБФ-2017)

М.В. Косевич, В.А. Карачевцев

*Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина
Национальной академии наук Украины, пр. Науки 47, 61103, Харьков, Украина*

Современная биофизика с появлением нанотехнологий получила толчок в качественно новом направлении объединения бионанообъектов и наноматериалов, породив новое научное направление – нанобиофизику. Для оформления этого направления в Украине в 2009 году биофизики Физико-технического института низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины (Харьков) и Института физики НАН Украины (Киев) учредили серию международных конференций «Нанобиофизика: фундаментальные и прикладные аспекты». Спустя восемь лет пятая по счету конференция НБФ-2017 продемонстрировала значительный прогресс в этой области науки, что и составляет предмет данного обзора. В конференции приняли участие около 90 ученых из 9 стран, представивших более 40 устных и порядка 50 стендовых презентаций. Исследователи биофизических отделов 7 академических институтов и университетов города Харькова рассказали о существенных достижениях в исследованиях бионаногибридов биополимеров и биологически активных веществ с неорганическими наноматериалами, которые проводили разными экспериментальными методами и посредством компьютерного моделирования. Биофизики ряда академических институтов города Киева доложили об экспериментальных и теоретических исследованиях биомолекулярных наносистем, перспективных для нанотехнологии и биомедицинских приложений. Впечатляющие достижения биофизических исследований на нано-уровне были представлены в приглашенных лекциях ведущих специалистов из Эстонии, Франции, Латвии, Словакии, Южной Кореи и Китайской народной республики. Конференция обеспечила площадку для встреч участников международных проектов и для продуктивного обсуждения дальнейшего научного сотрудничества.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нанобиофизика; молекулярная биофизика; нанотехнология; бионаногібриди; біонаноструктури.

5th International conference “Nanobiophysics: Fundamental and Applied Aspects” – NBP2017 was held on 2-5 October, 2017 in Kharkov, Ukraine, at B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering (ILTPE) of the National Academy of Sciences (NAS) of Ukraine [1, 2]. NanoBioPhysics (NBP) conference series was jointly launched in 2009 by B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the NAS of Ukraine and the Institute of Physics of the NAS of Ukraine. Previous four conferences were organized on biennial basis in Kiev and Kharkov alternately.

Nanobiophysics is a new branch of science which operates at the interface of physics, biology, chemistry, material science, nanotechnology, and medicine. The basic motivation of the nanobiophysical investigations includes elucidation of fundamental mechanisms of biological processes at the molecular level and interfacing this knowledge with various medical and nanobiotechnology applications.

A previous conference held at the ILTPE in 2013 was completed by book publication in 2016 [3]. The book introduced the field of nanobiophysics through 12 reviews which were presented at the NBP2013 conference as invited lectures. These reviews were focused on some selected topics related to the physics of biomolecular nanosystems, nanobiohybrids involving DNA/RNA and single-walled carbon nanotubes. Some reviews in the book describe unique experimental physical methods which are used to study nanosized biostructures. Fundamental researches are also presented through 2 reviews with strong theoretical considerations and two chapters of the book are devoted to applied aspects of nanobiophysics.

The aim of the present conference was to discuss urgent problems in a new scientific field combining biophysics and nanotechnology as well as its progress and prospects. While many problems concerning the structure, physical properties and intermolecular interactions of biopolymers are intensively studied in the framework of traditional molecular biophysics, the XXIst century arouse new challenges of integration of useful properties of biomolecules with unique capabilities of nanomaterials for advanced practical applications. This was reflected in the titles of the topics considered at the conference sessions:

- Nanobiohybrids formed by nanocarbon materials with bioobjects;
- Biomolecules on nanoparticles and nanostructured surfaces;
- Physical aspects of biomolecular nanosystems;
- Theoretical calculations and computer modeling of nanobiosystems;
- Applied aspects of nanobiophysics.

About 90 scientists from 9 countries took part in the conference. 14 invited lectures, 28 oral presentations (Fig. 1) and about 50 posters were presented, a Book of Abstracts was published [1]. A possibility to present the result of the international, in particular European, collaboration of the conference participants as well as discussion of further international projects was of great importance (Fig. 2).

The contributions of the conference hosts reflected recent achievements of the Kharkov scientific school of molecular and nano biophysics. The lecture of the conference vice-chairman Professor **Karachevtsev V.A.** was devoted to experimental and theoretical studies of interaction of nucleic acid constituents – nitrogen bases and short oligonucleotides with novel nanoform of carbon – graphene oxide (supported by the National Academy of Sciences of Ukraine grant within the program “Fundamental Problems of the creation of new Nanomaterials and Nanotechnology”). Knowledge on the properties of DNA or RNA complexes with graphene oxide is claimed due to promising applications in genosensing and gene delivery.

The subject of nanobiohybrids formed by nanocarbon materials with biomolecules was further enlightened in the presentations of the coworkers of the Department of Molecular Biophysics of the ILTPE. Dr. **Glamazda A.Yu.** reported on spectroscopic studies of DNA-wrapped carbon nanotubes aligned in the stretched gelatine film. Contribution of **Kurnosov N.V.** was focused on interaction of thiol compounds with single-walled carbon nanotubes by means photoluminescence and Raman spectroscopy. Specific for the ILTPE direction of spectroscopic studies at low temperatures was reflected in the talk of Dr. **Ivanov A.Yu.** entitled “Biomolecules in the low temperature inert matrices and graphene oxide films: structures and vibrational spectra”. Low temperature technique of freeze-drying was applied for production of carbon nanotube-polyoxymethylene nanocomposite, while low temperature mass spectrometric method was used to characterize this composite in the work presented by Dr. **Kosevich M.V.** Computer simulation of nanomaterials was described by Dr. **Stepanian S.G.** in his talk “Structure and vibrational spectra of graphene oxide: *ab-initio* modeling”. Head of Department of Spectroscopy of Molecular Systems and Nanostructured Materials of ILTPE Dr. **Komarchuk G.V.** reported about the development of innovative point-contact nanosensors for real-time detection of *helicobacter pylori* virulent strains.

Achievements of Department of Biological Physics of O.Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of the NAS of Ukraine (Kharkov) in the area of studies of physical aspects of biomolecular nanosystems were presented in the talk of Professor **Shestopalova A.V.** devoted to revealing of particular features of structural and physical characteristics of nucleosomal DNA, which is a nanostructure formed in the living cell as well as artificially created. **Glibitskiy D.M.** informed about observations of zigzag patterns of solutions and films of bovine albumin with FeCl_3 probed by dynamic light scattering.



Ramseyer C.



Trusova V.M.



Seong Soo Choi



Ermakov V.N.



Kamarchuk G.V.



Petrov E.G.



Stepanian S.G.



Dovbeshko G.I.



Kutsevol N.V.



Yefimova G.L.



Vashchenko O.V.



Zhang B.



Ogurtsov A.N.



Shestopalova A.V.



Freiberg A.



Volkov S.N.

Fig. 1. Some emotional moments of the lectures at the NBP2017 conference.



Fig. 2. Informal discussions: Professor Kutsevol N.V. and Professor Víglaský V. (left), Professor Kryachko E.S. and Professor Cheranovskii V.O. at a poster session (right).

In a number of lectures basic nanophysical studies which are of interest for future pharmacological and biomedical applications were presented, in particular, in the contributions of researches of the Institute for Scintillation Materials of the NAS of Ukraine (Kharkov). Professor *Lisetsky L.N.* described results of application of differential scanning calorimetry technique to investigations of joint action of drugs in model membranes, which are useful in development and pre-clinical studies of novel drugs and drug formulations. Dr. *Vashchenko O.V.* told about distinction in individual and joint membranotropic action of calcium and magnesium stearates as medicines excipients. Dr. *Yefimova S.L.* told about physical aspect of a new approach to nanoparticle application in photodynamic therapy of cancer, namely about a novel composition on the base of porous CaCO_3 microspheres loaded with both scintillating gadolinium orthovanadate nanoparticles doped with europium ions and methylene blue photosensitizer molecules. Dr. *Seminko V.V.* reported about sensing reactive oxygen species using Ce^{3+} luminescence of cerium dioxide nanocrystals.

In the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine (Kharkov) nanoscience approach presented by Professor *Osetsky A.I.* is applied to studies of bionanostructures based on cluster crystallization of the solutions with weak interaction between components.

Along with researchers from academic institutes, scientists from universities of Kharkov contribute to nanobio-investigations and education. The Department of Molecular and Medical Biophysics of V.N. Karazin Kharkiv National University was represented by Dr. *Trusova V.M.* who described physical and structural properties of amyloid fibrillar assemblies involved in pathogenesis of so-called conformational diseases, such as neurological disorders and, at the same time are promising candidates for the design of novel functional materials and devices. Professor *Ogurtsov A.N.*, Chair of Biotechnology, Biophysics and Analytical Chemistry of the National Technical University “Kharkiv Polytechnic Institute” (NTU “KPI”), discussed capabilities of nanobiophysics in bionanotechnology as a branch of nanotechnology, which uses biologically inspired structural and functional principles, methods and techniques for development of atomic-level engineering and manufacturing technologies. Dr. *Lykah V.A.* (NTU “KPI”) described theoretical modeling of charge carrier behavior in functionalized CNT with charge transfer between CNT and the attached molecules.

Advances in nanobiophysical investigations were outlined in the reports of the conference co-organizers from Kiev Institute of Physics of the NAS of Ukraine. In the framework of the “Biomolecules on nanoparticles and nanostructured surfaces” session Professor *Dovbeshko G.I.* described studies on the DNA structure and conformation in confined volume and on the nanostructured surfaces. Professor *Chegel V.I.* (V.E. Lashkaryov

Institute of Semiconductor Physics of the NAS of Ukraine, Kiev) highlighted the biomolecular aspects of molecular plasmonics. Researchers from the Bogolyubov Institute for Theoretical Physics of the NAS of Ukraine (Kiev) have presented results of theoretical considerations of various phenomena occurring in bionanoobjects. Professor **Petrov E.G.** lectured about characteristic features of kinetic processes in bionanosystems, Professor **Volkov S.N.** described physical mechanisms of regulating the DNA activity at the nanoscale, and Professor **Ermakov V.N.** told about modeling of respirator mechanism for cyanide destruction by bacteria. Professor **Kutsevol N.V.** (Taras Shevchenko National University of Kyiv) told about biomedical application of nanosystems synthesized in branched PNIPAM (poly-N-isopropylacrylamide) polymer matrices with inclusion of Au nanoparticles and a photosensitizer Clorin e6.

Presentations of international collaborators provided precious information of the main developments and trends in the nanobiophysics-related fields worldwide. Professor **Freiberg A.** (Institute of Physics, University of Tartu, Estonia) in his opening impressive lecture “*In situ* engineering of excitons in biological nanostructures” gave a comprehensive picture of experimental investigations on photosynthetic energy transfer and trapping processes mediated by excitons in special biological nanostructures - pigment-protein complexes by a photo-chemical technique and a physical method of high hydrostatic pressure.

Professor **Víglaský V.** (Pavol Jozef Šafárik University, Košice, Slovakia) reported about the revealed unusual properties of G-quadruplex motifs of DNA found in living systems and designed for nanobiotechnology. Professor **Ramseyer C.** (Université de Franche-Comté, Besançon, France) described applications of High Performance Computer science for *in silico* calculations urgent for design of drugs which are highly efficient but also very selective toward cancer cells, when *in vivo* and *in vitro* experiments cannot go further. Professor **Seong Soo Choi** (SunMoon University, Ahsan, South Korea) described current nanotechnology advancements from Coulter cell counter to single molecule plasmonic nanopore sensor. Professor **Zhang B.** (affiliated in Liaoning Shihua University, Fushun, P. R. China, and University of Freiburg, Germany) told about aromatic polyimides maximizing π -stacking interactions with carbon nanotubes by mediating their backbone conformations.

In the framework of the conference meetings of participants of international collaboration and current international projects took place. In particular, a special session dedicated to HORIZON 2020 project "Asymmetry of biological membrane: theoretical, experimental and applied aspects" (690853 — assymcurv — H2020-MSCA-RISE-2015/H2020-MSCA-RISE-2015) was organized by its European coordinator Professor **Dovbeshko G.I.** (Fig. 3). Reports on the current developments of the project were made by Professors **Ramseyer C.** (France), **Berzina B.** (Latvia), **Freiberg A.** (Estonia), **Gogotsi O.G.** (Ukraine).

Competition for the best contribution of young scientists was organized in the framework of the conference. The winners in the nomination for the best oral talks were **Miroshnychenko K.V.** with her presentation “Ligand-induced DNA conformational changes in minor groove complexes studied by molecular dynamics simulation” and **Piatnytskyi D.V.** for his “Complexes of hydrogen peroxide and DNA phosphate group in quantum chemical calculations” talk. The best poster winners were **Lapshin V.A.** for his “Nanostructured and ultradisperse materials: production by means of immersed electric discharge and application for biology and medicine” poster and **Hubenko K.O.** for her “Nanocomposite CaWO₄ in mesoporous spheres SiO₂ for X-ray induced photodynamic therapy” poster (Fig. 4).

The conference was partially sponsored by the Trade Union of the ILTPE of the NAS of Ukraine and international scientific societies – The Optical Society (OSA, http://www.osa.org/en-us/about_osa/) and The International Society for Optics and Photonics

(SPIE, <http://spie.org/about-spie>). The secretary of the Young Scientists Council of the ILTPE **Gamayunova N.V.** had informed junior participants about the opportunities provided by the Student Chapters of these societies.



Fig. 3. Participants of the HORIZON 2020 project: Dovbeshko G.I. (coordinator), Olenchuk M., Freiberg A., Rivel T., Foley S., Berzina B.



Fig. 4. Diploma for the best young scientists' contributions are awarded by Professor Karachevtsev V.A. to Hubenko K.O. and Lapshin V.A.

In this issue *Biophysical Bulletin* publishes some articles presented at the NBP2017.

The next conference of the series is expected to be organized in autumn 2019 in Kiev. More information can be found at the conference site [2].

REFERENCES

1. Nanobiophysics: Fundamental and Applied Aspects. Book of Abstracts. / Ed. V.A. Karachevtsev. Kharkiv: ILTPE NASU, 2017. 130 p.
2. 5-th International Conference NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects // Conference site [Electronic resource] // Mode of access: URL: <http://www.ilt.kharkov.ua/nbp2017> – Title from the screen. – Last access: October 20, 2017.
3. Nanobiophysics: Fundamentals and Applications / Ed. V.A. Karachevtsev. Singapore: Pan Stanford Publishing, 2016. 417 p. (ISBN 978-981-4613-96-5 - Hardcover, ISBN 978-981-4613-97-2 - eBook).

REFERENCES

1. Karachevtsev, V.A. (Ed.). (2017). Nanobiophysics: Fundamental and Applied Aspects. Book of Abstracts. Kharkiv: ILTPE NASU.
2. 5-th International Conference NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects. (2017). Conference site. Retrieved from <http://www.ilt.kharkov.ua/nbp2017>
3. Karachevtsev V. A. (Ed.). (2016). Nanobiophysics: Fundamentals and Applications. Singapore: Pan Stanford Publishing. <https://doi.org/10.1201/b20480>

УДК 616-073.756.8

УСТОЙЧИВОСТЬ ИЗОБРАЖЕНИЙ, ПОЛУЧАЕМЫХ В КОМПЬЮТЕРНОЙ ТОМОГРАФИИ МЕТОДОМ ОБРАТНОГО ПРОЕЦИРОВАНИЯ

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

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, просп. Глушкова 2 А, Киев, Украина
oleksandr.motolyha@gmail.com

Поступила в редакцию 27 апреля 2017 г.

Принята 5 сентября 2017 г.

Актуальность. Метод обратного проецирования в современной компьютерной томографии достаточно распространён, и в научной литературе практически отсутствуют принципиальные критические замечания в его адрес. А причины для таких замечаний существуют. Главная из них, по нашему мнению, состоит в том, что в указанном методе никак не используется теория некорректных задач, несмотря на то, что сама задача реконструкции является некорректной.

Цель работы. Целью является разработка способа реконструкции томограмм, который представляет собой модификацию метода обратного проецирования с учетом теории некорректных задач.

Материалы и методы. В методе обратного проецирования значение параметра фильтрации выбирается практически произвольно. В предлагаемом в статье способе такой выбор получает обоснование: параметр фильтрации отождествляется с параметром регуляризации, что позволяет для его определения использовать теорию некорректных задач и тем самым обеспечить устойчивость реконструированного изображения.

Результаты. Была получена зависимость качества реконструкции от выбранной ширины фильтра, найдено значение фильтра, что при данном уровне погрешности исходных данных и данной геометрии соответствовало минимальной погрешности реконструированного изображения. Значение ширины фильтра зависит от параметров сканирования и уровня шума на проекциях, поэтому результатом является не конкретное значение фильтра, а способ выбора оптимального значения.

Выводы. В статье показано, что имеется возможность, не отказываясь полностью от метода обратного проецирования со всеми его положительными сторонами, модифицировать этот метод, дополнив его подходами, используемыми в теории некорректных задач. Такой подход должен обеспечить устойчивость реконструируемого изображения. Это может быть, например, отождествление параметра фильтрации с параметром регуляризации, что легло в основу предлагаемого в данной статье способа реконструкции изображений. Возможно существование и других путей использования теории некорректных задач в методе обратного проецирования.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рентгеновская компьютерная томография; метод обратного проецирования; теория некорректных задач.

СТІЙКІСТЬ ЗОБРАЖЕНЬ, ОТРИМАНИХ В КОМП'ЮТЕРНІЙ ТОМОГРАФІЇ МЕТОДОМ ОБЕРНЕНОГО ПРОЕЦІВАННЯ

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

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

Актуальність. Метод оберненого проєціювання в сучасній комп'ютерній томографії досить поширений, і в науковій літературі практично відсутні принципові критичні зауваження на його адресу. А причини для таких зауважень існують. Головна з них, на нашу думку, полягає в тому, що в зазначеному методі ніяк не використовується теорія некоректних задач, незважаючи на те, що сама задача реконструкції є некоректною.

Мета роботи. Метою є розробка способу реконструкції томограм, який є модифікацією методу оберненого проєціювання з врахуванням теорії некоректних задач.

Матеріали та методи. У методі оберненого проєціювання значення параметра фільтрації обирається практично довільно. У запропонованому в статті способі такий вибір отримує обґрунтування: параметр фільтрації ототожнюється з параметром регуляризації, що дозволяє для його визначення використовувати теорію некоректних задач і тим самим забезпечити стійкість реконструйованого зображення.

Результати. Було отримано залежність якості реконструкції від обраної ширини фільтра, знайдено значення фільтра, що при даному рівні похибки вихідних даних і даній геометрії сканування відповідає мінімальній похибці реконструйованого зображення. Значення ширини фільтра залежить від параметрів сканування і рівню шуму на проєкціях, тому результатом є не конкретне значення фільтра, а спосіб вибору оптимального значення.

Висновки. В статті показано, що є можливість не відмовлятися повністю від методу оберненого проєціювання з усіма його позитивними сторонами, а модифікувати цей метод, доповнивши його підходами, використовуваними в теорії некоректних задач. Такий підхід повинен забезпечити стійкість зображення, що реконструюється. Це може бути, наприклад, ототожнення параметра фільтрації з параметром регуляризації, що лягло в основу пропонованого в цій статті способу реконструкції зображень. Можливе існування і інших способів використання теорії некоректних задач в методі оберненого проєціювання.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: рентгенівська комп'ютерна томографія; метод оберненого проєціювання; теорія некоректних задач.

THE STABILITY OF IMAGES TAKEN IN COMPUTED TOMOGRAPHY BY BACK-PROJECTION METHOD

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

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

Background: The back-projection method is quite widespread in the modern computed tomography and there are not principled critical comments addressed to it in the scientific literature. But there are reasons for such comments. The main one of them, in our opinion, is that the method does not use the theory of ill-posed problems in any way, despite the fact that the problem of the reconstruction is ill-posed.

Objectives: The aim of the work is a development of a method of the reconstruction of tomograms, which is a modification of the back-projection method taking into account the theory of ill-posed problems.

Materials and methods: In the back-projection method, the value of the filter parameter is chosen practically arbitrarily. In the method proposed in the article, this choice receives a justification: the filter parameter is identified with the regularization parameter that allows us to use the theory of ill-posed problems for its determination, and thereby to ensure the stability of the reconstructed image.

Results: The dependence of the quality of the reconstruction on the selected filter width was obtained. The value of the filter at the given error level of the initial data and the given geometry corresponding to the minimum error of the reconstructed image was found. The value of the filter width depends on the scanning settings and the noise level on the projections, so the result is not the specific value of the filter but it's the way to select the optimal value.

Conclusions: In this paper we show that it is possible without completely abandon the back-projection method with all its positive sides to modify this method supplementing it with the approaches used in the theory of ill-posed problems. Such an approach must ensure the stability of the reconstructed image. This can be, for example, the identification of the filter parameter with the regularization parameter that formed the basis for the method of image reconstruction proposed in this article. It's possible there are other ways of using the theory of ill-posed problems in the of back-projection method.

KEW WORDS: X-ray computed tomography; back-projection method; ill-posed problems.

Данная статья посвящена применению в компьютерной томографии одного из разделов математической физики, который называется теория некорректных задач или теория регуляризации [1-3]. Эта статья является продолжением нашей работы [4]. В последней было показано, что изображение, полученное с помощью повсеместно распространенного метода обратного проецирования [5-6], является неустойчивым. Его неустойчивость проявляется в том, что при увеличении точности приборов реконструированное изображение остается сильно зашумленным. Для получения устойчивого изображения был использован метод регуляризации [1-3]. Однако показано, что применение метода регуляризации сопряжено со значительным увеличением алгоритмической сложности, что приводит к гораздо большим затратам машинного времени в сравнении с методом обратного проецирования.

В данной статье предлагается способ получения устойчивого изображения, в котором объединяются преимущества обоих вышеупомянутых методов. По своей сути,

этот способ представляет собой модифицированный метод обратного проецирования, в котором на определенном этапе расчета использована идея регуляризации.

Для описания предложенного способа логично, по нашему мнению, вначале кратко изложить основные положения как теории регуляризации, так и метода обратного проецирования.

ОБРАТНОЕ ПРОЕЦИРОВАНИЕ

Как известно [5], изображения, получаемые в компьютерной томографии, фактически представляют собой распределение μ – коэффициента линейного затухания рентгеновского излучения в срезе исследуемого объекта определенной плоскостью. В этой плоскости рассматривают две системы координат. Первая (x, y) – неподвижная (лабораторная), которая связана с исследуемым объектом. Именно в этой системе задают распределение $\mu(x, y)$. Вторая (x', y') – подвижная, связана с ориентацией рентгеновского пучка и детектора относительно объекта. Будем считать, что рентгеновское излучение направлено параллельно оси y' . Угол между осями x и x' будем обозначать ϕ .

В принятых обозначениях для интенсивности $I_\phi(x')$ рентгеновского излучения, что прошло сквозь объект под углом ϕ , можно записать:

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

где $I_\phi^0(x')$ – интенсивность рентгеновского излучения, которое вышло из источника.

Проекцией объекта называют величину:

$$\lambda_\phi(x') = -\ln \left[\frac{I_\phi(x')}{I_\phi^0(x')} \right]. \quad (2)$$

Учитывая, что положение по оси y' определяется выражением:

$$x' = x \cdot \cos(\phi) + y \cdot \sin(\phi), \quad (3)$$

и подставляя (1) в уравнение (2) переписываем его в виде

$$\lambda_\phi(x') = \int \int_{-\infty}^{\infty} \mu(x, y) \delta(x \cos \phi + y \sin \phi - x') dx dy, \quad (4)$$

Это выражение называется преобразованием Радона [7]. Целью компьютерной томографии является решение интегрального уравнения (4) относительно неизвестной функции $\mu(x, y)$ при наличии экспериментально измеренных значений функции $\lambda_\phi(x')$.

При использовании метода обратного проецирования исходным выражением является двумерное фурье-преобразование в полярных координатах:

$$\mu(x, y) = \int_0^\pi \int_{-\infty}^{\infty} \mu(r, \phi) \exp[2\pi r(x \cos \phi + y \sin \phi)] |r| dr d\phi, \quad (5)$$

Запишем выражение (5) в виде

$$\mu(x, y) = \int_0^\pi \lambda_\phi^*(x') d\phi, \quad (6)$$

где x' определяется выражением (3). Соответственно, для функции $\lambda_\phi^*(x')$ имеем соотношение:

$$\lambda_{\phi}^*(x') = \int_{-\infty}^{\infty} \mu(r, \phi) \exp[2\pi x'r] |r| dr, \quad (7)$$

Отметим, что бесконечное интегрирование в этом выражении заменяют конечным:

$$\lambda_{\phi}^*(x') = \int_{-R}^R \mu(r, \phi) \exp[2\pi x'r] |r| dr, \quad (8)$$

Далее доказывают, что формулу (8) можно представить в виде выражения:

$$\lambda_{\phi}^*(x') = \int_{-\infty}^{\infty} \lambda_{\phi}(x') p(x' - x) dx, \quad (9)$$

в котором функция $p(x')$ определяется формулой

$$p(x') = R^2 [2\text{sinc}(2Rx') - \text{sinc}^2(Rx')]. \quad (10)$$

Функция $\lambda_{\phi}^*(x')$ называется фильтрованной проекцией, при этом величину R можно назвать параметром фильтрации.

Формулы (6) и (9) являются решением уравнения (4). Как видно из приведенной схемы расчета ключевым пунктом в методе обратного проецирования является замена бесконечного интегрирования конечным. Вместе с тем выбор параметра фильтрации R остаётся фактически не обоснованным.

РЕГУЛЯРИЗАЦИЯ

Перепишем выражение (4) в виде уравнения:

$$A\mu = \lambda. \quad (11)$$

Обозначим через M и Λ множества, элементами которых являются функции μ и λ , при этом

$$\mu \in M, \lambda \in \Lambda. \quad (12)$$

Определим расстояние на этих множествах $\rho_M(\mu_1, \mu_2)$ и $\rho_{\Lambda}(\lambda_1, \lambda_2)$.

Пусть значение функции λ известно с некоторой погрешностью δ_{λ} , что записывается в виде

$$\rho_{\Lambda}(\lambda_{\delta}, \lambda_e) \leq \delta_{\Lambda}, \quad (13)$$

где λ_{δ} – приближенное, а λ_e – точное значение функции λ . Введем обозначение

$$\rho_M(\mu_{\delta}, \mu_e) \leq \delta_M, \quad (14)$$

где μ_{δ} – приближенное, а μ_e – точное решение уравнения, то есть μ_e удовлетворяет уравнению:

$$A\mu_e = \lambda_e. \quad (15)$$

Как известно [1-3], регуляризацией называют способ построения устойчивого (регуляризованного) приближенного решения уравнения (11). Указанное решение должно удовлетворять принципу регуляризации

$$\lim_{\delta_{\lambda} \rightarrow 0} \delta_M = 0. \quad (16)$$

При построении регуляризованного решения в рассмотрение вводится величина α , именуемая параметром регуляризации. Смысл введения параметра регуляризации состоит в том, чтобы с его помощью исказить оператор A в уравнении (11) и для этого искаженного уравнения получить приближенные решения μ_{δ} , зависящее от α и удовлетворяющее условие

$$\rho_{\Lambda}(A\mu_{\delta}, \lambda_{\delta}) = \delta_{\Lambda} \quad (17)$$

Левая часть выражения (17) носит название невязки. Её будем обозначать N . Как это следует из условия (17), уравнение (11) необходимо исказить настолько, чтобы возникшая при этом погрешность стала равной погрешности δ_Λ . Доказано [4], что это обеспечивает выполнение принципа регуляризации.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИДЕИ РЕГУЛЯРИЗАЦИИ В МЕТОДЕ ОБРАТНОГО ПРОЕЦИРОВАНИЯ

Как видно из вышесказанного, в обоих рассмотренных методах наблюдается общая черта. Действительно, когда мы, используя метод обратного проецирования, в (7-8) заменяем бесконечные пределы интегрирования на конечные, то тем самым исключаем из рассмотрения гармоники, для которых выполняется условие

$$r > R, \quad (18)$$

в результате чего функция $\lambda_\phi^*(x')$ оказывается сглаженной. Нечто подобное мы наблюдаем при использовании метода регуляризации. Именно искажая уравнения (11) введением параметра регуляризации получим приближенное решение μ_δ , сглаженное по отношению к точному решению μ_e . Заметим, что процедура сглаживания объединяет оба упомянутых метода.

Это обстоятельство позволяет рассматривать параметр фильтрации R как параметр регуляризации, что в свою очередь даёт возможность использовать равенство (17) для определения R . Выбор параметра R получает своё обоснование. Соответственно, при таком выборе R изображение $\mu(x, y)$ оказывается устойчивым (регуляризованным).

ЧИСЛЕННЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ

Программа численного эксперимента состоит из следующих этапов:

1) выбор математического фантома с известным распределением $\mu(x, y)$. Обозначим эту функции через μ_e , поскольку она будет играть роль точного решения уравнения (4);

2) подставим эту функцию в выражение (4), далее находим функцию $\lambda_\phi(x')$, соответствующую функции μ_e . По логике предыдущих рассуждений в данном случае это есть точное значение функции в правой части уравнения (11), поэтому обозначим его через $\lambda_{e\phi}(x')$;

3) искажаем функцию $\lambda_{e\phi}$, вводя в рассмотрение приближительную функцию $\lambda_{\delta\phi}(x')$, имеющую погрешность δ_Λ , которую рассчитываем по формуле

$$\rho_\Lambda(\lambda_{\delta\phi}(x'), \lambda_{e\phi}(x')) = \delta_\Lambda \quad (18)$$

4) для произвольно выбранного значения R с помощью формул (6, 9, 10) находим соответствующую функцию $\mu(x, y)$ и обозначая её через $\mu_{\delta R}(x, y)$;

5) изменяя величину R , находим оптимальные значения R_m и соответствующую функцию $\mu_{\delta R}(x, y)$, удовлетворяющую условию (17). В соответствии с теорией регуляризации эта функция есть приближенным решением уравнения (11), которое соответствует погрешности δ_Λ ; его обозначаем через μ_δ ;

6) пользуясь формулой (14), рассчитываем погрешность δ_M .

Нами был выбран фантом Шепа-Логана, который традиционно используется в компьютерной томографии для проверки эффективности методов реконструкции [8] и приблизительно моделирует срез человеческого мозга (Рис. 1).



Рис. 1. Фантом Шепа-Логана.

При расчете расстояния в множествах M и Λ считалось, что они являются элементами гильбертового метрического пространства. Далее исследовался интервал погрешности $\Delta \in [0; 0.1]$.

Процедура нахождения оптимального значения R_m параметра обрезки проиллюстрирована на Рис. 2, где представлена зависимость $N(r)$. Согласно этому графику для данной погрешности $R_m = 0,26$.

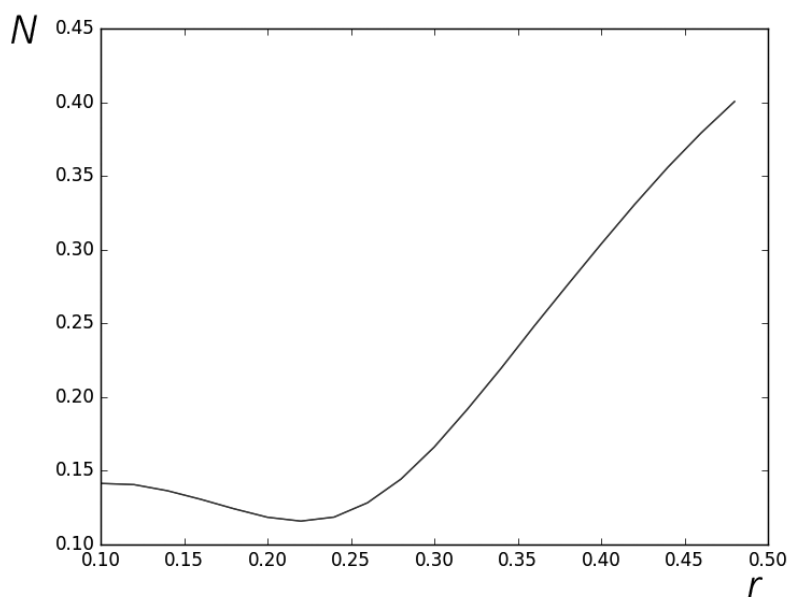


Рис. 2. Зависимость невязки N от радиуса фильтрации r .

Изображения фантома, полученные с помощью предлагаемого способа для различных значений погрешности δ_Λ , приведены на Рис. 3.

На Рис. 4 приведены зависимости погрешности изображения δ_M от погрешности эксперимента δ_Λ . Как видно погрешность δ_M уменьшается с уменьшением δ_Λ , что позволяет сделать вывод о том, что принцип регуляризации в данном случае выполняется. Другими словами изображения, полученные предлагаемым способом, устойчивы.

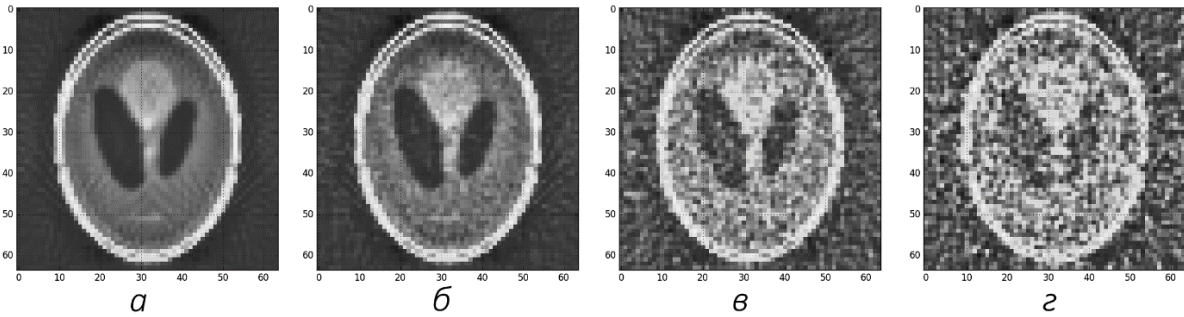


Рис. 3. Результаты реконструкции при значениях погрешности $\delta_\lambda = 0$ (а), $\delta_\lambda = 0.01$ (б), $\delta_\lambda = 0.03$ (в), $\delta_\lambda = 0.05$ (г)

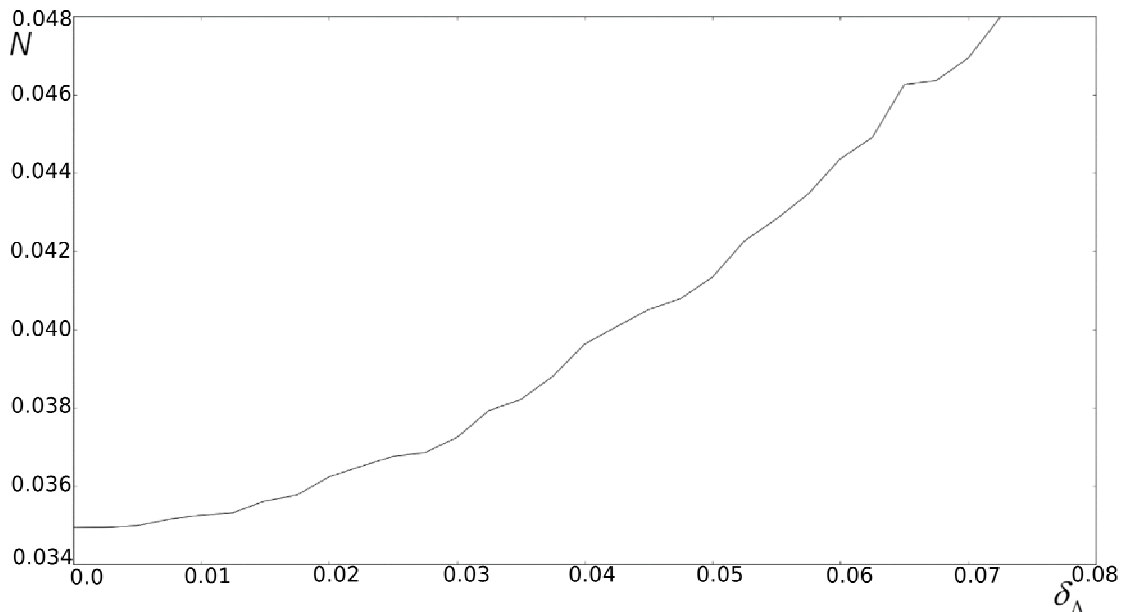


Рис. 4. Зависимость невязки N от погрешности эксперимента δ_λ .

ВЫВОДЫ

Метод обратного проецирования в современной компьютерной томографии достаточно распространён, и в научной литературе практически отсутствуют принципиальные критические замечания в его адрес. А причины для таких замечаний существуют. Главная из них, по нашему мнению, состоит в том, что в указанном методе никак не используется теория некорректных задач, несмотря на то, что сама задача реконструкции является некорректной. Поэтому изображения, получаемые с помощью указанного метода, является неустойчивым. То обстоятельство, что до настоящего времени эта неустойчивость не проявила себя в виде сильной «зашумленности» изображений, можно объяснить лишь тем, что погрешность математической реконструкции сопоставима с погрешностью современных приборов для рентгеновских исследований. Повышение точности упомянутых приборов при сохранении существующего математического аппарата реконструкции с неизбежностью повлечет за собой значительные ухудшения качества реконструированных изображений.

Как показано в данной статье, имеется возможность не отказываться полностью от метода обратного проецирования со всеми его положительными сторонами, а модифицировать этот метод, дополнив его подходами, используемыми в теории некорректных задач. Такой подход должен обеспечить устойчивость реконструируемого изображения. Это может быть, например, отождествление параметра фильтрации с параметром регуляризации, что легло в основу предлагаемого в данной статье способа реконструкции изображений. Возможно существование и других путей использования теории некорректных задач в методе обратного проецирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tikhonov A. N., Arsenin V. *Solution of Ill-posed Problems*. Washington, D.C. : V.H. Winston ; New York [etc.] : Wiley, 1977. 272 p.
2. Лаврентьев М., Романов В., Шишатский С. *Некорректные задачи математической физики и анализа*. Москва: Наука, 1980. 288 с.
3. Гласко В. *Обратные задачи математической физики*. Москва: МГУ, 1984. 127 с.
4. Булавін Л.А., Забашта Ю.Ф., Мотолига О.В., Сенчуров С.П. Аналіз стійкості методів томографічної реконструкції рентгенівських медичних зображень // *Біофізичний вісник*. 2017. Т. 37, № 1. С. 9-15.
5. Buzug T. M. *Computed tomography: from photon statistics to modern cone-beam CT*. Berlin : Springer, 2008. 522 p.
6. Herman G. T. *Fundamentals of computerized tomography: image reconstruction from projection*. 2nd edition. London: Springer, 2009. 300 p.
7. Stanley D. *The Radon Transform and Some of Its Applications*. New York: Wiley, 1983. 304 p.
8. Shepp L., Logan B. The Fourier Reconstruction of a Head Section // *IEEE Transactions on Nuclear Science*. 1974. 21 (3). P. 21-43.

REFERENCES

1. Tichonov, A. N., Arsenin, V. J. (1977). *Solutions of ill-posed problems*. Washington, D.C. : V.H. Winston ; New York [etc.] : Wiley.
2. Lavrentyev, M., Romanov, V., Shishatsky, S. (1980). *Ill-posed problems of mathematical physics and analysis*. Moscow: Nauka. (in Russian)
3. Glasko, V. (1984). *Inverse problems of mathematical physics*. Moscow: Moscow State University. (in Russian)
4. Bulavin, L.A., Zabashta, Y.F., Motolyha, O.V., Senchurov, S.P. (2017). Analysis of stability of tomographic reconstruction of X-ray medical images. *Biophysical Bulletin*. 37(1), 9-15. (in Ukrainian)
5. Buzug, T. M. (2010). *Computed tomography: from photon statistics to modern cone-beam CT*. Berlin ; Heidelberg: Springer.
6. Herman, G. T. (2009). *Fundamentals of computerized tomography: image reconstruction from projection* (2nd ed.). London: Springer.
7. Deans, S. R. (1983). *The Radon Transform and Some of Its Applications*. New York: Wiley.
8. Shepp, L., Logan, B. (1974). The Fourier Reconstruction of a Head Section. *IEEE Transactions on Nuclear Science*. 21(3). doi:10.1109/tns.2010.2085391

УДК 577.128:577.336:681.723.27

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ КАЛЬЦИЕВЫХ СИГНАЛОВ

В. М. Шкрыль*Институт физиологии им. О.О. Богомольца НАН Украины, ул. Богомольца 4, г. Киев, Украина
slava@biph.kiev.ua*

Поступила в редакцию 4 мая 2017 г.

Принята 14 сентября 2017 г.

Актуальность. Исследование быстрых процессов, протекающих в живых клетках, например, динамики ионов кальция или других ионов, является актуальным для современной биофизики, физиологии и медицины и может быть выполнено при помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Конфокальная микроскопия как метод исследования биологических объектов имеет ряд особенностей, требующих понимания тонких механизмов, лежащих в ее основе.

Цель работы. Описание принципов и деталей проведения исследований кальциевых сигналов в живой клетке при использовании лазерной сканирующей конфокальной микроскопии с использованием флуоресцентных индикаторов было целью работы.

Материалы и методы. В работе проведен анализ методических и практических аспектов исследований кальциевых сигналов методом конфокальной микроскопии.

Результаты. Конфокальная микроскопия позволяет исследовать изменения концентрации свободного кальция внутри клетки и даже малой ее части с использованием флуоресцентного красителя, что повышает контраст по сравнению с обычной флуоресцентной микроскопией за счет дополнительной конфокальной апертуры, расположенной перед детектором, а также использования лазерного источника освещения и сканирования объекта. Для регистрации кальциевых сигналов необходимо произвести выбор адекватных параметров, таких как: частота регистрации, размер единичного элемента сканирования (пикселя), чувствительность детектора, величины интенсивности облучения лазером, диаметра конфокальной щели, соответствующих фильтров для возбуждения и излучения используемого флуоресцентного красителя и соответствующего дихроичного зеркала. Важным этапом настройки конфокальной системы является определение величины функции рассеяния точки. Компенсация процесса выгорания красителя и уменьшения фототоксичности, минимизация процесса рассеяния изображения позволяют повысить воспроизводимость экспериментов.

Выводы. При использовании современных лазерных сканирующих конфокальных микроскопов для регистрации кальциевых сигналов от малой группы каналов (например риаудиновых рецепторов) или части клетки необходимо тщательно выбирать параметры аппаратной настройки, которые обусловлены природой объекта исследования и особенностями условий эксперимента. Это позволит получить достоверную информацию о функционировании как отдельных каналов, так и о механизмах Ca^{2+} -сигнализации целой клетки или ее части.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Ca^{2+} ; флуоресцентный метод; флуоресцентный краситель; конфокальная микроскопия.

BASIC PRINCIPLES OF CONFOCAL MICROSCOPY OF CALCIUM SIGNALS

V. M. Shkryl*Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, 4 Bogomoletz Str., Kyiv, Ukraine*

Background: The study of fast processes occurring in living cells, for example, the dynamics of calcium ions or other ions, is actual for modern biophysics, physiology and medicine and can be carried out by laser scanning confocal microscopy. Confocal microscopy as a method of studying biological objects has a number of features requiring an understanding of the delicate mechanisms underlying it.

Objectives: The aim of the work is the description of principles and details of measurements of calcium signals in the living cells using laser scanning confocal microscopy and fluorescent indicators.

Materials and methods: The analysis of the methodological and practical aspects of studies of calcium signals was carried out by confocal microscopy in the work.

Results: Confocal microscopy allows to study the changes in the concentration of free calcium within the cell and even a small part of it by a fluorescent dye, which increases the contrast in comparison with

conventional fluorescence microscopy through an additional confocal aperture located in the front of the detector and the use of laser light source and scanning the object. To register calcium signals it is necessary to make a selection of a number of adequate parameters: the registration frequency, the size of a single scanning element (pixel), the sensitivity of the detector, the intensity of laser irradiation, the diameter of the confocal gap, the corresponding filters for exciting and emitting the fluorescent dye used and the corresponding dichroic mirror. An important stage of a setup of a confocal system is the determination of the value of the scattering function of a point. Compensation of the process of bleaching of the fluorescence dye and reduction of phototoxicity, minimization of the scattering process of the image allow to increase a reproducibility of the experiments.

Conclusions: Using modern laser scanning confocal microscopes for registration of calcium signals from a small group of channels (for example, ryanodine receptors) or the cell part, it is necessary to carefully select the parameters of the hardware setup, which are determined by the nature of the object of study and the peculiarities of the experimental conditions. This will allow to receive the reliable information about the functioning of both individual channels and the mechanisms of Ca^{2+} signaling of the whole cell or its part.

KEY WORDS: Ca^{2+} ; fluorescent method; fluorescent dye; confocal microscopy.

ОСНОВНІ ПРИНЦИПИ КОНФОКАЛЬНОЇ МІКРОСКОПІЇ КАЛЬЦІЄВИХ СИГНАЛІВ

В. М. Шкриль

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, вул. Богомольця 4, м. Київ, Україна

Актуальність. Дослідження швидких процесів, що протікають в живих клітинах, наприклад, динаміки іонів кальцію або інших іонів, є актуальним для сучасної біофізики, фізіології та медицини і може бути виконано за допомогою лазерної скануючої конфокальної мікроскопії. Конфокальна мікроскопія як метод дослідження біологічних об'єктів має ряд особливостей, які потребують розуміння тонких механізмів, що лежать в її основі.

Мета роботи. Опис принципів і деталей проведення досліджень кальцієвих сигналів в живій клітині при використанні лазерної скануючої конфокальної мікроскопії з використанням флуоресцентних барвників було метою роботи.

Матеріали та методи. В роботі проведено аналіз методичних і практичних аспектів досліджень кальцієвих сигналів методом конфокальної мікроскопії.

Результати. Конфокальна мікроскопія дозволяє проводити дослідження змін концентрації вільного кальцію усередині клітини і навіть малої її частини з використанням флуоресцентного барвника, що збільшує контраст у порівнянні зі звичайною флуоресцентною мікроскопією за рахунок додаткової конфокальної апертури, розташованої перед детектором, а також використання лазерного джерела освітлення та сканування об'єкта. Для реєстрації кальцієвих сигналів необхідно провести вибір адекватних параметрів, таких як: частота реєстрації, розмір одиничного елемента сканування (пікселя), чутливість детектора, величини інтенсивності опромінення лазером, діаметр конфокальної щілини, відповідних фільтрів для збудження і випромінювання використовуваного флуоресцентного барвника та відповідного діхроїчного дзеркала. Важливими етапами налаштування конфокальної системи є визначення величини функції розсіювання точки. Компенсація процесу вигорання барвника й зменшення фототоксичності, мінімізація процесу розсіювання зображення дозволяють підвищити відтворюваність експериментів.

Висновки. При використанні сучасних лазерних скануючих конфокальних мікроскопів для реєстрації кальцієвих сигналів від малої групи каналів (наприклад ріанодінових рецепторів), або частини клітини необхідно ретельно обирати параметри апаратного налаштування, які обумовлені природою об'єкта дослідження й особливостями умов експерименту. Це дозволить отримати достовірну інформацію про функціонування як окремих каналів, так і про механізми Ca^{2+} -сигналізації цілої клітини або її частини.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: Ca^{2+} ; флуоресцентний метод; флуоресцентний барвник; конфокальна мікроскопія.

Ионы кальция играют важную роль в различных клеточных процессах. Визуализация Ca^{2+} сигналов позволяет исследовать временные и пространственные характеристики таких сигналов в клетках и тканях. Изучение кальциевой сигнализации имеет важное значение для понимания многих Ca^{2+} зависимых процессов протекающих в клетке, связанных с секрецией, сокращением, клеточной возбудимостью, экспрессией генов, синаптической передачей. Использование кальциевых флуоресцентных

индикаторов с применением метода визуализации, таким как конфокальная микроскопия, позволяет наблюдать клеточные Ca^{2+} сигналы с высокой степенью пространственного и временного разрешений, что было подробно рассмотрено ранее [1-3]. Широкое применение нашла именно конфокальная сканирующая микроскопия, которая широко используется для исследования как глобальных так и локальных кальциевых транзиентов. В этом методическом мини обзоре описаны важные аспекты проведения экспериментов по изучению кальциевых сигналов в клетке с использованием конфокальной микроскопии.

Общий принцип микроскопии

Микроскопия - это процесс получения на детекторе или окуляре микроскопа увеличенного изображения исследуемого объекта. Флуоресцентная микроскопия позволяет получать изображение от возбужденных, флуоресцирующих молекул объекта посредством кратковременного поглощения кванта света флуорофором с последующей быстрой эмиссией другого кванта света на другой длине волны. Возбуждение, поглощение и эмиссию фотонов света флуорофором хорошо описал Александр Яблонский в 1933 году посредством энергетических диаграмм [4]. В таких диаграммах состояние флуорофора на верхних энергетических уровнях соответствует его возбужденному состоянию со способностью испускать фотон. На нижних уровнях флуорофор находится в невозбужденном состоянии и не способен испускать фотон. При комнатной температуре большинство флуорофоров находятся на нижних энергетических уровнях и не способны испускать фотоны. Но при достаточном возбуждении, когда флуорофор накопил некоторое количество фотонов, он может переходить на более высокий уровень, когда уже возможно излучение фотонов. Абсорбция фотонов происходит за фемтосекунды, а их испускание возможно уже в пикосекундном интервале [5].

Для исследования живой клетки используются множество флуоресцентных красителей, способных при достаточном возбуждении изменять флуоресценцию, например при изменении концентрации определенного иона, который связывается этим красителем. При этом флуорофор избирательно чувствителен только к определенному иону и не изменяет своих свойств при наличии других ионов или имеет к ним низкую чувствительность (аффинность). Такая высокая аффинность к определенному иону позволяет использовать флуоресцентную микроскопию и флуоресцентный краситель для исследования изменения концентрации иона в присутствии других ионов. Большая разновидность флуоресцентных красителей позволяет исследовать различные клеточные процессы, такие как изменение концентрации ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , H^+ , АТФ и другие [6].

Предпочтительным подходом во флуоресцентной микроскопии является эпи-освещение. При таком освещении световой поток, отраженный от исследуемого объекта, собирается на детекторе. При этом объектив используется как для освещения, так и для получения изображения. Данный тип освещения позволяет исследовать образцы, которые не являются полупрозрачными или прозрачными, и которые могут быть отображены только с помощью эпи-освещения. Важным компонентом эпи-освещения является дихроичное зеркало (или дихроматический разделитель лучей), которое используется для отражения падающего, возбуждающего света в направлении образца, но является прозрачным для флуоресцентного излучения от возбужденного объекта и позволяет проходить ему на детектор. Таким образом, возбуждающий свет фокусируется линзой объектива на объект, а флуоресценция от изучаемого объекта тем же объективом микроскопа направляется на детектор. Выбор дихроичного зеркала

необходимо осуществлять в соответствии с используемым флуоресцентным красителем.

При конфокальной микроскопии ход светового потока практически повторяется как при обычной эпифлуоресцентной микроскопии. Однако конфокальная микроскопия позволяет получать более контрастные изображения по сравнению с обычным методом. Это достигается за счет трех дополнительных особенностей. Первым новым элементом является апертура (или диафрагма, или конфокальная щель; pinhole), которая устанавливается непосредственно перед детектором (что представлено на рис. 1) и убирает большую часть рассеянного света от исследуемого объекта. Второй отличительной особенностью является использование точечного источника освещения.

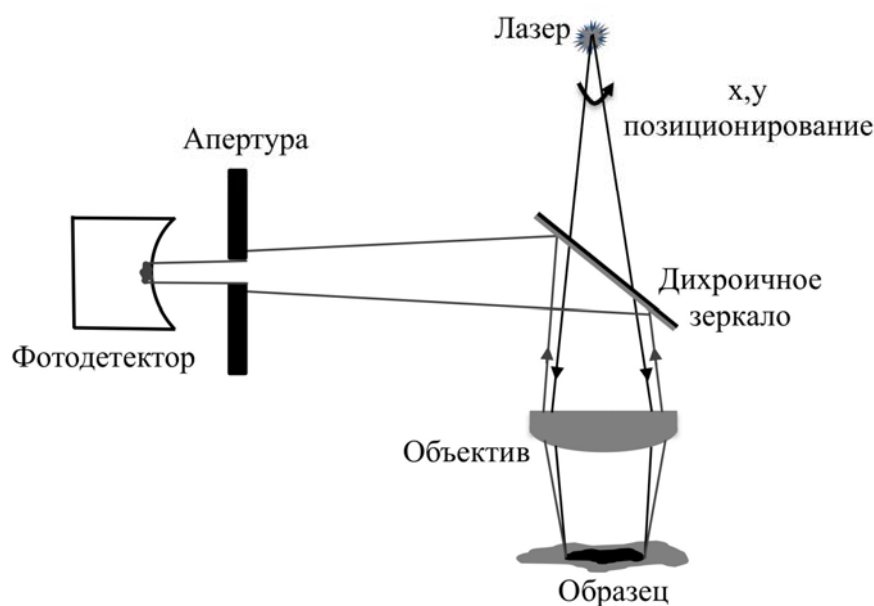


Рис. 1. Принципиальная схема конфокальной микроскопии (с модификацией [7]).

Точечным источником света для конфокальной микроскопии является лазер с длиной волны, соответствующей возбуждению молекул красителя. Преимущество лазеров по сравнению с ртутными или ксеноновыми лампами заключается в монохроматичности и высокой параллельности испускаемого пучка света. Также, лазер освещает на образце не все поле зрения, как при помощи ламп, а фокусируется в точку. Поэтому регистрируемая флуоресценция отображает оптический сигнал только от этой точки объекта. Для получения более детальной информации по всей площади или объему объекта необходимо производить сканирование — перемещение точечного освещения посредством системы позиционирования, с последующей визуализацией в одно-, двух- или трехмерное пространство (что будет оговорено ниже). Процесс сканирования является третьей особенностью конфокальной микроскопии.

Важно отметить, что подразумевается под конфокальностью. Так, фокальная плоскость — это плоскость, в которую фокусируется исследуемый объект, находящийся в фокусе объектива. Конфокальная плоскость — это часть фокальной плоскости, ограниченная апертурой, расположенной перед детектором. Другими словами, это часть информации, которая ограничена апертурой, сфокусированная на объекте, которая попадает на детектор.

Таким образом, лазерная конфокальная микроскопия позволяет убрать большую часть рассеянного сигнала вне фокуса. Такой свет, исходящий от препарата сверху или

снизу от фокальной плоскости, обрезается апертурой малого размера возле детектора, что позволяет улучшить контраст получаемого изображения и убрать рассеяние света. Такая дополнительная апертура позволяет регистрировать только конфокальную часть сигнала, что улучшает аксиальное (z) разрешение микроскопа.

Поток фотонов, излучаемый исследуемым объектом, регистрируется электронным детектором и преобразуется в полученное изображение, которое представляет собой массив данных, в который записывается этот сигнал за время сканирования.

Лазерный луч фокусируется в точку, размеры которой ограничены разрешающей способностью микроскопа, возбуждая при этом только малую область исследуемого объекта. Важно знать и помнить, что при обычном одноволновом возбуждении луч лазера может проникать в исследуемый объект на глубину не более 100 мкм (при 400–600 нм), что является пределом для лазерной конфокальной микроскопии при однофотонном возбуждении. С повышением длины волны возбуждения свет проникает глубже, так как уменьшается его рассеивание. Для еще более глубокого проникновения в исследуемый объект необходимо использовать так называемое двухфотонное возбуждение, когда возбуждение флуорофора происходит за счет двух фотонов и только в точке фокусировки двух фотонов, которые одновременно передают всю энергию флуоресцирующей молекуле. При этом свет может проникать на глубину до 300 мкм, а повреждение объекта при этом незначительно, что находит свое применение при работе со срезами мозга.

Как отмечалось выше, флуоресцентный краситель поглощает свет и при наличии связанного с ним иона вызывает испускание фотона. При этом эти два процесса можно разделить с помощью светофильтров, оставив только возбужденный свет, испускаемый красителем, который уже и попадает на детектор.

Важными характеристиками флуоресцентного красителя являются их спектры поглощения (абсорбции) и спектр возбуждения (эмиссии) с характерными пиками поглощения и возбуждения. Выбор соответствующих светофильтров осуществляется согласно с этими характеристиками. Например, такой кальциевый индикатор как Fluo максимально возбуждается светом с длиной волны 488 нм и имеет пик испускания на 510 нм. Но свечение красителя можно наблюдать и при меньшей длине волны, но с меньшей интенсивностью. Для того чтобы испускаемый флуорофором свет не перекрывался с поглощенным, флуоресцентный сигнал обрезается соответствующим фильтром на пути к детектору и регистрируется начиная с 510 нм.

Важной характеристикой флуорофора, используемого в качестве ионного индикатора, является его константа диссоциации (K_d) к чувствительному иону, например к кальцию. Используя значение K_d можно рассчитать рабочий диапазон концентраций чувствительности красителя к иону, что составляет от $0,1 K_d$ до $10 K_d$. Также величина константы диссоциации важна для вычисления свободной концентрации кальция из величины интенсивности флуоресценции [8].

Кальциевые флуоресцентные индикаторы, применяемые в конфокальной микроскопии

В работе Тсиен и др. (1980) [9] были впервые получены кальциевые флуоресцентные индикаторы, большинство из которых являются модификацией не флуоресцентных кальциевых хелаторов, таких как EGTA и ВАРТА. Такие кальциевые индикаторы являются в первую очередь буферами кальция, которые при связывании с ионом и при возбуждении светом способны испускать фотоны другой длины волны, отличной от длины волны возбуждения.

Такие кальциевые зонды как Fluo, Calcium Green, Calcium Orange, Rhod широко используются при конфокальной микроскопии, их характеристики представлены в таблице 1. По константе диссоциации красители можно разделить на высоко- и низкоаффинные. Так, например, краситель Fluo был синтезирован с разными значениями K_d . Fluo-4 имеет K_d равное 0,35 мкМ, Fluo-5F – 2,3 мкМ, Fluo-4FF – 9,7 мкМ, а Fluo-5N - 90 мкМ, что позволяет использовать соответствующий краситель в широком диапазоне исследуемых концентраций кальция. А если использовать одновременно два таких красителя, то можно существенно расширить диапазон чувствительности к кальцию, что было предложено в работе [10].

Также важно отметить, что флуоресцентный краситель существует в двух формах, в виде соли или сложного ацетокси-метил эфира (АМ-форма). Первая, как правило, не может проникать через мембрану клетки и поэтому используется в специфических условиях, когда проницаемость мембран увеличивается искусственно [11]. АМ-форма красителя позволяет ему легко проникать в клетку через неповрежденную мембрану.

Таблица 1

Характеристики кальциевых флуоресцентных индикаторов

Краситель	E_x (нм)	E_m (нм)	K_d (нМ)	ЕС ($\text{см}^{-1} \text{М}^{-1}$)
Calcium Green-1	506	530	190	81000
Calcium Orange	549	575	185	80000
Fluo-4	491	520	390	82000
Fura-2	340/380	510	140	28000
Rhod-2	549	581	570	81000

Примечание: E_x – длина волны возбуждения, поглощения красителя; E_m – длина волны испускания, свечения красителя; ЕС – коэффициент экстинкции

Рассчитать концентрацию красителя можно используя массу красителя и его молярный вес (например: 50 мкг Fluo-4, АМ поделенное на 1097 г/моль и на 1 мл объема раствора с красителем, что равняется 4,6 мкМ). Более точно концентрацию красителя можно определить используют спектрофотометр. Тогда концентрация красителя может быть рассчитана как отношение полученного значения на спектрофотометре к коэффициенту экстинкции (коэффициент ослабления света при распространении в среде за счет процессов поглощения и рассеяния), поделенное на толщину кюветы. При этом необходимо задать соответствующую длину абсорбции (обычно для этих красителей 350 нм) и толщину кюветы (обычно 1 см). Данная операция часто используется для флуоресцентного красителя в форме соли, так как для АМ-формы достаточно расчета по простой формуле с использованием массы и молекулярного веса.

Также возможно использовать два красителя одновременно, когда не происходит перекрывания спектров испускания и поглощения выбранных красителей. Так возможно использовать такие индикаторы как Fluo-4 и Mag-rhod-2, с возбуждением на 491 / 556 нм, и испусканием на 506/579 нм соответственно, что более детально описано в работе [12].

Используемые аргоновые или аргон-криптоновые лазеры (или более современные диодные лазеры, называемые полупроводниковыми лазерами) для возбуждения в конфокальных системах хорошо подходят для возбуждения этих красителей на 488, 512 и 568 нм.

Так как флуоресцентный краситель является также кальций-связывающим буфером, необходимо использовать такую его концентрацию, при которой не

происходило бы значительного изменения буферной емкости клетки и кальциевого гомеостаза. На практике концентрация индикатора не должна превышать 100 мкМ. При использовании концентрации свыше 200 мкМ происходит не только нарушение гомеостаза клетки, но и ее функции, например, наблюдается отсутствие сокращения мышечной клетки при достаточном возбуждении. Необходимо выбирать минимальную концентрацию красителя, которая была бы достаточной для достоверной регистрации полезного сигнала, и, следовательно, определения концентрации исследуемого иона.

Получение изображения флуоресцентного объекта с конфокальной плоскости исследуемого объекта при сканировании кальциевого сигнала

Вход кальция через кальциевые каналы плазматической мембраны или высвобождение из внутриклеточного Ca^{2+} депо может быть визуализировано с помощью быстрой конфокальной микроскопии [13]. Для проведения таких исследований необходимо точно выбрать режим регистрации. Опишем эти режимы.

Существует несколько режимов сканирования флуоресцентного сигнала при конфокальной микроскопии. Одним из наиболее распространенных является построчное или $x-t$ режим. В $x-t$ режиме изображение получается посредством сканирования объекта, то есть перемещением сканирующего луча в направлении x или y вдоль одной строки, и последующего повторения сканирования той же строки во времени. Обычно каждую точку строки регистрируют посредством трубки фотоумножителя (РМТ), регистрируя все фотоны, которые попали в фотоумножитель. При этом регистрируется информация о координате и величине сигнала этой точки. В результате получается массив данных, как двумерная матрица значений точек линии во времени, где временные строки обозначаются как $x-t$ или $y-t$. Это позволяет полностью визуализировать и записать конфокальное изображение в фокусируемой плоскости. Посредством соединения отсканированных изображений в плоскости $x-y$ можно получить двумерное изображение флуоресцирующего объекта. В этом случае изображение получается последовательным, поточечным перемещением возбуждения в одной строке (в координате x) и с последующим шагом в координате y и сканирования в других строках. При данном сканировании информация также сохраняется в виде двумерной матрицы. А если повторять эту процедуру во времени, то можно регистрировать изменения целого двумерного изображения. Данное сканирование называется $x-y-t$. Информация записывается при этом как трехмерная матрица данных, или же, как четырехмерный массив данных, с учетом амплитуды сигнала.

Таким образом, чтобы получить информацию об исследуемом объекте, необходимо производить сканирование объекта посредством последовательного перемещения лазерного возбуждающего луча через объект. Поэтому данная микроскопия получила название сканирующей. Однако нужно помнить, что полученное изображение является неким искажением исследуемого объекта, так как оно “размыто” в плоскости сканирования и растянуто в аксиальном направлении (что будет более детально описано ниже).

При использовании некоторых конфокальных систем, таких как LSM 5-LIVE или 7-LIVE (Zeiss, Germany), возбуждение происходит непосредственно сразу в целой строке (Achromatic Beam Splitter), что позволяет получать изображение целой линии без поточечного перемещения лазера. Такой тип возбуждения позволяет уменьшить время сканирования строки и получать временное разрешение до 16 мкс. Данный метод позволяет получать двумерные изображения до 1000 изображений в секунду [13].

Преимуществами конфокальной флуоресцентной микроскопии по сравнению с обычным эпифлуоресцентным освещением являются небольшие размеры ($\sim 300 \text{ нм} \times$

300 нм × 800 нм) облученного объекта в трехмерном пространстве (т.е. вокселя), низкий уровень шума детектора и быстрое время регистрации.

Режим $x-t$ может быть использован для сканирования как локального, миниатюрного, так и глобального кальциевого сигнала. При регистрации Ca^{2+} сигналов, как кальциевые вспышки (Ca^{2+} spark; [14]), в режиме $x-t$, было установлено, что параметры Ca^{2+} вспышек (амплитуда, пространственные и временные характеристики) регистрируются с ошибкой. Такая ошибка обусловлена невозможностью определения положения сканирующей линии по отношению к кластеру риадиноновых рецепторов (где наблюдается Ca^{2+} вспышка, [15]). При использовании режима $x-y-t$ Ca^{2+} вспышки регистрируются уже в двухмерной области и ошибка практически устраняется, а неопределенность остается только в аксиальном направлении (z). Для полного устранения этой неопределенности необходимо производить быструю регистрацию Ca^{2+} сигнала в трех плоскостях. Для этого сканирование производится сначала в верхнем слое области $x-y$ с последовательным перемещением в нижние слои (z_1, z_2, \dots, z_n) и последовательным возвращением в верхний. После чего все повторяется во времени. Технически это реализуется за счет быстрого изменения положения фокусировки в аксиальном направлении со скоростью до 100 Гц, за счет пьезокристалла. Такой режим, $x-y-z-t$, позволяет регистрировать параметры кальциевой вспышки, что было показано в работе [16].

Интересно, что визуализация одного и того же сигнала в разных режимах будет иметь разный вид. Процесс регистрации Ca^{2+} сигнала, который распространяется из периферии клетки в центр, будет иметь разный вид в режимах $x-t$ и $y-t$. Так например, если расположить линию сканирования вдоль кардиомиоцита предсердия, то регистрируемый Ca^{2+} сигнал в режиме $x-t$ (линия расположена перпендикулярно большей стороне миоцита) имеет вид дуги и отличается от Ca^{2+} сигнала, зарегистрированного в режиме $y-t$ (когда линия выбирается параллельно большей стороне миоцита), где сигнал однородный. При регистрации в режиме $x-y-t$ мы имеем более полную информацию об изменении кальция. Так, например, Ca^{2+} сигнал в миоците предсердия (в режиме $x-y-t$) появляется сначала в отдельных местах на периферии клетки, с постепенным увеличением кальция сначала у мембраны клетки, но и последующим распространением во внутрь клетки, во все области миоцита (более детально смотри [13, 17]). Из массива данных, полученных в режиме $x-y-t$, можно выделить часть информации, соответствующей режиму $x-t$, просто зафиксировав линию с выбранной координатой y . Необходимо помнить, что для устранения неопределенностей, выбор линии сканирования должен осуществляться с учетом особенностей морфологии и физиологии клетки.

Ограничения флуоресценции

Важно помнить, что с увеличением интенсивности возбуждения может происходить насыщение энергетического состояния флуоресцентной молекулы, что приводит к нечувствительности такой молекулы к дополнительному возбуждению. Повышение возбуждения флуоресцентной молекулы может и не приводить к абсорбции фотонов красителем. Также, флуоресцентная молекула может возбуждаться не бесконечное количество раз, после чего она становится неактивной (этот процесс напрямую зависит от присутствия кислорода и ускоряется с увеличением его концентрации). Эффект понижения интенсивности излучения красителя называется процессом выгорания красителя, который необходимо учитывать. Чтобы уменьшить процесс выгорания красителя необходимо уменьшать интенсивность облучения до

уровня обеспечения достаточного сигнала на детекторе, при условии его достоверного разграничения с уровнем шума.

Процесс выгорания красителя необходимо минимизировать, а если это невозможно – то произвести компенсацию. Для этого есть несколько подходов. Проводится контрольный эксперимент, цель которого – выяснить, насколько происходит процесс выгорания Ca^{2+} красителя. Полученные результаты можно использовать для компенсации данного процесса в последующих экспериментах. Следующим вариантом компенсации является подход, когда выбирается участок флуоресцентного сигнала, который находится вне исследуемой клетки. С этого выбранного участка регистрируют необходимый сигнал. Полученную функцию выгорания красителя можно использовать для компенсации процесса выгорания красителя непосредственно на исследуемой клетке.

Теорема Найквиста

Как известно в теории коммуникации согласно теореме Найквиста оцифровка сигнала волнового вида должна осуществляться с удвоением числа минимальных интервалов по сравнению с максимальной частотой исследуемой волны. Данная теорема должна применяться и в конфокальной микроскопии, чтобы не потерять информацию при сканировании. Этот принцип применяется не только к временной, но и к пространственной составляющей. Таким образом, определяется нужный интервал сканирования и размер пикселя (т.е. минимального элемента сканирования) изображения. Минимально-допустимые временные и пространственные интервалы должны быть определены с учетом разрешения микроскопа. Таким образом, размер пикселя должен быть равен половине разрешающей способности микроскопа.

Минимальный допустимый размер пикселя можно определить по формуле: $d = 0.25 \frac{\lambda}{N.A.}$, где λ – длина волны возбуждения, $N.A.$ – числовая апертура объектива.

Получение изображений с большим размером пикселя называется субдискретизацией, при этом часть тонких структур будет утеряна. Иногда это допустимо – при необходимости получить более широкую область исследуемого объекта. Когда же изображение получается с более сильной дискретизацией, намного меньше d , то произойдет также искажение получаемого изображения. С другой стороны, чем меньше выбранный размер пикселя, тем меньшее количество фотонов может быть зарегистрировано за единицу времени, и тем сложнее выделить полезный сигнал из уровня шума. В таких случаях необходимо увеличить время сканирования каждой временной точки или же размер пикселя, хотя и с потерей некоторой пространственной информации.

Выбор более медленной скорости сканирования приводит к искажению кальциевого сигнала. При регистрации быстрых процессов, таких как Ca^{2+} вспышки, необходимо выбрать скорость сканирования не меньше 500 Гц. Для регистрации глобального Ca^{2+} транзientа достаточно использовать регистрацию в 100 Гц. При более медленном сканировании как амплитуда так и временные параметры кальциевого сигнала будут искажены.

Разрешающая способность и конфокальность

Запишем формулы, с помощью которых можно рассчитать разрешающие характеристики конфокальной микроскопии. Последние могут быть рассчитаны следующим образом: $x, y = 0.5 \frac{\lambda}{N.A.}$ и $z = \frac{0.9 \cdot \lambda}{\sqrt{n^2 + N.A.^2} - n}$ [18] где λ – длина волны

возбуждения [нм]; n – отражающий индекс ($n = 1$ для воздуха; 1,5 для иммерсионного масла и, также, стекла); $N.A.$ – числовая апертура объектива, равная половине угла обзора объектива, $N.A. = n \cdot \sin \alpha$.

Рассчитаем эти величины при 488 нм для двух объективов: 40x/0,75 воздушный и 40x/1,4 масляно-иммерсионный, тогда величина z составит 1,76 и 0,8 мкм, соответственно. А разрешающая способность для x и y составит 0,33 и 0,17 мкм, соответственно. Как здесь видно, при одинаковой кратности увеличения этих двух объективов их разрешающие способности различаются существенно. Подбор нужного объектива является важным этапом подготовки к исследованиям.

При прохождении света через конфокальную щель наблюдается дифракция с характерным узором, имеющем яркую область по центру, известную как диск Эйри. Диаметр такой яркой области является важной характеристикой и обозначается как 1

AU. Величина 1 AU определяется по формуле: $1.2 \frac{\sqrt{\lambda_{ex} \cdot \lambda_{em}}}{N.A.}$, где λ_{ex} длина волны возбуждения, а λ_{em} – длина волны излучения красителя.

Размер конфокальной щели также влияет на разрешающую способность конфокального микроскопа (преимущественно в аксиальном направлении). С размером щели больше диаметра 1 AU происходит ухудшение разрешающей способности. Оптимальное разрешение наблюдается при величине диафрагмы в 0,25 AU. Хотя, чем меньше размер диафрагмы, тем меньше будет величина сигнала, что приведет к затруднению его регистрации детектором.

Контрастность получаемого изображения можно выразить через величину толщины оптического среза. Данная величина является удобной для оценки качества конфокальной микроскопии. Толщину оптического среза, как ширину сигнала при половинной амплитуде сигнала, можно вычислить по формуле:

$$d = \sqrt{2 \cdot \left(\frac{n \cdot h}{N.A.} \right)^2 + z^2}$$

где h – диаметр конфокальной щели.

Как видно из этого выражения, оптическая толщина среза, а поэтому и контраст, будут ухудшаться с увеличением диаметра конфокальной щели. Также видно, что эта величина зависит от величины z – разрешения в аксиальном направлении. Чем больше величина d , тем больше будет уровень сигнала, но хуже контраст изображения.

При полной открытой конфокальной щели появляется возможность использовать конфокальный микроскоп как обычный флуоресцентный, но с возможностью пошагового сканирования и использования лазера как точечного источника света для освещения. Данная конфигурация позволяет собрать весь свет в аксиальном направлении в условиях слабого контраста, что часто применяется, например, на культуре клеток, когда их толщина не превышает 10-20 мкм. При этом возможно фокусирование на нижнюю поверхность клетки или даже на покровное стекло, что обеспечит повышенный контраст по сравнению с фокусированием на среднюю часть клетки (данный принцип может быть применен и в обычной эпифлуоресцентной микроскопии).

На качество исследования влияет не только размер выбранного пикселя, но и размер апертуры перед детектором. Все эти параметры играют ключевую роль в получении контрастного, четкого изображения и должны быть точно определены при исследовании объектов с размерами, близкими к разрешающим способностям конфокального микроскопа, таких как отдельные структурные элементы клетки, например митохондрии, аксоны или дендриты нейронов.

Для регистрации Ca^{2+} вспышек необходимо использовать иммерсионный объектив с числовой апертурой не хуже 1,2. При этом размер пикселя выбирается не меньше 100 мкм, но не более 300 мкм в зависимости от используемого объектива.

Определение функции рассеяния точки при флуоресцентной микроскопии

Величину разрешающей способности флуоресцентного микроскопа можно получить не только арифметически, используя описанные выше формулы, но и экспериментально, посредством определения функции рассеяния точки (ФРТ). Способ ее получения был описан Агардом с соавторами (1989) [19]. Для этого используются флуоресцентные, симметричные частицы с размером меньше величины разрешающей способности (обычно диаметром 0,1 мкм). Для уменьшения неточности применяются все те настройки (скорость сканирования, коэффициент оптического увеличения, диаметр конфокальной щели), которые будут использоваться и в дальнейших экспериментах. Важно также, чтобы эти флуоресцентные частицы были обездвижены, обычно 4 % раствором агарного геля. Такой раствор практически соответствует экспериментальным условиям, например регистрациям в срезах ткани. ФРТ получается экспериментально посредством нескольких сканирований x - y оптических слоев в аксиальном (z) направлении посредством пошагового сдвига на 50-100 нм. Так как оптическое разрешение принято считать при половинной амплитуде сигнала, то в полученном изображении измеряется полная ширина при половинной амплитуде (FWHM) для трех координат, которая и характеризует оптическое разрешение оптической системы. Иногда для описания получаемой информации используется обобщенный (радиальный) размер флуоресцентной частицы ($r = \sqrt{x^2 + y^2}$; [15]). В этом приближении сигнал может быть аппроксимирован как продукт двух функций Гаусса:

$P = G(r) \cdot H(z)$, где $G \approx e^{-\frac{r^2}{2 \cdot \sigma_{xy}^2}}$ и $H \approx e^{-\frac{z^2}{2 \cdot \sigma_z^2}}$, где σ – среднеквадратическое отклонение соответствующей координаты. Также, возможна более сложная трехмерная аппроксимация этими же функциями. После аппроксимации легко определить σ_{xy} , σ_z и ширину кривой при половинной амплитуде, а значит, и разрешение микроскопа.

Устранение размытости изображения (deblurring)

Любая флуоресцентная частица или микрообъект будут иметь нечеткие границы и увеличенные размеры флуоресцентного сигнала из-за рассеивания света. Размытость изображения особенно критична для малых объектов с размерами, близкими к разрешающей способности микроскопа. При этом полученное изображение будет иметь кажущиеся увеличенные размеры и уменьшенную пиковую светимость по сравнению с оригиналом. Размывание изображения уменьшается вплоть до исчезновения с увеличением размера объектов.

Устранение размытости изображения является важным процессом в конфокальной микроскопии. Опишем вкратце общие принципы. Обозначим $F(x,y,z)$ как детектируемую флуоресценцию в пространстве изображения, а $f(x,y,z)$ обозначим как действительную флуоресценцию исследуемого объекта при условии отсутствия рассеивания света. Тогда можно записать:

$$F(x, y, z) = \iiint f(x, y, z) \cdot P(x, y, z) \cdot dx \cdot dy \cdot dz \quad (1)$$

где P является функцией рассеивания, которую для точечного объекта можно записать как трехмерную функцию Гаусса:

$$P = \frac{1}{\sigma_x \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2}{2\sigma_x^2}} \cdot \frac{1}{\sigma_y \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{y^2}{2\sigma_y^2}} \cdot \frac{1}{\sigma_z \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{z^2}{2\sigma_z^2}} \quad (2)$$

В математике существует функция свертки, которая показывает схожесть одной функции по отношению к другой. Результатом этой свертки является операция над двумя функциями, при которой получается третья функция; последняя может рассматриваться как модифицированная версия одной из первоначальных функций.

Уравнение (1) можно переписать посредством теоремы функции свертки как продукт двух функций f и P , каждая из которых трансформируется посредством преобразования Фурье в частотный интервал, тогда:

$$F = f \otimes P + n \quad (3)$$

где n – это шум, регистрируемый в системе; \otimes – оператор свертки.

Для трехмерного пространства можно записать $F(x, y, z) = f(x, y, z) \otimes P + n$. Тогда действительная флуоресценция $f(x, y, z)$ в простом приближении может быть определена как:

$$f(x, y, z) = \frac{F(x, y, z) - n}{P} \quad (4)$$

Данная операция производится в частотном интервале с последующим обратным преобразованием в пространственно-временной интервал [20]. На практике, однако, этот принцип не применяется, так как при делении сильно увеличивается шум, что затрудняет использование полученного результата.

Чтобы получить преобразование с приемлемым шумом, была предложена модификация уравнения (4), как $f(x, y, z) = \frac{F(x, y, z) - n}{P^2 + k}$, где k – аддитивный корректирующий фактор, добавление которого приводит к ограничению шума [21].

Существуют и другие алгоритмы, например, максимальной вероятности [22], когда полученные изображения в исправленной от искажений форме представляются посредством вероятности определенных участков объектов, используя дополнительные модели шума, добавляемые при преобразовании. Иногда применяется алгоритм Janson-van Cittert [23] с основным уравнением: $f^{k+1} = f^k + \alpha \cdot (F - (f^k \otimes P))$, где α – это критерий правильного результата, с помощью которого можно получить результат наиболее соответствующий действительности.

Данные операции по устранению размытости позволяют уменьшить артефакты рассеивания при микроскопии объектов с малыми размерами, а также скомпенсировать изменения интенсивности свечения флуоресцентного объекта. Описанные протоколы являются, однако, достаточно сложной процедурой для повседневной практики. Необходимость получения точных, скорректированных изображений исследуемых флуоресцентных объектов обусловила появление коммерчески доступных программ для обработки оптических данных.

Для точного перерасчета кальциевого сигнала в величину потока ионов кальция или перерасчет в величину протекающего тока необходимо сначала определить величину функции рассеяния точки экспериментально или рассчитать по выше представленным формулам. Используя полученную величину ФРТ произвести устранение размытости изображения. Эта процедура необходима для миниатюрных сигналов, соизмеримых с разрешающей способностью конфокального микроскопа. Ошибка в величине амплитуды сигнала может составить 20 %, а пространственные характеристики будут увеличены [16, 24].

Современные конфокальные микроскопы позволяют регистрировать сигналы от малой группы каналов, например риаудиновых рецепторов, и позволяют получать достоверную информацию, позволяющую точно определить физиологическую функцию как отдельных каналов, так и Ca^{2+} сигнала в целом. Необходимо точно производить настройку конфокальной системы и при необходимости производить компенсацию изменяющихся параметров для устранения неоднородности.

ВЫВОДЫ

Вкратце обобщим те важные моменты, о которых необходимо помнить при проведении конфокальной микроскопии. Первым важным шагом, как отмечалось выше, является выбор соответствующей длины волны излучения лазера для возбуждения красителя, адекватного дихроичного зеркала, которое должно соответствовать выбранному красителю или даже нескольким красителям, выбор нужного светофильтра перед детектором для отсекающего возбуждающего света. Выбор нужного размера диаметра конфокальной щели является важным шагом, так как величина щели влияет на контраст изображения.

Следующим важным этапом является правильный выбор величины пикселя (минимального размера изображения), что осуществляется по описанной выше теореме Найквиста. Согласно этой теореме и особенностям эксперимента подбирается также частота сканирования. Нужно помнить, что уменьшение размера пикселя приводит к уменьшению полезного регистрируемого сигнала (количества фотонов, испущенных в заданном объеме), и даже к его “слиянию” с шумом. В такой ситуации можно увеличить пиксель или же время сканирования. Альтернативой может быть также использование большей концентрации красителя (но не выше 200 мкМ), или увеличить размер конфокальной щели с ухудшением контрастности.

Важно также помнить, что при облучении лазером исследуемого объекта происходит не только фотовыгорание красителя, но и повреждается сам объект (фототоксичность). Эти процессы необходимо учитывать и, в частности, проводить компенсацию фотовыгорания зонда. Длительный эксперимент лучше разделить на части, чем накладывать много действий в одном. Разумно и необходимо также проводить контрольные регистрации для исключения данных вредных эффектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rochefort N.L., Jia H., Konnerth A. Calcium imaging in the living brain: prospects for molecular medicine // *Trends Mol Med*. 2008. V. 14. P. 389-399.
2. Russell J.T. Imaging calcium signals in vivo: a powerful tool in physiology and pharmacology // *Br J Pharmacol*. 2011. V. 163. P. 1605-1625.
3. Takahashi A., Camacho P., Lechleiter J.D. [et al.] Measurement of intracellular calcium // *Physiol Rev*. 1999. V. 79. P. 1089-1125.
4. Jablonski A. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes // *Nature*. 1933. V. 131. P. 839-840.
5. Lichtman J.W., Conchello J.A. Fluorescence microscopy // *Nature Methods*. 2005. V. 2. P. 910-919.
6. Yuste R. Fluorescence microscopy today // *Nature Methods*. 2005. V. 2. P. 902-904.
7. Minsky M. Microscopy Apparatus: U.S. Patent #3013467A; filed Nov 7, 1957; granted Dec 19, 1961.
8. Bootman M.D., Rietdorf K., Collins T. M. Ca^{2+} -sensitive fluorescent dyes and intracellular Ca^{2+} imaging // *Sanderson Cold Spring Harb. Prot*. 2013. № 2. P. 83-99.
9. Tsien R.Y. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures // *Biochemistry*. 1980. V. 19 (11). P. 2396-2404.
10. Figueroa L., Shkryl V.M., Blatter L.A. [et al.] Using two dyes with the same fluorophore to monitor cellular calcium concentration in an extended range // *PloS One*. 2013. V. 8 (2). P. e55778.
11. Isaeva E.V., Shkryl V.M., Shirokova N. Mitochondrial redox state and Ca^{2+} sparks in permeabilized mammalian skeletal muscle // *J. Physiol*. 2005. V. 565 (Pt 3). P. 855-872.
12. Shkryl V.M., Shirokova N. Transfer and tunneling of Ca^{2+} from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in skeletal muscle // *J. Biol. Chem*. 2006. V. 281 (3). P. 1547-1554.

13. Shkryl V.M., Blatter L.A. Ca²⁺ release events in cardiac myocytes up close: insights from fast confocal imaging // *PloS One*. 2013. V. 8 (4). P. e61525.
14. Cheng H., Lederer W.J., Cannell M.B. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle // *Science*. 1993. V. 262. P. 740-744.
15. Rios E., Stern M.D., Pizarro G. [et al.] Calcium release flux underlying Ca²⁺ sparks of frog skeletal muscle // *J. Gen. Phys.* 1999. V. 114 (1). P. 31-48.
16. Shkryl V.M., Blatter L.A., Rios E. Properties of Ca²⁺ sparks revealed by four-dimensional confocal imaging of cardiac muscle // *Gen Physiol*. 2011. V. 139. P. 189-207.
17. Blatter L.A., Kockskamper J., Sheehan K.A. [et al.] Local calcium gradients during excitation-contraction coupling and alternans in atrial myocytes // *J Physiol*. 2003. V. 546. P. 19-31.
18. Штейн Г.И. Руководство по конфокальной микроскопии // ИИЦ РАН Санкт-Петербург. 2007. С. 77.
19. Agard D.A., Hiraoka Y., Shaw P. [et al.] Fluorescence microscopy in three dimensions // *Meth. Cell Biol*. 1989. V. 30. P. 353-377.
20. Holmes F.J., O'Connor N.J. Blind deconvolution of 3D transmitted light brightfield micrographs // *J Microsc.* 2000. V. 200 (Pt2). P. 114-127.
21. Shaw P.J., Rawlins D.J. Three-dimensional fluorescence microscopy // *Prog. Bioph. Mol. Biol*. 1991. V. 56 (3). P. 187-213.
22. Holmes T.J., Liu Y.H. Richardson-Lucy/maximum likelihood image restoration algorithm for fluorescence microscopy: further testing // *Appl. Optics*. 1989. V. 28 (22). P. 4930-4938.
23. Agard D.A. Optical sectioning microscopy: cellular architecture in three dimensions // *Ann. Rev. Bioph. Bioeng*. 1984. V. 13. P. 191-219.
24. Soeller C., Cannell M.B. Estimation of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release flux underlying Ca²⁺ sparks // *Biophys J*. 2002. V. 82. P. 2396-2414.

REFERENCES

1. Rochefort, N. L., Jia, H., & Konnerth, A. (2008). Calcium imaging in the living brain: prospects for molecular medicine. *Trends Mol Med*, 14(9), 389-399. doi:10.1016/j.molmed.2008.07.005
2. Russell, J. T. (2011). Imaging calcium signals in vivo: a powerful tool in physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol*, 163(8), 1605-1625. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00988.x
3. Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J. D., & Herman, B. (1999). Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev*, 79(4), 1089-1125.
4. Jablonski, A. (1933). Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature*, 131, 839-840. doi:10.1038/131839b0
5. Lichtman, J. W., & Conchello, J. A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 2(12), 910-919. doi:10.1038/nmeth817
6. Yuste, R. (2005). Fluorescence microscopy today. *Nature Methods*, 2(12), 902-904. doi:10.1038/nmeth1205-902
7. Minsky M. (1961). Microscopy Apparatus: U.S. Patent #3013467A; filed Nov 7, 1957; granted Dec 19, 1961.
8. Bootman, M. D., Rietdorf, K., Collins, T., Walker, S., & Sanderson, M. (2013). Ca²⁺-sensitive fluorescent dyes and intracellular Ca²⁺ imaging. *Cold Spring Harb Protoc*, 2013(2), 83-99. doi:10.1101/pdb.top066050
9. Tsien, R. Y. (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*, 19(11), 2396-2404.
10. Figueroa, L., Shkryl, V. M., Blatter, L. A., & Rios, E. (2013). Using two dyes with the same fluorophore to monitor cellular calcium concentration in an extended range. *PLoS One*, 8(2), e55778. doi:10.1371/journal.pone.0055778
11. Isaeva, E. V., Shkryl, V. M., & Shirokova, N. (2005). Mitochondrial redox state and Ca²⁺ sparks in permeabilized mammalian skeletal muscle. *J Physiol*, 565(Pt 3), 855-872. doi:10.1113/jphysiol.2005.086280
12. Shkryl, V. M., & Shirokova, N. (2006). Transfer and tunneling of Ca²⁺ from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 281(3), 1547-1554. doi:10.1074/jbc.M505024200
13. Shkryl, V. M., & Blatter, L. A. (2013). Ca²⁺ release events in cardiac myocytes up close: insights from fast confocal imaging. *PLoS One*, 8(4), e61525. doi:10.1371/journal.pone.0061525
14. Cheng, H., Lederer, W. J., & Cannell, M. B. (1993). Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*, 262(5134), 740-744.
15. Rios, E., Stern, M. D., Gonzalez, A., Pizarro, G., & Shirokova, N. (1999). Calcium release flux underlying Ca²⁺ sparks of frog skeletal muscle. *J Gen Physiol*, 114(1), 31-48.
16. Shkryl, V. M., Blatter, L. A., & Rios, E. (2012). Properties of Ca²⁺ sparks revealed by four-dimensional confocal imaging of cardiac muscle. *J Gen Physiol*, 139(3), 189-207. doi:10.1085/jgp.201110709

17. Blatter, L. A., Kockskamper, J., Sheehan, K. A., Zima, A. V., Huser, J., & Lipsius, S. L. (2003). Local calcium gradients during excitation-contraction coupling and alternans in atrial myocytes. *J Physiol*, 546(Pt 1), 19-31.
18. Shtejn G.I. (2007). Rukovodstvo po konfokal'noj mikroskopii. (pp 19-21). INC RAN Sankt-Peterburg.
19. Agard, D. A., Hiraoka, Y., Shaw, P., & Sedat, J. W. (1989). Fluorescence microscopy in three dimensions. *Methods Cell Biol*, 30, 353-377.
20. Holmes F.J., O'Connor N.J. (2000). Blind deconvolution of 3D transmitted light brightfield micrographs. *J Microsc.*, V. 200 (Pt2), 114-127.
21. Shaw, P. J., & Rawlins, D. J. (1991). Three-dimensional fluorescence microscopy. *Prog Biophys Mol Biol*, 56(3), 187-213.
22. Holmes, T. J., & Liu, Y. H. (1989). Richardson-Lucy/maximum likelihood image restoration algorithm for fluorescence microscopy: further testing. *Appl Opt*, 28(22), 4930-4938. doi:10.1364/ao.28.004930
23. Agard, D. A. (1984). Optical sectioning microscopy: cellular architecture in three dimensions. *Annu Rev Biophys Bioeng*, 13, 191-219. doi:10.1146/annurev.bb.13.060184.001203
24. Soeller, C., & Cannell, M. B. (2002). Estimation of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release flux underlying Ca²⁺ sparks. *Biophys J*, 82(5), 2396-2414. doi:10.1016/s0006-3495(02)75584-7

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

UDK 537.636:53.047

PRIMARY PHYSICAL MECHANISM OF DIFFERENT MAGNETIC FIELDS ACTION ON ROOTS OF SOME PLANTS

N.V. Sheykina¹, N.I. Bogatina²¹National University of Pharmacy, 53 Pushkinska Str., 61002, Kharkiv, Ukraine

e-mail: sheykina@ukr.net

²B. Verkin Institute for Low Temperature Physics & Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, 47 Nauki Ave., 61102, Kharkiv, Ukraine

e-mail: n_bogatina@rambler.ru

Submitted January 31, 2017

Accepted October 25, 2017

Background: Though the magnetic field action on biological object is proved now by many experiments it cannot be explained. The counterarguments are the small value of magnetic induction, that is effective for static magnetic field and the small value of ions free path length for ion cyclotron resonance presence.

Objectives of the article were to generalize all the results that had been obtained before in static, alternative and combined magnetic fields and to explain all results by one and the same primary physical mechanism.

Materials and methods that were used to obtain experimental results were based on the using of well reproducible magnetic conditions. For this purpose 3 lays μ -metal shield and superconductive shield with warm volume were used. The artificial magnetic field was created in the shield. The objects of the investigation were roots of cress, maize and pea. Their gravitropic reaction was studied.

Results and discussion: All experimental results were compared with the theories and calculations made before and following from the three mechanisms proposed below.

It was shown that there were three physical primary mechanisms that could lead to effect of low frequency alternative and combined magnetic fields and permanent magnetic field on gravitropic reaction in plants. All of them depended on the relative location of roots, gravity and components of permanent and alternative magnetic fields between themselves. The first mechanism is based on the classic model of the rotation of ions in the plane that is perpendicular to the magnetic field direction or precession of magnetic moments round the direction of magnetic field vector. The second mechanism is connected with the piezoelectric properties of starch grain (porous piezoelectricity). This property of starch may create the change in the moving of starch grains in alternative and combined magnetic fields, and even in static one. The third mechanism is caused by the phase transition in water created by weak combined or alternative magnetic fields.

Conclusions: The comparison of effects of these three mechanisms between themselves allowed choosing the most possible one. It was shown that the first mechanism was preferred. Only the first mechanism can explain the dependence of observed effects on magnetic field direction.

KEY WORDS: combined magnetic field; alternative magnetic field; permanent magnetic field; cyclotron frequency of ion; starch grains; piezoelectricity; hydronium; free path of ion.

ПЕРВИЧНЫЙ ФИЗИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА КОРНИ НЕКОТОРЫХ РАСТЕНИЙ

Н.В. Шейкина¹, Н.И. Богатина²¹Национальный фармацевтический университет, ул. Пушкинская 53, 61002, Харьков, Украина²Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины, просп. Науки, 47, 61102 Харьков, Украина

Актуальность. Действие магнитных полей на биологические объекты в настоящее время доказано множеством экспериментов, однако единого физического механизма, объясняющего магнитные эффекты, до сих пор не существует. Одним из молекулярных механизмов биологического действия переменных магнитных полей может быть ионный циклотронный резонанс. Однако, в таком случае становятся труднообъяснимыми наблюдаемые малая величина магнитной индукции для постоянного магнитного поля и малая длина свободного пробега ионов для комбинированного магнитного поля.

Цель работы. Целью работы было обобщить собственные результаты, полученные ранее в постоянном, переменном и комбинированном магнитных полях и объяснить их с помощью одного первичного физического механизма.

Материалы и методы. Используемые в работе методы основаны на соблюдении хорошо воспроизводимых магнитных условий. Для этого использовали 3-х слойные пермаллоевые экраны и сверхпроводящий экран с теплым рабочим объемом. Искусственное магнитное поле создавали внутри экранов. Изучалась гравитропическая реакция корней кресс-салата, кукурузы и гороха.

Результаты и обсуждение. Все полученные результаты сравнивались с теориями и расчетами, сделанными ранее, и тремя механизмами, предложенными ниже. Было показано, что существует три первичных физических механизма воздействия постоянного, переменного и комбинированного магнитного поля на гравитропическую реакцию растений. Они зависят от взаимного расположения корней, силы гравитации и взаимного расположения компонент магнитного поля (постоянной и переменной). Первый механизм основан на классической модели вращения ионов в плоскости, перпендикулярной направлению магнитного поля, либо прецессии магнитных моментов вокруг направления вектора магнитного поля. Вторым механизмом связан с пьезоэлектрическими свойствами крахмальных зерен (пористое пьезоэлектричество). Это свойство крахмала может вызывать изменения движения крахмальных зерен в комбинированном, переменном и даже постоянном магнитном поле. Третий механизм связан с фазовыми переходами в воде, вызванными слабым комбинированным или переменным магнитным полем.

Выводы. Сравнение эффектов, вызванных тремя этими механизмами между собой, позволило выбрать наиболее вероятный механизм. Показано, что первый механизм является наиболее предпочтительным, поскольку он позволяет объяснить зависимость наблюдаемых эффектов от направления магнитного поля.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: комбинированное магнитное поле; переменное магнитное поле; постоянное магнитное поле; циклотронная частота ионов; крахмальные зерна; пьезоэлектричество; ионы H_3O^+ ; длина свободного пробега иона.

ПЕРВИСНИЙ ФІЗИЧНИЙ МЕХАНІЗМ ДІЇ РІЗНИХ МАГНІТНИХ ПОЛІВ НА КОРИННЯ ДЕЯКИХ РОСЛИН

Н.В. Шейкіна¹, Н.І. Богатіна²

¹Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська 53, 61002, Харків, Україна

²Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України, просп. Науки 47, 61102, Харків, Україна

Актуальність. Дію магнітних полів на біологічні об'єкти на теперішній час доведено великою кількістю експериментів, однак єдиного фізичного механізму, який би пояснював магнітні ефекти, досі не існує. Одним з молекулярних механізмів біологічної дії змінних магнітних полів може бути іонний циклотронний резонанс. Однак у цьому випадку важко пояснити малу величину магнітної індукції для постійного магнітного поля і малу довжину вільного перебігу іонів для комбінованого магнітного поля, що спостерігаються.

Мета роботи. Метою роботи було узагальнити власні результати, що були отримані раніше в постійному, змінному і комбінованому магнітних полях та пояснити їх за допомогою одного первинного фізичного механізму.

Матеріали і методи. Застосовані у роботі методи засновані на використанні добре відтворюваних магнітних умов. Для цього використовували 3-х шарові пермаллоєві екрани та надпровідний екран з теплим робочим об'ємом. Штучне магнітне поле створювали всередині екранів. Досліджувалась гравітропічна реакція коріння кресс-салату, кукурудзи і гороху.

Результати та обговорення. Всі отримані результати порівнювалися з теоріями і розрахунками, які були розроблені раніше, і трьома механізмами, запропонованими нижче. Було показано, що існує три первинних фізичних механізми впливу постійного, змінного та комбінованого магнітного полів на гравітропічну реакцію рослин. Вони залежать від взаємного розташування коренів, сили гравітації і взаємного розташування компонент магнітного поля (постійної та змінної). Першим механізмом заснований на класичній моделі обертання іонів в площині, що перпендикулярна напрямку магнітного поля, або прецесії магнітних моментів навколо напрямку вектору магнітного поля. Другим механізмом пов'язаний з п'єзоелектричними властивостями крохмальних зерен (пориста п'єзоелектрика). Ця властивість крохмалю може викликати зміни руху крохмальних зерен в комбінованому, змінному і навіть постійному магнітному полі. Третім механізмом пов'язаний з фазовими переходами у воді, що викликані слабким комбінованим або змінним магнітним полем.

Висновки. Порівняння ефектів, викликаних трьома цими механізмами між собою, дозволило вибрати найбільш ймовірний механізм. Показано, що перший механізм є найкращим, оскільки він дозволяє пояснити залежність спостережуваних в магнітному полі ефектів від напряму магнітного поля.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: комбіноване магнітне поле; змінне магнітне поле; постійне магнітне поле; циклотронна частота іонів; крохмальні зерна; пориста п'єзоелектрика; іони H_3O^+ ; довжина вільного пробігу іону.

Bogatina N.I. supposed many years ago that the primary mechanism of magnetic field action on biological objects had the physical nature [1]. It was shown in [1] that there were many analogies between the action of magnetic field and gravity. The action of permanent magnetic field and gravity had the thresholds and their threshold values correlated very well between themselves. These conclusions were made on the base of the experimental works of Bogatina et al. on the observing of the threshold of growing reaction of wheat' coleoptiles and roots [2] and work of Merkis [3] who observed the threshold dependence of gravitropic reaction of roots and coleoptiles of plants on gravity.

In our previous works we obtained the following experimental results.

1. The presence of threshold for gravitropic reaction of plants both in permanent and alternative magnetic field [4, 5].

2. The biological effect in combined magnetic field (static magnetic field and collinear to it alternative magnetic field) depended on the direction of roots relatively permanent and alternative magnetic fields and the direction of these fields relatively the gravity force and each other [6, 7, 8].

3. The observation of negative gravitropic reaction for roots in some cases [9-13].

4. The distribution of amyloplasts and Ca^{2+} ions in the roots differed from the usual while the negative gravitropic reaction was observed. For small time of treatment in combined magnetic field amyloplasts were located in the center of the cells. For long time they moved to the upper part of the cells. Ca^{2+} ions moved to the upper part of the cell in contrary its usual movement to the down part [10, 12, 13].

5. The dependence of biological effect on concentration of Ca^{2+} ions was not linear [10].

The aim of the work is to compare the experimental results obtained by us before with the new theoretical propositions and accounts supposed by other authors and us and selection of the preferred model.

MAGNETIC AND ELECTROMAGNETIC CONDITIONS

It is important to notice here that all experimental results we used here to build the model of static, alternative and combined magnetic fields action on biological objects (roots in our case) were obtained under well reproducible magnetic and electromagnetic conditions [4-13]. These conditions were achieved by using two- coated μ -metal shields and superconductive shield with warm volume on the technical base of the Institute for Low Temperature Physics and Engineering of National Academy of Science of Ukraine (Kharkov, Ukraine).

The static and alternative magnetic fields were created artificially by 2 coaxial solenoids in μ -metal shield. The remained magnetic field in μ -metal shield was equal to 20 nT. The level of magnetic noise at the frequencies we used was not more than $2 \text{ nT/Hz}^{0.5}$.

For superconductive shield with warm volume the remained magnetic field was equal to 5-7 nT. The static magnetic field was frozen in the work volume by transition the Pb shield in the superconductive state in external magnetic field from the circular couture, that wasn't located in the bottom part of the shield. The magnetic noise level for superconductive shield was not more than $0.01 \text{ nT/Hz}^{0.5}$.

The alternative magnetic field was created by using of long solenoid. The data in combined magnetic field were obtained for cyclotron frequency of Ca^{2+} ions. The static

magnetic field's induction was $8.65\mu\text{T}$, the alternative magnetic field's amplitude was $15.9\mu\text{T}$, the frequency of it was equal to 6.85 Hz .

MECHANISM OF MAGNETIC FIELD ACTION

In [7] we proposed the mechanism of action of permanent magnetic field and combined one. It was based on the results of our experiments of action of both the permanent magnetic field and combined one and the theoretical work of Liboff with coauthors [14].

Here we developed our proposition [7].

In [7] we showed that the absence of permanent magnetic field led to the decreasing of any ions stream diameter near the membrane and to the changes of pressure on the membrane. So it might lead to the shutting of some channels for ions and to the presence of biological effect. The effect had to have the threshold for magnetic inductance value that depended on the minimal distance between the ion's channels.

This model was used recently by Bingi V.N. [15]. The dependence of the probability of biological effect on the magnetic field inductance coincided very well with the obtained by us in [4, 5] even in details. (Fig. 1, 2).

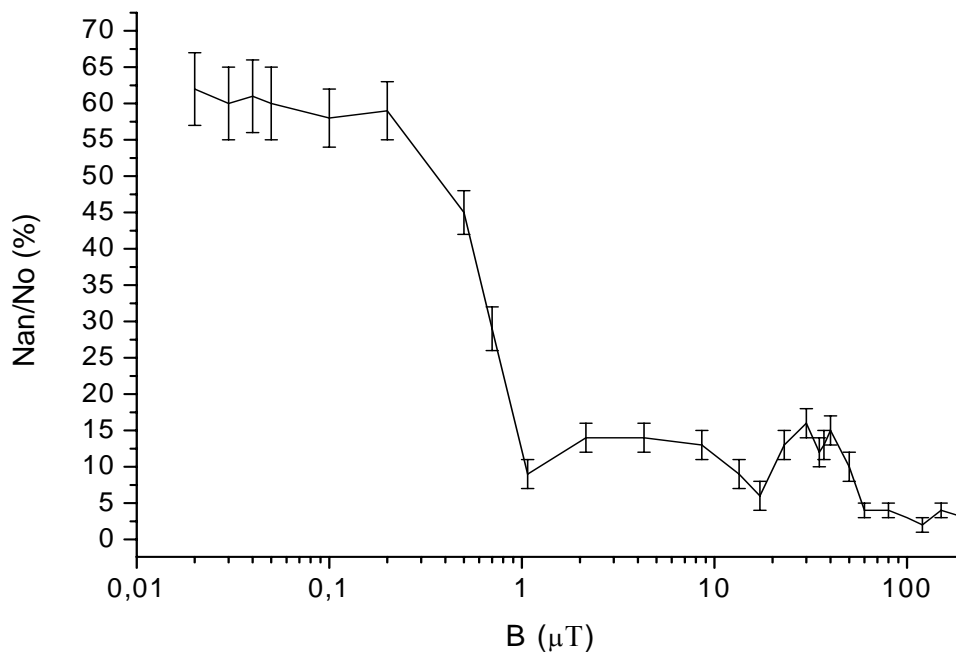


Fig. 1. The dependence of quantity of roots with anomalous gravitropic reaction (that is up and perpendicular to gravity) on the inductance of permanent magnetic field (experimental results [4]).

But we have to notice, that the value of the effect in the experiment was about 60%, while the predicted one was only 15%. The difference might be connected with the difference of the parameters values (here α – was the parameter of signal interaction and τ – was the parameter of the thermal interaction). The other reason for the difference was the following. In [15] the averaging was made for all directions of ions, but in our case we had evidently one main direction.

From the comparing of our results with the results of assessments [15] we can obtain besides the threshold value that is equal to $0.1-1\mu\text{T}$, the time of thermal relaxation for ions. It is of order 10^{-7} s for electrons, 10^{-3} s for proton and $10^{-2}-10^{-1}\text{ s}$ for ions. The qualitative accordance between curves on Fig. 1 and Fig. 2 was good. As we noted [7] the effect is more

for directed moving of ions. And it can decrease and even disappear when there was no distinguished direction of ions moving or this direction coincides with the direction of permanent magnetic field. As it was noticed in [15] the biological effect may be much more than the primary probability effect that had been counted.

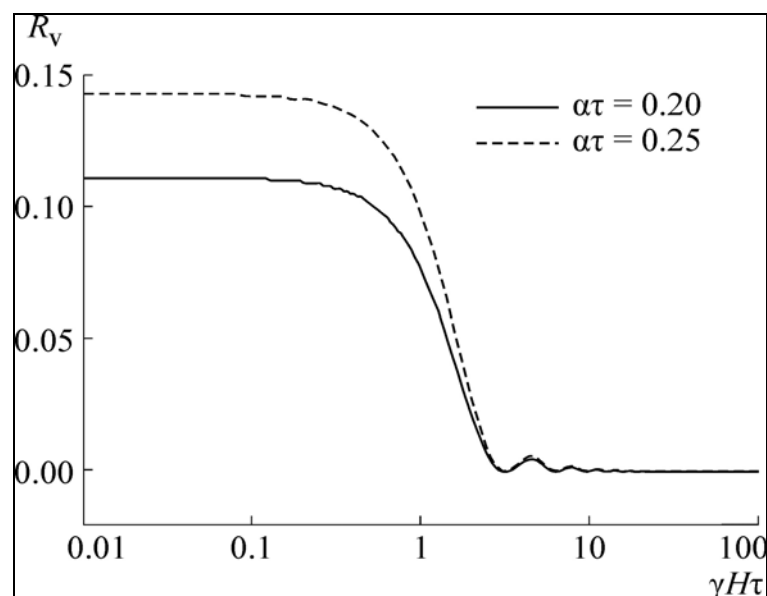


Fig. 2. “Effect of magnetic vacuum” is the increasing of probability of primary reaction caused by the permanent magnetic field decreasing [16] (γ is the gyromagnetic attitude; τ is the time of thermal relaxation). The probability R is zero dimensional magnitude and the magnitude $\gamma H \tau$ is zero dimensional too.

The only criticism that might take place was the big value for thermal relaxation time. It might be got over by the last theory of Del Guidice [16] who noted that adjacent to the membrane in EZ water (the type of water, variously called vicinal, interfacial, and now excluded zone, or E-Z water) the free path's length of ions could be much longer because of the domain structure of the water. This fact was confirmed indirectly by our work on hydronium [17, 18] and directly in the work of Liboff [19] they observed the phase transitions in the pure water in combined magnetic field and alternative magnetic field.

The same threshold effect was obtained for alternative magnetic field treatment while the static magnetic field was absent [5, 20]. We studied the gravitropic reaction of cress roots on time at the amplitudes of alternative magnetic field from 20 nT up to 5 μ T and wide diapason of frequencies (from parts of Hz up to 50 Hz).[5]. We revealed the presence of the step at the curve of dependence of roots' divergence angle on amplitude of alternative magnetic field. It was located approximately at 2 μ T. At amplitudes less than 0.2 μ T the gravitropic reaction of cress roots was decreased essentially, but at the amplitudes more than 4 μ T the gravitropic reaction was usual. So both static and alternative magnetic fields starting from certain magnitude began to influence on the gravitropic reaction of roots. The influence consisted in the essential increase of gravitropic reaction above some amplitude of alternative or static magnetic field. The threshold induction value is more for alternative magnetic field, than for static one. The fact coincides with the accounts [15].

The explaining of the effect is based on two hypotheses. The first one takes in to account membrane electric field and the second one proposes that Ca^{2+} ions flow by narrow directed stream.

The roots treated in the alternative magnetic field are present some part of period in the magnetic field that is less than the threshold of static magnetic field. This fact leads to decreasing of gravitropic reaction. When the amplitude of magnetic field becomes more than definite value, the ion's stream widens and captures more channels. So the gravitropic reaction has to increase until the definite limit. The limit is determined by ions' free path length [5, 20].

The effect didn't depend on the frequency while we substitute the permanent magnetic field by the alternative one [15] for the frequencies more than 1Hz.

In the work [17] we explained the effect of combined magnetic field action by the fact that in combined magnetic field some part of the time our roots were in the magnetic field that was less than the threshold value and it might lead to the essential decreasing of gravitropic reaction. And this model was calculated in the work of Bingi V.N. [15].

As it was shown in [7] all the ions that had velocity non parallel to the magnetic field direction were pressed to the cell membrane (the centrifugal force appeared during the rotation of ions). The induction of combined magnetic field changed from 0 to its maximum value during the period of alternative magnetic field so the pressure on membrane changed from maximum to 0. The amyloplasts might be carried away by ions stream to the membrane and pressed to membrane. When the inductance became too small and aspired to 0 the amyloplasts might be thrown away from the membrane to the center of the cell or even more to the upper or lower-laying part of the cell. As the concentration of ions in the lower-laying part of the cell was more than in the upper one due to the gravity, the concentration of amyloplasts in the upper part of the cell might exceed the concentration in the lower-laying part of the cell. All these facts were observed by us in [10, 12, 13]. The maximum effect had to be seen when there was the directed movement of one type of ions and it might be increased by the resonance at cyclotron frequency that coincided with the frequency of the alternative magnetic field. The amyloplasts might even to defense the investigated ions from the collisions with other ions and to increase their free path's length. The ions might be also carried away with the amyloplasts to the upper part of the cell. As the amyloplasts had a big mass compared to the ion's mass the way at which the ion lost its speed also increased when it moved with the amyloplasts. Besides the change of Ca^{2+} ion concentration might lead to the change of the concentration of auxin ions because Ca^{2+} ion took part in the process of syntheses of auxin and so to change of gravitropic reaction.

All these considerations might to explain all effects we observed. We can also explain all the results about the dependence of biological effect of the direction of combined magnetic field. The absence of any effect for parallel directions of roots and combined magnetic field may be easily explained. The direction of ions stream didn't change in parallel to its direction magnetic field. The investigation of combined magnetic field influence on the plants roots gravitropic reaction was studied in details before [6 – 13]. The different results obtained for different roots directions are shown on Fig 3.

It was found that roots gravitropic reaction was negative in first case and it was slowed essentially in the second one. In third case it was usual. So for the combined magnetic field the model for cyclotron resonance of ions is preferred because of the absence of any biological effect in some directions.

The other effect – the dependence of biological effect on the method of observation of gravistimulation may be easily explained in frames of this model. While observing the gravitation reaction on wet plane when the roots touched the plane with all their length we changed the direction of ions moving and so changed the biological effect.

The only objection from this model was the fact that the free path of Ca^{2+} ions was small. We estimated it. The average thermal velocity for Ca^{2+} ions was equal to 200 m/s, time between collisions was of the order 10^{-9} s. So the free path was equal to $2 \cdot 10^{-7}$ m (200 nm). As the distance between the Ca^{2+} channels was of the order 5-10 nm [21] the ion had time for

interaction with many channels. If the free path might be increased by 5 – 50 times, then any objection about the possibility of cyclotron resonance could be overcome because its length will approach the dimension of plant's cell. In the case with static or alternative magnetic fields we didn't need longer free path. Obtained free path is quite enough. We shall notice here that for H^+ ions the average velocity and so the free path was by 7 times more than for Ca^{2+} ions.

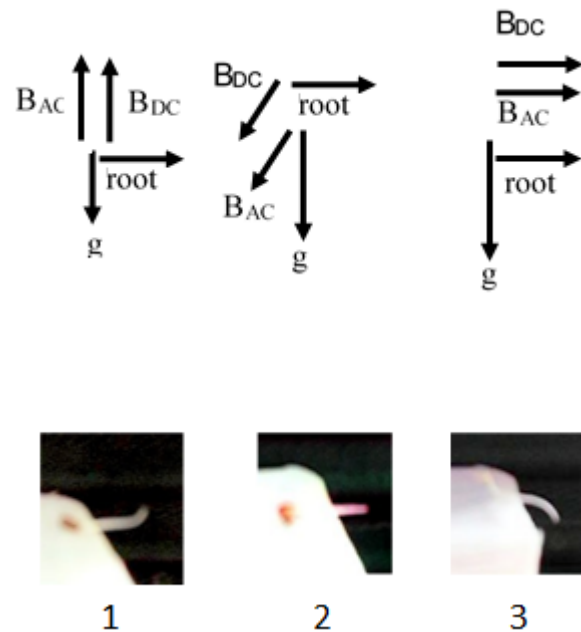


Fig.3. Different biological effect for different directions of combined magnetic field. Here B_{DC} is the induction of static magnetic field component; B_{AC} is the induction of alternative magnetic field component. They are parallel to each other. Combined magnetic field was parallel to the gravitation vector, the roots were located perpendicular to gravity and combined magnetic field vector (1); combined magnetic field was perpendicular to the gravitation vector and roots were located perpendicular to combined magnetic field and gravity (2); combined magnetic field was perpendicular to the gravity and roots were located parallel to combined magnetic field (3). The primary direction of roots always lays in the horizontal plane and is directed perpendicular to the acceleration due to gravity g . On the photos the gravitropic reaction of roots was fixed after 2 hours' treatment in different combined magnetic fields. The orientation of roots and corresponding the photo combined magnetic fields components relatively gravity vector g were showed above each photo. Here results were shown for cress' roots. Analogous results were obtained for pea' roots and maize ones. All results were obtained for the frequencies of alternative magnetic field component tuned to the cyclotron frequency of Ca^{2+} ions in the static magnetic field B_{DC} .

The other effect that we couldn't throw away was the fact that the amyloplasts were the starch grains (porous piezoelectric), and thus they are piezoelectric particles. While they are pressed to membrane the grains might polarize and create the electric field near themselves. As the direction of created dipole of the starch grain near the membrane wasn't determined it had to rotate and aspire to be parallel to the direction of electric field even in the contrary to the gravity. The created electric field is alternative one and had the frequency of alternative component of combined magnetic field. So in combined magnetic field the dipole had to change its direction with the changing the direction of alternative magnetic field. Besides the dipole moves in combined magnetic field and creates electric field. That should lead to electromagnetic field generation from the dipole. So the grains lost the energy and gravitropic reaction may be changed. The resonance had to take place when the frequency generated by electric dipole coincided with the frequency of alternative component of combined magnetic

field. But this frequency had nothing with the cyclotron frequencies of ions observed in experiment. The advantage of this model was in the absence of necessity of long free path for particles. This model couldn't explain the threshold for the dependence of biological effect probability on the induction of magnetic field. But the direction of dipoles relatively combined magnetic field was also important. The generation of electromagnetic noise from plants was observed by us in [9].

The third independent physic-chemical mechanism is connected with our last experimental work [18]. It is based on the result that the hydronium ions took immediate part in the gravitropic reaction. Though there was no any negative gravitropic reaction for these ions (it was only the essential decreasing of the gravitropic reaction) the peak for H_3O^+ ions was well observed.

We also observed the increasing of concentration of H^+ ions (pH measurements) during treatment of the pure water in combined magnetic field alternative component of which was tuned to the cyclotron frequency of hydronium ions. According to the hypothesis of Del Giudice [16] the free path for ions in the water near the membrane was much longer than in usual because of domain structure of this water and ion might jump between the domains. The change in the H_3O^+ and H^+ ions concentration that took place at the frequency of alternative magnetic field equal to the cyclotron frequency of the H_3O^+ ions led to the change of other water characteristics. It might lead to the changes of stretching and it might be different in different parts of the root. So it might lead both to decreasing of gravitropic reaction and to negative gravitropic reaction.

As the peaks of Ca^{2+} ions and hydronium ions were located very close between themselves the effects might be mixed. All the ions including the ions of metals may get to the EZ zone near membrane (the zone of structured water) but it is not clear whether they will have the long free path in that zone or only water components will have the long free path in that zone.

The measurements of conductivity of pure and clean water with the fixed concentrations of Ca^{2+} ions can give the answer on this question.

CONCLUSIONS

Three physical primary mechanisms were proposed in the work. The first one was preferable (this was the mechanism of action of magnetic field on ions).

It could explain the presence of the threshold in the dependence of probability of biological effect (changes in gravitropic and growing reactions in our case) on the induction of static magnetic field and the same effect in the alternative magnetic field (the threshold character of the changes in gravitropic reaction on amplitude of alternative magnetic field induction).

This mechanism was responsible for the resonance interaction of combined magnetic field alternative component of which was tuned for the cyclotron frequency of the ion (or for the magnetic moment of the ion that was one and the same). It could explain also all direction dependencies of biological effect. The only objection that the free path of the ion was too short for existence of ion cyclotron resonance might be overcome by the hypothesis that in EZ-water near the membrane the free path of any ions (not only hydronium) was much longer. But we couldn't exclude the other two primary mechanisms. Beside the third one was the first mechanism fitted to the water.

REFERENCES

1. Bogatina N.I., Litvin V.M., Travkin M.P. Possible mechanisms of action of magnetic, gravitropic and electric fields on biological objects, the analogies in their action // *Electronic treatment of materials*. 1986. No 1. P. 64-67.

2. Богатина Н.И., Веркин Б.И., Кулабухов В.Н. [и др.] Определение порога чувствительности проростков и корней пшеницы к величине магнитного поля // Физиология растений. 1979. Т.26, №3. С. 620-625.
3. Merkis A.I. Geotropic reaction of plants // Vil'nyus. 1973.
4. Богатина Н.И., Шейкина Н.В., Кордюм Е.Л. Изменения гравитропической реакции, вызванные постоянным магнитным полем // Біофізичний вісник. 2006. №17(1). С.78– 82.
5. Богатина Н.И., Шейкина Н.В. Влияние переменного магнитного поля на гравитропическую реакцию растений при экранировании постоянной составляющей магнитного поля. Роль частот Шумана // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского Серия «Биология, химия». 2013. Т.26, №3. С. 27 – 34. ISSN 1606-3716.
6. Богатина Н.И., Шейкина Н.В., Кордюм Е.Л. Влияние ориентации корней кресс-салата и кукурузы относительно комбинированного магнитного поля на изменение их гравитропической реакции. Эксперимент и новая гипотеза, механизм адаптации // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского Серия «Биология, химия». 2013. Т. 25 (64), № 2. С. 16-30.
7. Bogatina N.I., Sheykina N.V., Kordjum E.L. Maize and cress roots orientation in combined magnetic field change roots gravitropic reaction response on its action. Experiment and new hypothesis . Adaptation mechanism //Proceedings of VI International Congress “Low and superlow magnetic fields and radiation in biology and medicine. 02-06 July 2012. Saint-Petersburg. P.73-82. ISBN 5-86456-007-3. Saint-Petersburg : VNLU. (in English).
8. Bogatina N.I., Sheykina N.V. Influence of different relative orientation of static and alternative magnetic fields and cress roots on their gravitropic reaction // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского Серия «Биология, химия». 2014. Т.27, №1. С.24-28.
9. Шейкина Н.В., Богатина Н.И., Кордюм Е.Л. Влияние комбинированного магнитного поля на гравитропическую реакцию растений и спектр электромагнитного излучения, генерируемого ими // Радиофизика и электроника. 2005. Т.10, №2. – P.331 – 335.
10. Bogatina N.I., Sheykina N.V., Kordjum E.L. Activation of metal ions and biologically active compounds ions action by combined magnetic field // Proceedings of V1 International Congress “Low and superlow magnetic fields and irradiation in biology and medicine. 02-06 July 2012, Saint-Petersburg. P. 90-98. ISBN 5-86456-007-3. Saint-Petersburg : VNLU. (in English).
11. Богатина Н.И., Шейкина Н.В., Кордюм Е.Л., Карачевцев В.А. Гравитропическая реакция растений в комбинированном (постоянном и переменном) магнитном поле // Доповіді НАН України. 2002. № 4. С. 176 – 179.
12. Kordyum E.L., Bogatina N.I., Kalinina Ya. M., Sheykina N.V. A weak combined magnetic field changes root gravitropism // Advances in Space Research. 2005. V. 36, №7. P. 1229 – 1236.
13. Кордюм Е.Л., Соболев М.А., Калинин Я.М., Богатина Н.И., Шейкина Н.В. Біологічна дія комбінованого магнітного поля на гравітропічну реакцію кореня *lepidium Sativum L.*// Укр. ботан. журн. 2009. Т.65, №1. С.141-157.
14. Vincze L., Szasz G., Liboff A. New theoretical treatment of ion resonance phenomena //, Bioelectromagnetics. 2006. V.29. P.380-386.
15. Bingi V.N. A primary physical mechanism of biological effects of weak magnetic fields // Biophysics. 2016. V.61, No1. P. 201-208.
16. Del Giudice E., Fleischmann H., Preparata G., Talpo G. On the “unreasonable” effects on ELF magnetic fields upon a system of ions// Bioelectromagnetics . 2002. V.23. P. 522-553.
17. Шейкина Н.В., Богатина Н.И., Кордюм Е.Л. Зависимость гравитропической реакции кресс-салата от амплитуды переменной составляющей комбинированного магнитного поля // Біофізичний Вісник (Вісник Харківського університету). 2007. Т.№18(1). P. 78 – 90.
18. Bogatina N.I., Sheykina N.V. Role of Hydronium ions in biological effects of weak combined magnetic fields // Physics of Alive. 2014. T.21, №1-2. P. 43-45.
19. Grimaldi S., Lisi, A., Ledda M., D'Emilia E., Liboff A., Giuliani L., Foletti A. Weak-field H3O(+) ion cyclotron resonance alters water refractive index // Journal: Electromagnetic Biology and Medicine. 2016. 001R.2. P.1-24.
20. Bogatina N.I., Sheykina N.V. Effect of alternative magnetic field on plants gravitropic reaction under the conditions of absence of static components of magnetic field //X INTERNATIONAL CRIMEAN CONFERENCE «COSMOS AND BIOSPHERE». 23 – 28 September 2013. Koktebel. Crimea. Ukraine. (in English)
21. Сидоров А.В. Физиология внутриклеточной коммуникации . Минск: БГУ. 2008.

REFERENCES

1. Bogatina, N.I., Litvin, V.M., Travkin, M.P. (1986.) Possible mechanisms of action of magnetic, gravitropic and electric fields on biological objects, the analogies in their action. *Electronic treatment of materials*, (1), 64-67.
2. Bogatina, N.I., Verkin, B.I., Kulabuhov, V.N. [et al.] (1979) Opredelenie poroga chuvstvitel'nosti prorostkov i kornej pshenicy k velichine magnitnogo polja. *Fiziologija rastenij*, (26, №3), 620-625. (in Russian)
3. Merkis, A.I. (1973) *Geotropic reaction of plants*. Vil'nyus. (in Russian)
4. Bogatina, N.I., Sheykina, N.V., Kordjum, E.L. (2006) Izmenenija gravitropicheskoi reakcii, vyzvannye postojannym magnitnym polem. *Biofizichnij visnik*, (17(1)), 78– 82. (in Russian)
5. Bogatina, N.I., Sheykina, N.V. (2013) Vlijanie peremennogo magnitnogo polja na gravitropicheskuju reakciju rastenij pri jekranirovanii postojannoju sostavljajushhej magnitnogo polja. Rol' chastot Shumana. *Uchenye zapiski Tavricheskogo nacional'nogo universiteta im. V.I. Vernadskogo Serija «Biologija, himija»*, (26, №3), 27 – 34. (in Russian)
6. Bogatina, N.I., Sheykina, N.V., Kordjum, E.L. (2012) Vlijanie orientacii kornej kress-salata i kukuruzy otноситel'no kombinirovannogo magnitnogo polja na izmenenie ih gravitropicheskoi reakcii. Jeksperiment i novaja gipoteza, mehanizm adaptacii. *Uchenye zapiski Tavricheskogo nacional'nogo universiteta im. V. I. Vernadskogo Serija «Biologija, himija»*, (25, № 2), 16-30. (in Russian)
7. Bogatina, N.I., Sheykina, N.V., Kordjum, E.L. (2012) *Maize and cress roots orientation in combined magnetic field change roots gravitropic reaction response on its action. Experiment and new hypothesis . Adaptation mechanism. Proceedings of VI International Congress “Low and superlow magnetic fields and radiation in biology and medicine*, Saint-Petersburg, 02-06 July 2012 (pp 73-82). ISBN 5-86456-007-3. Saint-Petersburg : VNLU.
8. Bogatina, N.I., Sheykina, N.V. (2014) Influence of different relative orientation of static and alternative magnetic fields and cress roots on their gravitropic reaction. *Uchenye zapiski Tavricheskogo nacional'nogo universiteta im. V. I. Vernadskogo Serija «Biologija, himija»*, (27, №1), 24-28.
9. Sheykina, N.V., Bogatina, N.I., Kordjum, E.L. (2005) Vlijanie kombinirovannogo magnitnogo polja na gravitropicheskuju reakciju rastenij i spektr jelektromagnitnogo izluchenija, generiruemogo imi. *Radiofizika i jelektronika*, (10, №2), 331 – 335. (in Russian)
10. Bogatina, N.I., Sheykina, N.V., Kordjum, E.L. (2012) Activation of metal ions and biologically active compounds ions action by combined magnetic field. *Proceedings of VI International Congress “Low and superlow magnetic fields and irradiation in biology and medicine*, Saint-Petersburg, 02-06 July 2012 (90-98). ISBN 5-86456-007-3. Saint-Petersburg : VNLU.
11. Bogatina, N.I., Sheykina, N.V., Kordjum, E.L., Karachevcev, V.A. (2002) Gravitropicheskaja reakcija rastenij v kombinirovannom (postojannom i peremennom) magnitnom pole. *Dopovidi NAN Ukraini*, (4), 176 – 179. (in Russian)
12. Kordjum, E.L., Bogatina, N.I., Kalinina, Ya. M., Sheykina, N.V. (2005) A weak combined magnetic field changes root gravitropism. *Advances in Space Research*, (36, №7), 1229 – 1236.
13. Kordjum, E.L., Sobol', M.A., Kalinina, Ja.M., Bogatina, N.I., Sheykina, N.V. (2009) Biologichna dija kombinovanogo magnitnogo polja na gravitropichnu reakciju korenja lepidium Sativum L.. *Ukr. botan. zhurn.*, (65, №1), 141-157. (in Ukrainian)
14. Vincze, L., Szasz, G., Liboff, A. (2006) New theoretical treatment of ion resonance phenomena. *Bioelectromagnetics*, (29), 380-386.
15. Bingi, V.N. (2016) A primary physical mechanism of biological effects of weak magnetic fields. *Biophysics*, (61, No1). P. 201-208.
16. Del Giudice, E., Fleischmann, H., Preparata, G., Talpo, G. (2002) On the “unreasonable” effects on ELF magnetic fields upon a system of ions. *Bioelectromagnetics*, (23), 522-553.
17. Sheykina, N.V., Bogatina, N.I., Kordjum, E.L. (2007) Zavisimost' gravitropicheskoi reakcii kress-salata ot amplitudy peremenoj sostavljajushhej kombinirovannogo magnitnogo polja, *Biofizichnij Visnik (Visnik Harkivs'kogo universitetu)*, (18(1)), 78 – 90. (in Russian)
18. Bogatina, N.I., Sheykina, N.V. (2014) Role of Hydronium ions in biological effects of weak combined magnetic fields. *Physics of Alive*, (21, №1-2), 43-45.
19. Grimaldi, S., Lisi, A., Ledda, M., D'Emilia, E., Liboff, A., Giuliani, L., Foletti, A. (2016) Weak-field H₃O⁽⁺⁾ ion cyclotron resonance alters water refractive index. *Journal: Electromagnetic Biology and Medicine*, (001R.2), 1-24.
20. Bogatina N.I., Sheykina N.V. (2013) Effect of alternative magnetic field on plants gravitropic reaction under the conditions of absence of static components of magnetic field. *X INTERNATIONAL CRIMEAN CONFERENCE «COSMOS AND BIOSPHERE»*, 23 – 28 September 2013, Koktebel, Crimea, Ukraine. VNLU. (in English)
21. Sydorov, A.V. (2008) *Fyzylohyia vnutrykoletochnoi kommunykatsyy*. Mynsk: BHU. (in Russian)

УДК 577.152.3

ЕФЕКТИ ГІДРОГЕН ПЕРОКСИДУ НА ОСНОВНІ КІНЕТИЧНІ ПАРАМЕТРИ ГІДРОЛІЗУ АТР УАБАЇНЧУТЛИВОЮ Na^+ , K^+ -АТР-АЗОЮ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ІНФЕРТИЛЬНИХ ЧОЛОВІКІВ

Р.В. Фафула, О.І. Мескало, Е.І. Личковський, З.Д. Воробець

*Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69,
м. Львів, 79010, Україна*

e-mail: roman_fafula@ukr.net

Надійшла до редакції 13 листопада 2017 року

Прийнята 17 листопада 2017 року

Актуальність. Na^+ , K^+ -АТР-аза відіграє вирішальну роль у фізіології сперматозоїдів та підтриманні їх фертилізаційної здатності. Na^+ , K^+ -АТР-аза є однією з мішеней для активних форм кисню. Гіперпродукція активних форм кисню може пошкодити клітини сперматозоїдів і вважається одним із механізмів чоловічого непліддя.

Мета роботи. Оцінити вплив H_2O_2 на основні кінетичні параметри гідролізу АТР уабаїнчутливою Na^+ , K^+ -АТР-азою сперматозоїдів фертильних (нормозооспермія) та інфертильних чоловіків (астенозооспермія).

Матеріали і методи. Активність Na^+ , K^+ -АТР-ази визначали спектрофотометрично за утворенням P_i . Концентраційні залежності лінеаризовано в координатах Лайнуївера-Берка.

Результати. Продемонстровано ефективний інгібуючий вплив H_2O_2 на уабаїнчутливу Na^+ , K^+ -АТР-азу активність сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків. У зв'язку з інгібуючим ефектом H_2O_2 було досліджено вплив цього ефектора на основні кінетичні параметри гідролізу АТР за участю Na^+ , K^+ -АТР-ази. У всьому діапазоні досліджуваних концентрацій АТР активність Na^+ , K^+ -АТР-ази сперматозоїдів плідних та неплідних чоловіків знижена за присутності H_2O_2 в середовищі інкубації. Проте, оптимальна активність Na^+ , K^+ -АТР-ази сперматозоїдів чоловіків з нормо- та астенозооспермією спостерігається за наявності 5 мМ АТР в інкубаційному середовищі. Шляхом лінеаризації отриманих даних у координатах Лайнуївера-Берка визначено основні кінетичні параметри Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР в сперматозоїдах фертильних та інфертильних чоловіків. За дії H_2O_2 константа спорідненості Na^+ , K^+ -АТР-ази до АТР в сперматозоїдах чоловіків з нормо- і астенозооспермією зростає в декілька разів. Початкова максимальна швидкість гідролізу АТР суттєво знижується лише в сперматозоїдах фертильних чоловіків з нормозооспермією.

Висновки. За умов H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу пригнічення активності уабаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТР-ази в сперматозоїдах чоловіків відбувається за рахунок зниження спорідненості ензиму до субстрату та зниження числа обертів ензиму (лише для сперматозоїдів фертильних чоловіків).

КЛЮЧОВІ СЛОВА: Na^+ , K^+ -АТР-аза; інгібування; кінетичний аналіз; сперматозоїди; інфертильність у чоловіків.

EFFECT OF HYDROGEN PEROXIDE ON THE MAIN KINETIC PARAMETERS OF ATP HYDROLYSIS BY OUBAIN SENSITIVE Na^+ , K^+ -ATP-ASE IN SPERMATOOA OF INFERTILE MEN

R.V. Fafula, O.I. Meskalo, E.I. Lychkovskyy, Z.D. Vorobets

Danylo Halysky Lviv National Medical University, Pekarska Str., 69, Lviv, 79010, Ukraine

Background: It is known that Na^+ , K^+ -ATPase plays important role in physiology of spermatozoa including their motility. Na^+ , K^+ -ATPase is one of the targets for reactive oxygen species. Hyperproduction of reactive oxygen species can damage sperm cells and is considered to be as one of the mechanisms of male infertility.

Objectives: To evaluate the H_2O_2 effect on the main kinetic parameters of ATP hydrolysis by oubain-sensitive Na^+ , K^+ -ATPase of spermatozoa of fertile (normozoospermia) and infertility men (asthenozoospermia).

Materials and methods: Na^+ , K^+ -ATPase activity was determined spectrophotometrically by production of P_i . Concentration dependencies were linearized in Lineweaver-Burk plot.

Results: Effective inhibitory effect of H_2O_2 on ouabain-sensitive Na^+, K^+ -ATP-ase activity of sperm cells of fertile and infertile men was demonstrated. The effects of H_2O_2 on the main kinetic parameters of the ATP hydrolysis with the involvement of Na^+, K^+ -ATP-ase was studied. In the whole range of studied concentrations of ATP the Na^+, K^+ -ATP-ase activity of spermatozoa of fertile and infertile men was reduced in the presence of H_2O_2 in the incubation medium. However, the optimal activity of the Na^+, K^+ -ATPase activity of sperm cells in both normozoospermic and asthenozoospermic men was observed in the presence of 5 mM ATP in the incubation medium. By linearization of concentration curves in Lineweaver-Burk plot the main kinetic parameters of Na^+, K^+ -activated, Mg^{2+} -dependent ATP hydrolysis in the sperm cells of fertile and infertile men were determined. Under the effect of H_2O_2 , the affinity constant of enzyme to ATP in normozoospermic and asthenozoospermic men increases several times. The initial maximum rate of ATP hydrolysis was significantly reduced only in the spermatozoa of fertile men with normozoospermia.

Conclusions: Under conditions of H_2O_2 -induced oxidative stress inhibition of ouabain-sensitive Na^+, K^+ -ATP-ase activity in sperm cells occurs due to a decrease in the enzyme affinity to the substrate and a decrease in the maximum reaction rate (only for asthenozoospermic men).

KEY WORDS: Na^+, K^+ -ATPase; inhibition; kinetic analysis; spermatozoa; male infertility.

ЭФФЕКТЫ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА ОСНОВНЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ГИДРОЛИЗА АТР УАБАИНЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ Na^+, K^+ -АТР-АЗОЙ СПЕРМАТОЗОИДОВ НЕФЕРТИЛЬНЫХ МУЖЧИН

Р.В. Фафула, О.И. Мескало, Е.И. Лычковский, З.Д. Воробець

*Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, ул. Пекарская, 69,
г. Львов, 79010, Украина*

Актуальность. Na^+, K^+ -АТФ-аза играет решающую роль в физиологии сперматозоидов и поддержании их фертилизационной способности. Na^+, K^+ -АТФ-аза является одной из мишеней для активных форм кислорода. Гиперпродукция активных форм кислорода может повреждать клетки сперматозоидов и считается одним из механизмов мужского бесплодия.

Цель работы. Оценить влияние H_2O_2 на основные кинетические параметры гидролиза АТР уабаинчувствительной Na^+, K^+ -АТФ-азой сперматозоидов фертильных (нормозооспермия) и нефертильных мужчин (астенозооспермия).

Материалы и методы. Активность Na^+, K^+ -АТФ-азы определяли спектрофотометрически по образованию P_i . Концентрационные зависимости линеаризованно в координатах Лайнуивера-Берка.

Результаты. Продемонстрировано эффективное ингибирующее влияние H_2O_2 на уабаинчувствительную Na^+, K^+ -АТФ-азную активность сперматозоидов фертильных и инфертильных мужчин. В связи с ингибирующим эффектом H_2O_2 было исследовано влияние этого агента на основные кинетические параметры гидролиза АТР с участием Na^+, K^+ -АТФ-азы. Во всем диапазоне исследуемых концентраций АТР активность Na^+, K^+ -АТФ-азы сперматозоидов фертильных и бесплодных мужчин снижена в присутствии H_2O_2 в среде инкубации. Однако, оптимальная активность Na^+, K^+ -АТФ-азы сперматозоидов мужчин с нормо- и астенозооспермией наблюдается при наличии 5 мМ АТР в инкубационной среде. Путем линеаризации полученных данных в координатах Лайнуивера-Берка определены основные кинетические параметры Na^+, K^+ -активированного, Mg^{2+} зависимого гидролиза АТР в сперматозоидах фертильных и нефертильных мужчин. Под влиянием H_2O_2 константа сродства Na^+, K^+ -АТФ-азы в АТР в сперматозоидах мужчин с нормо- и астенозооспермией растет в несколько раз. Начальная максимальная скорость гидролиза АТР существенно снижается только в сперматозоидах фертильных мужчин с нормозооспермией.

Выводы. В условиях H_2O_2 -индуцированного оксидативного стресса подавление активности уабаинчувствительной Na^+, K^+ -АТФ-азы в сперматозоидах мужчин происходит за счет снижения сродства энзима к субстрату и снижения числа оборотов фермента (только для сперматозоидов фертильных мужчин).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Na^+, K^+ -АТФ-аза; ингибирование; кинетический анализ; сперматозоиды; мужское бесплодие.

Na^+, K^+ -АТРаза (Na^+, K^+ -активована, Mg^{2+} -залежна АТР-гідролаза, ЕС 3.6.1.37) ідентифікована в різних клітинах, зокрема, і в сперматозоїдах. Дві ізоформи каталітичної субодиниці Na^+, K^+ -АТРази, $\alpha 1$ та $\alpha 4$, які мають різні каталітичні

властивості, ідентифіковано в сперматозоїдах. Сперматозоїди трансгенних мишей, нокаутних за геном $\alpha 4$, втрачали здатність до запліднення яйцеклітин, що вказує на вагомому роль Na^+, K^+ -АТР-ази для підтримання фертилізаційної здатності сперматозоїдів [2]. Відомо, що Na^+, K^+ -АТР-аза відіграє вирішальну роль у фізіології сперматозоїдів. Ензим регулює рухливість клітин, проліферацію клітин, синтез глікогену, внутрішньоклітинний кальцієвий рівень, гомеостаз йонів натрію, сигналізацію кальцію, апоптоз, тощо [3-5]. Сигнальні функції ензиму були продемонстровані в різних типах клітин, зокрема, в сперматозоїдах [1].

Гіперпродукція активних форм кисню (АФО) може пошкодити клітини сперматозоїдів і вважається одним із механізмів чоловічого неплоддя [6]. АФО постійно виробляється в більшості клітин, а їхній вміст регулюється рядом ензиматичних і неензиматичних антиоксидантів. АФО можуть змінювати структуру і функції біомолекул, включаючи поліненасичені жирні кислоти спермальних мембран, в результаті чого відбувається пероксидне окиснення ліпідів і порушення мембранних білків. Показано, що екзогенне додавання H_2O_2 збільшує рівень внутрішньоклітинних АФО в сперматозоїдах [7]. Крім утворення високоефективних реактивних молекул, H_2O_2 може викликати ряд прямих впливів на клітини, порушувати їх метаболізм та функціонування ензимів.

Метою роботи було оцінити вплив H_2O_2 на основні кінетичні параметри гідролізу АТР уабайнчутливою Na^+, K^+ -АТР-азою сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом для дослідження були зразки сім'яної рідини, яку отримували після статевої абстиненції 3-5 днів. Показники спермограм (концентрація сперматозоїдів, їх рухливість, морфологія та відсоток живих форм) оцінювали за допомогою світлооптичної мікроскопії, згідно з директивами щодо їх проведення (ВООЗ, 2010) [8]. Матеріал отримували відповідно до передбачених заходів, спрямованих на забезпечення задовільних умов збереження здоров'я пацієнта, дотримання його прав, людської гідності та морально-етичних норм. Умови відбору дослідних зразків відповідали вимогам принципів Гельсінської декларації охорони прав людини, конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину та положенням відповідних законів України. Перед включенням до дослідження всі чоловіки були ознайомлені з інформаційним листком пацієнта та давали інформовану згоду на участь в дослідженні. У дослідження включені 10 пацієнтів з астенозооспермією (зниження рухливості сперматозоїдів), які проходили первинне обстеження у зв'язку з неплоддям у консультативній поліклініці Львівської обласної клінічної лікарні. Критерії включення: вік 21-39 років, неплодність у шлюбі 1-10 років, чоловічий фактор неплодності за умов астенозооспермії. Критерії виключення: неплодність у шлюбі понад 10 років, азооспермія, надмірне вживання алкоголю та вплив будь-яких шкідливих фізико-хімічних чинників під час діагностично-лікувальних заходів. Групу контролю становили чоловіки з нормозооспермією і підтвердженим батьківством.

Сперматозоїди відмивали від плазми еякуляту 3-разовим центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 10 хв у середовищі, яке містило (ммоль/л): NaCl – 120, KCl – 30, Hepes (рН 7,4) – 30. Вміст загального протеїну в пробах визначали методом Лоурі з використанням набору виробництва НВФ "Simko Ltd" (Україна) [9].

Визначення загальної АТР-азної ензиматичної активності лімфоцитів проводили при 37° С у середовищі інкубації (об'ємом 1 мл) наступного складу (мМ): 120 NaCl , 30 KCl , 5 MgCl_2 , 5 АТР, 1 ЕГТА, 1 NaN_3 (інгібітор мітохондріальної АТР-ази), 20 Hepes-Tris -буфер (рН = 7,4), 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази

ендоплазматичного ретикулуму). Наявність Ca^{2+} -хелатора ЕГТА в середовищі інкубації забезпечувало зв'язування в ньому ендогенних іонів Ca^{2+} . Ензиматичну реакцію ініціювали внесенням до інкубаційного середовища аліквоти клітин; кількість білка у пробі не перевищувала 50 мкг/мл. Тривалість інкубації – 5 хв. Ензиматичну реакцію зупиняли додаванням 1 мл охолодженого стоп-розчину наступного складу: 1,5 М натрій ацетат, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % ТХО (рН = 4,3). Суспензію центрифугували (10 хв., 1600 g) і в отриманому безбілковому супернатанті визначали вміст неорганічного фосфору P_i . Кількість продукту реакції визначали за методом Fiske-Subbarow [10] і виражали у нмоль P_i /(хв·мг) протеїну. Уабаїнчутливу Na^+, K^+ -АТФ-азну активність обчислювали за різницею між величиною загальної АТФ-азної і базальної Mg^{2+} активності в присутності 1 мМ уабаїну [11]. Уявні кінетичні параметри, які характеризують Na^+, K^+ -активовану, Mg^{2+} -залежну АТФ-гідролазну реакцію – константу спорідненості до АТФ та початкову максимальну швидкість реакції гідролізу АТФ визначали за методом Лайнуівера-Берка. Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням програми “MS Excel-2003” для Windows. Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обчислювали критерій Стьюдента. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

В наших попередніх дослідженнях показано, що активність Na^+, K^+ -АТФ-ази сперматозоїдів чоловіків із збереженою фертильністю (нормозооспермія, група контролю) становила $46,3 \pm 4,2$ нмоль P_i /год на 1 мг протеїну. В сперматозоїдах неплідних чоловіків з астенозооспермією активність уабаїнчутливої Na^+, K^+ -АТФ-ази була суттєво нижчою і становила $23,6 \pm 2,6$ нмоль P_i /год на 1 мг протеїну. Зроблено припущення, що інгібування АТФ-азної активності сперматозоїдів чоловіків з неплідністю може бути зумовлене зниженням вмісту внутрішньоклітинного аденозинтрифосфату та пошкодженням спермальних мембран продуктами пероксидного окиснення ліпідів [12]. Na^+, K^+ -АТФ-аза є однією з мішеней для АФО. Сперматозоїди піддавали H_2O_2 -індукованому окисному стресу. Показано дозозалежний інгібувальний ефект H_2O_2 на уабаїнчутливу активність Na^+, K^+ -АТФ-ази сперматозоїдів плідних та неплідних чоловіків з різними формами патоспермій. Ми припускаємо, що можливими механізмами інгібування є окиснення функціонально важливих тіольних залишків ензиму H_2O_2 .

Отримані результати узгоджуються з даними інших досліджень. Зокрема, показано пригнічення Na^+, K^+ -АТФ-азної активності в тучних клітинах за наявності 0,5 мМ H_2O_2 (Derham et al., 2003) [13]. Liu et al. показали, що окисний стрес, індукований АФО, викликав такі ж ефекти як і уабаїн і пригнічував активність Na^+, K^+ -АТФ-ази [14]. Проте, в інших дослідженнях виявлено різке зростання Na^+, K^+ -АТФ-азної активності в *Leishmania amazonensis* у відповідь на низькі (0,1 мкМ) концентрації H_2O_2 (Россо-Machado et al., 2015) [15].

Пригнічення активності Na^+, K^+ -АТФ-ази може бути зумовлене оксидативним стресом, який супроводжується ліпопероксидацією спермальних мембран. Сперматозоїди особливо чутливі до гіпероксидації внаслідок наявності в складі їх мембран високої концентрації поліненасичених жирних кислот та через неможливість репарації ДНК. Поліненасичені жирні кислоти є головними мішенями процесів гіпероксидації, які ведуть до зниження в'язкості та інших структурних перебудов спермальних мембран [16, 17]. Відомо, що одним із найбільш чутливих маркерів пероксидного окиснення ліпідів та оксидативного стресу є ТБК-активні продукти [18].

В наших попередніх дослідженнях [19] виявлено значне підвищення вмісту ТБК-позитивних продуктів в сперматозоїдах чоловіків з астенозооспермією.

У зв'язку з інгібуючим ефектом H_2O_2 було досліджено вплив цього ефектора на основні кінетичні параметри гідролізу АТФ за участю Na^+, K^+ -АТФ-ази. В діапазоні концентрацій АТФ від 1 до 5 мМ (за сталої концентрації $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Mg}^{2+}$) відбувається монотонне збільшення ензиматичної активності уабічутливої Na^+, K^+ -АТФ-ази з виходом на плато. У всьому діапазоні досліджуваних концентрацій АТФ активність Na^+, K^+ -АТФ-ази сперматозоїдів плідних та неплідних чоловіків знижена за присутності H_2O_2 в середовищі інкубації. Проте, оптимальна активність Na^+, K^+ -АТФ-ази сперматозоїдів чоловіків з нормо- та астенозооспермією спостерігається за наявності 5 мМ АТФ в інкубаційному середовищі (рис. 1). Характер залежності Na^+, K^+ -АТФ-азної активності від субстрату для інших досліджуваних груп інфертильних чоловіків був схожий.

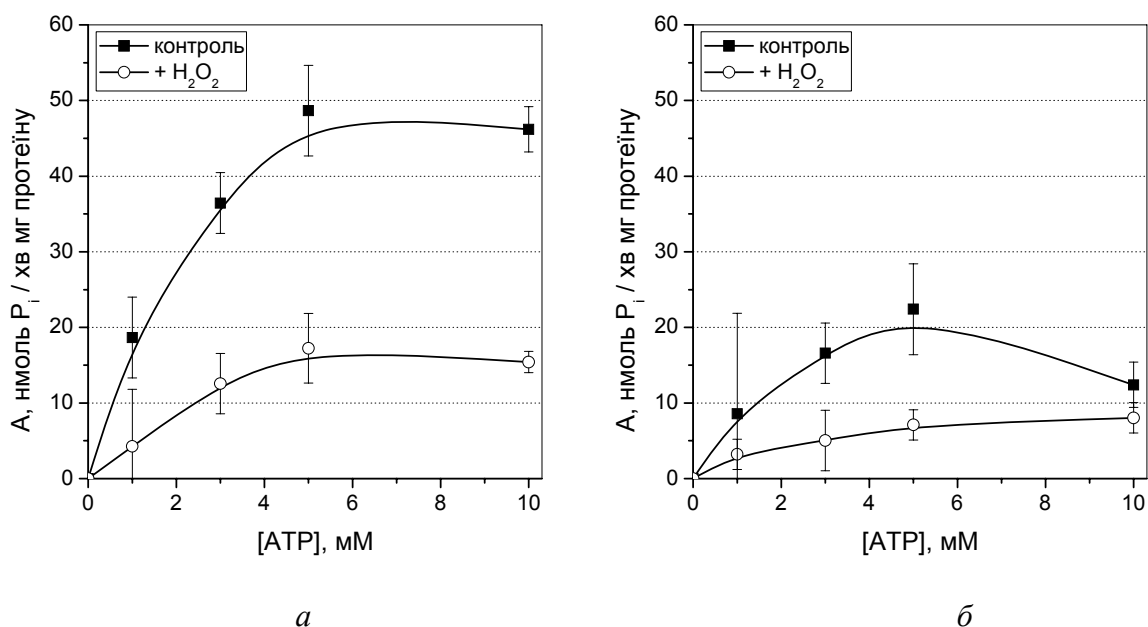


Рис. 1. Вплив 100 нМ H_2O_2 на активність Na^+, K^+ -АТФ-ази сперматозоїдів фертильних (а, нормозооспермія) та інфертильних (б, астенозооспермія) чоловіків за зміни концентрації АТФ в середовищі інкубації.

Для з'ясування можливого механізму зміни ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТФ-ази в сперматозоїдах чоловіків проведено визначення основних кінетичних параметрів Na^+, K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу (рис. 2). Як видно з рис. 2, криві залежностей $\{1/V; 1/[\text{АТФ}]\}$ за наявності інгібітора в середовищі інкубації відрізняються тангенсом кута нахилу.

Шляхом лінеаризації отриманих даних у координатах Лайнуівера - Берка визначено основні кінетичні параметри Na^+, K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ в сперматозоїдах фертильних та інфертильних чоловіків (рис. 3).

За дії H_2O_2 константа спорідненості Na^+, K^+ -АТФ-ази до АТФ в сперматозоїдах чоловіків з нормо- і астенозооспермією зростає в декілька разів. Початкова максимальна швидкість гідролізу АТФ суттєво знижується лише в сперматозоїдах фертильних чоловіків з нормозооспермією.

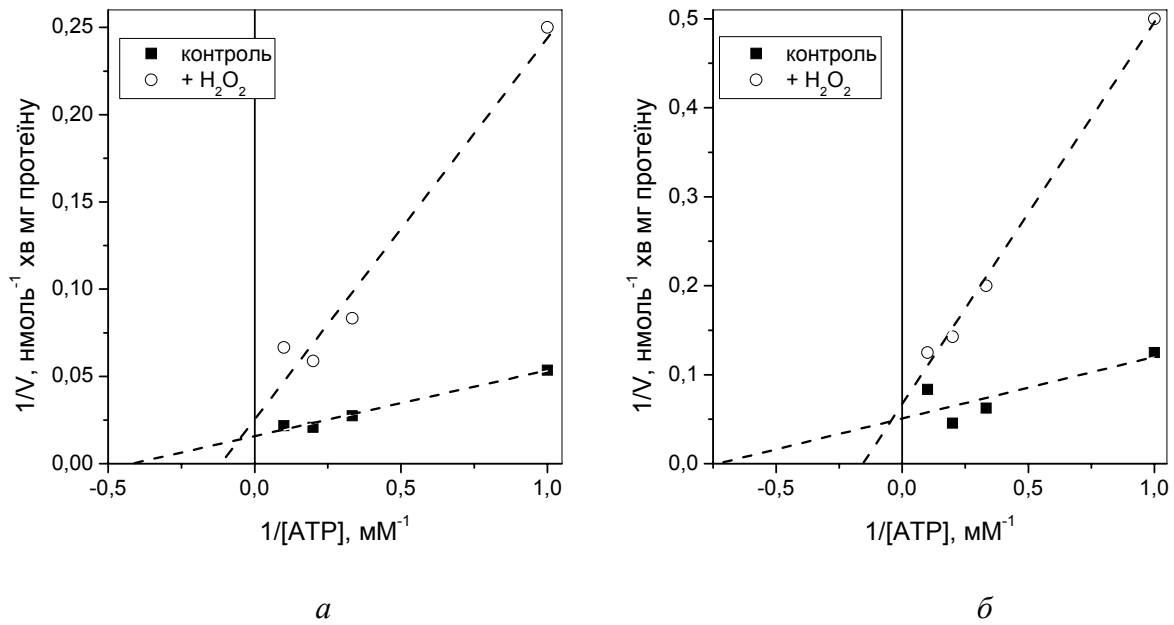


Рис. 2. Лінеаризація концентраційних кривих, наведених на рис. 1, у координатах Лайнуівера-Берка, де V – уабайнчутлива Na^+ , K^+ -АТР-азна активність в сперматозоїдах фертильних (а, нормозооспермія) та інфертильних (б, астенозооспермія) чоловіків.

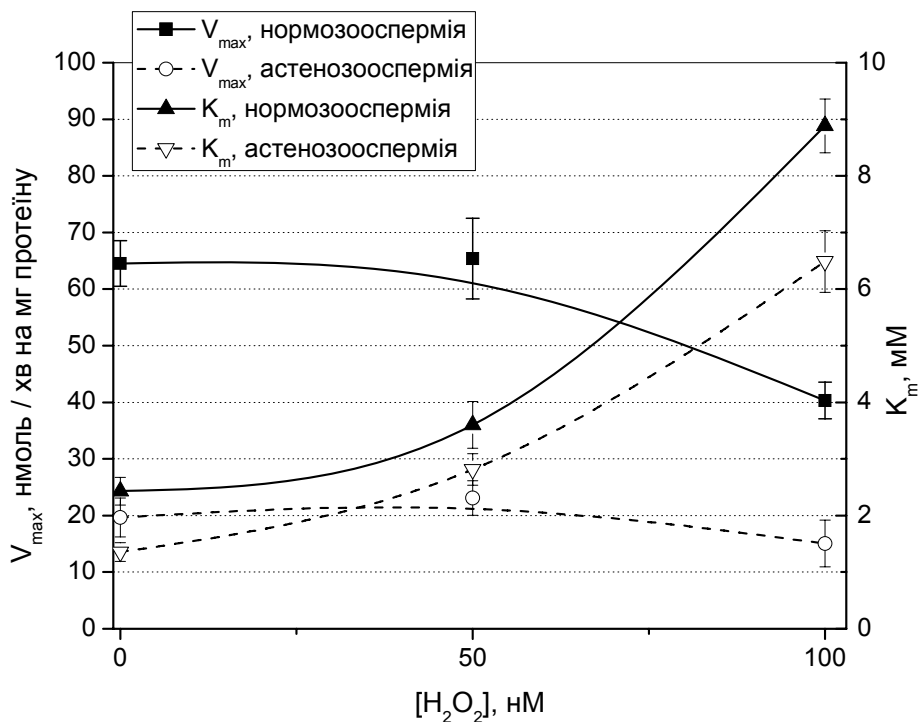


Рис. 3. Вплив різних концентрацій H_2O_2 на кінетичні параметри за АТР (K_m і V_{max}) в сперматозоїдах фертильних та інфертильних чоловіків.

Отже, за формальними ознаками за умов дії H_2O_2 в сперматозоїдах фертильних чоловіків з нормозооспермією спостерігається змішаний тип інгібування (зростає спорідненість до субстрату, знижується максимальна швидкість реакції). Проте, в

сперматозоїдах інфертильних чоловіків спостерігається неконкурентний тип інгібування (зростає спорідненість до субстрату, максимальна швидкість реакції достовірно не змінюється).

ВИСНОВКИ

За умов H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу пригнічення активності убаїнчутливої Na^+, K^+ -АТФ-ази в сперматозоїдах чоловіків відбувається за рахунок зниження спорідненості ензиму до субстрату та зниження числа обертів ензиму (лише для сперматозоїдів фертильних чоловіків).

Подяка

Стаття містить результати досліджень НДР “Молекулярно-біологічні регуляторні механізми порушення запліднювальної здатності сперматозоїдів і розробка нових імунобіохімічних методів діагностики фертильності у чоловіків”, проведених за грантом Президента України (розпорядження № 97/2016-рп від 13.04.2016 р.).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

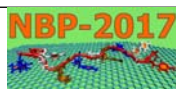
1. Thundathil J. C., Anzar M., Buhr M. M. Na^+/K^+ -ATPase as a signaling molecule during bovine sperm capacitation // *Biology of Reproduction*. 2006. Vol.75. P. 308–317.
2. Sanchez G., Nguyen A. T., Timmerberg B., Tash J. S., Blanco G. The Na, K -ATPase $\alpha 4$ isoform from humans has distinct enzymatic properties and is important for sperm motility // *Molecular Human Reproduction*. 2006. Vol. 12. P. 565–576.
3. Barwe S. P., Anilkumar G., Moon S. Y., Zheng Y., Whitelegge J. P., Rajasekaran S. A., Rajasekaran A. K. Novel role for Na, K -ATPase in phosphatidylinositol 3-kinase signaling and suppression of cell motility // *Molecular Biology of the Cell*. 2005. Vol. 16(3). P. 1082–1094.
4. Khundmiri S. J., Metzler M. A., Ameen M., Amin V., Rane M. J., Delamere N. A. Ouabain induces cell proliferation through calcium-dependent phosphorylation of Akt (protein kinase B) in opossum kidney proximal tubule cells // *American Journal of Physiology, Cell Physiology*. 2006. Vol. 291(6). P. 1247–1257.
5. Nguyen N. T., Wallace D. P., Blanco G. Ouabain binds with high affinity to the Na, K -ATPase in human polycystic kidney cells and induces extracellular signal-regulated kinase activation and cell proliferation // *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007. Vol. 18(1), P. 46–57.
6. Mahfouz R. Z., du Plessis S. S., Aziz N., Sharma R., Sabanegh E., Agarwal A. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress // *Fertility and Sterility*. 2010. Vol. 93(3). P. 814–821.
7. Mahfouz R. Z., Aziz N., Sharma R., Bykova M., Sabanegh E., Agarwal A. Assessment of intracellular human sperm reactive oxygen species after hydrogen peroxide exposure using four different probes // *Fertility and Sterility*. 2008. Vol. 90(Suppl 1). P. 320–321.
8. WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen, in 5th ed (2010). WHO, 271 p.
9. Онуфрович О. К., Фафула Р. В., Наконечний Й. А., Воробець Д. З., Єфремова У. П., Воробець З. Д. Активність глутатіонзалежних ензимів сперматозоїдів за умов патоспермії // *Медицина та клінічна хімія*. 2016. Т. 18. № 4. С. 5–10.
10. Vignini A, Buldreghini E., Nanetti L., Amoroso S., Boscaro M., Ricciardo-Lamonica G., Mazzanti L., Balercia G. Free thiols in human spermatozoa: are Na^+/K^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase activities involved in sperm motility through peroxynitrite formation? // *Reproductive BioMedicine Online*. 2009. Vol. 18(1). P. 132–140.
11. Мельник О. В., Корнійчук О. П., Першин О. І., Воробець З. Д. Властивості Na^+, K^+ -активованої, Mg^{2+} -залежної АТФ-гідролази лімфоцитів крові у хворих на реактивний артрит. // *Вісник Дніпропетровського університету. Серія Біологія. Медицина*. 2014. № 4(2). С. 57–62.
12. Meskalo O. I., Fafula R. V., Lychkovskij E. I., Vorobets Z. D. Na^+, K^+ -ATPase and $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity in spermatozoa of infertile men with different forms of pathospermia // *Studia Biologica*. 2017. Vol. 11(2). P. 5–12.
13. Derham B. K., Ellory J. C., Bron A. J., & Harding J. J. The molecular chaperone α -crystallin incorporated into red cell ghosts protects membrane Na/K -ATPase against glycation and oxidative stress // *European Journal of Biochemistry*. 2003. Vol. 270. P. 2605–2611.

14. Liu J., Kesiry R., Periyasamy S. M., Malhotra D., Xie Z., Shapiro J. I. Ouabain induces endocytosis of plasmalemmal Na/K-ATPase in LLC-PK1 cells by a clathrin-dependent mechanism // *Kidney International*. 2004. Vol. 66(1). P. 227–241.
15. Rocco-Machado N., Cosentino-Gomes D., Meyer-Fernandes J. R. Modulation of Na⁺/K⁺ ATPase activity by hydrogen peroxide generated through heme in *L. amazonensis* // *PLoS One*. 2015. Vol. 10(6), e0129604.
16. Colagar A. H., Karimi F., Jorsaraei S. G. A. Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno- and oligoastheno- teratospermic men // *Iran. Red. Cresc. Med. J*. 2013. Vol. 15 (9). P. 780–785.
17. Aitken R. J., Jones K. T., Robertson S. A. Reactive oxygen species and sperm function – in sickness and in health // *J. Androl*. 2012. Vol. 33(6). P. 1096–1106.
18. Januszewski A. S., Alderson N. L., Jenkins A. J., Thorpe S. R., Baynes J. W. Chemical modification of proteins during peroxidation of phospholipids // *Journal of Lipid Research*. 2005. Vol. 46(7). P. 1440–1449.
19. Фафула Р.В., Онуфрович О.К., Єфремова У.П., Наконечний Й.А., Воробець З.Д. Інтенсивність процесів ліпопероксидації у сперматозоїдах чоловіків із порушенням фертильності // *Вісник проблем біології та медицини*. 2017. Vol. 1 (135). P. 199–204.

REFERENCES

1. Thundathil, J. C., Anzar, M., Buhr, M. M. (2006). Na⁺/K⁺-ATPase as a signaling molecule during bovine sperm capacitation. *Biology of Reproduction*, 75, 308–317.
2. Sanchez, G., Nguyen, A. T., Timmerberg, B., Tash, J. S., Blanco, G. (2006). The Na,K-ATPase a4 isoform from humans has distinct enzymatic properties and is important for sperm motility. *Molecular Human Reproduction*, 12, 565–576.
3. Barwe, S. P., Anilkumar, G., Moon, S. Y., Zheng, Y., Whitelegge, J. P., Rajasekaran, S. A., & Rajasekaran, A. K. (2005). Novel role for Na,K-ATPase in phosphatidylinositol 3-kinase signaling and suppression of cell motility. *Molecular Biology of the Cell*, 16(3), 1082–1094.
4. Khundmiri, S. J., Metzler, M. A., Ameen, M., Amin, V., Rane, M. J., Delamere, N. A. (2006). Ouabain induces cell proliferation through calcium-dependent phosphorylation of Akt (protein kinase B) in opossum kidney proximal tubule cells. *American Journal of Physiology, Cell Physiology*, 291(6), P. 1247–1257.
5. Nguyen, N. T., Wallace, D. P., Blanco, G. (2007). Ouabain binds with high affinity to the Na,K-ATPase in human polycystic kidney cells and induces extracellular signal-regulated kinase activation and cell proliferation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(1), 46–57.
6. Mahfouz, R. Z., du Plessis, S. S., Aziz, N., Sharma, R., Sabanegh, E., Agarwal, A. (2010). Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. *Fertility and Sterility*, 93(3), 814–821.
7. Mahfouz, R. Z., Aziz, N., Sharma, R., Bykova, M., Sabanegh, E., Agarwal, A. (2008). Assessment of intracellular human sperm reactive oxygen species after hydrogen peroxide exposure using four different probes. *Fertility and Sterility*, 90(1), 320–321.
8. WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen (2010). WHO.
9. Onufrovych, O. K., Fafula, R. V., Nakonechnyi, Io. A., Vorobets, D. Z., Iefremova, U. P., Vorobets, Z. D. (2016). Activity of glutathione-dependent enzymes in spermatozoa in patients with pathospermia. *Medical and Clinical Chemistry*, 18(4), 5–10. (in Ukrainian)
10. Vignini, A., Buldreghini, E., Nanetti, L., Amoroso, S., Boscaro, M., Ricciardo-Lamonica, G., Mazzanti, L., Balercia, G. (2009). Free thiols in human spermatozoa: are Na⁺/K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase activities involved in sperm motility through peroxynitrite formation? *Reproductive BioMedicine Online*, 18(1), 132–140.
11. Melnyk O. V., Kornijchuk O. P., Pershyn O.I., Vorobets Z.D. (2014). Properties of Na⁺,K⁺-activated, Mg²⁺-dependent ATP-hydrolase of blood lymphocytes in patients with reactive arthritis. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Med.*, 4(2), 57–62. (in Ukrainian)
12. Meskalo, O. I., Fafula, R. V., Lychkovskiy, E. I., Vorobets, Z. D. (2017). Na⁺, K⁺ -ATPase and Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase activity in spermatozoa of infertile men with different forms of pathospermia. *Studia Biologica*, 11(2), 5–12.
13. Derham, B. K., Ellory, J. C., Bron, A. J., & Harding, J. J. (2003). The molecular chaperone a-crystallin incorporated into red cell ghosts protects membrane Na/K-ATPase against glycation and oxidative stress. *European Journal of Biochemistry*, 270, 2605–2611.
14. Liu, J., Kesiry, R., Periyasamy, S. M., Malhotra, D., Xie, Z., Shapiro, J. I. (2004). Ouabain induces endocytosis of plasmalemmal Na/K-ATPase in LLC-PK1 cells by a clathrin-dependent mechanism. *Kidney International*, 66(1), 227–241.
15. Rocco-Machado, N., Cosentino-Gomes, D., Meyer-Fernandes, J. R. (2015). Modulation of Na⁺/K⁺ ATPase activity by hydrogen peroxide generated through heme in *L. amazonensis*. *PLoS One*, 10(6), e0129604.

16. Colagar, A. H., Karimi, F., Jorsaraei, S. G. A. (2013). Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno- and oligoastheno- teratospermic men. *Iran. Red. Cresc. Med. J.*, 15(9), 780–785.
17. Aitken, R. J., Jones, K. T., Robertson, S. A. (2012). Reactive oxygen species and sperm function – in sickness and in health. *J. Androl.*, 33(6), 1096–1106.
18. Januszewski, A. S., Alderson, N. L., Jenkins, A. J., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. (2005). Chemical modification of proteins during peroxidation of phospholipids. *Journal of Lipid Research*, 46(7), 1440–1449.
19. Fafula, R. V., Onofrovych, O. K., Iefremova, U. P., Nakonechnyi, Io. A., Vorobets, Z. D. (2017). Інтенсивність процесів ліпопероксидації у сперматозоїдах чоловіків із порушенням фертильності. [Intensity of processes of lipid peroxidation in sperm of men with fertility breach]. *Bulletin of problems biology and medicine*, 1 (135), 199–204. (in Ukrainian).



УДК 577.322

PROTEIN-DNA COMPLEXATION: CONTACT PROFILES IN DNA GROOVES

M.Yu. Zhitnikova¹, A.V. Shestopalova^{1,2}

¹*O. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics, Natl. Acad. of Sci. of Ukraine,
Acad. Proskury Street, 12, Kharkiv, 61085, Ukraine*

²*V.N. Karazin Kharkiv National University, Svobody sq., 4, Kharkiv, 61022, Ukraine
e-mail: allusio@gmail.com*

Submitted November 1, 2017

Accepted November 17, 2017

Background: Investigation of the specific protein-DNA complexation mechanisms allows to establish general principles of molecular recognition, which must be taken into account while developing artificial nanostructures based on DNA, and to improve the prediction efficiency of the protein binding sites on DNA. One of the main characteristics of the protein-DNA complexes are the number and type of contacts in the binding sites of DNA and proteins. Conformational changes in the DNA double helix can cause changes in these characteristics.

Objectives: The purpose of our study is to establish the features of the interactions between nucleotides and amino acid residues in the binding sites of protein-DNA complexes and their dependence on the conformation of deoxyribose and the angle γ of the polynucleotide chain.

Materials and methods: At research of protein-DNA recognition process we have analyzed the contacts between amino acids and nucleotides of the 128 protein-DNA complexes from the structural databases. Conformational parameters of DNA backbone were calculated using the 3DNA/CompDNA program. The number of contacts was determined using a geometric criterion. Two protein and DNA atoms were considered to be in contact if the distance between their centers is less than 4.5 Å. Amino acid residues were arranged according to hydrophobicity scale as hydrophobic or nonpolar and polar.

Results: The analysis of contacts between polar and hydrophobic residues and nucleotides with different conformations of the sugar-phosphate backbone showed that nucleotides form more contacts with polar amino acids in both grooves than with hydrophobic ones regardless of nucleotide conformation. But the profile of such contacts differs in minor and major grooves and depends on the conformation of both deoxyribose and γ angle. The contact profiles are characterized by the sequence-specificity or the different propensity of nucleotides to form contacts with the residues in both grooves.

Conclusions: Our analysis have shown, that the amount and type of protein-nucleic contacts and their distribution in the grooves depend on the conformation of the sugar-phosphate backbone, the nucleotide sequence and the type of amino acids in the binding sites.

KEY WORDS: protein-DNA recognition; protein-DNA contacts; DNA structure; binding site prediction; structural variations.

КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ БІЛКИ-ДНК: КОНТАКТНІ ПРОФІЛІ В ЖОЛОБКАХ ДНК

М.Ю. Житнікова¹, Г.В. Шестопалова^{1,2}

¹*Інститут радіофізики та електроніки ім. О.Я.Усикова НАН України,
вул. Акад. Проскури, 12, Харків, 61085, Україна*

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

Актуальність. Дослідження механізмів специфічного білково-нуклеїнового комплексоутворення дозволяє встановити загальні принципи молекулярного впізнавання, які необхідно враховувати при розробці штучних наноструктур на основі біополімерів, а також для підвищення ефективності прогнозування сайтів зв'язування білків і ДНК. Одними з основних характеристик білково-нуклеїнових комплексів є кількість і тип контактів в сайтах зв'язування ДНК і білків. Конформаційні перебудови подвійної спіралі ДНК можуть викликати зміни цих характеристик.

Мета роботи. Метою нашого дослідження було визначення особливостей взаємодії між нуклеотидами і амінокислотними залишками в сайтах зв'язування білково-нуклеїнових комплексів в залежності від конформації дезоксирибози і кута γ полінуклеотидного ланцюга.

Матеріали і методи. При дослідженні механізмів білково-нуклеїнового впізнавання ми встановили міжмолекулярні контакти для 128 білково-нуклеїнових комплексів із структурних баз даних. Конформаційні параметри цукрофосфатного остову ДНК розраховувалися за допомогою пакету програм 3DNA/CompDNA. Кількість білково-нуклеїнових контактів визначалася за

геометричним критерієм. Два атома білка і ДНК вважалися взаємодіючими, якщо відстань між їх центрами була менша 4,5 Å. Амінокислотні залишки позначалися за шкалою гідрофобності як гідрофобні або неполярні та полярні.

Результати. Аналіз розподілу білково-нуклеїнових контактів показав, що нуклеотиди, незалежно від конформації, утворюють в обох жолобках більше контактів з полярними амінокислотними залишками, ніж з гідрофобними. Але профіль таких контактів різниться в малому і великому жолобках і залежить як від конформації дезоксирибози, так і кута γ . Контактні профілі також характеризуються сиквенс-специфічністю або різною схильністю нуклеотидів до взаємодій з амінокислотними залишками в обох жолобках.

Висновки. Кількість і тип білково-нуклеїнових контактів та їх розподіл по жолобках залежать від конформації цукрофосфатного остову, нуклеотидної послідовності і типу амінокислот в сайтах зв'язування.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: білково-нуклеїнове впізнавання; білково-нуклеїнові контакти; структура ДНК; передбачення сайтів зв'язування; структурні варіації.

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ БЕЛКИ-ДНК: КОНТАКТНЫЕ ПРОФИЛИ В ЖЕЛОБКАХ ДНК

М.Ю. Житникова¹, А.В. Шестопалова^{1,2}

¹Институт радиофизики и электроники им. А.Я.Усикова НАН Украины,
ул. Акад.Прокура, 12, Харьков, 61085, Украина

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

Актуальность. Исследование механизмов специфического белково-нуклеинового комплексообразования позволяет установить общие принципы молекулярного узнавания, которые необходимо учитывать при разработке искусственных наноструктур на основе биополимеров, а также для повышения эффективности прогнозирования сайтов связывания ДНК и белков. Одними из основных характеристик белково-нуклеиновых комплексов являются количество и тип контактов в сайтах связывания ДНК и белков. Конформационные перестройки двойной спирали ДНК могут вызывать изменения этих характеристик.

Цель работы. Целью нашего исследования было определение особенностей взаимодействия между нуклеотидами и аминокислотными остатками в сайтах связывания белково-нуклеиновых комплексов в зависимости от конформации дезоксирибозы и угла γ полинуклеотидной цепи.

Материалы и методы. При исследовании механизмов белково-нуклеинового узнавания мы установили межмолекулярные контакты для 128 белково-нуклеиновых комплексов из структурных баз данных. Конформационные параметры сахаро-фосфатного остова рассчитывались с помощью пакета программ 3DNA/CompDNA. Количество контактов определялось с помощью геометрического критерия. Два атома белка и ДНК считались взаимодействующими, если расстояние между их центрами меньше 4,5 Å. Аминокислотные остатки распределялись по шкале гидрофобности как гидрофобные или неполярные и полярные.

Результаты. Анализ распределения белково-нуклеиновых контактов показал, что нуклеотиды, независимо от конформации, образуют в обоих желобках больше контактов с полярными аминокислотными остатками, чем с гидрофобными. Но профиль таких контактов различается в малом и большом желобках и зависит как от конформации дезоксирибозы, так и угла γ . Контактные профили также характеризуются сиквенс-специфичностью или различной склонностью нуклеотидов к взаимодействиям с аминокислотными остатками в обоих желобках.

Выводы. Количество и тип белково-нуклеиновых контактов и их распределение по желобкам зависят от конформации сахарофосфатного остова, нуклеотидной последовательности и типа аминокислот в сайтах связывания.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: белково-нуклеиновое узнавание; белково-нуклеиновые контакты; структура ДНК; предсказание сайтов связывания; структурное многообразие.

Molecular recognition of DNA by proteins is a fundamental problem in molecular biology and drug design. Investigation of the mechanisms of specific protein-DNA complexation allows us to establish general principles of the molecular recognition, which must be taken into account while developing artificial nanostructures based on DNA, and, also, to improve the efficiency of the prediction of protein-DNA binding sites. The prediction of DNA binding sequences for proteins is an unsolved problem, but significant progress has occurred in the last years [1]. To improve the reliability of DNA-binding sites prediction, some problems must be solved. Primarily

structural and physicochemical complementarity between DNA sequences and proteins or between the DNA nucleotides and interacting amino acid residues are the principal factors of specificity. That is the binding site information is depending on both protein and DNA structure [2]. For most of protein-DNA complexes the location and sequences of binding sites are not defined. Their experimental determination requires expensive methods. But if we have the information about the spatial structures of the complexes, it is possible for us to predict *in silico* protein-DNA binding sites [3-5].

One of the characteristics of protein-DNA complexation is the number and type of the contacts in protein-DNA binding sites. The detailed analysis of protein-DNA interactions are presented in Refs. [6,7]. Authors have determined all protein-nucleic contacts and separated them according to the types of interactions and possible places of their formation in complexes. They have found that the most common types of protein-nucleic interactions are hydrogen bonds and van der Waals contacts. As for the primary binding sites it turned out that more than two-thirds of the protein contacts are formed with the DNA sugar-phosphate backbone.

Simultaneously conformational changes in DNA can lead to changes in the protein-DNA contact profiles, which are formed, as a rule, in the grooves of the double helix [8, 9]. Since, the DNA shape can implicate to protein-DNA binding specificity [9], we also have to look for any peculiar properties of DNA shape.

It should be noted that in protein-DNA binding sites is observed an enriched occurrence of the A-like conformers and mixed A/B conformers [10]. The tendency of A-like nucleotides appearance in surface of protein-DNA complexes is accompanied by a transition of the deoxyribose from the C2'-endo (B-like) to C3'-endo (A-like) sugar pucker. This effect is known as the 'sugar switching' and facilitating by hydrophobic interactions in the minor groove [8, 11]. Unusual DNA conformers are often concentrated in the DNA binding sites of protein-DNA complexes. Obviously the propensity of DNA to adopt unusual conformers is essential for their recognition by proteins. The occurrence of these non-canonical forms of the DNA double helix can also explain the role of such DNA structures for evolution [12].

Typical re-arrangements of the DNA sugar-phosphate backbone in the complexes with protein involve B→A sugar switching and rotations around the four torsion angles (α , γ , ϵ , ζ) with following possible conformations: *gauche+* (*g+*), *trans* (*t*), *gauche-* (*g-*) [8,13,14]. Earlier [15] we focused on the question of how the transition of the γ angle (O5'-C5'-C4'-C3') in the DNA sugar-phosphate backbone from classical *g+* to alternative *t* and *g-* conformations affects the local DNA interface accessible for interaction with proteins in the minor and major grooves and evaluate the sequence dependence of such transitions?

The purpose of this study is to establish the features of the interactions between nucleotides and amino acid residues in protein-DNA binding sites depending on the conformation of deoxyribose and the angle γ of the polynucleotide chain. The results are based on the statistical analysis of crystallographic structures of protein-DNA complexes from the NDB database [16].

MATERIALS AND METHODS

Data set of crystallographic structures

The data-set of the 128 protein-DNA complexes was generated for comprehensive analysis. For the structure selection we use crystallographic coordinates of the protein-DNA complexes extracted from the Nucleic acids Data Bank [16].

The resolution of structures solved by the X-ray crystallography is better than 1.9 Å. This resolution has been previously identified as the one that ensures accurate determination of the

sugar puckers and backbone torsion angles as well as statistical analysis of their distribution [13]. All chosen complexes were defined as any structure containing one or more protein chains and at least one double-stranded DNA with more than 4 nucleotides in each chain. From this set we excluded modified and terminal unpaired nucleotides. In order to avoid the end effects, the terminal base pairs on both ends of each DNA structure are excluded from the analysis. Moreover, the data-set is non-redundant, i.e. only one structure is selected from the group of complexes containing an identical protein or its mutants. The preference is given to the complexes with wild-type proteins and better resolution.

Calculation of the DNA structural parameters

The values of the dihedral angle γ of the DNA backbone (O5'–C5'–C4'–C3') and the angle of pseudorotation (P) of the sugar ring for each nucleotide are calculated by means of the 3DNA/CompDNA analyzer [17].

The angle γ values are classified as *gauche+* (*g+*), *trans* (*t*), and *gauche-* (*g-*) according to the classical threefold staggered pattern of the dihedrals: *g+* ($60^\circ \pm 30^\circ$), *t* ($180^\circ \pm 30^\circ$), *g-* ($300^\circ \pm 30^\circ$). The sugar pucker is sorted into the categories of «south» B-like ($120^\circ < P < 220^\circ$) and «north» A-like sugars ($-60^\circ < P < 60^\circ$). The nucleotides with stereochemically unfavorable P and γ values outside of these domains are not included into analysis.

Revealing the atom–atom contacts in the protein–DNA binding sites

An amino acid residue is considered as forming contacts if the distance between the atoms of the residues and the nucleotide atoms is less than a cutoff radius. Several studies have used different methods of definitions of protein-DNA contacts in the binding sites [1, 18]. Two atoms of the residue and nucleotide are considered to form contact if the distance between their centers is less than 4.5 Å [7, 8] and afterward authors in Ref. [19] declared that this cutoff distance gave the best determination of binding and nonbinding residues to predict binding sites.

We also use the cutoff value of 4.5 Å in our investigation. In this way, we find atoms interacting according to all different mechanisms (hydrogen bonds, electrostatic interactions, and van der Waals interactions). We identify the contacting pairs of atoms in the protein–DNA binding sites by means of the modified software package proposed in [8] that distinguishes contacts in the major and minor grooves. The atoms of bases are also divided into groups exposed in the major (N4, N6, N7, O4, O6, C5, C6, C7, C8, and C4 in Thymine and Cytosine) and minor grooves (N2, N3, O2, C2, and C4 in Adenine and Guanine). The nucleotides which contain atoms contacting with protein are classified as interacting nucleotides, with further subdivision into those interacting in the minor and major grooves.

Twenty amino acids have different hydrophobic and polar properties [20,21]. In our analysis all amino acid residues are separated as hydrophobic or nonpolar IFVLMAGC and polar WYTPSHENQDKR residues (denote by one-letter codes) according to the hydrophobicity scale [22].

RESULTS AND DISCUSSION

Distribution of the protein-DNA contacts

In previous investigation [15] we have shown that the ability of the nucleotides to participate in contacts with protein residues for the both grooves is connected with conformations of their sugar moiety and torsion angle γ . Now more detail analysis presented in this investigation allowed us to make some clarifications. The protein–DNA interactions were calculated for 128 protein-DNA complex structures. These complexes include 1765 nucleotides: 230 A-like nucleotides

and 1535 B-like ones. The nucleotides in the classical conformation (1352 nucleotides with the B-conformation of deoxyribose and $g+$ conformation of the γ angle) are the most frequently found, while the other conformations are much less frequent. For A-like nucleotides there are: 152 $g+$ classical and 71 t alternative nucleotides, for B-like: 1352 $g+$, 53 $g-$ and 38 t . However, as previously reported [8,9,13-15], such alternative conformations can play an important role in the process of indirect proteins recognition of their binding site on DNA sequence. The more detailed scheme of the structure selection and base composition can be found in Ref. [15].

In total we have analyze the 26293 amino acid–DNA contacts. The numbers of contacts between amino acid and DNA in the both grooves are counted separately for bases and sugar-phosphate backbone. Then, all nucleotides were divided according to their deoxyribose conformation (the A-like or the B-like) and conformation of γ angle (classical $g+$ and alternative t or $g-$).

At first we consider the distribution of the protein–DNA interactions between the grooves. According to our data (Table 1) A-like nucleotides more often interact with proteins in a minor groove (3853 (2351 $g+$) and 2793 (1682 $g+$) contacts in minor and major groove, respectively), while B-like nucleotides more often form contacts with protein residues in the major groove (8446 (7918 $g+$) and 11935 (10368 $g+$) contacts in minor and major groove respectively) regardless of the γ angle conformation. But it should be noted that alternative A-like nucleotides form more contacts in the grooves (1503 and 1111 contacts in minor and major groove, respectively) than alternative B-like nucleotides with both t and $g-$ angle γ conformations (528 and 967 contacts in minor and major groove, respectively).

Table 1

Number of amino acid residue contacts with bases and sugar-phosphate backbone for different nucleotides in the both grooves

	Minor groove					Major groove				
	A-like		B-like			A-like		B-like		
	$g+$	t	$g+$	t	$g-$	$g+$	t	$g+$	t	$g-$
Base contacts										
A	106	20	244	0	0	105	48	774	21	15
C	73	12	107	7	0	336	94	757	75	27
G	44	74	394	25	13	119	247	1342	37	52
T	72	24	127	0	12	151	88	1071	30	67
Sugar-phosphate backbone contacts										
A	455	362	1858	9	28	186	96	1507	160	28
C	791	164	1557	157	25	401	140	1171	100	68
G	348	599	2196	86	42	131	225	1958	75	70
T	462	248	1435	53	71	253	173	1653	64	78

Hence the conformational transitions of sugar-phosphate backbone do not interfere with the formation of the protein–DNA contacts in both grooves even facilitating their realization in some particular situations (see below).

Then we examine the location of contacts in the grooves and determine that near 3/4 of the protein–DNA contacts are formed with the sugar-phosphate backbone (19483 contacts or 74%), and the rest one (6810 contacts or 26%) are formed with bases. At the same time the distribution of the contacts between the grooves are differed. In the minor groove only 10% of interactions are the contacts between residues and bases, and 90% of residues contacts are formed with sugar-phosphate backbone. In the major groove the number of contacts with bases increases up to 39%. These results are in agreement with the well-known idea that specific protein contacts with DNA

bases are realized in the major groove whereas nonspecific interactions with the sugar-phosphate backbone are occurred in the minor groove [2,6,8,].

But the percentage of contacts between protein and bases or backbone atoms in the grooves is different for nucleotides with various conformations of the sugar-phosphate backbone. In the minor groove, the transition to alternative *t* conformation of the angle γ increases the participation of backbone atoms in the contacts with proteins, especially for A-like nucleotides: from 88% for *g+* state to 91.4% for *t* state. In the major groove, only the transition of B-like nucleotides to *t* γ angle conformation alters the participation of nucleotides in the contacts, increasing the number of backbone atom contacts (from 62 to 71%).

That is, transitions to alternative conformations of the angle γ can influence the features of protein-nucleic interactions primarily in the minor groove.

We also can notice some common patterns in the sequence-specificity of contacts for nucleotides with different sugar-phosphate backbone conformations.

In total the greatest number of contacts with amino acid residues forms nucleotides containing Guanine, while the other three types of nucleotide create practically the equal number of contacts. The decreasing order of contact propensity is: Guanine > Thymine > Cytosine \geq Adenine. This result is explained by the fact that Guanine exposes the greatest number of potential hydrogen-bonding atoms on the base edges [6] and only Guanine can serve as a hydrogen bond donor in the minor groove [23].

Conformational angle γ transitions and sugar switching lead to a different participation of all four types of nucleotides in the protein-DNA contacts.

It should be noted, that B-like alternative nucleotides contained Guanine are involved in contacts between Guanine and amino acid residues in the minor groove while B-like alternative nucleotides containing Adenine, do not form any contacts between Adenine and amino acid residues. Interesting, that Thymine nucleotides with B-like deoxyribose and *g-* γ angle conformation more often take part in the protein-DNA contacts in comparison to other conformations. Obviously this conformation promotes the interaction of the Thymine bases with amino acids, which can be one of the ways of the indirect recognition mechanism realization.

For A-like nucleotides in both grooves the transition to alternative *t* angle γ conformation leads to even the greater increasing of the number of Guanine contacts and for their decreasing with other bases, especially with Cytosine. The similar tendency is observed for amino acid contacts with sugar-phosphate backbone of A-like nucleotides: the number of contacts is increased for nucleotides containing Guanine and decreased for the other types of nucleotides.

In the major groove B-like nucleotides in *t* γ angle state containing Adenine form more backbone contacts than other types of nucleotides with the similar sugar-phosphate conformation. At the same time Adenines create the fewer number of base contacts in major groove as well as Cytosines in minor groove (both with alternative γ angle conformations).

Thus the contact profiles are characterized by the sequence-specificity, that is, the different propensity of certain nucleotides to form contacts with amino acids in the grooves.

Contacts with polar and hydrophobic amino acid residues

The analysis of contacts between polar and hydrophobic amino acid residues and nucleotides with different conformations of the sugar-phosphate backbone shows that nucleotides form more contacts with polar amino acids in both grooves than with nonpolar residues regardless of the nucleotide conformation (Table 2, Total contacts).

But, the profiles of such contacts differ in minor and major grooves and depend on the conformation of both deoxyribose and the angle γ (Fig.1).

The nucleotides with classical *g+* conformation of the γ angle are characterized by the similar contact profiles in both grooves independently on the deoxyribose conformation.

There are slightly changes in contacts profiles for A-like nucleotides with alternative *t* conformation of the γ angle (Table 2). The percent of contacts with polar amino acids in minor groove increases, and with hydrophobic amino acids decreases. In major groove, on the contrary, the percent of contacts with polar amino acids decreases, and with hydrophobic amino acids increases. These facts are in agreement with the change in the polar/nonpolar profile of the DNA surface, available in the major and minor grooves [15].

Table 2

Percent of contacts between polar/nonpolar amino acids and nucleotides with different γ angle conformations in the both grooves

			Total contacts		Bases		Sugar-phosphate backbone	
			Nonpolar amino acids	Polar amino acids	Nonpolar amino acids	Polar amino acids	Nonpolar amino acids	Polar amino acids
Major groove	A-like	<i>g+</i>	12.7	87.3	6.9	93.1	17.0	83.0
		<i>t</i>	14.0	86.0	13.2	86.8	14.6	85.4
	B-like	<i>g+</i>	15.8	84.2	11.1	88.9	18.7	81.3
		<i>t</i>	8.2	91.8	5.5	94.5	<u>9.3</u>	<u>90.7</u>
		<i>g-</i>	16.5	83.5	18.0	82.0	15.6	84.4
	Minor groove	A-like	<i>g+</i>	25.4	74.6	43.1	56.9	22.8
<i>t</i>			21.2	78.8	19.2	80.8	21.3	78.7
B-like		<i>g+</i>	21.6	78.4	18.6	81.4	22.0	78.0
		<i>t</i>	20.2	79.8	21.9	78.1	20.0	80.0
		<i>g-</i>	29.4	70.5	<u>80.0</u>	<u>20.0</u>	21.7	78.0

More careful evaluation of polar/hydrophobic contact profile shows that for A-like nucleotides with alternative *t* conformation of the γ angle the percent of residue contacts is differ for bases and backbone atoms (Table 2). For B-like nucleotides with alternative *t* conformation of the γ angle in both grooves, the percent of contacts with polar amino acids increases, and with hydrophobic amino acids decreases, especially in major groove. But the transition of B-like nucleotides to the *g-* alternative conformation reduces the percent of contacts with polar amino acids and increases it with nonpolar ones in both grooves (Table 2, Total contacts). So we observe the significant changes in their contact profiles (Fig.1). The verification of the results suggests that we need to be careful interpreting the high propensities of hydrophobic amino acids contact with bases of nucleotides in this conformation (B-like sugar pucker, *g-* conformation) because there are only 25 total residue-base contacts in the whole dataset. Whatever, such minor groove contacts may play a role for proteins binding only in the minor groove (such as Architectural), which is often associated with a dramatic widening and extensive hydrophobic contacts [24] and contribute to specificity.

The analysis of contacts has shown, that the significant changes are observed for base contacts rather than for sugar-phosphate backbone ones and primarily for classical nucleotides independently of deoxyribose conformation (Table 2). For alternative nucleotides such tendency is less defined. Only one exception is observed in the major groove for B-like nucleotides with *t* conformation representing the significant changes in sugar-phosphate backbone contact profiles. The most dramatical changes observed for the base contact profiles in the minor groove for B-like nucleotides with *g-* angle γ conformation we have discussed above.

Conformational transitions of sugar-phosphate DNA backbone can affect the propensity for DNA-binding of amino acids (Fig. 1).

Our determination the propensity of amino acids to interact with nucleotides shows, that the most common the protein-DNA contacts form positive charged Arginine (R) and Lysine (K) residues (Fig. 1) and this data are consistent with the results of many studies [6, 7, 23].

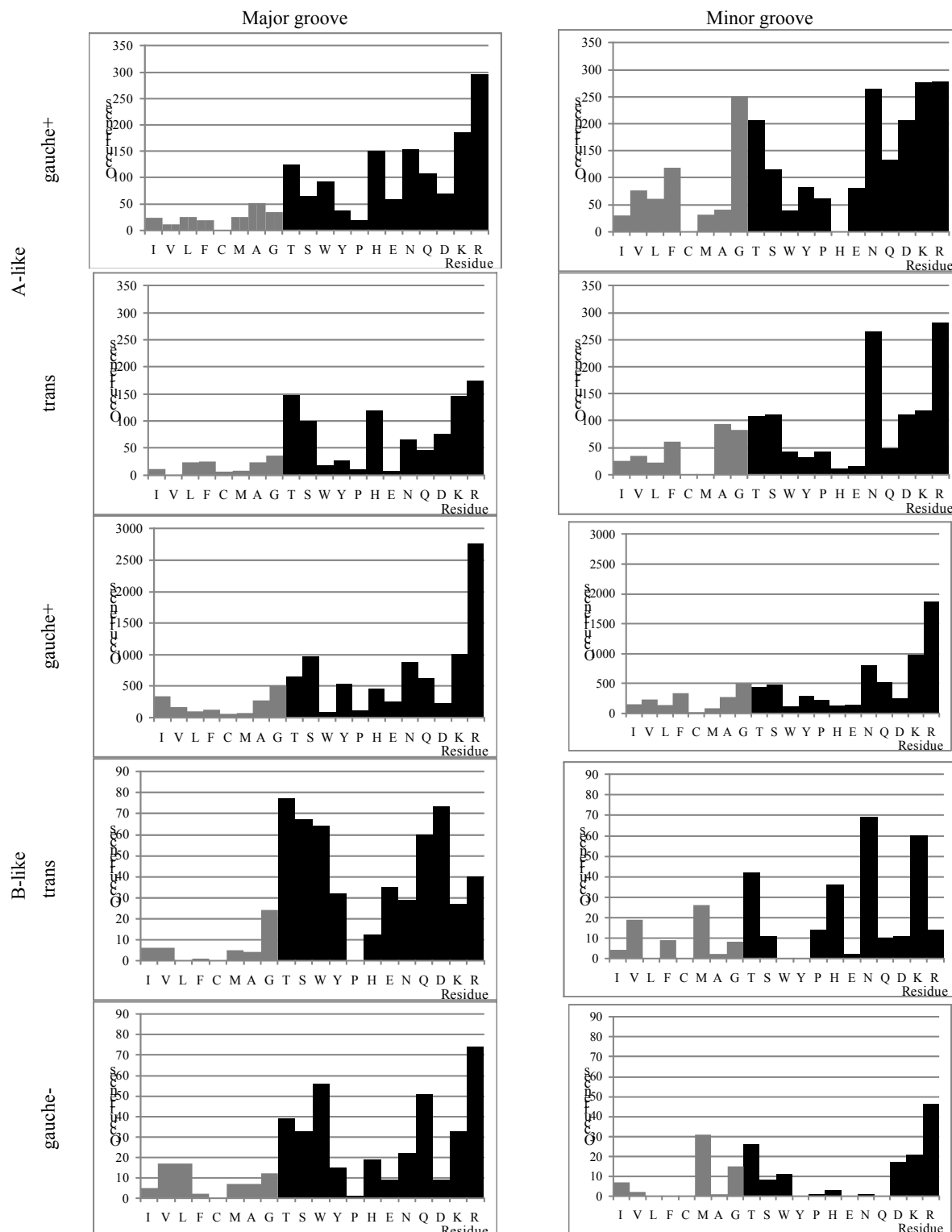


Fig. 1. Contact profiles in major and minor grooves or Number of the protein-DNA contacts between nonpolar (IVLFCMAG, grey) and polar (TSWYPHENQDKR, black) amino acids and nucleotides with different sugar-phosphate backbone conformations: A- or B-like deoxyribose; gauche+, trans, gauche- states of angle γ .

Tryptophan (W) has the largest propensity to form contacts with the DNA in major groove for B-like nucleotides in alternative γ angle conformations. Despite the fact that Tryptophan is referred as polar amino acid [22], the presence of a heterocyclic system in its side chain allows Tryptophan to participate in hydrophobic interactions. Therefore the observed effect can be explained by the increasing of nonpolar surface in the major groove upon the transitions of γ angle into alternative conformations [15] facilitating the formation of the specific hydrophobic contacts with nucleotides [25].

The number of Aspartate (D) contacts in DNA major groove is high for nucleotides with any sugar pucker and t γ angle conformations (Fig.1). Moreover, almost half of the contacts in minor groove for nucleotides with B-like sugar and t γ angle conformation are the Cytosine interactions (Table 1). Recently Corona et al. [23] have shown that negatively charged Aspartate is enriched in base interactions for highly specific DNA-binding proteins and predominately binds to Cytosine in the major groove through a single hydrogen bond or two consecutive Cytosines through bidentate hydrogen bonds. Obviously, transitions into t angle γ conformation contribute binding specificity through indirect readout mechanism.

The transition of B-like nucleotides into g - angle γ conformation reduces the number of Arginine (R) contacts in minor groove (Fig.1). This effect can be associated with sequence-specificity. Arginine is prefer to bind with Guanine [6], while we have shown, that in this conformation Thymine is more often takes part in the protein-DNA contacts (Table 1).

CONCLUSIONS

Prediction of protein binding sites on DNA will allow us to determine the functions of proteins and understand regulatory processes in molecular biological systems as well as to develop pharmaceutical drugs that can prevent the expression of target genes. For solving this problem some general principles concerning the frequency of formation of the specific amino acid-base pairs in binding sites should be formulated.

In this investigation we try to identify common features of DNA backbone rearrangements which can effect on the ability of nucleotides to participate in contacts with proteins. According to the results of our study one can assert the existence of certain preferences in the formation of the protein-DNA contacts, depending on the conformation of the DNA sugar-phosphate backbone.

The A-like nucleotides more often interact with proteins in the minor groove, while B-like nucleotides make more contacts in the major groove regardless of the γ angle conformation. At the same time the alternative A-like nucleotides form more contacts in the grooves than B-like nucleotides with both t and g - alternative angle γ conformations.

Near 3/4 of the protein-DNA contacts are formed with sugar-phosphate backbone. Such interactions predominate in the minor groove especially for A-like alternative nucleotides. In the major groove the number of contacts with bases is significantly higher, but the transition of B-like nucleotides to alternative t conformation of angle γ leads to increasing the interaction with backbone atoms.

The nucleotides form more contacts with polar amino acids in both grooves than with nonpolar residues regardless of the nucleotide conformation, but the profiles of such contacts differ in minor and major grooves and depend on the conformation of both deoxyribose and the angle γ .

In the minor groove the amount of interactions between alternative nucleotides and polar amino acids increase, and with hydrophobic amino acids decrease. In the major groove, on the contrary, alternative nucleotides form less number of contacts with polar amino acids than with hydrophobic ones. The polar/hydrophobic contact profile for alternative A-like nucleotides is differed for bases and backbone atoms.

We have shown that contact profiles are characterized by the sequence-specificity, that is, the different propensity of certain nucleotides to form contacts with amino acids in both grooves. In particular the transitions to alternative conformations of the angle γ can influence the specificity of the protein-DNA interactions primarily in the minor groove. But the correct determination of preferred amino acid – nucleotide pairs in the binding sites of protein-DNA complexes requires additional studies.

Statistical analysis of the presented protein-DNA structures allows us to make following concluding remark. It is well known that there are no simple rules in protein-DNA recognition [9], and the prediction of binding sites is extremely difficult, since proteins and DNA have a significant conformational variability. Most of the methods predicting protein binding sites on DNA are based on sequence preferences of residues and protein structure in binding site [1] and take into account only the DNA sequence (i.e., direct readout) [26-31]. We assume that information about conformational rearrangements of DNA (indirect or shape recognition) will allow to supplement the results of these methods and take into consideration not only protein features but also the structure of DNA. Such data can substantially improve the quality of binding sites prediction.

Acknowledgment

The investigation was supported in part by the SCST Programme of Implementation and Usage of GRID technologies for 2017.

REFERENCES

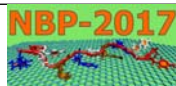
1. Si J., Zhao R., Wu R. An Overview of the Prediction of Protein DNA-Binding Sites // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. No 16. P. 5194-5215.
2. Mandel-Gutfreund Y., Margalit H. Quantitative parameters for amino acid–base interaction: implications for prediction of protein–DNA binding sites // *Nucleic Acids Res.* 1998. Vol. 26. No 10. P. 2306–2312.
3. Jones S., Shanahan H.P., Berman H.M., Thornton J.M. Using electrostatic potentials to predict DNA-binding sites on DNA-binding proteins // *Nucleic Acids Res.* 2003. No 31. P. 7189–7198.
4. Shanahan H.P., Garcia M.A., Jones S., Thornton J.M. Identifying DNA-binding proteins using structural motifs and the electrostatic potential // *Nucleic Acids Res.* 2004. No 32. P. 4732–4741.
5. Ofra Y., Mysore V., Rost B. Prediction of DNA-binding residues from sequence // *Bioinformatics.* 2007. Vol. 23. No 13. P. i347–i353.
6. Luscombe N.M., Laskowski R.A., Thornton J.M. Amino acid–base interactions: a three-dimensional analysis of protein–DNA interactions at an atomic level // *Nucleic Acids Research.* 2001. Vol. 29. No 13. P. 2860–2874.
7. Lejeune D., Delsaux N., Charlotiaux B., Thomas A., Brasseur R. Protein–Nucleic Acid Recognition: Statistical Analysis of Atomic Interactions and Influence of DNA Structure // *Proteins.* 2005. Vol. 61. No 2. P. 258–271.
8. Tolstorukov M.Y., Jernigan R.L., Zhurkin V.B. Protein-DNA hydrophobic recognition in the minor groove is facilitated by sugar switching // *J. Mol. Biol.* 2004. No 337. P. 65–76.
9. Rohs R., Jin X., West S.M., Joshi R., Honig B., Mann R.S. Origins of specificity in protein-DNA recognition // *Annual review of biochemistry.* 2010. No 79. P. 233–26.
10. Schneider B., Cerny J., Svozil D., Cech P., Gelly J.-C., de Brevern A. G. Bioinformatic analysis of the protein/DNA interface // *Nucleic Acids Research.* 2014. Vol. 42. No 5. P. 3381–3394.
11. Locasale J.W., Napoli A.A., Chen S., Berman H.M., Lawson, C.L. Signatures of protein-DNA recognition in free DNA binding sites // *J. Mol. Biol.* 2009. No 386. P. 1054–1065.
12. Zhao J., Bacolla A., Wang G., Vasquez K.M. Non-B DNA structure-induced genetic instability and evolution // *Cell. Mol. Life Sci.* 2010. No 67. P. 43–62.
13. Schneider B., Neidle S., Berman H. M. Conformations of the sugar–phosphate backbone in helical DNA crystal structures // *Biopolymers.* 1997. Vol. 42. No 1. P. 113–124.
14. Varnai P., Djuranovic D., Lavery R., Hartmann B. α - γ transitions in the B-DNA backbone // *Nucl. Acids Res.* 2002. Vol. 30. No 24. P. 5398–5406.
15. Zhitnikova M.Yu., Boryskina O.P., Shestopalova A.V. Sequence-specific transitions of the torsion angle gamma change the polar-hydrophobic profile of the DNA grooves: implication for indirect protein-DNA recognition // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2014. Vol. 32. No 10. P. 1670-1685.
16. Berman H. M., Olson W. K., Beveridge D. L., Gelbin A., Demeny T., Hsieh S. H., Srinivasan A.R., Schneider B. The nucleic acid database: A comprehensive relational database of three-dimensional structures of nucleic acids // *Biophysical Journal.* 1992. No 63. P. 751–759.

17. Lu X. J., Olson W. K. 3DNA: A software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures // *Nucleic Acids Research*. 2003. No 31. P. 5108–5121.
18. Ahmad S., Gromiha M.M., Sarai A. Analysis and prediction of DNA-binding proteins and their binding residues based on composition, sequence and structural information // *Bioinformatics*. 2004. No 20. P. 477–486.
19. Kuznetsov I.B., Gou Z., Li R., Hwang S. Using evolutionary and structural information to predict DNA-binding sites on DNA-binding proteins // *Proteins*. 2006. No 64. P. 19–27.
20. Bartlett G.J., Porter C.T., Borkakoti N., Thornton J.M. Analysis of catalytic residues in enzyme active sites // *J. Mol. Biol.* 2002. No 324. P. 105–121.
21. Faucher J., Pliska V. Hydrophobic parameters π of amino acid side chains from the partitioning of N-acetyl-amino-acid amides // *Eur. J. Med. Chem.* 1983. No 18. P. 369–375.
22. Kyte J., Doolittle R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein // *J. Mol. Biol.* 1982. No 157. P. 105–132.
23. Corona R. I., Guo J.T. Statistical analysis of structural determinants for protein-DNA binding specificity // *Proteins*. 2016. Vol. 84. No 8. P. 1147–1161.
24. Bewley C.A., Gronenborn A.M., Clore G.M. Minor groove-binding architectural proteins: structure, function, and DNA recognition // *Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1998. Vol. 27. P. 105–131.
25. Huang J., Zhao Y., Liu H., Huang D., Cheng X., Zhao W., Taylor I.A., Liu J., Peng Y.L. Substitution of tryptophan 89 with tyrosine switches the DNA binding mode of PC4 // *Scientific Reports*. 2015. Vol. 5. P. 8789.
26. Schneider T.D., Stormo G.D., Gold L. Information content of binding sites on nucleotide sequences // *J. Mol. Biol.* 1986. No 188. P. 415–431.
27. Berg O.G., von Hippel P.H. Selection of DNA binding sites by regulatory proteins—statistical-mechanical theory and application to operators and promoters // *J. Mol. Biol.* 1987. No 193. P. 723–750.
28. Takeda Y., Sarai A., Rivera V.M. Analysis of the sequence-specific interactions between Cro repressor and operator DNA by systematic base substitution experiments // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. No 86. P. 439–443.
29. Sarai A., Takeda Y. λ repressor recognizes the approximately 2-fold symmetric half-operator sequences asymmetrically // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. No 86. P. 6513–6517.
30. Tanikawa J., Yasukawa T., Enari M., Ogata K., Nishimura Y., Ishii S., Sarai A. Recognition of specific DNA sequences by the c-Myb proto-oncogen product: Role of three repeat units in the DNA-binding domain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. No 90. P. 9320–9324.
31. Kono H., Sarai A. Structure-based prediction of DNA target sites by regulatory proteins // *Proteins*. 1999. No 35. P. 114–131.

REFERENCES

1. Si, J., Zhao, R., & Wu, R. (2015). An Overview of the Prediction of Protein DNA-Binding Sites. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 5194–5215. doi: 10.3390/ijms16035194
2. Mandel-Gutfreund, Y., & Margalit, H. (1998). Quantitative parameters for amino acid–base interaction: implications for prediction of protein–DNA binding sites. *Nucleic Acids Research*, 26(10), 2306–2312. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC147552/pdf/262306.pdf>
3. Jones, S., Shanahan, H.P., Berman, H.M., & Thornton, J.M. (2003). Using electrostatic potentials to predict DNA-binding sites on DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Research*, 31, 7189–7198. doi: 10.1093/nar/gfg922
4. Shanahan, H.P., Garcia, M.A., Jones, S., & Thornton, J.M. (2004). Identifying DNA-binding proteins using structural motifs and the electrostatic potential. *Nucleic Acids Research*, 32, 4732–4741. doi: 10.1093/nar/gkh803
5. Ofra, Y., Mysore, V., & Rost, B. (2007). Prediction of DNA-binding residues from sequence. *Bioinformatics*, 23(13), i347–i353. doi: 10.1093/bioinformatics/btm174
6. Luscombe, N.M., Laskowski, R.A., & Thornton, J.M. (2001). Amino acid–base interactions: a three-dimensional analysis of protein–DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Research*, 29(13), 2860–2874. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC55782/>
7. Lejeune, D., Delsaux, N., Charlotteaux, B., Thomas, A., & Brasseur, R. (2005). Protein–Nucleic Acid Recognition: Statistical Analysis of Atomic Interactions and Influence of DNA Structure. *Proteins*, 61(2), 258–271. doi: 10.1002/prot.20607
8. Tolstorukov, M.Y., Jernigan, R.L., & Zhurkin, V.B. (2004). Protein-DNA hydrophobic recognition in the minor groove is facilitated by sugar switching. *Journal of Molecular Biology*, 337, 65–76. doi: 10.1016/j.jmb.2004.01.011
9. Rohs, R., Jin, X., West, S.M., Joshi, R., Honig, B., & Mann, R.S. (2010). Origins of specificity in protein-DNA recognition. *Annual review of biochemistry*, 79, 233–26. doi: 10.1146/annurev-biochem-060408-091030
10. Schneider, B., Cerny, J., Svozil, D., Cech, P., Gelly, J.-C., & de Brevern, A. G. (2014). Bioinformatic analysis of the protein/DNA interface. *Nucleic Acids Research*, 42(5), 3381–3394. doi: 10.1093/nar/gkt1273

11. Locasale J.W., Napoli A.A., Chen S., Berman H.M., & Lawson, C.L. (2009). Signatures of protein-DNA recognition in free DNA binding sites. *Journal of Molecular Biology*, 386, 1054–1065. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2753591/>
12. Zhao, J., Bacolla, A., Wang, G., & Vasquez, K.M. (2010). Non-B DNA structure-induced genetic instability and evolution. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 43–62. doi: 10.1007/s00018-009-0131-2
13. Schneider, B., Neidle, S., & Berman, H. M. (1997). Conformations of the sugar–phosphate backbone in helical DNA crystal structures. *Biopolymers*, 42(1), 113–124. doi:10.1002/(SICI)1097-0282(199707)42:1<113::AID-BIP10>3.0.CO;2-O
14. Varnai, P., Djuranovic, D., Lavery, R., & Hartmann, B. (2002). α - γ transitions in the B-DNA backbone. *Nucleic Acids Research*, 30(24), 5398–5406. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC140057/>
15. Zhitnikova, M.Yu., Boryskina, O.P., & Shestopalova, A.V. (2014). Sequence-specific transitions of the torsion angle gamma change the polar-hydrophobic profile of the DNA grooves: implication for indirect protein-DNA recognition. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 32(10), 1670-1685. doi: 10.1080/07391102.2013.830579
16. Berman, H. M., Olson, W. K., Beveridge, D. L., Gelbin, A., Demeny, T., Hsieh, S. H., ... Schneider, B. (1992). The nucleic acid database: A comprehensive relational database of three-dimensional structures of nucleic acids. *Biophysical Journal*, 63, 751–759. doi: 10.1016/S0006-3495(92)81649-1
17. Lu, X. J., & Olson, W. K. 3DNA: (2003). A software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures. *Nucleic Acids Research*, 31, 5108–5121. doi: 10.1093/nar/gkg680
18. Ahmad, S., Gromiha, M.M., & Sarai, A. (2004). Analysis and prediction of DNA-binding proteins and their binding residues based on composition, sequence and structural information. *Bioinformatics*, 20, 477–486. doi: 10.1093/bioinformatics/btg432
19. Kuznetsov, I.B., Gou, Z., Li, R., & Hwang, S. (2006). Using evolutionary and structural information to predict DNA-binding sites on DNA-binding proteins. *Proteins*, 64, 19–27. doi: 10.1002/prot.20977
20. Bartlett, G.J., Porter, C.T., Borkakoti, N., & Thornton, J.M. (2002). Analysis of catalytic residues in enzyme active sites. *Journal of Molecular Biology*, 324, 105–121. doi: 10.1016/S0022-2836(02)01036-7
21. Faucher, J., & Pliska, V. (1983). Hydrophobic parameters pi of amino acid side chains from the partitioning of N-acetyl-amino-acid amides. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 18, 369–375. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/246404378_Hydrophobic_parameters_II_of_amino_acid_side-chains_from_the_partitioning_of_N-acetyl-amino_acid_amides
22. Kyte, J., & Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157, 105–132. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283682905150?via%3Dihub>
23. Corona, R. I., & Guo, J.T. (2016). Statistical analysis of structural determinants for protein-DNA binding specificity. *Proteins*, 84(8), 1147–1161. doi: 10.1002/prot.25061
24. Bewley, C.A., Gronenborn, A.M., & Clore, G.M. (1998). Minor groove-binding architectural proteins: structure, function, and DNA recognition. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 27, 105–131. doi: 10.1146/annurev.biophys.27.1.105
25. Huang, J., Zhao, Y., Liu, H., Huang, D., Cheng, X., Zhao, W., ... Peng, Y.L. (2015). Substitution of tryptophan 89 with tyrosine switches the DNA binding mode of PC4. *Scientific Reports*, 5, 8789. doi: 10.1038/srep08789
26. Schneider, T.D., Stormo, G.D., & Gold, L. (1986). Information content of binding sites on nucleotide sequences. *Journal of Molecular Biology*, 188, 415–431. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283686901658?via%3Dihub>
27. Berg, O.G., & von Hippel, P.H. (1987). Selection of DNA binding sites by regulatory proteins—statistical-mechanical theory and application to operators and promoters. *Journal of Molecular Biology*, 193, 723–750. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/med/3612791>
28. Takeda, Y., Sarai, A., & Rivera, V.M. (1989). Analysis of the sequence-specific interactions between Cro repressor and operator DNA by systematic base substitution experiments. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86, 439–443. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC286485/>
29. Sarai, A., & Takeda, Y. (1989). λ repressor recognizes the approximately 2-fold symmetric half-operator sequences asymmetrically. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86, 6513–6517. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC297874/>
30. Tanikawa, J., Yasukawa, T., Enari, M., Ogata, K., Nishimura, Y., Ishii, S., & Sarai, A. (1993). Recognition of specific DNA sequences by the c-Myb proto-oncogen product: Role of three repeat units in the DNA-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90, 9320–9324. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC47559/>
31. Kono, H., & Sarai, A. (1999). Structure-based prediction of DNA target sites by regulatory proteins. *Proteins*, 35, 114–131. Retrieved from <http://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?arnumber=6961027>



УДК: 616-073.584:541.135:543.062

НАНОСТРУКТУРНЫЕ ТОЧЕЧНО-КОНТАКТНЫЕ СЕНСОРЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КАНЦЕРОГЕННЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИИ *HELICOBACTER PYLORI*

Г.В. Камарчук¹, А.П. Поспелов², Д.А. Гарбуз², В.А. Гудименко¹,
Л.В. Камарчук³, А.С. Заика¹, А.М. Плетнев¹, А.В. Кравченко⁴

- ¹Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины,
просп. Науки, 47, г. Харьков, 61103, Украина
- ²Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт»,
ул. Кирпичева, 21, г. Харьков, 61002, Украина
- ³ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков» НАМН Украины,
просп. Юбилейный, 52-А, г. Харьков, 61153, Украина
- ⁴Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина,
пл. Свободы, 4, г. Харьков, 61022, Украина

e-mail: kamarchuk@ilt.kharkov.ua

Поступила в редакцию 4 ноября 2017 г.

Принята 17 ноября 2017 г.

Актуальность. На сегодняшний день вопрос детектирования различных штаммов бактерии *H. pylori* приобрел большую значимость ввиду распространенности этой бактерии по всему миру и той роли, которую она играет в развитии множества серьезных желудочных и внежелудочных заболеваний. При этом не все штаммы бактерии *H. pylori* являются агрессивными и требуют лечения с использованием антибиотиков. Таким образом, возникает вопрос о необходимости дифференциации этих бактерий по их факторам вирулентности. Недорогой и общедоступной технологией для решения этой задачи могут стать современные сенсорные устройства.

Цель работы. Цель работы состоит в разработке сенсорного устройства нового типа для дифференциального распознавания штаммов *H. pylori* на основе анализа смеси газов, выдыхаемых человеком. Такое устройство может быть создано на основе точечно-контактного газового сенсора.

Материалы и методы. Фундаментальные свойства точечных контактов, используемых в микроконтактной спектроскопии Янсона, позволили сформировать на основе соединений TCNQ точечно-контактную мезоскопическую матрицу, чувствительную к малым концентрациям веществ в составе сложной газовой смеси. Анализируемым веществом служил газ, выдыхаемый человеком.

Результаты. Газочувствительные точечно-контактные сенсоры на основе соединений TCNQ имеют сложные кривые отклика с двумя экстремумами, которые можно называть спектральными профилями сложной газовой смеси. Используя спектральные профили выдыхаемого газа различных пациентов можно дифференцировать различные состояния организма человека, вызванные бактерией *H. pylori*.

Выводы. Показано, что продукты метаболизма канцерогенных штаммов бактерии *H. pylori* доминантно влияют на электропроводность сенсора и определяют поведение особенностей на кривых отклика сенсоров. В результате, используя точечно-контактные сенсоры на основе соединений TCNQ возможно дифференцировать штаммы *H. pylori* по их канцерогенному потенциалу.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *H. pylori*; точечный контакт; микроконтактная спектроскопия Янсона; TCNQ; кластерный анализ; выдыхаемый газ; мезоскопическая структура.

NANOSTRUCTURAL POINT-CONTACT SENSORS FOR DIAGNOSTICS OF CARCINOGENIC STRAINS OF *HELICOBACTER PYLORI*

G.V. Kamarchuk¹, A.P. Pospelov², D.A. Harbuz², V. A. Gudimenko¹,
L.V. Kamarchuk³, A.S. Zaika¹, A.M. Pletnev¹, A.V. Kravchenko⁴

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

²National Technical University "Kharkiv Polytechnic Institute", 21 Kyrpychov Str., 61002 Kharkiv, Ukraine

³SI 'Institute for Children and Adolescents Health Care' of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine,
52-A Yuvileinyi Ave., 61153 Kharkiv, Ukraine

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

Background: The problem of detecting the different strains of *H. pylori* has gained great importance today due to the worldwide prevalence of this bacterium and its role in the pathogenesis of a number of serious gastric and extragastric diseases. However, not all *H. pylori* strains are aggressive and require antibiotic treatment. Thus, the question arises about the necessity of differentiating these bacterium strains with respect to their virulence factors. In accordance with the IV Maastricht Consensus Report, among the variety of ways to diagnose *H. pylori* infection, non-invasive methods should be given preference. Most of them are based on the analysis of gas which is exhaled by a human. Mass spectrometry, gas chromatography, and IR spectroscopy are currently the mostly used ones. However, despite the obvious advantages, these techniques have a number of disadvantages that make them difficult to use in everyday medical practice. Modern sensor devices can become an inexpensive and easy to access alternative to these technologies.

Objectives: The aim of the work is to develop a new type of sensor device for selective recognition of *H. pylori* strains which is based on analysis of a mixture of gases exhaled by human. Such a kind of device can be designed on the basis of a point-contact gas sensor.

Materials and methods: Anion-radical salts of the organic conductor TCNQ were chosen as the sensitive material for point-contact sensors. The fundamental properties of point contacts which are used in the Yanson point-contact spectroscopy make it possible to create a point-contact mesoscopic matrix on the basis of this material, which is sensitive to small concentrations of components in complex gas media. The sensors were obtained by electrochemical deposition of salts from a solvent characterized by a high vapor pressure on a textolite substrate. Gas exhaled by a human served as the substance to be analyzed. The measurements were carried out following a specially developed technique. The sensor response curves were recorded by a measuring complex and original software designed by the authors.

Results: A set of 350 active-type TCNQ-based sensors was studied under the influence of a mixture of breath gases. Gas-sensitive sensors based on TCNQ compounds are characterized by a complex response curve with two extrema. Since the temporal variation in electrical conductivity of the sensor correlates well with the dependence of its resistance on the energy of the adsorbed components of the gas mixture, the resulting response curves of point-contact sensors can be called *spectral profiles* of a complex gas mixture. It is possible to differentiate among the various states of human body caused by the *H. pylori* bacterium by using spectral profiles of the gas exhaled by different patients. As a result, the developed sensors were shown to be an effective tool for analyzing breath gas exhaled in real time mode. They demonstrated a high sensitivity and selectivity to the products of activity of different *H. pylori* strains.

Conclusions: It was shown that the products of metabolism of carcinogenic *H. pylori* strains had a dominant influence on electrical conductivity of the sensor and thus shaped the behavior of the features on sensor response curves. As a result, it is possible to differentiate *H. pylori* strains with respect to their carcinogenic potential using point-contact sensors based on TCNQ compounds. Thus, an effective portable tool was created in this work for the first time to develop innovative screening technologies for non-invasive diagnosis of human body conditions characterized by gastroduodenal pathology and to distinguish carcinogenic strains of *H. pylori* from tolerant ones.

KEYWORDS: *H. pylori*; point-contact; Yanson point-contact spectroscopy; TCNQ; cluster analysis; exhaled gas; mesoscopic structure.

НАНОСТРУКТУРНІ ТОЧКОВО-КОНТАКТНІ СЕНСОРИ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ КАНЦЕРОГЕННИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЇ *HELICOBACTER PYLORI*

Г.В. Камарчук¹, О.П. Поспелов², Д.О. Гарбуз², В.О. Гудименко¹,
Л.В. Камарчук³, О.С. Заїка¹, О.М. Плетньов¹, А.В. Кравченко⁴

¹Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України,
просп. Науки, 47, м. Харків, 61103, Україна

²Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут»,
вул. Кирпичова, 21, м. Харків, 61002, Україна

³ДУ «Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків» НАМН України,
просп. Ювілейний, 52-А, м. Харків, 61153, Україна

⁴Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, м. Харків, 61077, Україна

Актуальність. На сьогоднішній день проблема детектування різних штамів бактерії *H. pylori* набула великої значимості у зв'язку з поширеністю цієї бактерії по всьому світу та тієї ролі, яку вона відіграє у розвитку багатьох серйозних шлункових та позашлункових захворювань. При

цьому не усі штамми бактерії *H. pylori* є агресивними і потребують лікування з використанням антибіотиків. Таким чином, виникає питання про необхідність диференціації цих бактерій за їх факторами вірулентності. Недорогою і загальнодоступною технологією для вирішення цієї задачі можуть стати сучасні сенсорні пристрої.

Мета роботи. Мета роботи полягає у розробці сенсорного пристрою нового типу для диференційного розпізнавання штамів *H. pylori* на основі аналізу сумішей газів, що видихаються людиною. Такий пристрій може бути створений на основі точково-контактного газового сенсора.

Матеріали і методи. Фундаментальні властивості точкових контактів, що використовуються в мікроконтактній спектроскопії Янсона, дозволили сформувати на основі сполук TCNQ точково-контактну мезоскопічну матрицю, чутливу до малих концентрацій речовин у складі складної газової суміші. Речовиною, що аналізується, служив газ, який видихається людиною.

Результати. Газочутливі сенсори на основі сполук TCNQ мають складні криві відгуку з двома екстремумами, які можна назвати спектральними профілями складної газової суміші. Використовуючи спектральні профілі видихуваного газу різних пацієнтів можна диференціювати різні стани організму людини, викликані бактерією *H. pylori*.

Висновки. Показано, що продукти метаболізму канцерогенних штамів бактерії *H. pylori* мають домінуючий вплив на електропровідність сенсора і визначають поведінку особливостей на кривих відгуку сенсорів. В результаті, використовуючи точково-контактні сенсори на основі сполук TCNQ, можливо диференціювати штамми *H. pylori* по їх канцерогенному потенціалу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: *H. pylori*; точковий контакт; мікроконтактна спектроскопія Янсона; TCNQ; кластерний аналіз; видихуваний газ; мезоскопічна структура.

В настоящее время проблема обнаружения и эрадикации бактерии *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) является особенно острой ввиду широкого распространения данной инфекции по всему миру и ее роли в патогенезе множества серьезных желудочных и внежелудочных заболеваний [1, 2]. Гастродуоденальная патология, связанная с *H. pylori*, имеет хроническое рецидивирующее течение. Всемирная организация здравоохранения признает бактерию *H. pylori* основным причинным фактором развития язвенной болезни и рака желудка [1, 3]. Было доказано, что существует прямая взаимосвязь между заболеваемостью *H. pylori* и раком желудка [1, 4]. Однако стоит отметить, что не все штаммы *H. pylori* одинаково опасны и вызывают развитие патологических изменений слизистой оболочки желудка. Различные штаммы *H. pylori* имеют разные канцерогенные потенциалы, которые зависят от факторов вирулентности [1, 5, 6]. Таким образом, не все штаммы инфекции являются агрессивными и требуют лечения с использованием антибиотиков. Данный факт является существенным препятствием в ходе диагностики инфекции, так как возникает необходимость в дифференциации различных штаммов *H. pylori* для выбора эффективного лечения.

Согласно IV Маастрихтскому консенсусу (the Maastricht IV/ Florence Consensus Report) [1] среди всего разнообразия способов диагностики инфекции *H. pylori*, предпочтение отдается неинвазивным методам. В основном они базируются на исследовании газа, выдыхаемого человеком. Выдыхаемый газ представляет собой сложную смесь газов, имеющих различное эндогенное происхождение и секретлируемые в дыхательные пути, желудочно-пищеварительный тракт и ротовую полость, однако на его состав влияют и внешние факторы, такие как курение или загрязнение окружающей среды. Такая смесь состоит более чем из 2000 летучих компонентов, при этом концентрация некоторых из них очень мала и не превышает уровня долей ppm [7]. Часть этих компонентов являются маркерами различных состояний организма человека, ввиду чего чувствительность метода их анализа играет ключевую роль в диагностике.

В настоящее время в качестве неинвазивных способов диагностики инфекции *H. pylori* используется ряд методов для анализа выдыхаемого газа. В первую очередь к ним относятся масс-спектрометрия, газовая хроматография, ИК-спектроскопия [8-10]. Несмотря на то, что эти методы обеспечивают получение достаточно точных данных,

они обладают рядом недостатков, в числе которых большая стоимость экспериментального оборудования и его громоздкость, необходимость высокой квалификации персонала ввиду сложности эксплуатации такого оборудования. Следует отметить, что существенная сложность в анализе выдыхаемого газа заключается также и в том, что различные компоненты данной газовой смеси могут взаимодействовать между собой, ввиду чего важным требованием является проведение анализа *in situ*. Эти недостатки являются значительной преградой для использования указанных методов в повседневной медицинской практике. Недорогой и общедоступной альтернативой данным технологиям могут стать современные сенсорные устройства. Поэтому в последнее время особое внимание уделяется разработке специализированных газовых сенсоров [11-13]. Принципы детектирования, используемые при дизайне современных сенсоров, как правило, позволяют создавать устройства, ориентированные на обнаружение какого-либо определенного газа – так называемого маркера. Ввиду наличия взаимодействия между компонентами газа, выдыхаемого человеком, диагностика, построенная на выявлении отдельных маркеров, может приводить к ложноположительным или ложноотрицательным результатам, особенно при детектировании бактерии *H. pylori* [14].

Вышеперечисленные факторы обуславливают цель нашей работы, которая состоит в разработке сенсорного устройства нового типа для дифференциального распознавания штаммов *H. pylori* на основе анализа смеси газов, выдыхаемых больными, имеющими в анамнезе инфицированность бактерией. В перечень требований к такому устройству входят также низкая стоимость, высокая чувствительность, возможность работы *in situ*, малогабаритность и простота обслуживания. Всем этим требованиям может отвечать устройство, имеющее в своей основе точечно-контактный газовый сенсор [13]. В соответствии с этим целесообразно рассмотреть и проанализировать результаты исследований созданных нами точечно-контактных газовых сенсоров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В основе точечно-контактного сенсорного устройства лежат точечные контакты (микрконтакты) Янсона, принципы работы которых детально изучены в рамках микрконтактной спектроскопии Янсона [15]. Такие контакты обладают рядом фундаментальных свойств, делающих их перспективными для создания сенсорных устройств [13]. Точечный контакт Янсона представляет собой электрический контакт между двумя массивными электродами, осуществленный на площади, сопоставимой с длиной свободного пробега носителей заряда. Следовательно, такой контакт представляет собой типичный нанообъект, размер которого может быть сопоставим с размерами одного атома. Разумно предположить, что даже одна молекула газа, адсорбированная на поверхности такого контакта в области сужения, будет влиять на проводимость контакта существенным образом, обуславливая его высокую сенсорную чувствительность [16, 17]. Важная особенность точечного контакта Янсона как объекта, пригодного для использования в качестве газового сенсора, наряду с его геометрическими размерами, заключается в распределении носителей заряда, которое значительно отличается от распределения в массивном проводнике [18]. Изменение электрического потенциала в контакте такого рода осуществляется непосредственно в области сужения, где и формируется сопротивление всей точечно-контактной структуры [18]. В результате, сопротивление массивных контактирующих электродов не влияет на сопротивление системы в целом благодаря быстрому растеканию тока в них. Другая уникальная особенность точечного контакта заключается в способности

сохранять устойчивость при большой плотности тока в канале проводимости, которая может достигать величины 10^8 А/см² при комнатных температурах, обуславливая быструю десорбцию молекул газа с поверхности и возврат сенсора в исходное состояние [16].

В качестве чувствительного вещества сенсора были выбраны анион-радикальные соли на основе соединений 7,7,8,8-тетрацианохинодиметана (TCNQ) с N-алкилхинолинием (N-Alk-Qn) и N-алкилизохинолинием (N-Alk-iso-Qn) [19]. Эти вещества относятся к классу синтетических органических проводников. Фактором, определяющим возможность использования этих соединений в качестве чувствительного материала, послужила особенность их кристаллической структуры. Она заключается в том, что в процессе кристаллизации эти вещества растут в виде игл или пластин, молекулы же вещества укладываются в стопки. При этом проводимость осуществляется за счет перекрытия π -волновых функций электронов внутри стопки, разные же стопки слабо связаны между собой. Это, в свою очередь, приводит к формированию квазиодномерной проводимости, осуществляемой вдоль оси стопки, с низкой вероятностью электронных переходов между разными стопками. Таким образом, анизотропия повышает чувствительность проводимости кристалла к адсорбционным процессам, происходящим под воздействием выдыхаемого газа.

Для получения высокочувствительного сенсорного материала была разработана оригинальная технология, с помощью которой была синтезирована анион-радикальная соль $[C_4H_9\text{-iso-Qn}](TCNQ)_2$ [20].

Образцы сенсоров были изготовлены на текстолитовой подложке, покрытой медной фольгой с обеих сторон. Площадь подложки – 5×10 мм². На материале фольги формировались электродные сопряжения с газочувствительным слоем. Кроме того, фольга служила в качестве токоподводящих электродов. Во время приготовления образцов часть фольги с размерами $0,15 \times 5$ мм² была удалена с подложки для формирования межэлектродного пространства. Точечно-контактные образцы соединения TCNQ были изготовлены в этом зазоре в качестве мезоструктуры. Для того чтобы получить газочувствительный элемент, был использован насыщенный раствор соли $[C_4H_9\text{-iso-Qn}](TCNQ)_2$ в органическом растворителе с высокой упругостью паров. Это обуславливало быстрое испарение растворителя при нормальных (комнатных) условиях. Чувствительные элементы были изготовлены с использованием оригинальной электрохимической технологии [21], которая позволяла формировать мезоскопическую микроконтактную мультиструктуру. Мультиструктура состояла из точечно-контактных элементов (рис. 1), которые были образованы между краями или боковыми поверхностями игольчатых кристаллов соединения TCNQ аналогично формированию точечных контактов по сдвиговой методике Чубова [22] в микроконтактной спектроскопии Янсона [13, 23]. Каждый из точечно-контактных элементов представляет собой единичный точечно-контактный датчик. Массив точечно-контактных датчиков (мультиструктура) может включать в себя до 200-300 точечных контактов на площади $0,15 \times 5$ мм². Совокупность полученных таким образом микроконтактов, соединенных друг с другом и с токоподводящими электродами, обеспечивает значительный уровень выходного сигнала.

С целью создания сенсоров активного типа, имеющих в своем составе источник тока, был использован ряд оригинальных технологических приемов и «know how» [24]. Процесс изготовления включал в себя поляризацию границ раздела «токоподводящий металл–газочувствительное вещество» в процессе формирования мультиструктуры. Это обеспечивало сохранение во времени остаточного потенциала и формирование источника энергии. В то время как продукты катодной поляризации были

нестабильными и распадались в течение нескольких минут, продукты анодной поляризации были достаточно устойчивы, вследствие чего остаточная разность потенциалов сохранялась во времени [21].

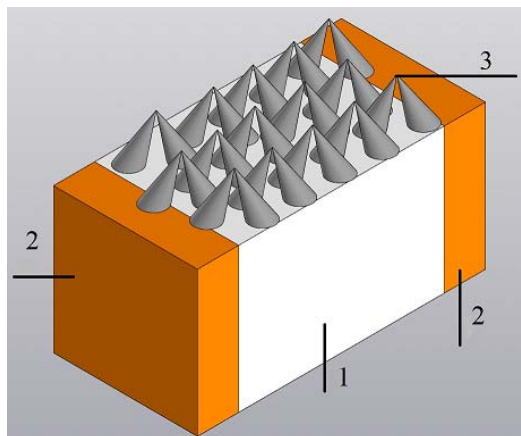


Рис. 1. Модельное изображение точечно-контактной мультиструктуры.
1 – текстолит, 2 – медная фольга, 3 – точечный контакт.

В качестве анализируемого газообразного агента использовалась смесь газов, выдыхаемых человеком. Следует отметить, что для получения реальных данных о метаболическом состоянии человека и стабильной воспроизводимости результатов было необходимо придерживаться специально разработанной методики исследований [25].

Регистрация изменения проводимости газочувствительных сенсоров под воздействием газовой смеси проводилась путем измерения падения напряжения на прецизионном резисторе (С2-29В-0, 125-1М, НПО «ЕРКОН», Россия) с сопротивлением 1 МОм, подключенном в электрическую цепь последовательно с самим сенсором.

Для измерений был создан измерительный комплекс, который включал в себя мультиметр Keithley 2000, специально разработанный держатель сенсора и персональный компьютер, на который производилась запись полученных результатов в реальном времени при помощи оригинального программного обеспечения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В то время как для традиционных газовых сенсоров под действием газа, выдыхаемого человеком, наблюдается монотонное изменение сигнала отклика с одним пиком (см., например, обзор [12] и цитированную в нем литературу), газочувствительные сенсоры на основе соединений TCNQ показывают более сложную кривую отклика с двумя экстремумами (рис. 2). При этом один из экстремумов проявляется в период экспозиции, а второй находится в релаксационной части кривой отклика, то есть той части, которая соответствует периоду времени после окончания воздействия выдыхаемого газа [25]. Сопротивление сенсора на воздухе без предварительного воздействия газа превышает 200 МОм, при этом можно допустить, что в ждущем режиме насколько-либо значимый ток, текущий через сенсор, отсутствует. Под действием же выдыхаемого газа сопротивление сенсора падает на 3 порядка ниже значения в 0,5 МОм, что значительно уменьшает сопротивление электрической цепи сенсора и приводит к появлению в ней электрического тока, задаваемого источником внутренней энергии сенсора. Это позволяет регистрировать

изменение электропроводности сенсора от времени, обусловленное взаимодействием с выдыхаемым газом, путем измерения падения напряжения на прецизионном резисторе, включенном в цепь последовательно с сенсором. После прекращения воздействия газа сопротивление сенсора возвращается к исходному значению в течение 1-5 минут без применения каких-либо дополнительных мер, что обеспечивает значительную привлекательность сенсора в качестве объекта для повсеместного использования в режиме реального времени.

Полное отсутствие симметрии между экспозиционной и релаксационной фазами кривой отклика указывает на различную природу формирования сигнала. Экспозиционная фаза характеризуется, в частности, адсорбцией молекул газа на поверхности точечного контакта. Адсорбция компонентов выдыхаемого газа увеличивает проводимость сенсора до определенного уровня, что характеризуется кривой отклика с насыщением. Процессы, происходящие в релаксационной фазе, могут быть описаны следующей моделью. Под действием тока большой плотности, адсорбированные молекулы компонентов выдыхаемого газа необратимо десорбируются с поверхности газочувствительного материала. Процесс десорбции стимулируется носителями заряда, которые при протекании тока в точечно-контактной мультиструктуре испытывают многократные неупругие столкновения с адсорбированными молекулами. В процессе такого взаимодействия электроны передают часть своей энергии молекулам газа, и, когда накопленной энергии становится достаточно для того, чтобы преодолеть энергию связи молекулы с поверхностью, адсорбированный газ десорбируется. Так как избыточная энергия адсорбированной частицы растет с увеличением времени, при анализе кривых отклика с определенной степенью уверенности можно говорить о том, что изменение электропроводности сенсора во времени коррелирует с зависимостью его сопротивления от энергии адсорбированных частиц [13, 14]. Этот факт предоставляет возможность называть полученные кривые отклика точечно-контактных сенсоров спектральными профилями сложной газовой смеси.

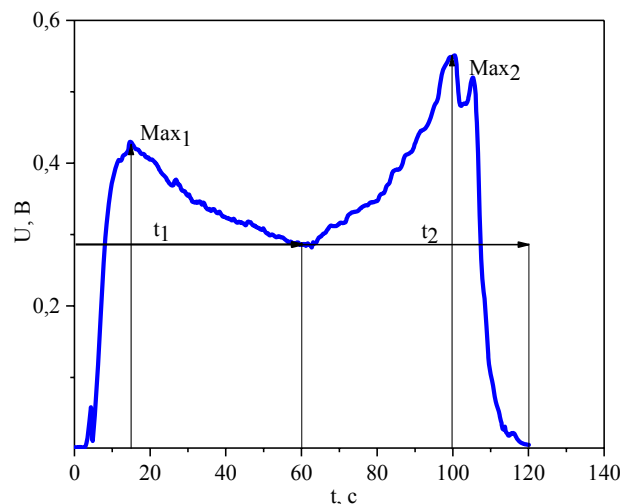


Рис. 2. Типичная кривая отклика сенсора на основе соединений TCNQ под действием газа, выдыхаемого условно здоровым человеком. Время экспозиции равно 60 сек.

Было доказано, что различные вариации параметров кривой отклика соответствуют различным метаболическим состояниям организма человека, чей выдыхаемый газ

анализируется [13]. В числе таких параметров находятся: значения максимумов экспозиции и релаксации; значение сигнала сенсора в точке начала релаксации; отношение высоты релаксационного максимума, измеряемой в точке начала релаксации, к его абсолютной величине; отношение значения релаксационного максимума к экспозиционному; время релаксации. Таким образом, можно дифференцировать различные состояния организма человека, вызванные бактерией *H. pylori*, используя анализ кривых отклика, полученных под действием газа, выдыхаемого различными пациентами.

Мы изготовили и исследовали 350 сенсоров активного типа на основе соединения $[C_4H_9\text{-iso-Q}_n](TCNQ)_2$ под воздействием смеси газов, выдыхаемых человеком. Период экспозиции составлял 60 секунд. Выбор продолжительности периода экспозиции обусловлен стремлением достичь оптимальной информативности получаемых кривых [25]. Для каждого сенсора было проведено по 5 параллельных экспериментов, что обеспечивало достаточные условия для статистической обработки данных.

Так как каждый изготовленный сенсор характеризуется определенными параметрами мезоскопической структуры (количество и конфигурация точечных контактов), трудно достичь полной идентичности изделий даже в пределах одной выпускаемой партии. Вследствие этого партии формировались на основе данных кластерного анализа. В качестве критерия схожести чувствительных образцов использовались евклидовы расстояния по ряду метрологических параметров. Кластерный анализ заключался в разбиении объектов на группы по определенным признакам, при этом различие между двумя объектами в одной группе должно быть значительно меньше различия двух наиболее «похожих» объектов из разных групп [26, 27].

Для выполнения кластерного анализа необходимо перевести неоднородно масштабируемые случайные величины X , которые представляют наши параметры датчика, в стандартизированные путем масштабирования исходного набора данных. Для этого нам необходимо заменить все случайные величины (P_1 и P_2) их стандартизированными аналогами U , которые характеризуются нулевым математическим ожиданием $M(U) = 0$ и единичной дисперсией $D(U) = 1$:

$$U = \frac{X - M(X)}{\sigma(X)} \quad (1)$$

Здесь $M(X)$ – математическое ожидание для случайной величины, а $\sigma(X)$ – дисперсия.

Таким образом, все наши расчеты параметров кластерного анализа производятся для двумерного евклидова пространства восстановленных случайных величин U_1 и U_2 , связанных с выбранными параметрами P_1 и P_2 с помощью следующих уравнений:

$$U_1^{(i)} = \frac{(P_1^{(i)} - \bar{P}_1)}{\sigma_1} \quad (2)$$

$$U_2^{(i)} = \frac{(P_2^{(i)} - \bar{P}_2)}{\sigma_2} \quad (3)$$

После этого рассчитывается евклидово расстояние между объектами 1 и 2 в двумерном пространстве по формуле:

$$d = \sqrt{(U_1^{(1)} - U_1^{(2)})^2 + (U_2^{(1)} - U_2^{(2)})^2} \quad (4)$$

В общем виде такой подход позволяет найти общее расстояние между двумя любыми объектами как квадратный корень из суммы квадратов их параметров.

Кластерный анализ проводился по следующим критериям: абсолютная интенсивность экспозиционного максимума превышала 0,5 В; время релаксации;

отношение интенсивности экспозиционного максимума к релаксационному и отношение интенсивности релаксационного максимума, отсчитываемого от точки окончания экспозиции, к абсолютной величине этого максимума. Были сформированы кластеры с евклидовым расстоянием между двумя наиболее отдаленными объектами в них не более 0,6 единиц. Параметры кривых отклика, которые характеризуют отобранные сенсоры, приведены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристики сенсоров, входящих в кластер с евклидовым расстоянием 0,6

Наименование сенсора	Время релаксации t , с	Max_1/Max_2	$(Max_2 - P_{12})/Max_2$
P13	68	0,86	0,21
NC8	72	0,84	0,23
1/22	73	0,79	0,28
W/32	68	0,82	0,24
W/44	70	0,81	0,27
W/47	73	0,84	0,27

Здесь Max_1/Max_2 – отношение интенсивности экспозиционного максимума к релаксационному; $(Max_2 - P_{12})/Max_2$ – отношение интенсивности релаксационного максимума, отсчитываемого от точки окончания экспозиции, к абсолютной величине этого максимума.

При сравнении двух кривых отклика, полученных от разных сенсоров из сформированного кластера, можно убедиться, что эти кривые подобны как по качественным признакам, так и по их количественным значениям (рис. 3.). Следует отметить, что представленные кривые приведены до нормировки кривых отклика, что показывает их высокую схожесть даже в абсолютных величинах интенсивности и времен релаксации. Небольшие расхождения в поведении отдельных участков кривых отклика могут быть обусловлены изменением метаболического профиля выдыхаемого газа человека в течение одного часа, соответствовавшего промежутку времени между измерениями, что является вполне естественным для данной сложной биологической среды.

Выбранные образцы сенсоров с максимально близкими характеристиками были использованы для детектирования канцерогенных штаммов бактерии *H. pylori*. В качестве примера приведем результаты детектирования выдыхаемого газа пациентов с различной патологией.

Исследования проводились в Институте охраны здоровья детей и подростков НАМН Украины [14]. В качестве испытуемых волонтеров выступали пациенты, госпитализированные в связи с жалобами диспептического характера. С помощью точечно-контактных газовых сенсоров были получены кривые отклика для 142 подростков. В качестве группы сравнения выступал 31 здоровый доброволец. Для контроля состояния инфицированности *H. pylori* были параллельно использованы методы иммуноферментного анализа (ELISA) и аммиачный дыхательный тест (HELIC АBT). В результате проведенных исследований было показано, что состоянием организма, инфицированного различными штаммами *H. pylori*, соответствуют сенсорные кривые отклика с различными характеристическими параметрами (рис. 4, см. также [14]).

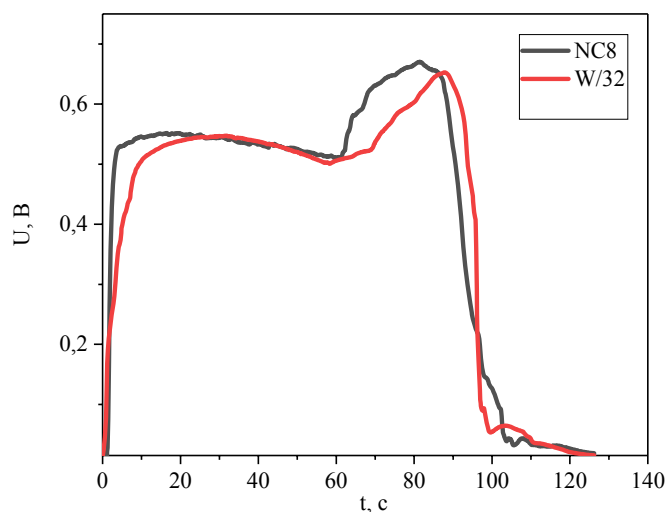


Рис. 3. Кривые отклика для двух сенсоров (NC8 и W/32) под действием газа, выдыхавшегося одним добровольцем.

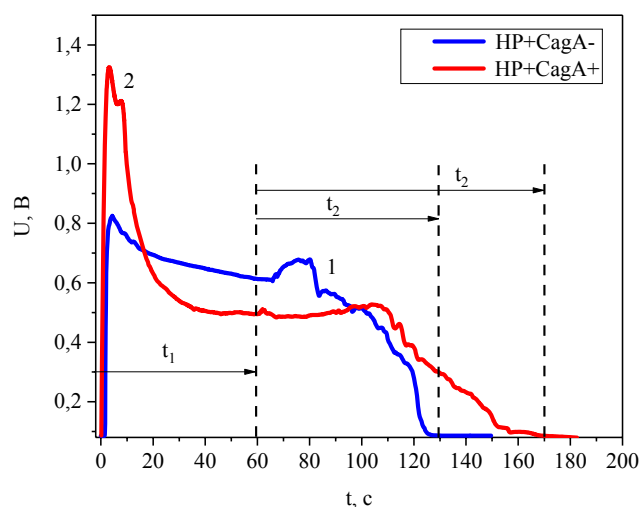


Рис. 4. Кривые отклика для пациентов, зараженных различными штаммами бактерии *H. Pylori*. 1 - пациент Б.К. (HP+CagA-), 2 – пациент Н.В. (HP+CagA+). t_1 – время экспозиции, t_2 – время релаксации.

Мы обнаружили, что один из этих параметров, а именно, время релаксации (t_2 на рис. 4) обладает диагностическими возможностями для анализа выдыхаемого газа пациентов с гастродуоденальной патологией и позволяет детектировать состояния, обусловленные инфекцией *H. pylori*. При инфицировании организма бактерией *H. pylori* время релаксации сенсора под действием выдыхаемого газа достоверно превосходит время релаксации в случае анализа выдыхаемого газа здоровых добровольцев. В случае инфицирования организма цитотоксичными Cag A штаммами бактерии наблюдается ярко выраженный эффект увеличения времени релаксации сенсора не только по отношению к случаю здоровых добровольцев, но и по сравнению с ситуацией инфицированности нетоксигенными штаммами бактерии *H. pylori*. Существенную разницу в величине параметра t_2 для последних двух случаев

демонстрируют кривые на рис. 4. Очевидно, что продукты метаболизма канцерогенных штаммов бактерии *H. pylori* доминантно влияют на электропроводность сенсора и определяют поведение особенностей на кривых отклика сенсоров, в частности, приводят к значительному увеличению времени релаксации после воздействия выдыхаемого газа инфицированных пациентов. Таким образом, используя точечно-контактные сенсоры на основе соединений TCNQ, возможно дифференцировать штаммы *H. pylori* по их канцерогенному потенциалу.

ВЫВОДЫ

В ходе данной работы были созданы и исследованы 350 точечно-контактных газовых сенсоров на основе соединений TCNQ. Применение оригинальных технологических приемов позволило сформировать сенсоры активного типа, которые включали в себя миниатюрный источник тока и, следовательно, могли работать в автономном режиме без внешнего источника питания. Для отбора чувствительных элементов с максимально близкими параметрами был использован математический метод кластерного анализа, что позволило обеспечить высокую достоверность результатов при работе сенсоров в сложных газовых средах. Используя специальную методику сбора экспериментальных данных, мы исследовали кривые отклика этих сенсоров под воздействием газа, выдыхаемого человека. Было показано, что разработанные сенсоры являются эффективным инструментом для анализа выдыхаемого газа пациентов в режиме реального времени и демонстрируют высокую чувствительность и избирательность по отношению к продуктам жизнедеятельности различных штаммов бактерии *H. pylori*. Таким образом, в данной работе впервые создан эффективный портативный инструмент для разработки инновационных скрининговых технологий неинвазивной диагностики состояний организма человека, характеризующихся гастродуоденальной патологией, и дифференциации толерантных и канцерогенных штаммов инфекции *H. pylori*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C. A., Atherton J., Axon A. T., Bazzoli F., Gensini G. F., Gisbert J. P., Graham D. Y., Rokkas T., El-Omar E. M., Kuipers E. J. Management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht IV/ Florence Consensus Report // *Gut*. 2012. Vol. 61(5). P. 646-664.
2. Garza-González E., Perez-Perez G.I., Maldonado-Garza H.J., Bosques-Padilla F.J. A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication // *World J Gastroenterol*. 2014. Vol. 20(6). P. 1438-1449.
3. IARC Working Group. *Helicobacter pylori* Eradication as a Strategy for Preventing Gastric Cancer // Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2014. (IARC Working Group Reports, Vol. 8). P. 181 Available from: http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wrk/wrk8/Helicobacter_pylori_Eradication.pdf.
4. Graham D.Y., *Helicobacter pylori* infection is the primary cause of gastric cancer // *J. Gastroenterol*. 2000. Vol. 35(12). P. 90-97.
5. Wroblewski L.E., Peek R. M., Jr., Wilson K. T. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk // *Clinical microbiology reviews*. 2010. Vol. 23(4). P. 713-739.
6. Palframan S.L., Kwok T., Gabriel K. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis // *Front Cell Infect Microbiol*. 2012. Vol. 2(92). P. 9.
7. Costello B.d.L., Amann A., Al-Kateb H., Flynn C., Filipiak W., Khalid T., Osborne D., Ratcliffe N.M. A review of the volatiles from the healthy human body // *J. Breath Res*. 2014. Vol. 8(1). P. 014001 (29 pp).
8. Smith D., Španěl P. Selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS) for on-line trace gas analysis // *Mass Spectrom Rev*. 2005. Vol. 24(5). P. 661-700.
9. Ishimaru M., et al. Analysis of volatile metabolites from cultured bacteria by gas chromatography /atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry // *J Breath Res*. 2008. Vol. 2(3). P. 037021.
10. Graham D.Y., et al. *Campylobacter pylori* detected noninvasively by the ¹³C-urea breath test // *Lancet*. 1987. Vol. 1(8543). P. 1174-1177.
11. Iniewski K. *Smart Sensors for Industrial Applications. Devices, Circuits, and Systems*. Boca Raton: CRC Press, 2013. 598 p.

12. Kamarchuk G.V., Pospelov A.P., Kushch I.G. Sensors for exhaled gas analysis: an analytical review, in *Volatile biomarkers: non-invasive diagnosis in physiology and medicine* / eds. A. Amann and D. Smith. Amsterdam: Elsevier, 2013. P. 265-300.
13. Kamarchuk G.V., Pospelov A.P., Kamarchuk L.V., Kushch I.G. Point-Contact Sensors and Their Medical Applications for Breath Analysis: A Review, In *Nanobiophysics: Fundamentals and Applications* / ed. V.A. Karachevtsev. Philadelphia: Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., 2015. P. 327-379.
14. Kushch I., Korenev N., Kamarchuk L., Pospelov A., Kravchenko A., Bajenov L., Kabulov M., Amann A., Kamarchuk G., On the importance of developing a new generation of breath tests for *Helicobacter pylori* detection // *J. Breath Res.* 2015. Vol. 9(4). P. 047109 (15 pp).
15. Naidyuk Yu.G., Yanson I.K. *Point-contact spectroscopy*. New York: Springer, 2005. 300 p.
16. Kamarchuk G.V., Pospelov O.P., Yermenko A.V., Faulques E., Yanson I.K. Point-Contact Sensors: New Prospects for a Nanoscale Sensitive Technique // *Europhys. Lett.* 2006. Vol. 76(4). P. 575-581.
17. Kamarchuk G.V., Kolobov I.G., Khotkevich A.V., Yanson I.K., Pospelov A.P., Levitsky I.A., Euler W.B. New chemical sensors based on point heterocontact between single wall carbon nanotubes and gold wires // *Sensors and Actuators B.* 2008. Vol. 134 (2). P. 1022-1026.
18. Кулик И.О., Омелянчук А.Н., Шехтер Р.И. Электропроводность точечных микроконтактов и спектроскопия фононов и примесей в нормальных металлах // *ФНТ.* 1977. Т. 3, № 12. С. 1543-1558.
19. Kravchenko A.V., Starodub V.A., Kazachkov A.R., Khotkevich A.V., Pyshkin O.S., Kamarchuk G.V. Spectral and electrophysical characteristics of anion-radical salts of TCNQ and methyl-TCNQ with N-alkylpirazinium cations, in *Spectroscopy of Emerging Materials* / eds. E.C. Faulques, D.L. Perry, A.V. Yermenko. Boston / Dordrecht / London: Kluwer Academic Publishers, 2004. P. 319-330.
20. Pyshkin O., Kamarchuk G., Yermenko A., Kravchenko A., Pospelov A., Alexandrov Yu., Faulques E. Evidence for sensory effects of a 1D organic conductor under gas exposure // *J. Breath Res.* 2011. Vol. 5(1). P. 016005 (9 pp).
21. Пospelov A.П., Кушч Е.Г., Александров Ю.Л., Плетнев А.М., Камарчук Г.В. Сенсоры активного типа для анализа выдыхаемого газа // *Сенсорна електроніка і мікросистемні технології.* 2007. № 2. С. 49-54.
22. Чубов П.Н., Янсон И.К., Акименко А.И. Электрон-фононное взаимодействие в алюминиевых микроконтактах // *ФНТ.* 1982. Т. 8. № 1. С. 64-80.
23. Khotkevich A.V., Yanson I.K. *Atlas of Point Contact Spectra of Electron-Phonon Interactions in Metals*. Boston / Dordrecht / London: Kluwer Academic Publishers, 1995. 168 p.
24. Твердотельный газовый сенсор: пат. 17424 Україна № U 2006 04253 ; заявл. 17.04.2006 ; опубл. 15.09.2006, Бюл. № 9. 90 с.
25. Kushch I.G., Korenev N.M., Kamarchuk L.V., Pospelov A.P., Alexandrov Y.L., Kamarchuk G.V. Sensors for Breath Analysis: An Advanced Approach to Express Diagnostics and Monitoring of Human Diseases, in *Biodefence. NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology*, A.K. / ed. S. Mikhalovsky. Luxembourg: Springer Science+Business Media, 2011. P. 63-75.
26. Jeffers J.N.R. *An introduction to systems analysis: with ecological applications*. London: Edward Arnold, 1978. 198 p.
27. Орлов А.И. *Математика случая: Вероятность и статистика - основные факты*. Москва: МЗ-Пресс, 2004. 110 с.

REFERENCES

1. Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C. A., Atherton, J., Axon, A. T., Bazzoli, F., Kuipers, E. J. (2012). Management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut*, 61(5), 646-664. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302084.
2. Garza-González, E., Perez-Perez, G.I., Maldonado-Garza, H.J. & Bosques-Padilla, F.J. (2014). A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. *World J Gastroenterol*, 20(6), 1438-1449. doi: 10.3748/wjg.v20.i6.1438.
3. IARC *Helicobacter pylori* Working Group (2014). *Helicobacter pylori Eradication as a Strategy for Preventing Gastric Cancer*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC Working Group Reports, No. 8). Available from: http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wrk/wrk8/Helicobacter_pylori_Eradication.pdf.
4. Graham, D.Y. (2000). *Helicobacter pylori* infection is the primary cause of gastric cancer. *J Gastroenterol*, 35(12), 90-97.
5. Wroblewski, L.E., Peek, R. M., Jr. & Wilson, K. T. (2010). *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clinical microbiology reviews*, 23(4), 713-739. doi: 10.1128/CMR.00011-10.
6. Palframan, S.L., Kwok, T., Gabriel, K. (2012). Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol.*, 2(92), 9. doi: 10.3389/fcimb.2012.00092.

7. Costello, B.d.L., Amann, A., Al-Kateb, H., Flynn, C., Filipiak, W., Khalid, T., Ratcliffe, N. M. (2014). A review of the volatiles from the healthy human body. *J. Breath Res*, 8(1), 014001 (29 pp). doi: 10.1088/1752-7155/8/1/014001.
8. Smith, D. & Španěl, P. (2005). Selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS) for on-line trace gas analysis. *Mass Spectrom Rev.*, 24(5), 661-700. DOI: 10.1002/mas.20033.
9. Ishimaru M., et al. (2008). Analysis of volatile metabolites from cultured bacteria by gas chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *J Breath Res.*, 2(3), 037021. doi: 10.1088/1752-7155/2/3/037021.
10. Graham D.Y., et al. (1987). *Campylobacter pylori* detected noninvasively by the ¹³C-urea breath test. *Lancet*, 1(8543), 1174-1177.
11. Iniewski, K. (2013). *Smart Sensors for Industrial Applications. Devices, Circuits, and Systems*. Boca Raton: CRC Press.
12. Kamarchuk, G.V., Pospelov, A.P. & Kushch, I.G. (2013). Sensors for exhaled gas analysis: an analytical review. In Amann, A. & Smith, D. (Eds), *Volatile biomarkers: non-invasive diagnosis in physiology and medicine* (pp. 265-300). Amsterdam: Elsevier.
13. Kamarchuk, G.V., Pospelov, A.P., Kamarchuk, L.V. & Kushch, I.G. (2015). Point-Contact Sensors and Their Medical Applications for Breath Analysis: A Review. In V. A. Karachevtsev (Ed.), *Nanobiophysics: Fundamentals and Applications* (pp. 327-379). Philadelphia: Pan Stanford Publishing Pte. Ltd.
14. Kushch, I., Korenev, N., Kamarchuk, L., Pospelov, A., Kravchenko, A., Bajenov, L., Kamarchuk G. (2015). On the importance of developing a new generation of breath tests for *Helicobacter pylori* detection *J. Breath Res.*, 9(4), 047109 (15 pp). doi: 10.1088/1752-7155/9/4/047111.
15. Naidyuk, Yu.G. & Yanson, I.K. (2005). *Point-contact spectroscopy*. New York: Springer.
16. Kamarchuk, G.V., Pospelov, O.P., Yeremenko, A.V., Faulques, E. & Yanson, I.K. (2006). Point-Contact Sensors: New Prospects for a Nanoscale Sensitive Technique. *Europhys. Lett.*, 76(4), 575-581. doi: 10.1209/epl/i2006-10303-6.
17. Kamarchuk, G.V., Kolobov, I.G., Khotkevich, A.V., Yanson, I.K., Pospelov, A.P., Levitsky, I.A. & Euler W.B. (2008). New chemical sensors based on point heterocontact between single wall carbon nanotubes and gold wires. *Sensors and Actuators B.*, 134(2), 1022-1026. doi: 10.1016/j.snb.2008.07.012
18. Kulik, I. O., Omelyanchuk, A. N. & Shekhter, R. I. (1977). Electric conductivity of point contacts and spectroscopy of phonons and impurities in normal metals. *Fizika Nizkikh Temperatur*, 3, 1543-1558.
19. Kravchenko, A.V., Starodub, V.A., Kazachkov, A.R., Khotkevich, A.V., Pyshkin, O.S. & Kamarchuk G.V. (2004). Spectral and electrophysical characteristics of anion-radical salts of TCNQ and methyl-TCNQ with N-alkylpirazinium cations. In E.C. Faulques, D.L. Perry, & A.V. Yeremenko (Eds.), *Spectroscopy of Emerging Materials* (pp. 319-330). Boston/Dordrecht/London: Kluwer Academic Publishers.
20. Pyshkin, O., Kamarchuk, G., Yeremenko, A., Kravchenko, A., Pospelov, A., Alexandrov, Yu. & Faulques E. (2011). Evidence for sensory effects of a 1D organic conductor under gas exposure. *J. Breath Res.*, 5(1), 016005 (9 pp). doi:10.1088/1752-7155/5/1/016005
21. Pospelov, A. P., Kushch, I. G., Alexandrov, Yu. L., Pletnev, A. M. & Kamarchuk, G. V. (2007). Active type sensors for breath gas analysis. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*, 2, 49-54.
22. Chubov, P. N., Yanson, I. K. & Akimenko, A. I. (1982). Electron-phonon interaction in aluminum point contacts. *Sov. J. Low Temp. Phys.*, 8, 32-42.
23. Khotkevich, A.V., Yanson, I.K. (1995). *Atlas of Point Contact Spectra of Electron-Phonon Interactions in Metals*. Boston/Dordrecht/London: Kluwer Academic Publishers.
24. Declaration patent of Ukraine „Solid-state gas sensor” #17424, Bull. #9, 15.09.2006.
25. Kushch, I.G., Korenev, N.M., Kamarchuk, L.V., Pospelov, A.P., Alexandrov, Y.L. & Kamarchuk G.V. (2011). Sensors for Breath Analysis: An Advanced Approach to Express Diagnostics and Monitoring of Human Diseases. In S. Mikhalovsky (Ed.), *Biodefence. NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology* (pp. 63-75). Luxembourg: Springer Science+Business Media.
26. Jeffers, J.N.R. (1978). *An introduction to systems analysis: with ecological applications*. London: Edward Arnold.
27. Orlov, A. I. (2004). *Mathematics of Chance: Probability and Statistics*. Moscow: MZ-Press.

Наукове видання

“Біофізичний вісник”

Вип. 38(2)

Збірник наукових праць

Укр., рос. та англ. мовами.

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

Підписано до друку 01.12.2017. Формат 60×84 1/8.
Папір офсетний. Друк ризографічний.
Ум. друк. арк. 5,48. Обл.-вид. арк. 6,37. 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

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Electronic files of the contributions (created in MS Word 2007 and later versions) written in English, Ukrainian or Russian, scans of the expert inference directive and directive from the author's institution should be sent to the Editorial Office online via the website <http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk>.

A manuscript should be typed in single spacing on A4 paper. Use the MS Word with following options: 12 points Times New Roman font, text justified. Left and right margins should be 2.5 cm, the upper margin should be 3.5 cm, and bottom one should be 2 cm. Mathematical and chemical symbols, equations, and formulae should be inserted in the text by computer means (MathType or Microsoft Equation). Figures should be computer-generated in software packages intended for processing and visualization of scientific data: Origin, Mathcad, etc. The use of the MS Office Excel is not recommended. Use computer printed symbols for axes labeling. Insert prepared images into an MS Word file as files in *.emf, *.wmf, *.jpg, *.jpeg, *.png format within the area of the page specified above. We recommend the following layout: images are placed in the first row of the table with transparent outer borders, legends and comments to figures are placed in the second row of the table. The font size of figure legends should be 9 points. Formulae, tables, figures should be numbered consecutively using Arabic numerals, e.g. (1), Table 1, Fig 1.

Insert UDK in the first line on the left of a first page (11 pt, Italic). Leave one line blank. Place the title of the paper in capital letters (12 pt, bold, centered) on the next line. After one blank line type initials and surnames of the authors (12 pt, bold, centered). On the next line type the authors' affiliation and postal addresses of the institution where the actual work was done, including an e-mail address of the corresponding author (10 pt, Italic, centered). Then, place the date of the paper submission: day — in numbers, month — in words, year — in numbers (straight font, 10 pt, centered). Then, place the date of the paper submission (to be filled by editor).

After one blank line place three abstracts of the paper (written in Ukrainian, Russian and English). The first abstract should be written in the language of the manuscript. On the next line provide second, and then on the next line — third abstracts (capital letters, straight font, 10 pt, bold, centered). Above the second and third abstracts place the titles of the paper in two languages (capital letters, straight font, 10 pt, bold, centered), then — initials and surnames of the authors (straight font, 10 pt, bold, centered), and finally — the authors' affiliation names and addresses (9 pt, Italic, centered), every time starting from a new line. The abstract should be structured and consist of the following parts with headings: **Background, Objectives, Materials and Methods, Results, Conclusions**, each placed on a new line. The words "Резюме" and "Abstract" should be omitted. The headers of structural parts are written in bold letters, putting a dot after the header. All the three abstracts of the paper should contain not less than 1,800 and not more than 2,000 phonetic symbols (i.e., without taking into account the spacing between words); straight font, 10 pt. On the next line type 5-8 key words, separated by a semicolon (10 pt — first abstract, 9 pt — second and third abstracts). Next, the header "**KEY WORDS:**" should be typed in bold capital letters at the beginning of the line. The texts of the abstracts and key words should be indented 0.5 cm from the left and right margins. The abstracts should be separated by a blank line.

Then, leave one blank line before starting to type the text of the paper with following options: Times New Roman font, 12 pt, text justified. The first line of each paragraph should be indented 0.75 cm from the left margin. Each manuscript should contain the following elements: an introduction (heading of this section should be omitted), **MATERIALS AND METHODS** (obligatory for experimental studies), **RESULTS AND DISCUSSION**, **CONCLUSIONS**. For theoretical less specified text organization is envisaged, e.g., instead of section **MATERIALS AND METHODS**, the sections **PROBLEM FORMULATION** or **MODEL** are recommended, etc. The sections are not numbered, capital letters, bold, centered. Sections may be subdivided into subsections, if necessary. Subsection Headings are centered and should be bold and capitalized. Leave one blank line after each section or subsection. A dot should be omitted after headings of sections and subsections. Names of the foundations and grant numbers should be included in the section **ACKNOWLEDGMENTS** at the end of the text after one blank line. The next section should be **CONFLICT OF INTEREST** in which you should declare financial or any other conflict of interest. If there is no conflict of interest you can state: "The authors declare that there is no conflict of interest."

References to the literature should be cited in the text consecutively by Arabic numerals in square brackets. The citation of unpublished papers, textbooks and tutorials are prohibited. List of references (10 pt) should be given twice. The first one should be given at the end of the manuscript as a separate section **REFERENCES**, formatted according to the Ukrainian DSTU GOST 8302:2015 style. The second list of references is given in English. It should be placed after the first one, entitled as **REFERENCES**, and formatted according to the APA style for scientific publications.

The examples for reference formats are given on the journal's website in the "Author Guidelines": <http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/about/submissions#authorGuidelines>

Manuscripts that do not meet the requirement mentioned above will not be considered for publication!