

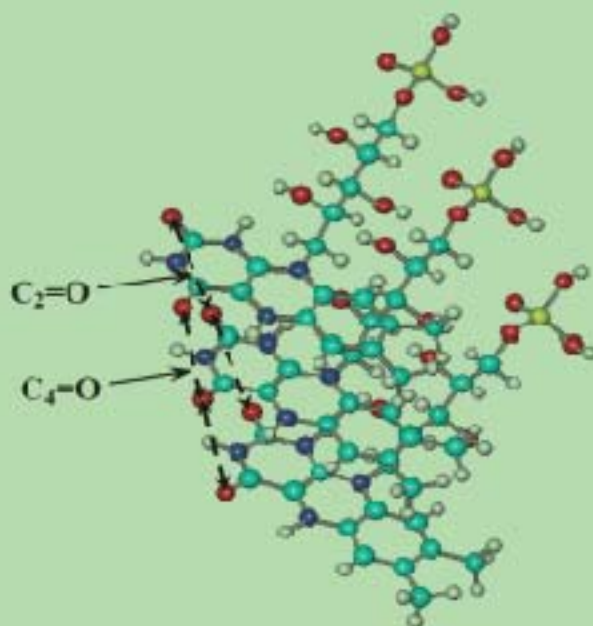
ISSN 2075-3810 (Print)  
ISSN 2075-3829 (Online)



**KARAZIN UNIVERSITY**  
**CLASSICS AHEAD OF TIME**



**BIOPHYSICAL**  
**BULLETIN**



41'2019

**БІОФІЗИЧНИЙ**  
**ВІСНИК**

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

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

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

# Біофізичний Вісник Biophysical Bulletin

**Випуск 41 Issue**

Заснований 1998 р.

Founded in 1998

**Харків 2019 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 № 1 від 21 січня 2019 р.).

#### Редакційна колегія:

Головний редактор – **Горбенко Г.П.** – д.ф.-м.н., проф.,

ХНУ імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

Заступник головного редактора – **Катрич В.О.** – д.ф.-м.н., проф.,

ХНУ імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

Відповідальний секретар – **Берест В.П.** – к.ф.-м.н., доц.,

ХНУ імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

**Баранник Є.О.** – д.ф.-м.н., проф.,

ХНУ імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

**Бондаренко В.А.** – д.б.н., проф.,

ХНУ імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

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

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

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

ІМБГ НАН України, Київ, Україна

**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, Харків, Україна

**Кірілова Є.** – PhD, доцент,

Даугавпільський університет, Даугавпілс, Латвія

**Кнігавко В.Г.** – д.б.н., проф., Харківський національний

медичний університет, Харків, Україна

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

ІМБГ НАН України, Київ

**Косевич М.В.** – д.ф.-м.н., с.н.с.,

ФТІНТ ім. Б.І. Веркіна НАН України, Харків, Україна

**Малєєв В.Я.** – д.ф.-м.н., проф.,

ІРЕ ім. О.Я. Усикова НАН України, Харків, Україна

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

ХНУ імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

**Осецький О.І.** – д.ф.-м.н., проф.,

ІПКіК НАН України, Харків, Україна

**Перський Є.Е.** – д.б.н., проф.,

ХНУ імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

**Семенов М.О.** – д.ф.-м.н., проф.,

ІРЕ ім. О.Я. Усикова НАН України, Харків, Україна

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

Інститут біології клітини, Львів, Україна

**Сорокін В.О.** – д.ф.-м.н., проф.,

ФТІНТ ім. Б.І. Веркіна НАН України, Харків, Україна

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

Інститут біології клітини, Львів, Україна

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

Сумський державний університет, Суми, Україна

**Толсторуков М.Є.** – PhD, Відділ молекулярної біології,

Массачусетська загальна лікарня, Бостон, США

**Трусова В.М.** – д.ф.-м.н., проф.,

ХНУ імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

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

ІРЕ ім. О.Я. Усикова НАН України, Харків, Україна

**Шкорбатов Ю.Г.** – д.б.н., проф.,

ХНУ імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

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

#### Адреса редакційної колегії:

Кафедра молекулярної і медичної біофізики

Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна

Майдан Свободи, 4, Харків, 61022, Україна

тел. / phone: +38 057 707 55 76

e-mail: biofiz-visnyk@karazin.ua

#### Editorial Board:

*Editor-in-Chief* – **G.P. Gorbenko** – Dr. Sci., Prof.,

V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

*Vice Editor-in-Chief* – **V.A. Katrich** – Dr. Sci., Prof.,

V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

*Executive Secretary* – **V.P. Berest** – PhD., Associate Prof.,

V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

**E.A. Barannik** – Dr. Sci., Prof.,

V.N. Karazin KhNU, Kharkiv, Ukraine

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

V.N. Karazin KhNU, Kharkiv, Ukraine

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

Bogomoletz Institute of Physiology, NASU, Kiev, Ukraine

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

NASU, IMBG, NASU, Kiev, Ukraine

**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, United Kingdom,

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

B. Verkin ILTPI, NASU, Kharkiv, Ukraine

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

Daugavpils University, Daugavpils, Latvia

**V.G. Knigavko** – Dr. Sci., Prof., Kharkiv National

Medical University, Kharkiv, Ukraine

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

NASU, IMBG, NASU, Kiev, Ukraine

**M.V. Kosevich** – Dr. Sci., PI,

B. Verkin ILTPI, NASU, Kharkiv, Ukraine

**V.Ya. Maleev** – Dr. Sci., Prof.,

O.Ya. Usikov IRE, NASU, Kharkiv, Ukraine

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

V.N. Karazin KhNU, Kharkiv, Ukraine

**A.I. Osetski** – Dr. Sci., Prof., Institute for Problems of

Cryobiology and Cryomedicine, NASU, Kharkiv, Ukraine

**Ye.E. Perskiy** – Dr. Sci., Prof.,

V.N. Karazin KhNU, Kharkiv, Ukraine

**M.A. Semenov** – Dr. Sci., Prof.,

O.Ya. Usikov IRE NASU, Kharkiv, Ukraine

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

Institute of Cell Biology, Lviv, Ukraine

**V.A. Sorokin** – Dr. Sci., Prof.,

B. Verkin ILTPI, NASU, Kharkiv, Ukraine

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

NASU, Institute of Cell Biology, Lviv, Ukraine

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

NASU, Sumy State University, Sumy, Ukraine

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

Biology, Massachusetts General Hospital, Boston, USA

**V.M. Trusova** – Dr. Sci., Prof.,

V.N. Karazin KhNU, Kharkiv, Ukraine

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

O.Ya. Usikov IRE, NASU, Kharkiv, Ukraine

**Yu.G. Shkorbatov** – Dr. Sci., Prof.,

V.N. Karazin KhNU, Kharkiv, Ukraine

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

#### Address:

Department of Molecular and Medical Biophysics

V.N. Karazin Kharkiv National University

4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine

факс / fax: +38 057 754 47 46

http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk

Статті пройшли внутрішнє та зовнішнє рецензування.

Свідоцтво про державну реєстрацію КВ № 11007 від 17.02.2006.

## ЗМІСТ

## МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

- K.V. Miroshnychenko, A.V. Shestopalova**  
Ligand-induced DNA conformational changes in proflavine minor groove-bound complexes studied by molecular dynamics simulation 5-33
- A.A. Skuratovska, D.A. Pesina, E.G. Bereznyak, N.A. Gladkovskaya, E.V. Dukhopelnykov**  
Interaction of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with DNA and BSA 34-40

## МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

- О.В. Олар, В.О. Ушенко, М.Ю. Сахновський, Ю.О. Ушенко, О.В. Дуболазов, О.Г. Ушенко**  
Поляризаційно-інтерференційне картографування мереж в полікристалічних дифузних біологічних тканинах 41-51
- О.В. Олар, В.О. Ушенко, М.Ю. Сахновський, Ю.О. Ушенко, О.В. Дуболазов, О.Г. Ушенко, А.В. Мотрич**  
Методи і засоби азимутально-інваріантної мюллер-матричної поляриметрії оптично-анізотропних біологічних шарів 52-62

## БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

- Ю.М. Барабаш, Т.В. Серденко, П.П. Нокс, О.А. Голуб**  
Комп'ютерна методика аналізу структурно-динамічних властивостей реакційних центрів *Rhodobacter Sphaeroides* на основі системи диференціальних рівнянь 63-73

**CONTENTS****MOLECULAR BIOPHYSICS**

- K.V. Miroshnychenko, A.V. Shestopalova**  
Ligand-induced DNA conformational changes in proflavine minor groove-bound complexes studied by molecular dynamics simulation 5-33
- A.A. Skuratovska, D.A. Pesina, E.G. Bereznyak, N.A. Gladkovskaya, E.V. Dukhopelnykov**  
Interaction of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with DNA and BSA 34-40

**BIOPHYSICAL METHODS**

- O.V. Olar, V.O. Ushenko, M.Yu. Sakhnovsky, Yu.O. Ushenko, O.V. Dubolazov, O.G. Ushenko**  
Polarization-interference mapping of networks in diffusal polycrystalline biological tissues 41-51
- O.V. Olar, V.O. Ushenko, M.Yu. Sakhnovsky, Yu.O. Ushenko, O.V. Dubolazov, O.G. Ushenko, A.V. Motrich**  
Methods and means of asymtutal-invariant muller matrix polarimetry of optical and anisotropic biological layers 52-62

**BIOPHYSICS OF COMPLEX SYSTEMS**

- Y.M. Barabash, T.V. Serdenko, P.P. Knox, O.A. Golub**  
Computer method to analyze structural-dynamic properties of *Rhodobacter Sphaeroides* reaction centers based on system of differential equations 63-73

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2019-41-01>

UDC 577.323+577.113.7

## LIGAND-INDUCED DNA CONFORMATIONAL CHANGES IN PROFLAVINE MINOR GROOVE-BOUND COMPLEXES STUDIED BY MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION

K.V. Miroshnychenko<sup>1</sup>, A.V. Shestopalova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*O.Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of NAS of Ukraine,  
12 Ac. Proskura St., Kharkiv, 61085, Ukraine*

<sup>2</sup>*V.N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine  
e-mail: [kateryna.miroshnychenko@gmail.com](mailto:kateryna.miroshnychenko@gmail.com)*

Submitted October 3, 2018

Accepted December 19, 2018

**Background:** Minor groove binding is a rate-limiting step in proflavine-DNA intercalation reaction. This step is believed also to be responsible for the sequence-dependent kinetics of proflavine binding to DNA. At the same time, most studies are focused on the final stage of the reaction – the intercalation complex, and there is a lack of data concerning the structure and stability of proflavine-DNA minor groove-bound complexes.

**Objectives:** The objective of this study was to investigate the stability of proflavine minor groove-bound complexes with DNA oligonucleotides of different sequence by molecular dynamics simulation and to analyze the DNA conformational changes caused by the proflavine binding.

**Materials and methods:** The molecular dynamics simulations of proflavine minor groove-bound complexes with poly(dA)-poly(dT) and poly(dCG)-poly(dCG) oligonucleotides of 30 bp length were done in program package AMBER12 with explicit water (SPC/E) and ions (NaCl 0.15 M) using force fields FF14SB for DNA and GAFF for ligand. The starting configurations of complexes were obtained by docking method in AutoDock 3.05. After multi-stage equilibration protocol, each system was simulated at T=300 K and p=1 bar for a 50 ns production phase. Then trajectories were post-processed in AMBERTools17 and VMD-1.9.3 packages.

**Results:** Our simulations confirm that proflavine-DNA minor groove-bound complexes are stable in the 50 ns time range but there are some structural rearrangements in them with respect to the initial structures. The narrowing of the DNA minor groove is observed in the proflavine binding site. In proflavine-poly(dCG)-poly(dCG) complex it is more pronounced and is accompanied by the BI/II transitions in DNA and the reorientation of ligand. In proflavine-poly(dA)-poly(dT) complex the specific intermolecular hydrogen bonds are formed, which are optimized by the changes in opening and propeller twisting of involved AT-base pairs. Complexes are stabilized by the van der Waals and hydrophobic interactions, which are more favorable in the proflavine-poly(dA)-poly(dT) complex.

**Conclusions:** Our results show that the binding of proflavine to a minor groove of DNA induces the conformational changes in the DNA that are important for the resulting complex stability.

**KEY WORDS:** proflavine; DNA oligonucleotide; minor groove-bound complex; molecular dynamics simulation; induced fit mechanism; minor groove narrowing; BI/II transitions.

## ВИКЛИКАНІ ЛІГАНДОМ КОНФОРМАЦІЙНІ ЗМІНИ ДНК В КОМПЛЕКСАХ ПРОФЛАВІНУ ПО ТИПУ ЗВ'ЯЗУВАННЯ В МАЛОМУ ЖОЛОБКУ, ДОСЛІДЖЕНІ ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМІЧНОГО МОДЕЛЮВАННЯ

К.В. Мірошніченко<sup>1</sup>, Г.В. Шестопалова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Інститут радіофізики та електроніки ім. О.Я. Усикова НАН України,  
вул. Ак. Проскури, 12, Харків, 61085, Україна*

<sup>2</sup>*Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, 61022, Україна*

**Актуальність.** Зв'язування профлавіну в малому жолобку ДНК – це стадія, що обмежує швидкість реакції інтеркаляції. Вважають також, що ця стадія реакції відповідає за залежність кінетики зв'язування профлавіну з ДНК від послідовності. Більшість досліджень орієнтовані на фінальну стадію реакції – інтеркаляційний комплекс, тому бракує даних щодо структури та стабільності комплексів профлавіну в малому жолобку ДНК.

**Мета роботи.** Метою даного дослідження було вивчення стабільності комплексів профлавіну в малому жолобку олігонуклеотидів ДНК різної послідовності за допомогою молекулярно-динамічного моделювання та аналіз конформаційних змін ДНК, викликаних зв'язуванням профлавіну.

**Матеріали та методи.** Молекулярно-динамічне моделювання комплексів профлавіну з олігонуклеотидами poly(dA)·poly(dT) та poly(dCG)·poly(dCG), довжиною 30 п.о., було проведено в програмному пакеті AMBER12 з явним урахуванням води (SPC/E) та іонів (NaCl 0.15 M) з використанням силових полів FF14SB для ДНК та GAFF для ліганду. Стартові конфігурації комплексів були отримані методом докінгу в AutoDock 3.05. Після багатоетапного протоколу врівноваження, продукційна фаза моделювання для кожної системи становила 50 нс за умови T=300 K і p=1 бар. Аналіз траєкторій проводився за допомогою пакетів AMBERTools17 та VMD-1.9.3.

**Результати.** Результати моделювання свідчать, що комплекси профлавіну в малому жолобку ДНК є стабільними в часовому інтервалі 50 нс, однак у порівнянні зі стартовими структурами є деякі структурні зміни. В місці зв'язування профлавіну відбувається звуження малого жолобка ДНК. Воно є більш вираженим у комплексі профлавіну з poly(dCG)·poly(dCG) і супроводжується переходами VI/VIІ в ДНК та переорієнтацією ліганду. В комплексі профлавіну з poly(dA)·poly(dT) утворюються специфічні міжмолекулярні водневі зв'язки, що оптимізуються через зміну параметрів опенінг та пропелер задіяних АТ-пар. Стабілізація комплексів відбувається завдяки ван-дер-ваальсовим та гідрофобним взаємодіям, що є більш вигідними в комплексі профлавіну з poly(dA)·poly(dT).

**Висновки.** Наші результати вказують на те, що зв'язування профлавіну в малому жолобку запускає конформаційні зміни в ДНК за механізмом індукованої відповідності, що є важливими для стабільності кінцевого комплексу.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** профлавін; олігонуклеотид ДНК; комплекс в малому жолобку; молекулярно-динамічне моделювання; механізм індукованої відповідності; звуження малого жолобка; VI/VIІ переходи.

## ВЫЗВАННЫЕ ЛИГАНДОМ КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ДНК В КОМПЛЕКСАХ ПРОФЛАВИНА ПО ТИПУ СВЯЗЫВАНИЯ В МАЛОМ ЖЕЛОБКЕ, ИССЛЕДОВАННЫЕ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Е.В. Мирошниченко<sup>1</sup>, А.В. Шестопалова<sup>1,2</sup>

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

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

**Актуальность.** Связывание профлавина в малом желобке ДНК – это стадия, ограничивающая скорость реакции интеркаляции. Считают также, что эта стадия отвечает за зависимость кинетики связывания профлавина с ДНК от последовательности. Большинство исследований ориентированы на финальную стадию реакции – интеркаляционный комплекс, поэтому не хватает данных о структуре и стабильности комплексов профлавина в малом желобке ДНК.

**Цель работы.** Задачей данной работы было изучение стабильности комплексов профлавина в малом желобке олігонуклеотидов ДНК разной последовательности с помощью молекулярно-динамического моделирования и анализ конформационных изменений ДНК, вызванных связыванием профлавина.

**Материалы и методы.** Молекулярно-динамическое моделирование комплексов профлавина с олігонуклеотидами poly(dA)·poly(dT) и poly(dCG)·poly(dCG), длиной 30 п.о., было проведено в пакете AMBER12 с явным учетом воды (SPC/E) и ионов (NaCl 0.15 M) при использовании силовых полей FF14SB для ДНК и GAFF для лиганда. Стартовые конфигурации комплексов были получены методом докинга в AutoDock 3.05. После уравнивания, продукционная фаза моделирования для каждой системы составляла 50 нс при T=300 K и p=1 бар. Анализ траєкторий проводился с помощью пакетов AMBERTools17 и VMD-1.9.3.

**Результаты.** Получено, что комплексы профлавина в малом желобке ДНК являются стабильными во временном интервале 50 нс, но есть некоторые структурные изменения по сравнению с начальными конфигурациями. В месте связывания профлавина происходит сужение малого желобка ДНК. Оно более выражено в комплексе профлавина с poly(dCG)·poly(dCG) и сопровождается переходами VI/VIІ в ДНК и переориентацией лиганда. В комплексе профлавина с poly(dA)·poly(dT) образуются специфические межмолекулярные водородные связи, которые оптимизируются за счет изменения параметров опенинг и пропеллер задействованных АТ-пар.

Стабилизация комплексов происходит благодаря ван-дер-ваальсовым и гидрофобным взаимодействиям, которые более выгодны в комплексе профлавина с poly(dA)·poly(dT).

**Выводы.** Наши результаты указывают на то, что связывание профлавина в малом желобке запускает конформационные изменения в ДНК по механизму индуцированного соответствия, которые являются важными для стабильности конечного комплекса.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:**профлавин; олигонуклеотид ДНК; комплекс в малом желобке; молекулярно-динамическое моделирование; механизм индуцированного соответствия; сужение малого желобка; VI/VII переходы.

Proflavine (PF) (Fig. 1) is a small aromatic molecule that is known to exert antibacterial and mutagenic properties due to its interaction with DNA [1]. Depending on drug-DNA concentration, two binding modes are observed for PF: the strong binding of individual PF molecules to DNA at low drug-DNA ratios and weak binding of PF aggregates to DNA at high drug-DNA ratios [2]. To explain the strong binding of PF to DNA, an intercalation model was proposed by Lerman [3], according to which the planar drug is inserted between the base pairs into the DNA double helix with drug plane being perpendicular to the helix axis and long axis of the drug chromophore being almost parallel to the long axis of the base pair. This model became generally accepted due to the large number of experimental facts supporting it [3-6]. Later the X-ray structures of PF complexes with dinucleoside monophosphates [7-9] and short DNA duplex [10] were resolved also confirming the Lerman intercalation model.

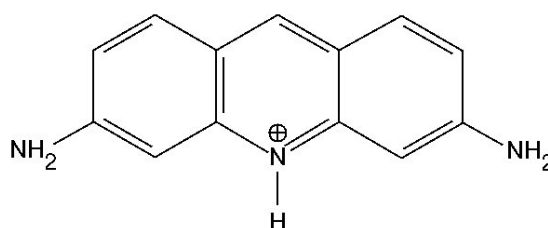
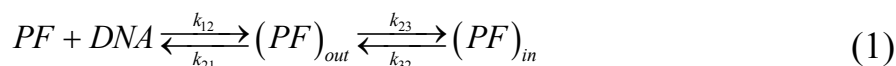


Fig. 1. The structural formula of proflavine.

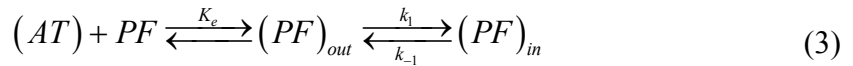
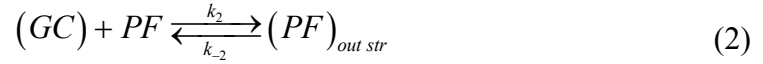
Despite the overall agreement on the structure of PF-DNA intercalation complex, the mechanism of the intercalation reaction has been controversial. Early kinetic studies on strong PF binding to calf-thymus DNA, performed by Li [11] using joule-heating temperature-jump method with absorption detection, revealed two relaxation times in sub-millisecond and millisecond range with different dependence on concentration. The two-step scheme of the reaction was proposed: the strong outside-bound complex is formed between the PF and DNA on the first stage and the intercalation complex is formed on the second stage (Scheme 1). The absorption spectrum of the outside-bound complex was similar to that of the intercalation complex, implying that there was at least a partial overlap of bases with PF in the outside-bound complex.



The subsequent investigations showed that the kinetics of the PF intercalation reaction depends strongly on the DNA base composition [12, 13]. Using joule-heating temperature-jump method with fluorescence detection, Ramstein found that there was only one relaxation time in the relaxation signal of PF-poly[d(GC)] system, and the inverse of the relaxation time varied linearly with concentration [13]. He suggested a single-step reaction for binding of PF to poly[d(GC)] and the resulting complex was interpreted as a strong outside-bound complex (Scheme 2). For the PF-poly[d(AT)] system also only one relaxation time was found, though its inverse leveled off at high phosphate concentration, and the two-step mechanism of the reaction proposed by Li was found to be appropriate (Scheme 3). An additional slower



relaxation time independent on concentration was seen for the interaction of PF with natural DNAs. Ramstein supposed that it was due to the PF exchange between GC- and AT-sites, having different kinetics of dye binding.

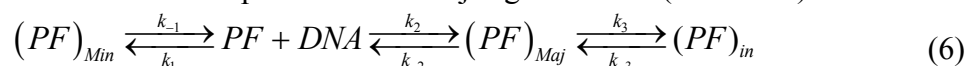


Later, the kinetics of PF binding to DNA was reinvestigated by Marcandalli using iodine-laser temperature-jump technique with absorption [14] and fluorescence detection [15]. One relaxation time was detected regardless of the choice of the method used. The dependence of reciprocal relaxation time on DNA concentration was linear in the case of GC-rich DNA and tended to a plateau at high DNA concentrations for AT-rich DNA. To explain the results Marcandalli suggested that there were two types of sites in DNA: B<sub>1</sub> sites (connected to GC-pairs) and B<sub>2</sub> sites (connected to AT-pairs). But unlike Ramstein, he proposed two-step mechanism of the reaction for both sites, and the complex formed at the final stage of the reaction was believed to be of intercalation type in both cases (Scheme 4, 5). The complexes formed on the first stage, E and E', were rapidly formed outside-bound complexes, but in contrast to the outside-bound complex from the Li scheme [11], these complexes were spectrophotometrically similar to free dye molecules, implying that they were water-solvated and there was no direct overlap of PF with DNA bases in them. Marcandalli showed that the magnitude of K<sub>e</sub>B<sub>i</sub> (K<sub>e</sub>– is the equilibrium constant of the first step of the reaction (Scheme 4, 5), B<sub>i</sub> – number of corresponding sites) determined the dependence of reciprocal relaxation time on DNA concentration. In the case of GC-rich DNA the outside-bound complex of PF was weak resulting in linear concentration dependence. For the AT-rich DNA strong outside-bound complex was formed between PF and DNA, which led to the leveling off of reciprocal relaxation time at high DNA concentrations and slower intercalation compared to the GC-sites. Marcandalli assumed that the greater stability of the outside-bound complex of PF with AT-rich DNA could be due to the hydrogen bonding of PF with purine N3 and pyrimidine O2 atoms in the minor groove of DNA. The N2 amino group of guanine protruding into the minor groove would interfere such interactions causing the weaker outside binding of PF with GC-rich DNA.



Nowadays the detailed picture of drug-DNA interactions at the atomic level can be obtained using computer simulation methods. Most of the computational studies of PF-DNA interactions considered the final stage of the reaction – the intercalation complex [16-21]. The outside binding of PF was modeled in the pioneering works as a hydrogen bonding to phosphate group [22], based on the 3:2 PF-CpG structure of Berman [8], or as an incomplete intercalation from the minor groove side [23]. To the best of our knowledge, the first modeling study that investigated the outside-bound complex of PF with DNA oligomer was done by Sasikala [24]. Using metadynamics method he studied the dissociation of PF from the minor groove-bound state and with appropriate configurational restraint managed to achieve the intercalation of PF from the minor groove-bound state. In the subsequent work of Sasikala, the intercalation of PF from the major groove-bound state was achieved and the processes of intercalation, de-intercalation and dissociation of PF from both grooves of DNA were compared [25]. It was found that the intercalation and de-intercalation of PF proceeded through the major groove side but the timescale of the intercalation reaction was determined

by the stable pre-intercalative minor groove-bound state. According to Sasikala, the binding of PF to DNA can be described by the following scheme: first, drug forms quickly (in a nanosecond range) groove-bound states with the population of the minor groove-bound state being higher due to its greater stability (compared to the major groove-bound state), but the direct intercalation from the minor groove-bound state is extremely slow due to the high energy barrier, therefore drug dissociates from the minor groove-bound state in a millisecond range and forms the intercalation complex from the major groove side (Scheme 6).



Recently the outside-binding of multiple PF molecules to DNA was simulated by Sasikala [26]. The formation of PF aggregates around DNA in nanosecond range was observed. Aggregates were seen mostly in the major groove of DNA, though a few stacks of PF molecules in the minor groove of DNA were also found. Due to the low phosphate to dye ratio (P/D=1) used in that study, the simulated process can be attributed to the weak binding of PF to DNA. It would be interesting though to investigate the strong monomeric minor groove binding of PF in more detail. There is a lack of simulation data on minor groove binding of PF to different DNA sequences. At the same time, there is multiple experimental evidence that the kinetics of PF binding to DNA depends on the DNA composition [12, 13, 15], and the analysis of literature suggests that it is the minor groove-bound state of PF that is responsible for the timescale of the reaction and the sequence-dependent kinetics [15, 25].

Previously we used molecular docking method to obtain the minor groove-bound (MGB) complexes of PF with DNA oligonucleotides of different sequence built according to the X-ray fiber data [27]. Depending on the geometry of the minor groove of DNA, two types of PF MGB complexes were observed. For DNA-targets with narrow minor groove (mostly poly(dA)·poly(dT) sequences), the strong MGB complex of PF was formed: its energy was comparable or even more favorable than that of the intercalation complex of PF. In this type of MGB complex, the PF chromophore was laying along the groove and its amino groups were participating in hydrogen bonding with DNA bases. For DNA-targets with wide minor groove (DNA of GC-composition), the second type of PF MGB complex was obtained: the PF chromophore was located across the minor groove and its amino groups formed hydrogen bonds with one of the sugar-phosphate chains. This type of complex was less energetically favorable than the intercalation complex of PF and the first type of PF MGB complex. The aim of this study was to investigate the stability of PF MGB complexes formed with DNA oligonucleotides of different sequence using molecular dynamics (MD) simulation with explicit solvent and physiological salt concentration and to analyze the DNA conformational changes caused by the PF binding.

## MATERIALS AND METHODS

The DNA oligonucleotides of 30 base pairs long were constructed in the module NAB of AMBERTools17 [28] or program FIBER of 3DNA package [29]. The protonated form of PF molecule was optimized at the B3LYP/6-31G\* level in the Gaussian 03 software [30], and the RESP atomic charges were calculated at the HF/6-31G\* level of theory using RED III package [31]. The structures of PF MGB complexes were obtained by molecular docking method in the AutoDock 3.05 package [32] using Lamarckian genetic algorithm with the following parameters: the size of population = 150 individuals, the maximum number of energy evaluations =  $10^7$ , the maximum number of generations = 27000. The Kollman partial atomic charges were used for DNA-targets and the RESP atomic charges – for PF molecule during docking procedure. All hydrogen atoms in the structures of target and ligand were considered explicitly and treated as non-polar. Under these conditions the NDB structures of

PF complexes with dinucleoside monophosphates (NDB codes: ddb009, ddb033, ddb034, drb008, drd004 [33]) were well reproduced in test re-docking calculations. The docking search space was confined by the grid box of 70x70x70 points centered at the fifteenth step of the DNA oligonucleotide with distance between adjacent grid points equal to 0.375 Å. 100 dockings were performed for each DNA-target, and the obtained complexes were ranked by the docking energy and clustered using a tolerance of 1 Å. The best cluster containing more than 10 conformations was used as a starting structure for MD simulations.

The MD simulations were performed for MGB complexes of PF with poly(dA)·poly(dT) and poly(dCG)·poly(dCG) oligonucleotides, and separately for DNA oligonucleotides and the PF. The program package AMBER12 [34] was used with the force fields FF14SB [35] for DNA and GAFF [36] for PF. Each system was solvated with SPC/E water molecules [37] in a truncated octahedral box, and periodic boundary conditions were applied. The minimal distance from solute atoms to the edge of the box was greater than 15 Å. The sodium counterions were used to neutralize the DNA charge, and an additional amount of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions was added to model the 0.15M concentration of NaCl salt. The Joung parameters for ions were used [38]. The initial positions of ions were randomized so that there were no ions within 6 Å of solute, and the minimal distance between the ions was greater than 4 Å. The long-range electrostatic interactions were treated using particle-mesh Ewald method [39] with a direct space cutoff of 9 Å. The bonds involving hydrogen were fixed using SHAKE algorithm [40], and a 2 fs integration step was applied. To equilibrate the system, the multi-stage protocol was used. First, the positions of water and ions were minimized keeping the solute fixed with weak restraints (25-20 kcal/(mol·Å<sup>2</sup>). Then the system was heated during 100 ps from 100 to 300 K under constant volume condition and 15 kcal/(mol·Å<sup>2</sup>) restraints on solute. After that, the restraints on solute atoms were gradually relaxed from 15 to 1 kcal/(mol·Å<sup>2</sup>) during a 5 series of alternating stages of 5000 steps minimization and 50 ps NPT MD at T = 300 K and p = 1 bar. To control the temperature and pressure, the Berendsen thermostat and barostat [41] were used with a coupling constant of 0.2 ps for both parameters. The next step was the 50 ps NPT MD with 0.5 kcal/(mol·Å<sup>2</sup>) restraints on solute followed by the 100 ps unrestrained NPT MD. The last stage of the equilibration protocol was the unrestrained 1 ns NPT MD at T = 300K and p = 1bar with the coupling constants increased to 5 ps. Then the simulations were extended under the same conditions for a 50 ns production phase.

The MD trajectories were analyzed using CPPTRAJ module [42] of AmberTools17 [28] and visualized in VMD-1.9.3 [43]. The hydrogen bonds (HB) were determined using the geometric criteria: the distance between the HB donor and the HB acceptor should be less than 3.2 Å, and the angle formed by the HB donor, the hydrogen and the HB acceptor should be greater than 120°. The ion was considered to be located in the minor groove of a DNA helical step when it was within 3 Å of N3 purine or O2 pyrimidine atoms of bases of this helical step.

The binding free energy estimates were obtained according to the molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area methodology (MMPBSA) using MMPBSA.py script [44] from AmberTools17. Under this approach, the binding free energy is calculated as a difference between the free energy of complex and the sum of the free energies of the unbound receptor and ligand:

$$\Delta G_{bind} = G_{complex} - [G_{receptor} + G_{ligand}]. \quad (7)$$

Each term in this equation can be represented as a sum of three components: the gas energy, calculated from the force field, the solvation energy and the entropy contribution:

$$G = E_{gas} + G_{solv} - TS. \quad (8)$$

The solvation free energy can be divided into the polar and non-polar part:

$$G_{solv} = G_{pol} + G_{np} . \quad (9)$$

The polar part of the solvation free energy was calculated by solving nonlinear Poisson-Boltzmann equation. The ionic strength was set to 0.15 M. The dielectric constants of solute and solvent were equal to 4 and 80, correspondingly. The ratio between the longest dimension of the rectangular finite-difference grid and that of the solute was equal to 4.0. The grid spacing of 0.5 Å was used.

The non-polar part of the solvation free energy was estimated as a sum of the repulsive term related to the formation of the solute-sized cavity in the solvent and the attractive dispersion term describing the attractive solute-solvent interactions. The repulsive term was calculated as

$$G_{rep} = p \cdot SAV + c , \quad (10)$$

where SAV – is the molecular volume enclosed by the solvent-accessible surface,  $p=0.0378$  kcal/(mol·Å<sup>3</sup>) – is the solvent pressure parameter, and  $c=-0.5692$  kcal/mol. The dispersion term was computed with a surface-based integration method [45].

Each energy term was calculated as an average over the ensemble of representative structures taken from the trajectory. Both single and multiple trajectory approaches were used and compared. We used for the calculation every 10<sup>th</sup> frame of the trajectory production phase (at every 20 ps, 2500 frames total).

The entropy contribution was calculated as a sum of translational, rotational and vibrational terms using standard statistical mechanics formulas for the rigid rotor harmonic oscillator ideal gas approximation [46]. Due to the computational cost, the entropy calculation was done only for a subset of 50 trajectory frames taken at every 1 ns. These frames were minimized using implicit solvent and then subjected to the normal mode analysis. It took more than 40 hours on 8-core node (2x Intel® Xeon® CPU 5420) to complete the minimization and normal mode calculation for 50 frames.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Average MD structures and root-mean-square deviation of PF from the initial position*

The starting structures of PF MGB complexes with poly(dA)·poly(dT) and poly(dCG)·poly(dCG) oligonucleotides obtained by docking method are shown in Fig. 2 (a) and (b). As one can see, the position of PF in the DNA minor groove is different in these two complexes. The poly(dA)·poly(dT) oligonucleotide has narrow minor groove, and in complex with it, the PF chromophore is located along the groove with its protonated ring nitrogen and amino groups being directed into the groove and making hydrogen bonds with DNA. The poly(dCG)·poly(dCG) oligonucleotide has wider minor groove compared to the poly(dA)·poly(dT), and in this case, the PF chromophore is positioned across the groove with its protonated nitrogen interacting with one of the sugar-phosphate chains.

To estimate the stability of PF MGB complexes in MD simulation, the root-mean-square deviation (RMSD) of PF heavy atoms with respect to the starting structures was calculated (the structures were aligned by the 4 base pairs closest to the bound PF) (Fig. 3). From the RMSD values it follows that the PF MGB complexes are stable in the 50 ns time interval. The average RMSD value of PF in complex with poly(dA)·poly(dT) is quite small ( $1.38 \pm 0.28$  Å) indicating that the structure of the docking complex is well conserved during the MD trajectory. Indeed, the average MD structure of PF MGB complex with poly(dA)·poly(dT) is very much alike to the starting structure (Fig. 2 (a) and (c)). On the contrary, the average RMSD value of PF in complex with poly(dCG)·poly(dCG) is relatively high and equals to  $4.09 \pm 0.93$  Å. This means that though the ligand is in close contact with poly(dCG)·poly(dCG)

during all the trajectory time there are some structural rearrangements in this complex with respect to the starting structure. Visual inspection of the trajectory reveals that during the MD simulation the reorientation of ligand takes place that causes the narrowing of the poly(dCG)-poly(dCG) minor groove in the PF binding site. The chromophore of ligand becomes located along the groove, like in the complex of PF with poly(dA)·poly(dT), except that amino groups of PF are directed outside the groove (Fig. 2 (d)). As it is evident from the time dependence of the RMSD, the reorientation of ligand occurs already at the equilibration phase (Fig. S1). The different orientation of PF amino groups in the average MD structures of PF MGB complexes can be explained by the fact that poly(dCG)·poly(dCG) has more shallow minor groove compared to the poly(dA)·poly(dT) due to the NH<sub>2</sub>- groups of guanine protruding into the minor groove.

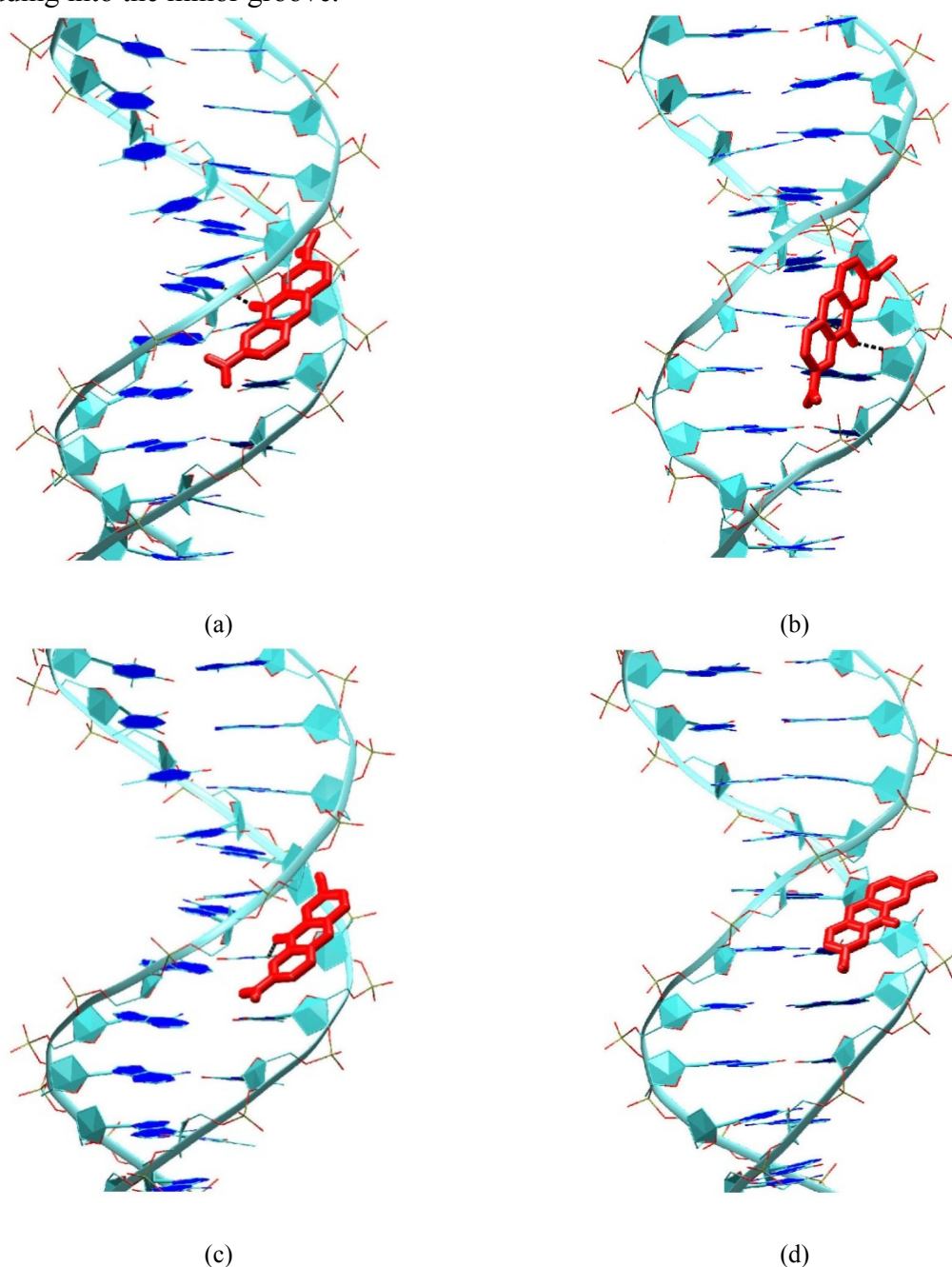


Fig. 2. The structures of PF MGB complexes: (a) and (b) starting (docking) structures of PF-poly(dA)·poly(dT) and PF-poly(dCG)·poly(dCG) complexes, correspondingly; (c) and (d) – average structures obtained from MD simulation for PF-poly(dA)·poly(dT) and PF-poly(dCG)·poly(dCG) complexes. PF is shown with red color.

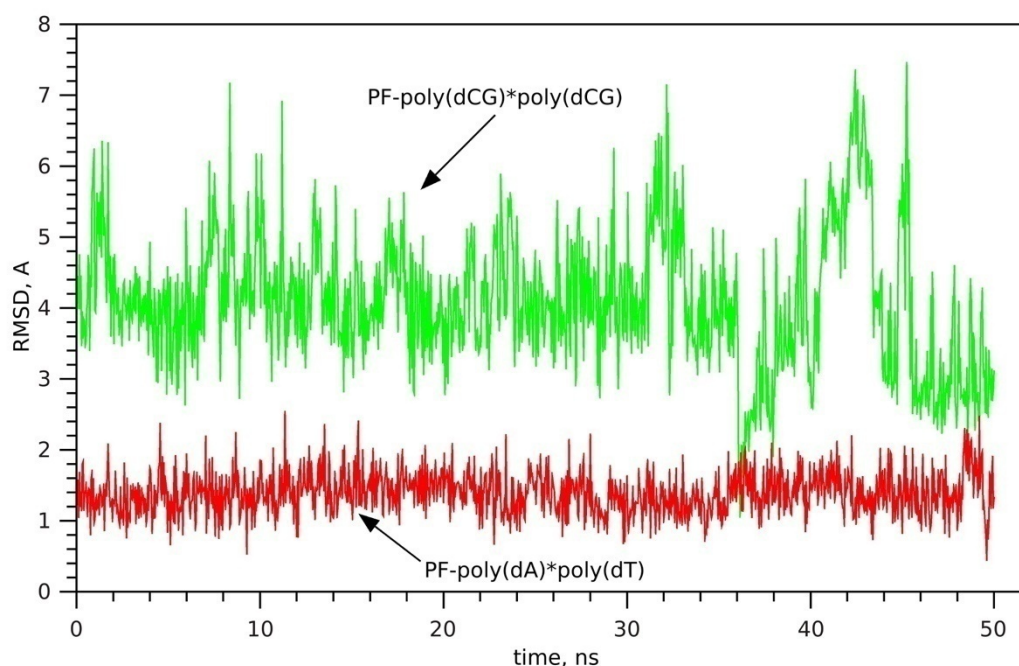


Fig. 3. The RMSD of PF heavy atoms with respect to the starting structures vs simulation time.

### *Hydrogen bonds*

The orientation of PF amino groups affected the formation of intermolecular HB in PF MGB complexes. There were no intermolecular HB in the PF-poly(dCG)·poly(dCG) complex during the most part of the simulation time. And in the MD trajectory of PF-poly(dA)·poly(dT) complex, the average number of HB between the PF and DNA was 1.77. In Fig. 4, the snapshots from the MD trajectory of the PF-poly(dA)·poly(dT) complex with depicted intermolecular HB are given. As shown, there are two PF groups, which make HB with DNA (thymine O2 or adenine N3 atoms) at the same time: the protonated ring nitrogen and one of the PF amino groups. This observation is in agreement with the prediction of Marcandalli that strong outer complex with AT-rich DNA is formed only for those acridine derivatives that have HB donor groups simultaneously in the positions 6 and 10 of the acridine chromophore [15].

### *Interactions with solvent and ions*

In both PF MGB complexes, water-mediated intermolecular HB (water bridges) were seen during the MD simulation. The average number of water bridges between the PF and DNA was equal to 1.2 for the PF-poly(dA)·poly(dT) complex and 1.6 for the PF-poly(dCG)·poly(dCG) complex. The snapshots of the PF MGB complexes with the maximum observed number of water bridges are shown in Fig. S2. In the PF-poly(dCG)·poly(dCG) complex, all the PF nitrogens were solvated and could interact via water bridges with DNA. And in the PF-poly(dA)·poly(dT) complex, only amino-groups of PF were solvated whereas the protonated ring nitrogen was unavailable to water because it was deeply inserted into the DNA minor groove and most part of the time participated in direct hydrogen bonding with DNA. The lifetime of the HB between PF and water molecules was in range 10-20 ps. Due to the PF-DNA interactions, the total number of water molecules bound via HB to each MGB complex was ~5 molecules less than the sum of the waters bound via HB to its free components (Table S1).



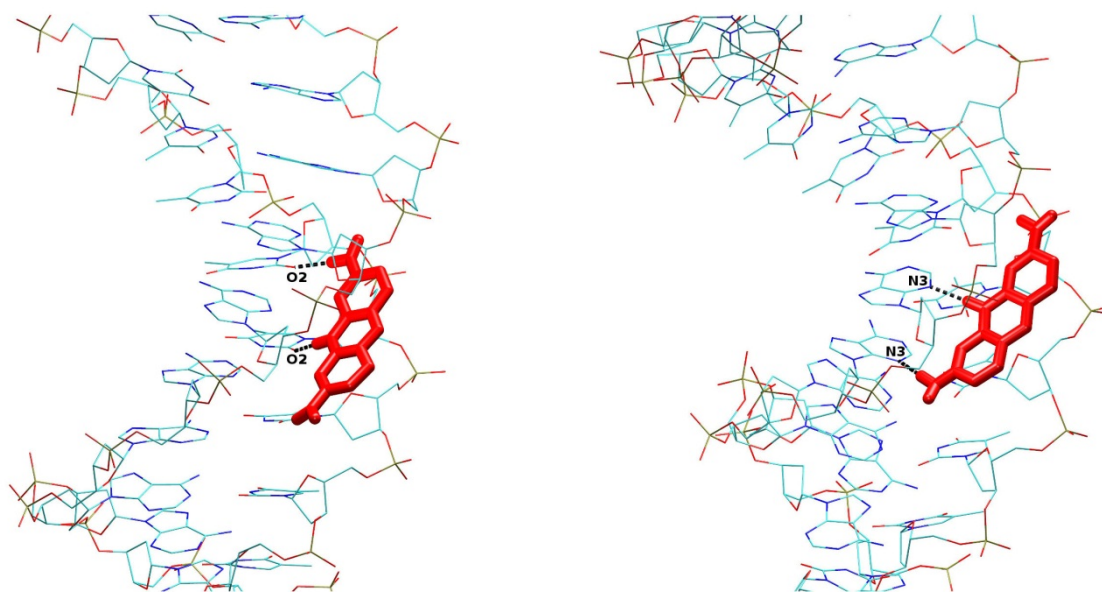


Fig. 4. Snapshots from the MD-trajectory of PF-poly(dA)-poly(dT) MGB complex with different pattern of intermolecular HB. PF is shown with red color. HB are shown as black dashed lines. DNA atoms that participate in hydrogen bonding are labeled.

The intrusion of the PF into the DNA minor groove caused not only the change of the hydration pattern but also the redistribution of the sodium ions in the DNA minor groove (Fig. 5). More noticeable changes were seen for the poly(dA)-poly(dT), which had more  $\text{Na}^+$  ions in its minor groove during the simulation compared to the poly(dCG)-poly(dCG) in line with other simulation studies [47, 48]. The residence times of  $\text{Na}^+$  ions within the minor groove of the PF MGB complexes were about one-and-half to two times shorter than that for the free DNA oligonucleotides.

#### *Helical parameters*

To study the structural deformations of DNA caused by the PF minor groove binding, the helical parameters of DNA in complexes were calculated for every 40 ps of the MD trajectory (using CPPTRAJ) and compared to the parameters obtained from the MD trajectories of free DNA oligonucleotides. The most obvious change was the narrowing of the DNA minor groove in the PF binding site and the neighboring helical steps with respect to the free DNA oligonucleotides (Fig. 6). The effect was more pronounced for the PF-poly(dCG)-poly(dCG) MGB complex: the groove narrowing in the PF binding site was up to 2 Å compared to the free DNA oligonucleotide. In complex with poly(dA)-poly(dT), the narrowing of the minor groove caused by PF was circa 1 Å.

A partial widening of the minor groove observed at the initial steps for the poly(dA)-poly(dT) oligonucleotide both in free state and in complex with PF (Fig. 6) was due to the fraying of the terminal AT base pair and the subsequent formation of the stacked noncanonical structure between the terminal thymine and adenine during the MD simulation. The fraying of the terminal base pairs in MD simulations is a known force field artifact [49]. However, we expect that it slightly affects the final geometry of the PF binding site because PF was bound in the central part of the 30bp DNA oligonucleotide.

The narrowing of the minor groove was accompanied by the variations of other DNA helical parameters. The increased twist (overwinding) was found in the PF binding site, which was partially compensated by unwinding in the adjacent steps (Fig. S3). The changes of other

helical parameters involved decrease of roll with change of sign from positive to negative, more positive x-displacement and more positive slide in complex with poly(dCG)·poly(dCG) (Fig. S4-S6). Those changes are characteristic for BI/BII transitions of DNA backbone that are caused by coupled changes of dihedral angles  $\epsilon$  and  $\zeta$  from (t,g-) in BI state to (g-,t) in BII state [50, 51].

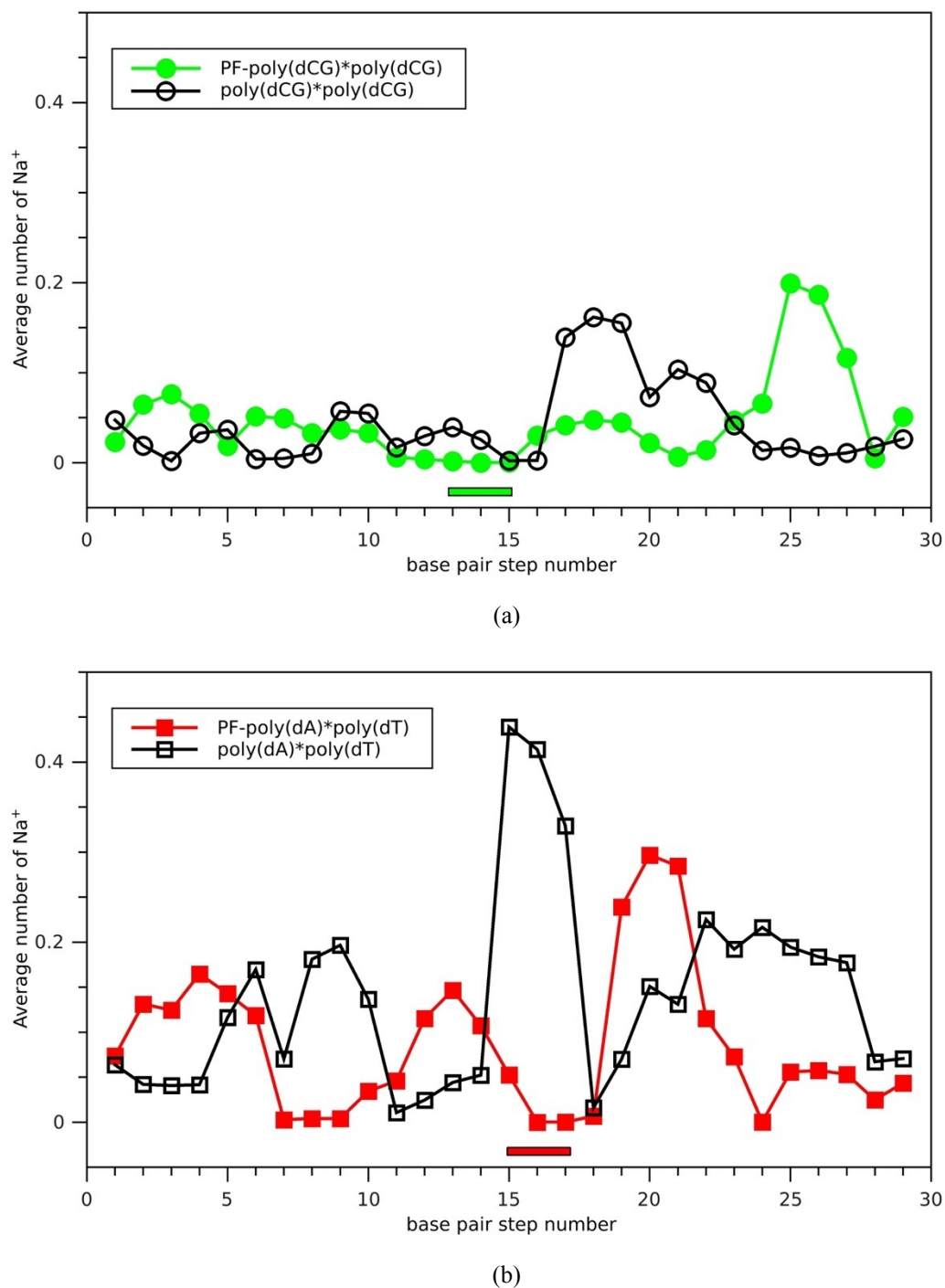
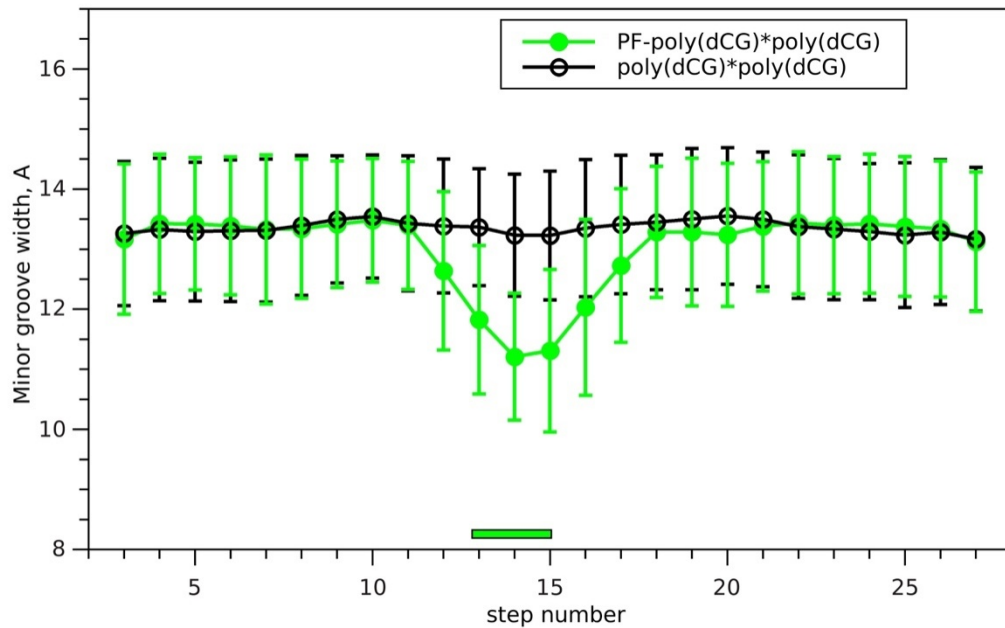


Fig. 5. The average number of Na<sup>+</sup> ions in the minor groove of PF-DNA MGB complexes and free DNA oligonucleotides during the MD simulation: (a) PF-poly(dCG)·poly(dCG) complex, (b) PF-poly(dA)·poly(dT) complex. The position of the bound PF is shown with horizontal line.

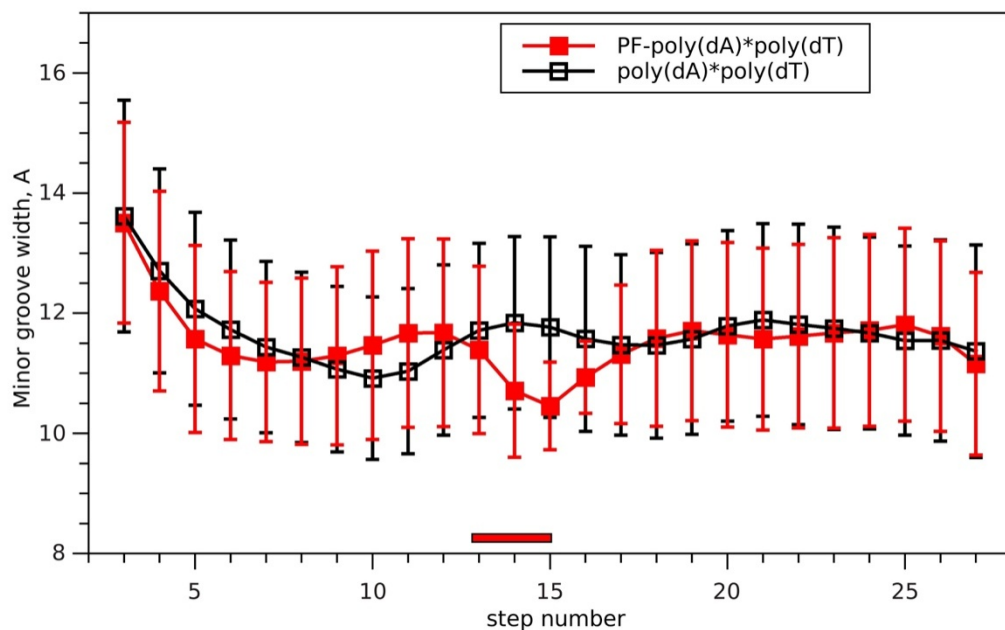
The difference  $\epsilon$ - $\zeta$  is around  $-90^\circ$  for BI state and around  $90^\circ$  for BII state. The analysis of DNA backbone angles in the PF binding site showed that, in the MD trajectory of PF-



poly(dCG)-poly(dCG) complex, two nucleotides (C15 and G46) had significant population of BII state (Fig. 7). The transitions to the BII state caused a shift in the distribution of sugar puckers of cytosines (C13, C15, C45, C47) in the PF binding site to the south region (Fig. S7). The adaptation of the double helix structure to the backbone transitions led to the enhanced fluctuations of propeller twist near the bound PF in the PF-poly(dCG)-poly(dCG) complex (Fig. S8 (a)). The BI/BII transitions are often seen upon binding of proteins to DNA and are believed to play an important role in the indirect DNA recognition [52-54].



(a)



(b)

Fig. 6. Minor groove width in PF-DNA MGB complexes: a) PF-poly(dCG)-poly(dCG); b) PF-poly(dA)-poly(dT). The position of the bound PF is marked with horizontal line.

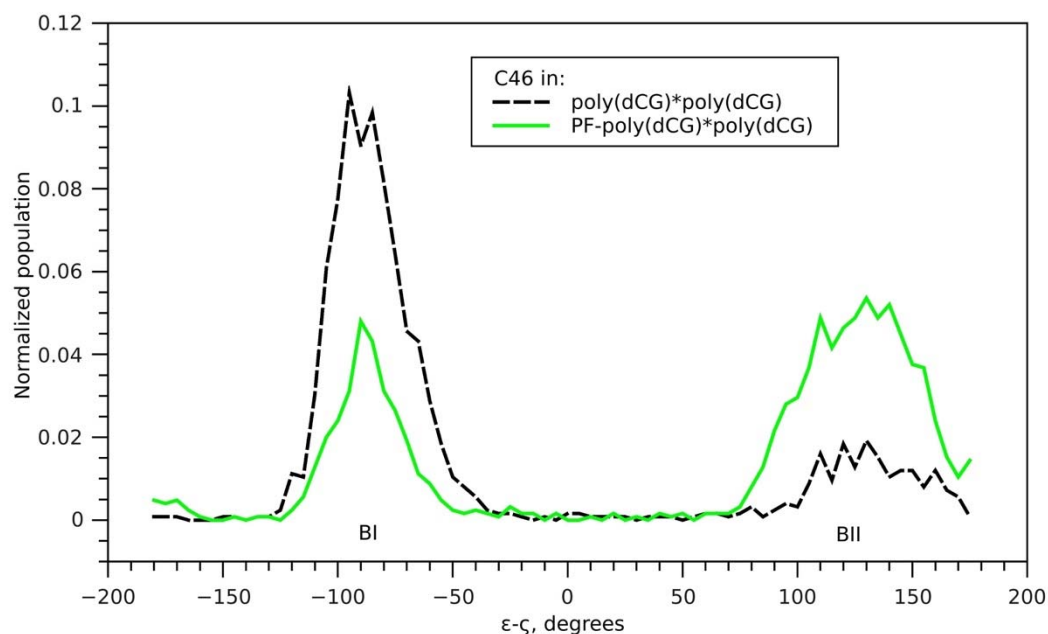
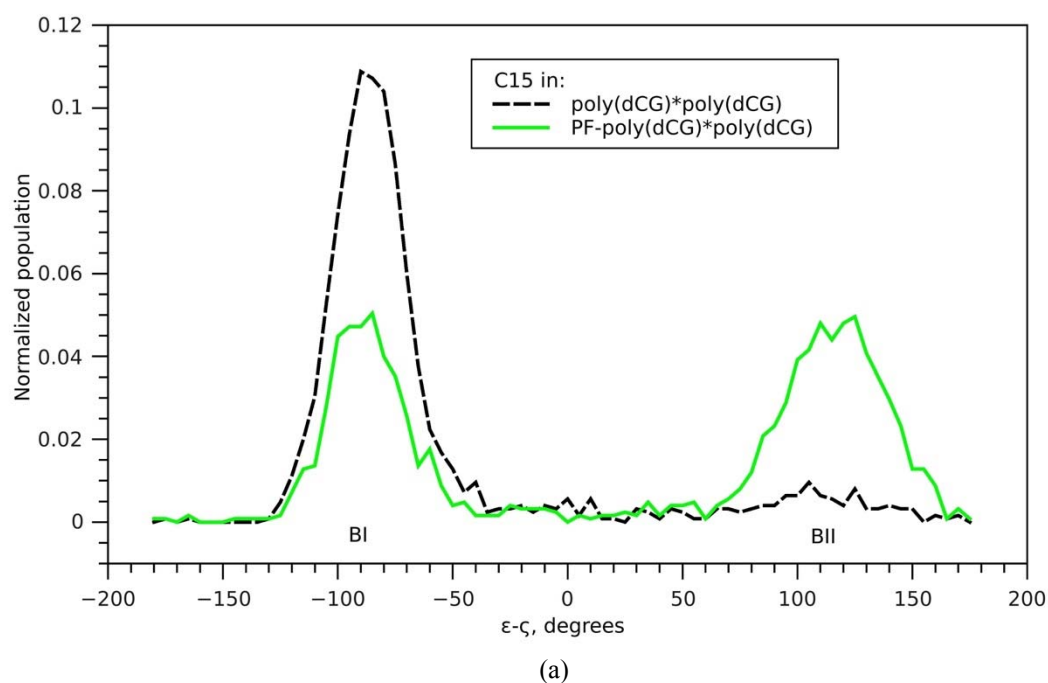


Fig. 7. The populations of BI and BII states of C15 and G46 residues during MD simulation of PF-poly(dCG)·poly(dCG) complex and free poly(dCG)·poly(dCG) oligonucleotide.

Unlike the PF-poly(dCG)·poly(dCG) complex, the nucleotides in the PF binding site in its complex with poly(dA)·poly(dT) were mostly in the BI state during the MD simulation. This difference can be rationalized by two reasons. First, the poly(dA)·poly(dT) already has a narrow minor groove, and small conformational changes are needed to provide tighter proflavine binding. Second, the BI/BII conformational transitions are sequence specific: the CG and GC steps are known to undergo BI/BII transition more easily than AA or TT steps

[55, 56]. The base pairs of the PF binding site in the PF-poly(dA)·poly(dT) complex were characterized by more negative propeller twist and an increased opening (Fig. S8 (b) and S9 (b)). These changes most likely were due to the hydrogen bonding of PF with N3 atoms of adenine (A17, A16) and/or O2 atoms of thymine (T44, T45) (Fig. 4). The sugar pucker distributions of A18 and A17 nucleotides were shifted to the north region (Fig. S10) possibly as a result of the interaction of their O4' atoms with the aromatic system of the PF chromophore (Fig. S11).

### *MMPBSA free energy estimates*

To estimate quantitatively the stability of PF MGB complexes, we calculated the PF binding free energies using MMPBSA approach. The results are given in Table 1. As one can see, the MGB complex of PF with poly(dA)·poly(dT) is enthalpically more favorable than that with the poly(dCG)·poly(dCG). The stabilization of complexes was due to the van der Waals interactions and hydrophobic interactions (there is no need to form an extra cavity in solvent because PF fits well into the DNA minor groove) (Table S2). At the same time, the intrusion of PF disturbed the DNA-solvent interactions in the minor groove that caused the unfavorable  $\Delta G_{\text{disp}}$  term (Table S2).

The entropy penalty was less in the case of PF-poly(dCG)·poly(dCG) complex. Analysis of the entropy components showed that the major unfavorable contribution ( $\sim 22$  kcal/mol) was due to the loss of translational and rotational degrees of freedom, which was partially compensated by the favorable vibrational term (Table S3). It should be noted that the entropy gain due to the release of tightly bound water molecules upon PF binding from the spine of hydration of poly(dA)·poly(dT) or ribbon of hydration in the case of poly(dCG)·poly(dCG) was not taken into account. Therefore we suppose that the obtained entropy penalties are overestimated.

Values of the energy terms calculated using multiple trajectory approach showed high fluctuations. But this approach allowed to access the cost of the DNA conformational changes upon the PF binding. For the PF-poly(dCG)·poly(dCG) complex, the unfavorable conformational term ( $\Delta G_{\text{conf}}$ ) was obtained that is consistent with the observed in the MD trajectory notable conformational changes of the poly(dCG)·poly(dCG) minor groove in the PF binding site (Table S2).

Table 1. The binding free energies for proflavine MGB complexes with poly(dA)·poly(dT) and poly(dCG)·poly(dCG)

System		$\Delta H$	$-T\Delta S$	$\Delta G_{\text{Total}}$
poly(dA)·poly(dT)+PF	ST	-19.0 $\pm$ 2.5	20.2 $\pm$ 1.9	1.2 $\pm$ 3.1
	MT	-24.8 $\pm$ 49.0	21.0 $\pm$ 3.9	-3.8 $\pm$ 49.1
poly(dCG)·poly(dCG) +PF	ST	-13.8 $\pm$ 3.5	17.8 $\pm$ 2.6	4.0 $\pm$ 4.4
	MT	-2.6 $\pm$ 51.6	18.9 $\pm$ 5.4	16.3 $\pm$ 51.9

All energy terms are given in kcal/mol. ST and MT are the single and multiple trajectory approaches, correspondingly.  $\Delta H$  is the sum of all energy terms except entropy contribution;  $-T\Delta S$  is the entropy penalty due to the loss of translational, rotational and vibrational degrees of freedom upon ligand binding;  $\Delta G_{\text{Total}} = \Delta H - T\Delta S$ .

## CONCLUSIONS

We performed the MD simulation of the PF MGB complexes with DNA oligonucleotides poly(dA)·poly(dT) and poly(dCG)·poly(dCG). The stability of those complexes is responsible for the timescale of the PF intercalation reaction [25]. The results of our simulation confirm, that PF MGB complexes are stable in the 50 ns time interval but there are some structural

rearrangements with respect to the initial docking structures, especially in the case of PF-poly(dCG)·poly(dCG) complex.

The binding of PF to the DNA minor groove is sequence specific. The PF-poly(dA)·poly(dT) MGB complex is enthalpically more favorable than that with the poly(dCG)·poly(dCG). It is stabilized by the van der Waals and hydrophobic interactions. Besides, there are specific hydrogen bonds in PF-poly(dA)·poly(dT) complex formed by the protonated ring nitrogen and one of the amino-groups from the PF side and O2 thymine and N3 adenine atoms of poly(dA)·poly(dT), which were predicted earlier by Marcandalli [15]. The PF-poly(dCG)·poly(dCG) MGB complex is weaker due to the interfering amino-groups of guanine in the minor groove of poly(dCG)·poly(dCG), which prevent deeper binding of ligand.

The binding of PF launches the DNA conformational changes through the induced fit mechanism. The narrowing of the DNA minor groove in the PF binding site is observed. In the PF-poly(dCG)·poly(dCG) complex, it is more pronounced and is accompanied by the BI/BII backbone conformational transitions. During the induced fit process, the reorientation of ligand in the PF-poly(dCG)·poly(dCG) complex takes place: the PF chromophore becomes located along the minor groove, like in PF-poly(dA)·poly(dT) complex, except that its amino-groups are directed outside the groove.

In the case of PF-poly(dA)·poly(dT) complex, the conformational changes are not so large but they are still important for tighter PF-DNA binding: the change of the propeller twist and the increased opening in the PF binding site optimize specific hydrogen bonds between the PF and poly(dA)·poly(dT). Recently Ramakers and coworkers reported that the binding of Hoechst33258 to the A-tract DNA induces subtle conformational changes in the DNA structure, which maximize favorable ligand-DNA interactions [57]. The results of our study and that of Ramakers indicate that the model of rigid DNA-target is not a good choice even for small minor groove binders. An induced fit model gives better description of the binding process. One should keep in mind the DNA conformational changes induced by ligand binding upon design of new minor groove binders.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The paper is dedicated to the memory of the outstanding scientist and the remarkable teacher, the Doctor of Physical and Mathematical Sciences, Professor Yu. P. Blagoi. Long-term cooperation with him allowed authors to successfully carry out research in the field of molecular biophysics and nucleic acids physics.

The simulations were done using the facilities of GRID-cluster of O.Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of NAS of Ukraine, Kharkiv, Ukraine. The work was partly supported by the SCST Programme of Implementation and Usage of GRID technologies for 2018.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

#### Authors' ORCID ID

K. V. Miroshnychenko  <https://orcid.org/0000-0002-2543-6519>

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

## SUPPLEMENTARY FIGURES

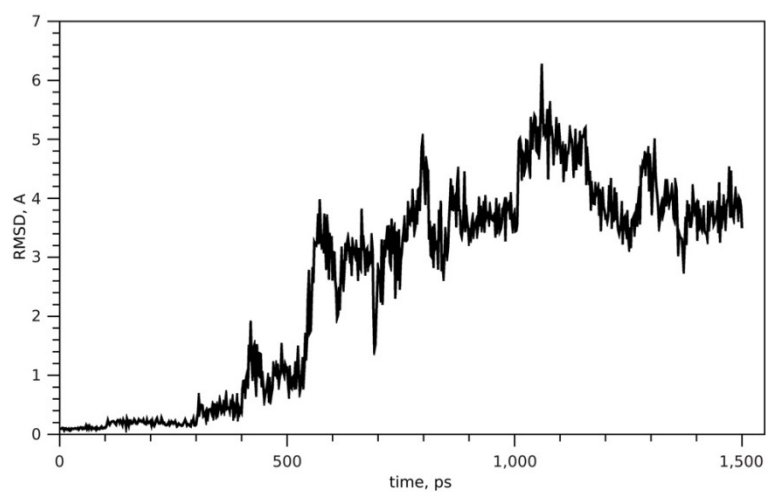


Figure S1. The RMSD of PF heavy atoms with respect to the initial structure for PF-poly(dCG)-poly(dCG) MGB complex during the equilibration phase.

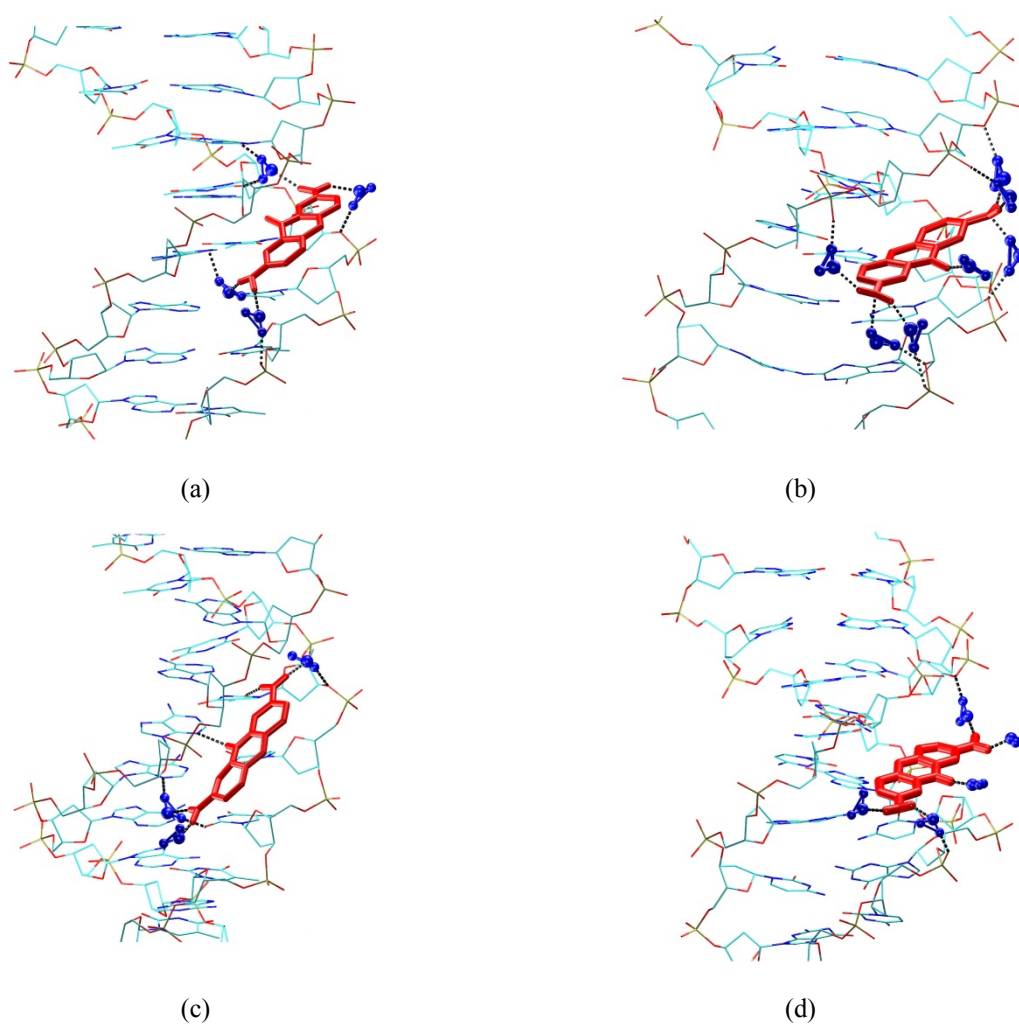
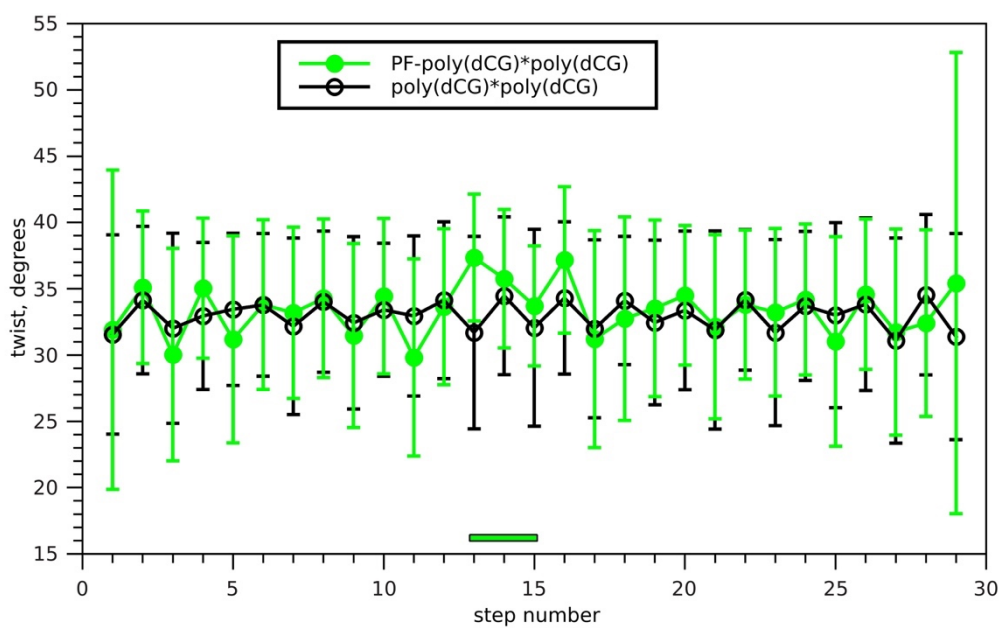
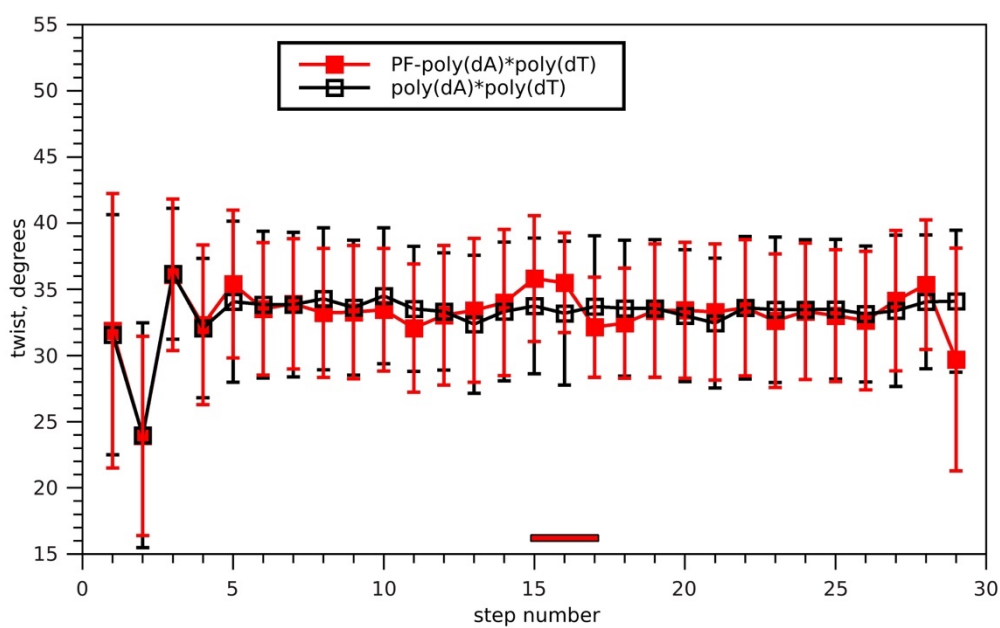


Figure S2. Waters bound via hydrogen bonds and water bridges in PF-DNA MGB complexes: (a) and (c) – maximum and average number of water bridges in PF-poly(dA)-poly(dT) complex; (b) and (d) – maximum and average number of water bridges in PF-poly(dCG)-poly(dCG) complex. PF is shown with red color and waters are blue. Hydrogen bonds are shown as black dashed lines.



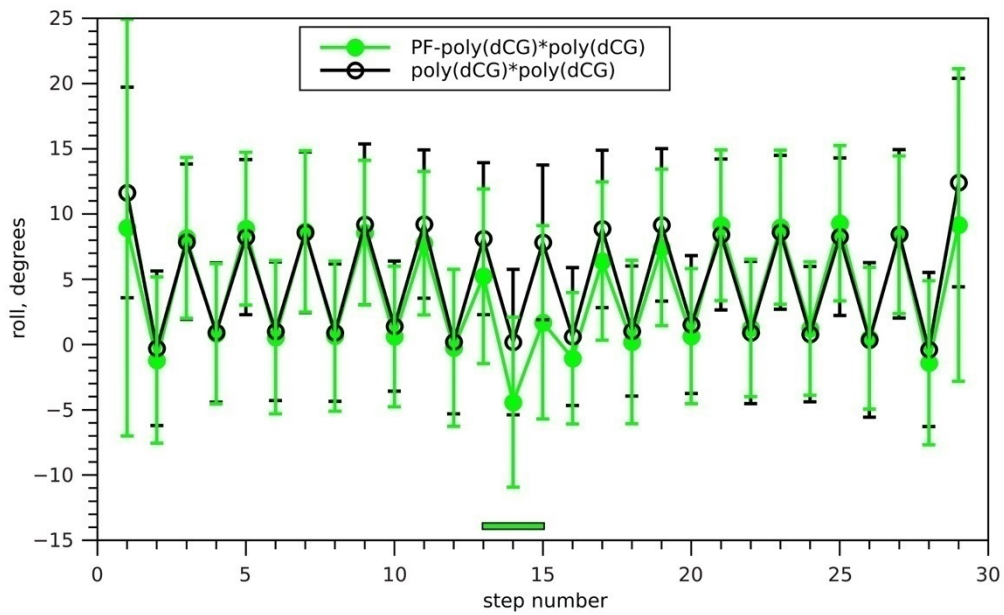
(a)



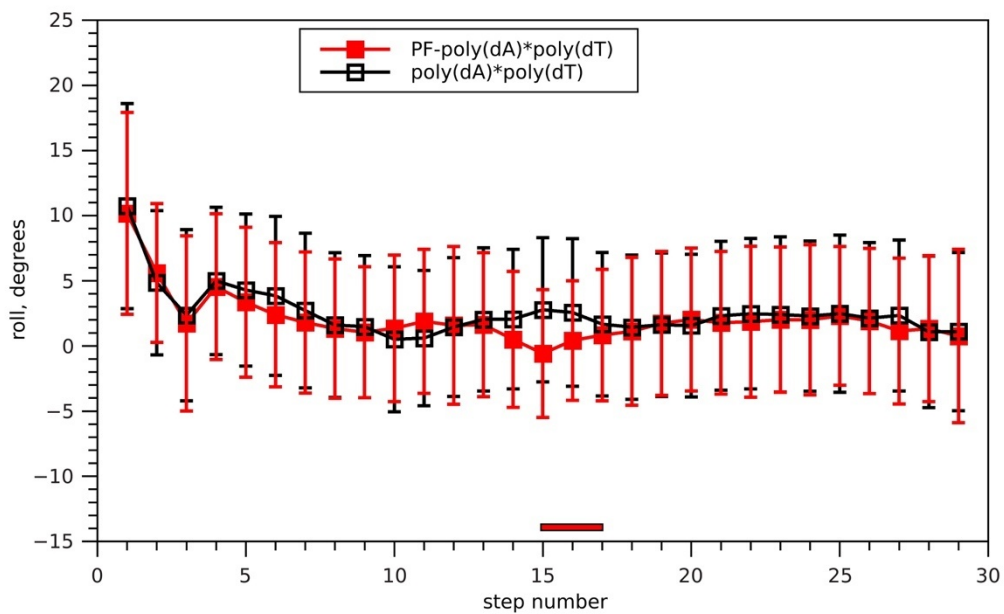
(b)

Figure S3. Twist in PF-DNA MGB complexes: (a) PF-poly(dCG)-poly(dCG); (b) PF-poly(dA)-poly(dT) complex. The position of the bound PF is marked.



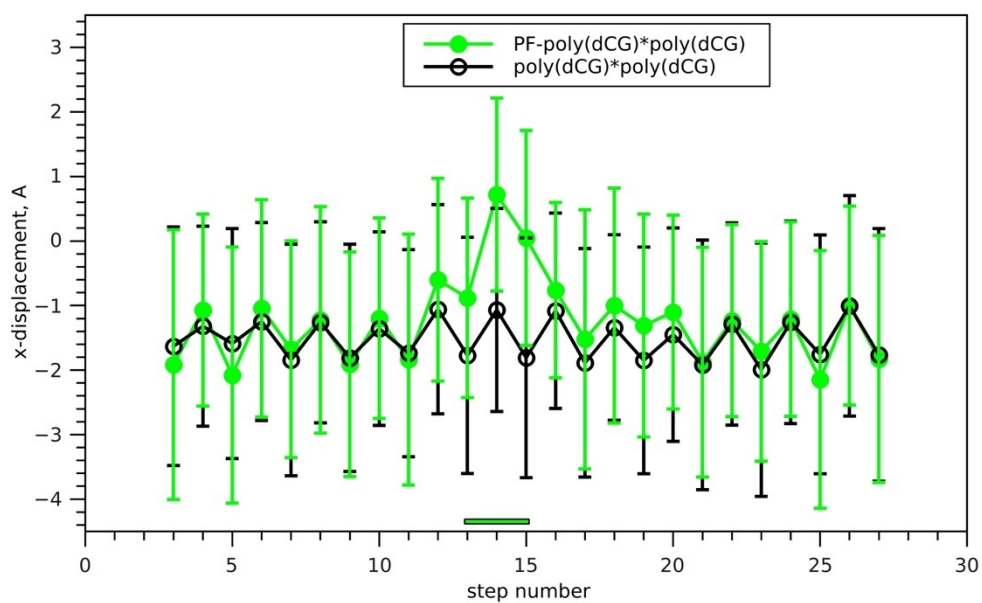


(a)

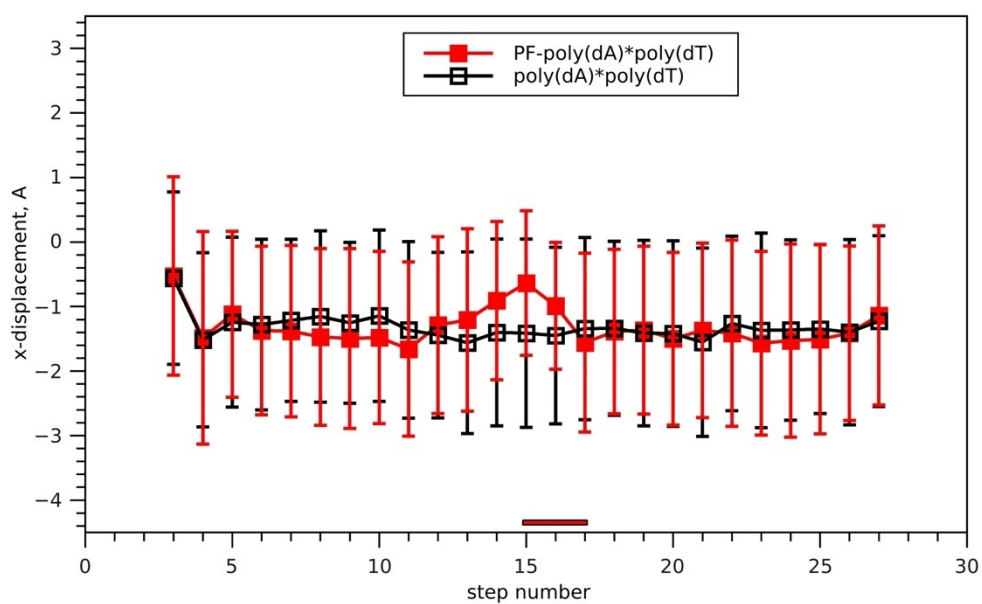


(b)

Figure S4. Roll in PF-DNA MGB complexes: (a) PF-poly(dCG)-poly(dCG); (b) PF-poly(dA)-poly(dT) complex.



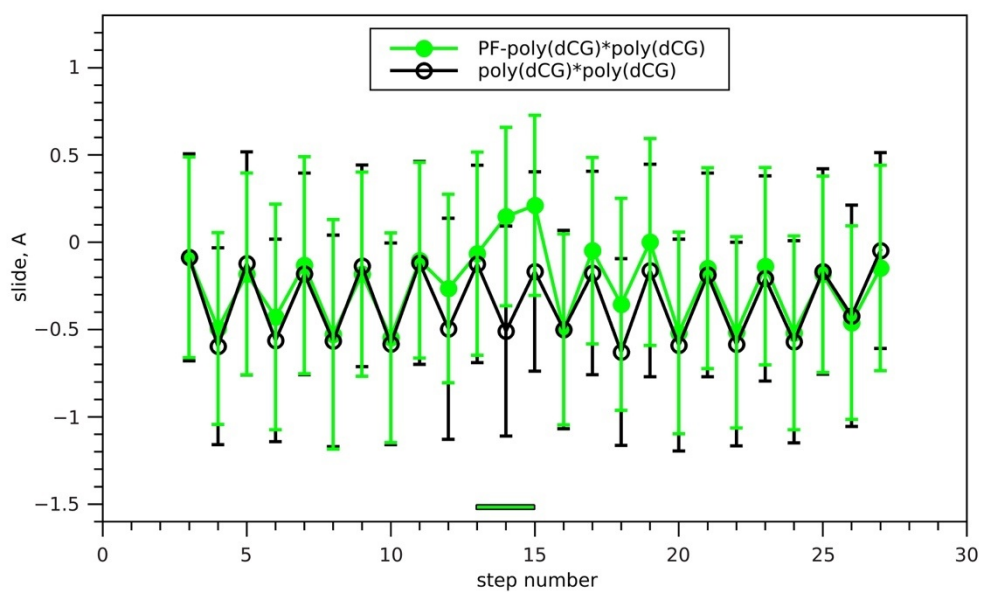
(a)



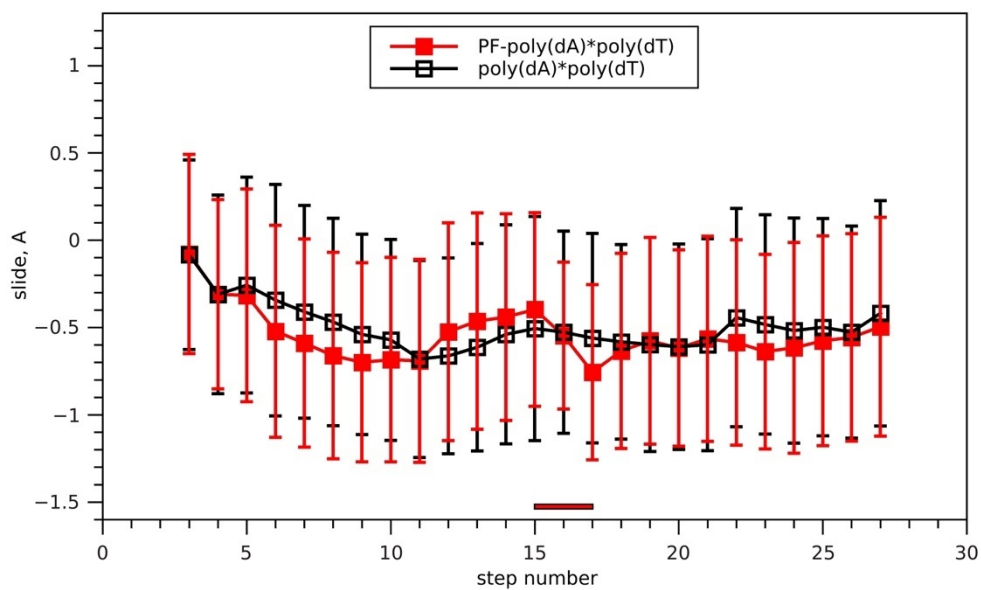
(b)

Figure S5. X-displacement in PF-DNA MGB complexes: (a) PF-poly(dCG)-poly(dCG); (b) PF-poly(dA)-poly(dT) complex.





(a)



(b)

Figure S6. Slide in PF-DNA MGB complexes: (a) PF-poly(dCG)·poly(dCG); (b) PF-poly(dA)·poly(dT) complex.

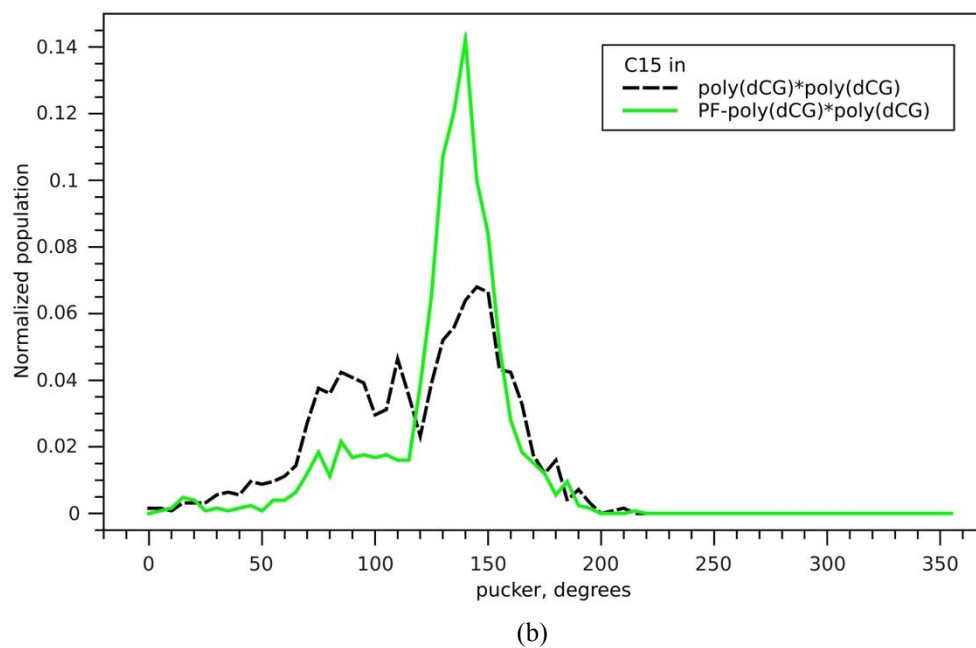
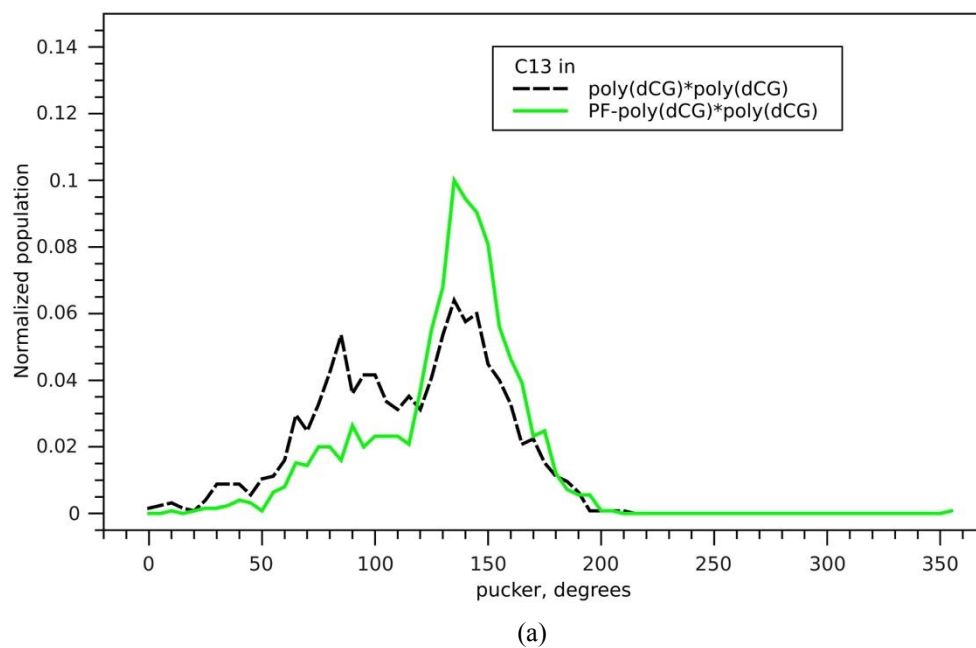


Figure S7. The distributions of sugar pucker of cytosine residues C13 (a), C15 (b) in the PF binding site in PF-poly(dCG)·poly(dCG) complex.

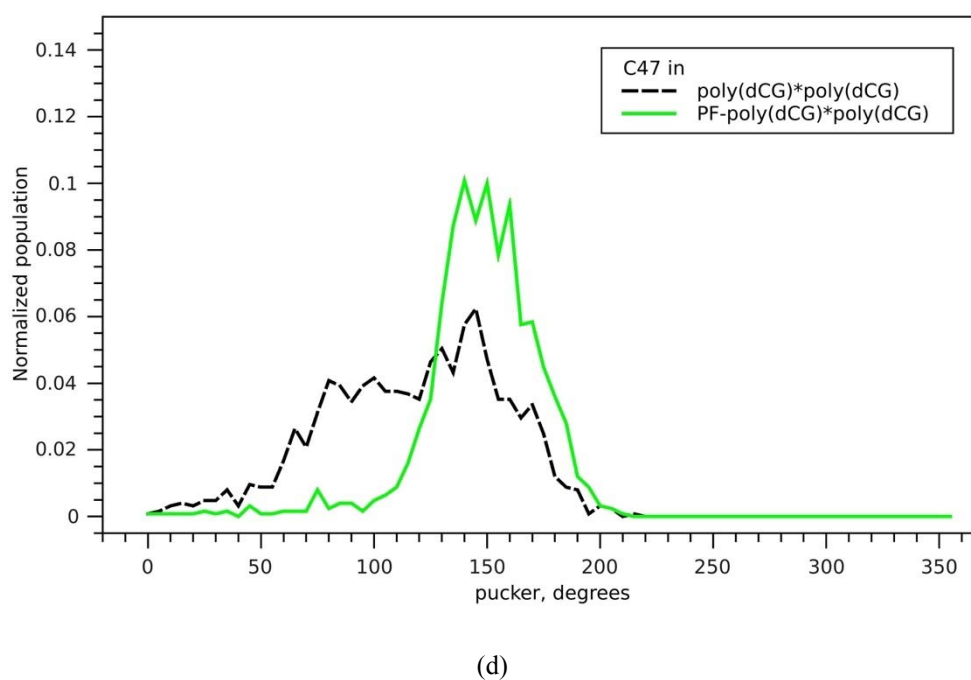
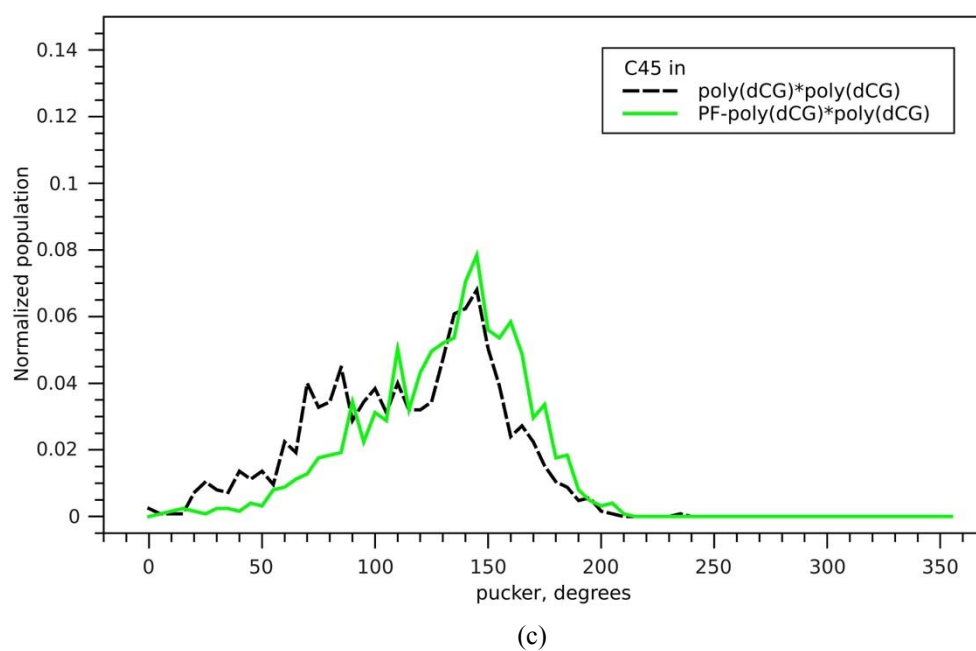
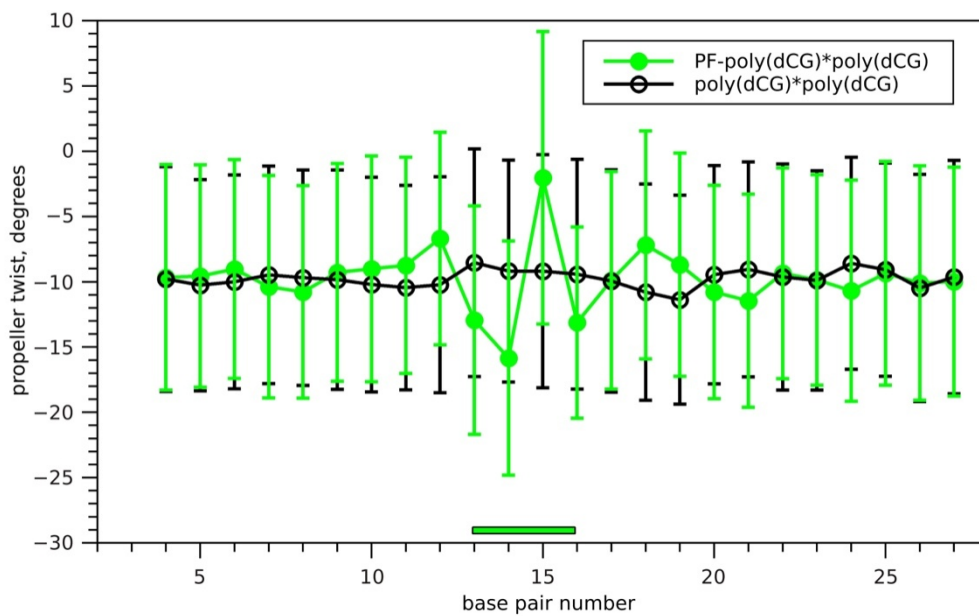
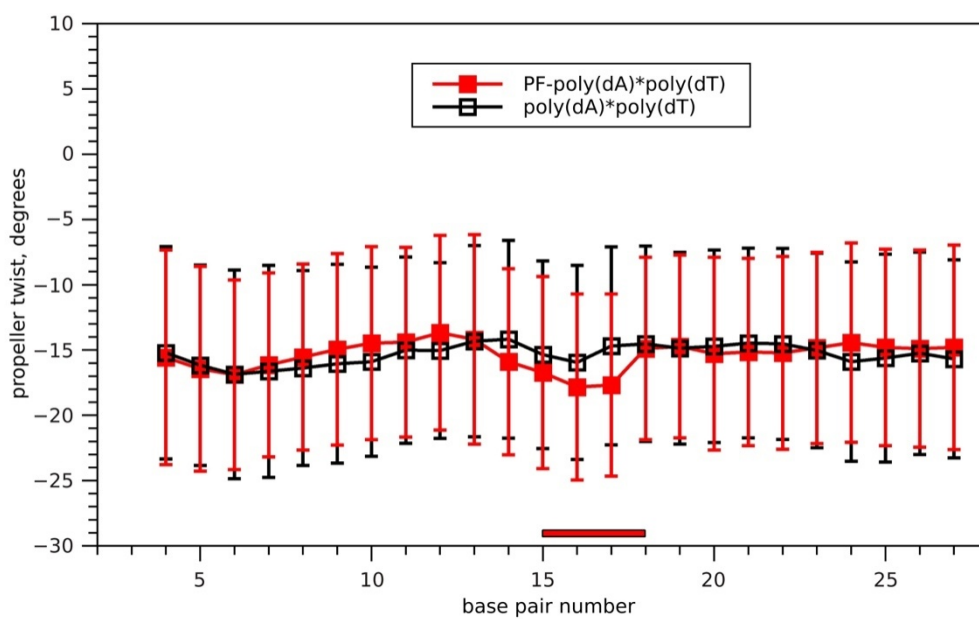


Figure S7. The distributions of sugar pucker of cytosine residues C45 (c), C47 (d) in the PF binding site in PF-poly(dCG)·poly(dCG) complex.



(a)



(b)

Figure S8. Propeller twist in PF-DNA MGB complexes: (a) PF-poly(dCG)-poly(dCG); (b) PF-poly(dA)-poly(dT) complex.

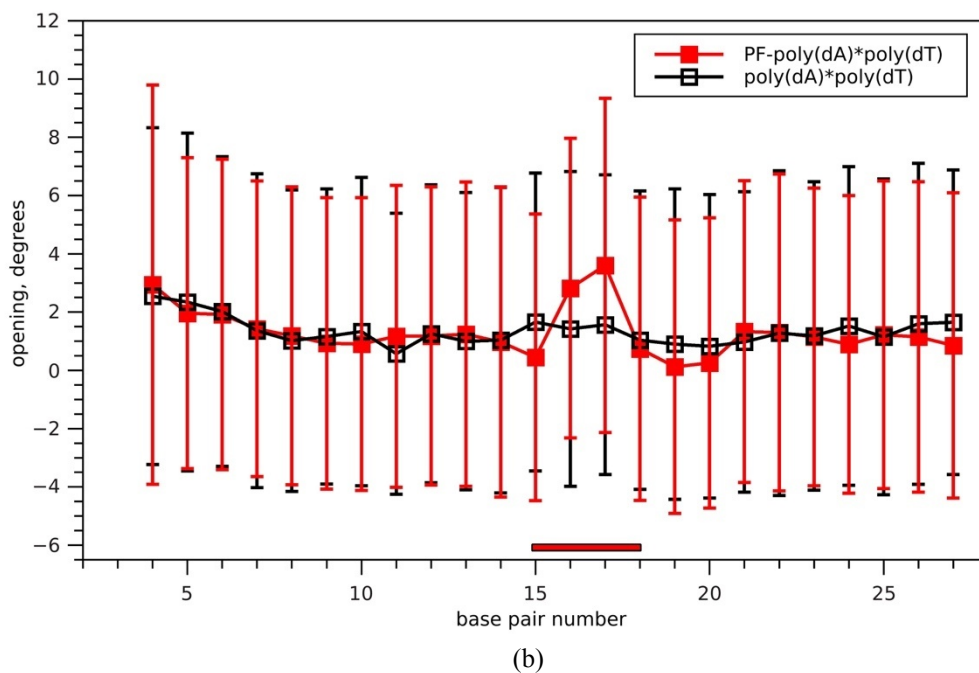
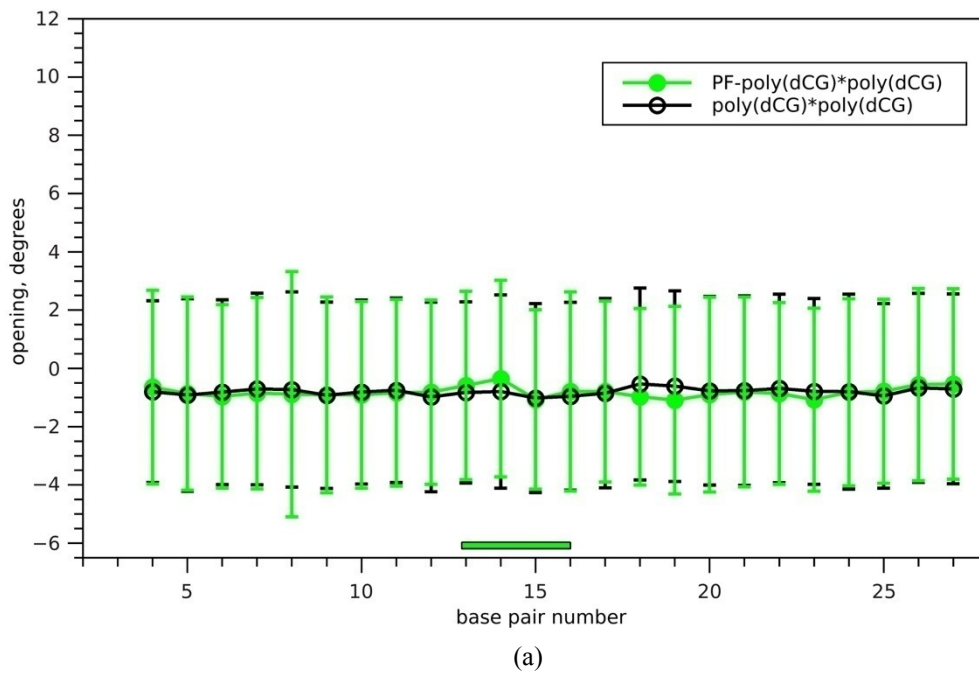
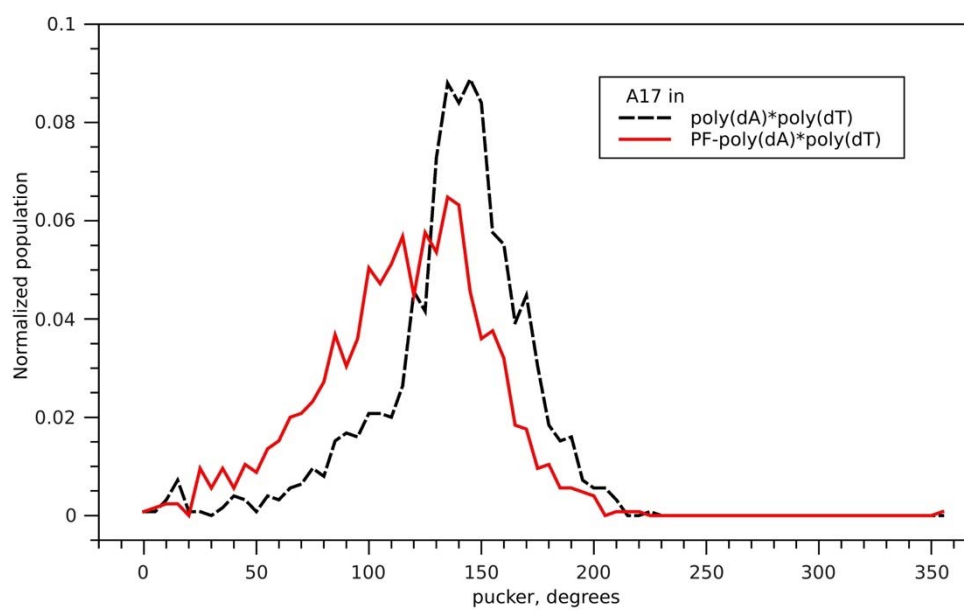
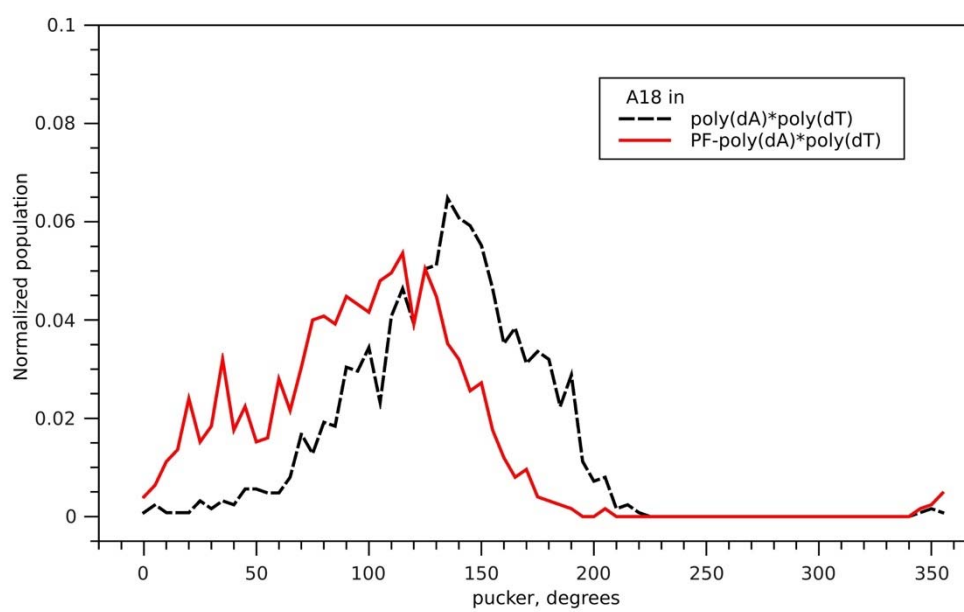


Figure S9. Opening in PF-DNA MGB complexes: (a) PF-poly(dCG)-poly(dCG); (b) PF-poly(dA)-poly(dT) complex.



(a)



(b)

Figure S10. The distributions of sugar pucker of adenine residues A17 (a) and A18 (b) in the PF binding site in PF-poly(dA)-poly(dT) complex.

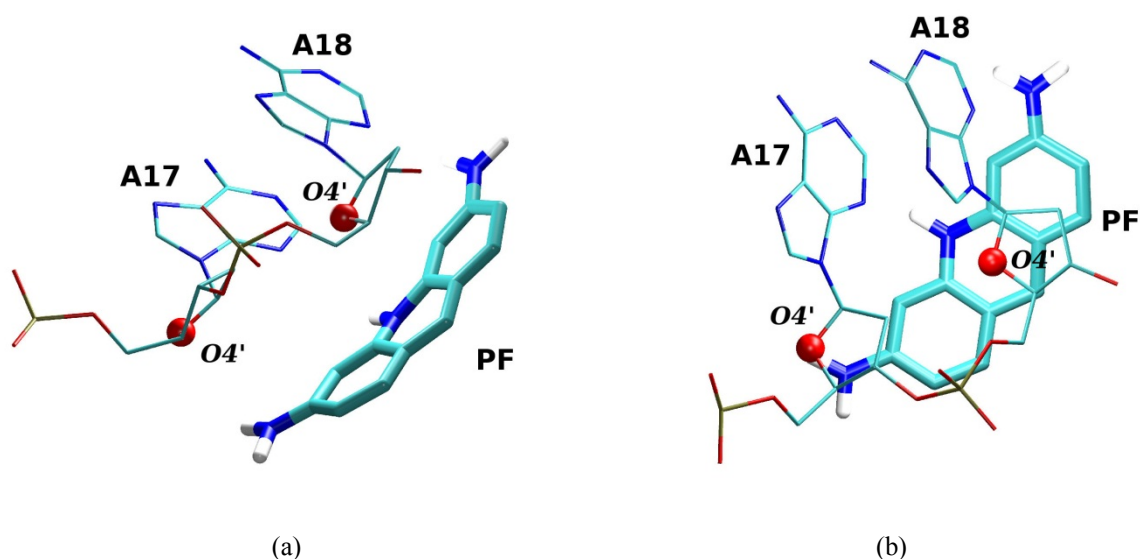


Figure S11. The interaction of PF and sugars of adenine nucleotides A17 and A18 in the PF- poly(dA)·poly(dT) complex: (a) side view; (b) top view.

Table S1. The average number of water molecules bound via hydrogen bonds to PF MGB complexes and free components

System	Number of HB waters (N)			$\Delta N$
	Complex	DNA	PF	
PF-poly(dA)·poly(dT)	481.5±8.4	480.0±8.4	2.7±0.7	-5.1±12.0
PF-poly(dCG)·poly(dCG)	506.9±9.3	503.9±9.2	4.5±1.1	-5.6±13.1
poly(dA)·poly(dT)	-	482.0±8.5	-	-
poly(dCG)·poly(dCG)	-	507.9±9.1	-	-
PF	-	-	4.6±1.2	-

$\Delta N$  is the difference between the number of water molecules bound via hydrogen bonds to the complex and the sum of the bound waters of its free components.

Table S2. The binding free energies for proflavine MGB complexes with poly(dA)·poly(dT) and poly(dCG)·poly(dCG)

System		$\Delta G_{\text{conf}}$	$\Delta G_{\text{vdW}}$	$\Delta G_{\text{Coul}} + \Delta G_{\text{PB}}$	$\Delta G_{\text{rep}}$	$\Delta G_{\text{disp}}$	$\Delta H$	$-T\Delta S$	$\Delta G_{\text{Total}}$
poly(dA)·poly(dT)+PF	ST	0.0	-32.5	-0.8	-17.9	32.1	-19.0±2.5	20.2±1.9	1.2±3.1
	MT	-5.1	-34.6	0.3	-17.8	32.4	-24.8±49.0	21.0±3.9	-3.8±49.1
poly(dCG)·poly(dCG)+PF	ST	0.0	-28.3	0.7	-16.5	30.3	-13.8±3.5	17.8±2.6	4.0±4.4
	MT	11.8	-31.6	0.6	-17.6	34.2	-2.6±51.6	18.9±5.4	16.3±51.9

All energy terms are given in kcal/mol. ST and MT are the single and multiple trajectory approaches, correspondingly.  $\Delta G_{\text{conf}}$  is the sum of the bonded energy terms (bond, angle, dihedral) and 1-4 non bonded interactions;  $\Delta G_{\text{vdW}}$  is the van der Waals energy;  $\Delta G_{\text{Coul}} + \Delta G_{\text{PB}}$  – is the sum of the Coulombic energy and the polar solvation energy (Poisson-Boltzmann energy);  $\Delta G_{\text{rep}}$  – is the repulsive cavity term;  $\Delta G_{\text{disp}}$  – is the dispersion energy term describing the attractive solute-solvent interactions;  $\Delta H$  is the sum of all energy terms except entropy contribution;  $-T\Delta S$  is the entropy penalty due to the loss of translational, rotational and vibrational degrees of freedom upon ligand binding;  $\Delta G_{\text{Total}} = \Delta H - T\Delta S$ .

Table S3. Entropy contributions ( $\Delta S$ ) for PF-DNA MGB complexes (kcal/mol)

System		Translational	Rotational	Vibrational	Total
poly(dA)· poly(dT)+PF	ST	-12.5	-9.6	1.8±1.9	-20.2±1.9
	MT	-12.5	-9.6	1.1±3.9	-21.0±3.9
poly(dCG)· poly(dCG) +PF	ST	-12.5	-9.6	4.2±2.6	-17.8±2.6
	MT	-12.5	-9.6	3.2±5.4	-18.9±5.4

ST and MT stand for the single and multiple trajectory approaches, correspondingly

### REFERENCES

- Ferguson, L. R., & Denny, W. A. (1991). The genetic toxicology of acridines. *Mutation Research*, 258(2), 123-160. doi:10.1016/0165-1110(91)90006-H
- Peacocke, A. R., & Skerrett, J. N. H. (1956). The interaction of aminoacridines with nucleic acids. *Transactions of the Faraday Society*, 52, 261-279. doi:10.1039/TF9565200261
- Lerman, L. S. (1961). Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *Journal of Molecular Biology*, 3(1), 18-30. doi:10.1016/S0022-2836(61)80004-1
- Luzzati, V., Masson, F., & Lerman, L. S. (1961). Interaction of DNA and proflavine: a small-angle X-ray scattering study. *Journal of Molecular Biology*, 3(5), 634-639. doi:10.1016/S0022-2836(61)80026-0
- Lerman, L. S. (1963). The structure of the DNA-acridine complex. *Biochemistry*, 49(1), 94-102. doi:10.1073/pnas.49.1.94
- Neville, D. M. Jr., & Davies, D. R. (1966). The interaction of acridine dyes with DNA: an X-ray diffraction and optical investigation. *Journal of Molecular Biology*, 17(1), 57-74. doi:10.1016/S0022-2836(66)80094-3
- Neidle, S., Achari, A., Taylor, G. L., Berman, H. M., Carrell, H. L., Glusker, J. P., & Stallings, W. C. (1977). Structure of a dinucleoside phosphate-drug complex as model for nucleic acid-drug interaction. *Nature*, 269, 304-307. doi:10.1038/269304a0
- Berman, H. M., Stallings, W., Carrell, H. L., Glusker, J. P., Neidle, S., Taylor, G., & Achari, A. (1979). Molecular and crystal structure of an intercalation complex: proflavine-cytidylyl-(3',5')-guanosine. *Biopolymers*, 18(10), 2405-2429. doi:10.1002/bip.1979.360181004
- Shieh, H.-S., Berman, H. M., Dabrow, M., & Neidle, S. (1980). The structure of drug-deoxydinucleoside phosphate complex: generalized conformational behavior of intercalation complexes with RNA and DNA fragments. *Nucleic Acids Research*, 8(1), 85-97. doi:10.1093/nar/8.1.85
- Maehigashi, T., Persil, O., Hud, N. V., & Williams, L.D. (2010). Crystal structure of proflavine in complex with DNA hexamer duplex. Protein Data Bank. Retrieved from: <https://www.rcsb.org/structure/3FT6>.
- Li, H. J., & Crothers, D. M. (1969). Relaxation studies of the proflavine-DNA complex: the kinetics of an intercalation reaction. *Journal of Molecular Biology*, 39(3), 461-477. doi:10.1016/0022-2836(69)90138-7
- Ramstein, J., Dourlent, M., & Leng, M. (1972). Interaction between proflavine and deoxyribonucleic acid influence of DNA base composition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 47(4), 874-882. doi:10.1016/0006-291X(72)90574-8
- Ramstein, J., Ehrenberg, M., & Rigler, R. (1980). Fluorescence relaxation of proflavin-deoxyribonucleic acid interaction. Kinetic properties of a base-specific reaction. *Biochemistry*, 19(17), 3938-3948. doi:10.1021/bi00558a008
- Marcandalli, B., Winzek, C., & Holzwarth, J. F. (1984). A laser temperature jump investigation of the interaction between proflavine and calf-thymus deoxyribonucleic acid at low and high ionic strength avoiding electric field effects. *Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie*, 88(4), 368-374. doi:10.1002/bbpc.19840880411
- Marcandalli, B., Stange, G., & Holzwarth, J. F. (1988). Kinetics of the interaction of acridine dyes with nucleic acids. An iodine-laser temperature-jump investigation. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1*, 84(8), 2807-2819. doi:10.1039/F19888402807
- Alden, C. J., & Arnott, S. (1975). Visualization of planar drug intercalations in B-DNA. *Nucleic Acids Research*, 2(10), 1701-1717. doi:10.1093/nar/2.10.1701
- Alden, C. J., & Arnott, S. (1977). Stereochemical model for proflavine intercalation in A-DNA. *Nucleic Acids Research*, 4(11), 3855-3861. doi:10.1093/nar/4.11.3855
- Neidle, S., Pearl, L. H., Herzyk, P., & Berman, H. M. (1988). A molecular model for proflavine-DNA intercalation. *Nucleic Acids Research*, 16(18), 8999-9016. doi:10.1093/nar/16.18.8999



19. Herzyk, P., Neidle, S., & Goodfellow, J. M. (1992). Conformation and dynamics of drug-DNA intercalation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 10(1), 97-139. doi:10.1080/07391102.1992.10508633
20. Ruiz, R., Garcia, B., Ruisi, G., Silvestri, A., & Barone, G. (2009). Computational study of the interaction of proflavine with d(ATATATATAT)<sub>2</sub> and d(GCGCGCGCGC)<sub>2</sub>. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 915(1-3), 86-92. doi:10.1016/j.theochem.2009.08.022
21. Yoshida, N., Kiyota, Y., & Hirata, F. (2011). The electronic-structure theory of a large-molecular system in solution: application to the intercalation of proflavine with solvated DNA. *Journal of Molecular Liquids*, 159(1), 83-92. doi:10.1016/j.molliq.2010.04.019
22. Pack, G. R., Hashimoto, G. M., & Loew, G. H. (1981). Quantum chemical calculations on the two-step mechanism of proflavin binding to DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 367, 240-249. doi:10.1111/j.1749-6632.1981.tb50571.x
23. Islam, S. A., & Neidle, S. (1984). Nucleic acid binding drugs. X. A theoretical study of proflavine intercalation into RNA and DNA fragments: comparison with crystallographic results. *Acta Crystallographica Section B*, 40(4), 424-429. doi:10.1107/S010876818400241X
24. Sasikala, W. D., & Mukherjee, A. (2012). Molecular mechanism of direct proflavine-DNA intercalation: evidence for drug-induced minimum base-stacking penalty pathway. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(40), 12208-12212. doi:10.1021/jp307911r
25. Sasikala, W. D., & Mukherjee, A. (2013). Intercalation and de-intercalation pathway of proflavine through the minor and major grooves of DNA: roles of water and entropy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(17), 6446-6455. doi:10.1039/C3CP50501D
26. Sasikala, W. D., & Mukherjee, A. (2016). Structure and dynamics of proflavine association around DNA. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18(15), 10383-10391. doi:10.1039/C5CP07789C
27. Miroshnychenko, K. V., & Shestopalova, A. V. (2013, July). The study of different binding modes of proflavine with DNA and RNA sequences by molecular docking method: evidence for a proflavine as a minor groove binder. Paper presented at the 5<sup>th</sup> International Symposium "Methods and Applications of Computational Chemistry", Kharkiv, Ukraine. Retrieved from: <http://macc.org.ua/MACC-5/MACC5colored.pdf>
28. Case, D. A., Cerutti, D. S., Cheatham, T. E. III, Darden, T. A., Duke, R. E., Giese, T. J., ... Kollman P. A. (2017). AMBERTools17 [Computer software]. Retrieved from <http://ambermd.org>
29. Lu, X.-J., & Olson, W. K. (2008). 3DNA: a versatile, integrated software system for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic-acid structures. *Nature Protocols*, 3(7), 1213-1227. doi:10.1038/nprot.2008.104
30. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., ... Pople, J. A. (2004). Gaussian 03 (Revision E.01) [Computer software]. Gaussian, Inc., Wallingford CT.
31. Dupradeau, F.-Y., Pigache, A., Zaffran, T., Savineau, C., Lelong, R., Grivel, N., ... Cieplak P. (2010). The R.E.D. tools: advances in RESP and ESP charge derivation and force field library building. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(28), 7821-7839. doi:10.1039/c0cp00111b
32. Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14), 1639-1662. doi:10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14%3C1639::AID-JCC10%3E3.0.CO;2-B
33. Berman, H. M., Olson, W. K., Beveridge D. L., Westbrook, J., Gelbin, A., Demeny, T., ... Schneider, B. (1992). The nucleic acid database. A comprehensive relational database of three-dimensional structures of nucleic acids. *Biophysical journal*, 63(3), 751-759. doi:10.1016/S0006-3495(92)81649-1
34. Case, D. A., Darden, T. A., Cheatham, T. E. III, Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., ... Kollman P. A. (2012). AMBER 12 [Computer software]. Retrieved from <http://ambermd.org>
35. Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., & Simmerling, C. (2015). FF14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from FF99SB. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 11(8), 3696-3713. doi:10.1021/acs.jctc.5b00255
36. Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004). Development and testing of a general AMBER force field. *Journal of Computational Chemistry*, 25(9), 1157-1174. doi:10.1002/jcc.20035
37. Berendsen, H. J. C., Grigera, J. R., & Straatsma, T. P. (1987). The missing term in effective pair potentials. *The Journal of Physical Chemistry*, 91(24), 6269-6271. doi:10.1021/j100308a038
38. Joung, I. S., & Cheatham, T. E. III (2009). Molecular dynamics simulations of the dynamic and energetic properties of alkali and halide ions using water-model-specific ion parameters. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(40), 13279-13290. doi:10.1021/jp902584c
39. Darden, T., York, D., & Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald: an N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics*, 98(12), 10089-10092. doi:10.1063/1.464397

40. Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G., & Berendsen, H. J. C. (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*, 23(3), 327-341. doi:10.1016/0021-9991(77)90098-5
41. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A., & Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, 81(8), 3684-3690. doi:10.1063/1.448118
42. Roe, D. R., & Cheatham, T. E. III (2013). PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 9(7), 3084-3095. doi:10.1021/ct400341p
43. Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD-visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33-38. doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5
44. Miller, B. R. III, McGee, T. D. Jr., Swails, J. M., Homeyer, N., Gohlke, H., & Roitberg, A. E. (2012). MMPBSA.py: an efficient program for end-state free energy calculations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8(9), 3314-3321. doi:10.1021/ct300418h
45. Tan, C., Tan, Y.-H., & Luo, R. (2007). Implicit nonpolar solvent models. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(42), 12263-12274. doi:10.1021/jp073399n
46. McQuarrie, D. A. (1976). *Statistical Mechanics*. New York: Harper & Row.
47. Rueda, M., Cubero, E., Laughton, C. A., & Orozco, M. (2004). Exploring the counterion atmosphere around DNA: what can be learned from molecular dynamics simulations? *Biophysical Journal*, 87(2), 800-811. doi:10.1529/biophysj.104.040451
48. Mocchi, F., & Laaksonen, A. (2012). Insight into nucleic acid counterion interactions from inside molecular dynamics simulations is "worth its salt". *Soft Matter*, 8(36), 9268-9284. doi:10.1039/C2SM25690H
49. Zgarbova, M., Otyepka, M., Sponer, J., Lankas, F., & Jurecka, P. (2014). Base pair fraying in molecular dynamics simulations of DNA and RNA. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 10(8), 3177-3189. doi:10.1021/ct500120v
50. Fratini, A. V., Kopka, M. L., Drew, H. R., & Dickerson, R. E. (1982). Reversible bending and helix geometry in a B-DNA dodecamer: CGCGAATT<sup>Br</sup>CGCG. *Journal of Biological Chemistry*, 257(24), 14686-14707. Retrieved from: <http://www.jbc.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=7174662>
51. Djuranovic, D., & Hartmann, B. (2003). Conformational characteristics and correlations in crystal structures of nucleic acid oligonucleotides: evidence for sub-states. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 20(6), 771-788. doi:10.1080/07391102.2003.10506894
52. Wecker, K., Bonnet, M. C., Meurs, E. F., & Delepiepierre, M. (2002). The role of the phosphorus BI-BII transition in protein-DNA recognition: the NF-κB complex. *Nucleic Acids Research*, 30(20), 4452-4459. doi:10.1093/nar/gkf559
53. Djuranovic, D., Oguey, C., & Hartmann, B. (2004). The role of DNA structure and dynamics in the recognition of bovine papillomavirus E2 protein target sequences. *Journal of Molecular Biology*, 339(4), 785-796. doi:10.1016/j.jmb.2004.03.078
54. Robertson, J. C., & Cheatham, T. E. III (2015). DNA backbone BI/BII distribution and dynamics in E2 protein-bound environment determined by molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(44), 14111-14119. doi:10.1021/acs.jpcc.5b08486
55. Madhumalar, A., & Bansal, M. (2005). Sequence preference for BI/BII conformations in DNA: MD and crystal structure data analysis. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 23(1), 13-27. doi:10.1080/07391102.2005.10507043
56. Heddi, B., Foloppe, N., Bouchemal, N., Hantz, E., & Hartmann, B. (2006). Quantification of DNA BI/BII backbone states in solution. Implications for DNA overall structure and recognition. *Journal of the American Chemical Society*, 128(28), 9170-9177. doi:10.1021/ja061686j
57. Ramakers, L. A. I., Hithell, G., May, J. J., Greetham, G. M., Donaldson, P. M., Towrie, M., ... Hunt, N. T. (2017). 2D-IR spectroscopy shows that optimized DNA minor groove binding of Hoechst33258 follows an induced fit model. *The Journal of Physical Chemistry B*, 121(6), 1295-1303. doi:10.1021/acs.jpcc.7b00345

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2019-41-02>

УДК 577.32

## INTERACTION OF SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES WITH DNA AND BSA

**A.A. Skuratovska, D.A. Pesina, E.G. Bereznyak, N.A. Gladkovskaya,  
E.V. Dukhopelnykov**

*O.Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of National Academy of Sciences of Ukraine,  
12 Ac. Proskura St., Kharkiv, 61085, Ukraine  
e-mail: anastasiia.skuratovska@gmail.com*

Submitted August 7, 2018

Accepted December 3, 2018

**Background:** Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) are widely used in various biomedical technologies, in particular, as carriers for drug delivery to the target. Since SPION-drug complexes are planned to be used *in vivo*, it is necessary to find out if competitive binding of nanoparticles with biologically important macromolecules (nucleic acids and proteins) is possible.

**Objectives:** To investigate the possibility of complexation of iron oxide nanoparticles with DNA and serum albumin.

**Materials and methods:** Bare and sodium citrate coated SPION with different surface charges, bovine serum albumin (BSA) and calf thymus DNA were used. The complexes of SPION and macromolecules were precipitated by an external magnetic field. The research was carried out by spectrophotometry in visible and ultraviolet ranges.

**Results:** To study SPION interactions with DNA and BSA, the spectra of supernatants of the binary systems were compared with the spectra of the corresponding control macromolecules solutions. In the DNA-SPION systems, a decrease in the DNA absorption is observed only for bare nanoparticles. Our estimation shows that the maximum possible concentration ratio of bound DNA to SPION is about  $2.5 \times 10^{-4}$  mol/g. The addition of sodium citrate coated SPION to the DNA solution does not cause any spectral changes of the supernatant. The interaction of BSA with SPION, coated with sodium citrate, leads to a slight increase in supernatant absorption compared with the one of the control protein solution. It can be caused by the fact that the resulting complexes are not precipitated by a magnetic field. No difference between the spectrum of the supernatant of BSA-bare SPION system and the control protein solution was observed.

**Conclusions:** The obtained spectrophotometric results demonstrate the formation of complexes between DNA and bare iron oxide nanoparticles as well as between BSA and the nanoparticles, coated with sodium citrate. The maximum concentration ratio of bound DNA and bare SPION was obtained for the investigated system. It is necessary to take into account when SPION are used as carriers for drug delivery.

**KEY WORDS:** superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION); DNA; serum albumin; sodium citrate; complexation; spectrophotometry.

### ВЗАЄМОДІЯ СУПЕРПАРАМАГНІТНИХ НАНОЧАСТОК ОКСИДУ ЗАЛІЗА З ДНК І БСА

**А.А. Скуратовська, Д.О. Песіна, К.Г. Березняк, Н.О. Гладковська, Є.В. Духопельников**

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

**Актуальність.** Суперпарамагнітні наночастки оксиду заліза широко використовуються у різноманітних біомедичних технологіях, зокрема, як носії лікарських препаратів для їх доставки до мішені. Оскільки планується використовувати комплекси наночасток оксиду заліза з препаратами *in vivo*, необхідно з'ясувати, чи можливе конкурентне зв'язування наночасток з біологічно важливими макромолекулами (нуклеїновими кислотами та білками).

**Мета роботи.** Дослідити можливість комплексоутворення наночасток оксиду заліза з ДНК і сироватковим альбуміном.

**Матеріали та методи.** Використовувались немодифіковані та покриті цитратом натрію наночастки оксиду заліза з різними поверхневими зарядами, бичачий сироватковий альбумін

(BSA) і ДНК з тимусу теляти. Комплекси наночастинок з макромолекулами було осаджено за допомогою зовнішнього магнітного поля. Дослідження проводились методом спектрофотометрії у видимій і ультрафіолетовій областях.

**Результати.** Щоб дослідити взаємодію наночастинок оксиду заліза з БСА і ДНК, спектри надосадових рідин подвійних систем порівнювались зі спектрами відповідних контрольних розчинів макромолекул. У системі ДНК-наночастки зменшення поглинання ДНК у надосадовій рідині спостерігається лише для немодифікованих наночастинок. За нашими розрахунками, максимально можливе співвідношення концентрації зв'язаної ДНК до концентрації наночастинок складає приблизно  $2.5 \times 10^{-4}$  моль/г. Взаємодія БСА з наночастинами, покритими цитратом натрію, викликає невелике зростання поглинання надосадової рідини відносно поглинання контрольного розчину білка. Це може бути пов'язано з тим, що утворені комплекси не осаджуються під впливом магнітного поля. Спектри надосадової рідини суміші БСА з немодифікованими наночастинами і контрольного розчину білка практично не відрізняються.

**Висновки.** Отримані результати свідчать про те, що комплекси утворюються між ДНК і немодифікованими наночастинами, а також між БСА та наночастинами, покритими цитратом натрію. Це необхідно брати до уваги при використанні наночастинок оксиду заліза у якості носіїв лікарських препаратів.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** суперпарамагнітні наночастинки оксиду заліза; ДНК; сироватковий альбумін; цитрат натрію; комплексоутворення; спектрофотометрія.

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СУПЕРПАРАМАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА С ДНК И БСА

А. А. Скуратовская, Д. А. Песина, Е. Г. Березняк, Н. А. Гладковская, Е. В. Духопельников

*Институт радиофизики и электроники им. А. Я. Усикова НАН Украины,  
ул. Ак. Проскуры, 12, Харьков, 61085, Украина*

**Актуальность.** Суперпарамагнитные наночастицы оксида железа широко используются в различных биомедицинских технологиях, в частности, в качестве носителей лекарственных препаратов для их доставки к мишени. Поскольку планируется использовать комплексы наночастиц оксида железа с препаратами *in vivo*, необходимо выяснить, возможно ли существование конкурентного связывания наночастиц с биологически важными макромолекулами (нуклеиновыми кислотами и белками).

**Цель работы.** Исследовать возможность комплексообразования наночастиц оксида железа с ДНК и сывороточным альбумином.

**Материалы и методы.** Использовались немодифицированные и покрытые цитратом натрия наночастицы с различными поверхностными зарядами, бычий сывороточный альбумин (BSA) и ДНК тимуса телят. Комплексы наночастиц с макромолекулами осаждались под действием внешнего магнитного поля. Исследования проводились методом спектрофотометрии в видимой и ультрафиолетовой областях.

**Результаты.** Чтобы исследовать взаимодействие наночастиц с ДНК и БСА, спектры надосадоочных жидкостей двойных систем сравнивались со спектрами соответствующих контрольных растворов макромолекул. В системе ДНК-наночастицы уменьшение поглощения ДНК наблюдается только для немодифицированных наночастиц. Согласно нашим исследованиям максимально возможное соотношение концентрации связанной ДНК к концентрации наночастиц составляет около  $2.5 \times 10^{-4}$  моль/г. Взаимодействие БСА с наночастицами, покрытыми цитратом натрия, приводит к небольшому увеличению поглощения надосадоочной жидкости по сравнению с поглощением контрольного раствора белка. Это может быть связано с тем, что образованные комплексы не осаждаются под действием внешнего магнитного поля. Спектр надосадоочной жидкости смеси БСА с немодифицированными наночастицами практически не отличается от спектра контрольного раствора белка.

**Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют о формировании комплексов ДНК с немодифицированными наночастицами, а также БСА с наночастицами, покрытыми цитратом натрия. Это необходимо учитывать при использовании магнитных наночастиц оксида железа в качестве носителей лекарственных препаратов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** суперпарамагнитные наночастицы оксида железа; ДНК; сывороточный альбумин; цитрат натрия; комплексообразование; спектрофотометрия.

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) are a promising material for biological, biomedical and biotechnological applications [1, 2] due to their unique physical

and chemical properties such as large surface-to-volume ratio, chemical stability, biocompatibility, and low toxicity [3-7]. Another advantage of SPION is an easy modification of the surface to change their charge which makes it possible to get electrostatic complexes of SPION with different types of drugs. All these properties and the ability to be controlled by an external magnetic field make SPION extremely perspective in the drug delivery.

For many types of drugs with different clinical applications, DNA is a target molecule. In case of using nanoparticles as drug carriers, the therapeutic effect depends on the interactions in the ternary drug-SPION-DNA system. Thus, the investigation of binding in the binary SPION-DNA system can simplify the further study of competitive interactions that take place in the ternary system.

After the injection of drug-SPION mixture into the bloodstream, interactions with plasma proteins occur. Binding of the nanoparticles with proteins, along with various factors like SPION size, shape, surface charge, and solubility, is considered one of the key elements that affect their biodistribution [8]. As shown in the review [8], the interactions with plasma proteins modulate the immune system response of the body and affect the circulation time of nanoparticles in the blood. For example, opsonin proteins stimulate phagocytosis, and, therefore, reduce the circulation time of nanoparticles, while dysopsonins (including albumins) promote prolonged circulation time of the particles in the bloodstream, when binding to them.

The present study of the interaction between both bare and modified with sodium citrate SPION and biologically important macromolecules, DNA and bovine serum albumin (BSA), is a necessary step for further development of the biomedical application of the iron oxide nanoparticles.

## MATERIALS AND METHODS

Nanoparticles of iron oxide ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) were synthesized by cryochemical method [9]. The diameter of the nanoparticles is about 11 nm. Suspensions of SPION in water and water solution of sodium citrate (NaCit) with concentration  $C_{\text{NaCit}} = 8 \times 10^{-4}$  M were used. The surface charge of bare iron oxide nanoparticles in water is slightly positive [10]. The coating of SPION by NaCit leads to the negative charge of their surface [11]. The concentration of stock suspensions of nanoparticles was 0.4 mg/ml.

Commercial calf thymus DNA ("Serva") and bovine serum albumin ("Sigma") were used without additional purification. The stock solutions of DNA were prepared in distilled water with addition of NaCl ( $C_{\text{NaCl}} = 0.02$  M) and in sodium citrate solution ( $C_{\text{NaCit}} = 8 \times 10^{-4}$  M). The stock solutions of BSA were prepared in distilled water and in sodium citrate solution ( $C_{\text{NaCit}} = 8 \times 10^{-4}$  M). The concentrations of the macromolecules were determined using the molar absorption coefficients  $\epsilon_{280} = 4.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  for BSA [12] and  $\epsilon_{260} = 6.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  for DNA [13].

The stock SPION suspensions were diluted by the appropriate solvents and dispersed by ultrasound at two modes applied successively and repeated twice: 22 kHz for 0.5 min and 44 kHz for 5 min. Experimentally we have shown that it is the optimum mode for dispersing.

The stock solutions of macromolecules were then added to the SPION suspensions. Obtained mixtures were stirred for 30 min.

To take into account the possible kinetics of nanoparticles binding to the macromolecules, the samples were kept for 5 days. Then the mixtures were stirred again and exposed to the magnetic field (0.42 T) for 1 hour for precipitation of iron oxide nanoparticles and their complexes with the macromolecules.

The control samples were prepared by dilution of the stock macromolecules solutions and SPION suspensions by the appropriate solvents. The concentrations of SPION and macromolecules in the control samples were the same as in the investigated mixtures.

Absorption spectra of control samples and supernatants of the mixtures were obtained by spectrophotometer "Specord M40" (Germany) in ultraviolet and visible spectral ranges. Quartz cells (1 cm and 5 cm optical path length) were used for the measurements. The measurement error of optical density was 0.005 units. The precipitation degree of SPION and SPION-macromolecules complexes was controlled by the intensity of the absorption at 340 nm (maximum absorption of iron oxide). The supernatant absorption was compared with the absorption of the control samples of DNA and BSA. Concentrations of macromolecules in the supernatants were calculated from the spectra intensities at the macromolecules absorption maxima (260 nm for DNA and 280 nm for BSA). The error of the concentration calculation was about 10 %.

### RESULTS AND DISCUSSION

Figures 1a, b show absorption spectra of the control DNA solutions and the supernatants of DNA-SPION suspensions. The supernatant does not contain iron oxide nanoparticles (absorption at 340 nm  $A_{340} = 0$ ). The intensity of the supernatant spectrum is lower than the one of the control solution. It can be caused by the DNA binding to bare iron oxide nanoparticles and precipitation of the DNA-SPION complexes by the external magnetic field. Previously the possibility of electrostatic complexes formation between positively charged nanoparticles and DNA was shown in [14-16].

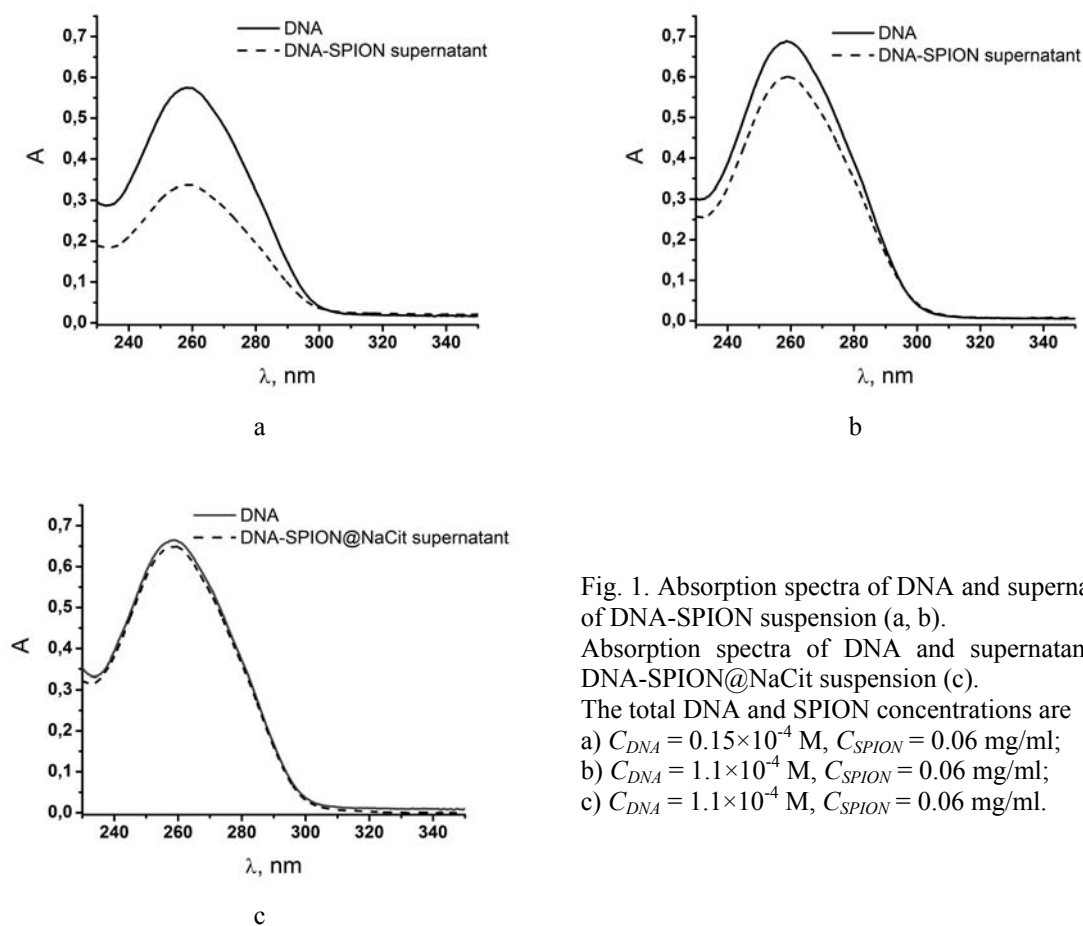


Fig. 1. Absorption spectra of DNA and supernatant of DNA-SPION suspension (a, b).

Absorption spectra of DNA and supernatant of DNA-SPION@NaCit suspension (c).

- The total DNA and SPION concentrations are  
 a)  $C_{DNA} = 0.15 \times 10^{-4}$  M,  $C_{SPION} = 0.06$  mg/ml;  
 b)  $C_{DNA} = 1.1 \times 10^{-4}$  M,  $C_{SPION} = 0.06$  mg/ml;  
 c)  $C_{DNA} = 1.1 \times 10^{-4}$  M,  $C_{SPION} = 0.06$  mg/ml.

Table 1. The concentration of bound DNA and the concentration ratio of bound DNA and SPION in suspensions with different initial DNA concentration

$C_{SPION}$ , mg/ml	$C_{DNA}$ , M	$C_{bound\ DNA}$ , M	$C_{bound\ DNA}/C_{SPION}$ , mol/g
0.06	$0.15 \times 10^{-4}$	$0.66 \times 10^{-5}$	$1.1 \times 10^{-4}$
0.06	$1.1 \times 10^{-4}$	$0.13 \times 10^{-4}$	$2.2 \times 10^{-4}$
0.06	$2.2 \times 10^{-4}$	$0.15 \times 10^{-4}$	$2.5 \times 10^{-4}$

The experiments at higher relative DNA concentrations demonstrate qualitatively similar results (Fig. 1b). However, amount of bound DNA changes. As can be seen from Table 1, with increase of the initial DNA concentration, the concentration of DNA bound to the nanoparticles rises up to  $0.13 \times 10^{-4}$  M and then practically does not change. The maximum possible ratio  $C_{bound\ DNA}/C_{SPION}$  is about  $2.5 \times 10^{-4}$  mol/g.

Absorption spectra of the control DNA solution and the supernatant of DNA-SPION@NaCit suspension practically do not differ (Fig. 1c). It indicates the absence of the DNA binding with the SPION@NaCit.

Though electrostatic interactions between DNA, a polyanion molecule, and negatively charged nanoparticles are impossible, negatively charged complexes of magnetic nanoparticles with certain drugs can bind to DNA in the minor groove [17]. Our studies indicate that for iron oxide nanoparticles coated with NaCit there is no mechanism of binding with DNA.

Fig. 2a shows absorption spectra of the control BSA solution and supernatant of the BSA-SPION@NaCit suspension. The supernatant spectrum intensity is greater than the one of the control solution. It should be noted that the higher absorption is also observed at the maximum of the iron oxide spectrum (340 nm).

The additional contribution to the absorption spectrum might be caused by the nanoparticles that did not precipitate under the influence of the magnetic field. To test this hypothesis, we compared the experimental spectrum of the system with superposition of the BSA spectrum and the spectrum of nanoparticles taken at the appropriate concentrations (Fig. 2a, dashed line). Since BSA does not absorb at 340 nm, the concentration of unprecipitated nanoparticles was estimated by the supernatant absorption at this wavelength. It amounted to 7 % of the initial SPION concentration. Total BSA concentration in the supernatant was the same as in the control solution.

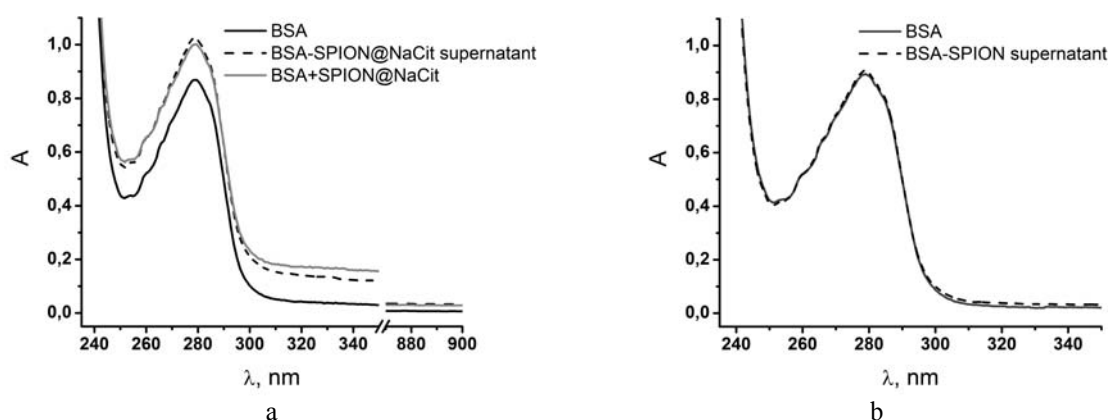


Fig. 2. Absorption spectra of BSA, the supernatant of BSA-SPION@NaCit suspension and the superposition of free BSA solution and SPION@NaCit suspension spectra (a). The total BSA and SPION concentrations corresponding to the experimental spectra are  $C_{BSA} = 2 \times 10^{-5}$  M and  $C_{SPION} = 0.06$  mg/ml. The total BSA and unprecipitated SPION concentrations corresponding to the calculated superposition curve are  $C_{BSA} = 2 \times 10^{-5}$  M and  $C_{SPION} = 0.0042$  mg/ml. Absorption spectra of BSA and the supernatant of BSA-SPION suspension (b). The total BSA and SPION concentrations are  $C_{BSA} = 2 \times 10^{-5}$  M and  $C_{SPION} = 0.06$  mg/ml.



The experimental plot and the calculated superposition curve are in a good agreement. It confirms the presence of the SPION in the supernatant. Since under the same experimental conditions free nanoparticles precipitate completely, the observed effect should be due to the interaction of SPION with the protein.

Qualitatively similar changes take place with the increase of the total BSA concentration in the investigated suspensions up to  $4.6 \times 10^{-5}$  M (graphs are not shown). However, significant light scattering of both the control solution and the supernatant, which may be caused by the aggregation of the protein at the relatively high concentration, complicates the detailed data analysis.

The absorption spectrum of BSA does not change upon addition of bare iron oxide nanoparticles (Fig. 2b) which indicates that BSA does not interact with SPION.

### CONCLUSIONS

Spectrophotometric studies of systems containing DNA and either bare or coated by sodium citrate SPION have shown the possibility of complexation between the positively charged SPION with DNA molecules. The maximum concentration ratio of bound DNA and bare SPION was obtained for the investigated system. It should be taken into account for application of SPION as carriers of the negatively charged drugs in the targeted delivery.

While bare SPION do not interact with BSA, minor interactions of negatively charged nanoparticles coated by sodium citrate with the protein are observed. It is shown that the formed BSA-SPION complexes can not be manipulated under the action of the external magnetic field.

### ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to Prof. A. G. Belous for providing the iron oxide nanoparticles samples. This work was supported, in part, by state order for research (0117U004039).

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

### Authors' ORCID ID

A.A. Skuratovska <https://orcid.org/0000-0001-6785-6952>  
 D.A. Pesina <https://orcid.org/0000-0001-7128-6841>  
 E.G. Bereznyak <https://orcid.org/0000-0003-1989-1408>  
 N.A. Gladkovskaya <https://orcid.org/0000-0002-5782-4567>  
 E.V. Dukhopelnykov <https://orcid.org/0000-0001-7764-2181>

### REFERENCES

1. Pan, B.-F., Gao, F., & Ao, L.-M. (2005) Investigation of interactions between dendrimer-coated magnetite nanoparticles and bovine serum albumin. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293, 252-258. doi: 10.1016/j.jmmm.2005.02.018
2. Macaroff, P. P., Oliveira, D. M., Lacava, Z. G. M., Azevedo, R. B., Lima, E. C. D., Morais, P. C., & Tedesco, A. C. (2004) The Effect of Bovine Serum Albumin on the Binding Constant and Stoichiometry of Biocompatible Magnetic Fluids. *IEEE Transactions on Magnetism*, 40(4), 3027-3029. doi: 10.1109/TMAG.2004.829204
3. Yang, Q., Liang, J., & Han, H. (2009) Probing the Interaction of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles with Bovine Serum Albumin by Spectroscopic Techniques. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(30), 10454-10458. doi: 10.1021/jp904004w
4. Xu, J.-K., Zhang, F.-F., Sun, J.-J., Sheng, J., Wang, F., & Sun, M. (2014) Bio and Nanomaterials Based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. *Molecules*, 19, 21506-21528. doi: 10.3390/molecules191221506
5. Berry, C., & Curtis, A. (2003) Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36, R198-R206. doi: 10.1016/j.nantod.2010.05.003



6. Lu, A.-H., Salabas, E.L., & Schuth, F. (2007) Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie-International Edition*, 46, 1222-1244. doi:10.1002/anie.200602866
7. Kudr, J., Haddad, Y., Richtera, L., Adam, V., & Zitka O. (2017) Magnetic Nanoparticles: From Design and Synthesis to Real World Applications. *Nanomaterials*, 7(9), 243. doi: 10.3390/nano7090243
8. Aggarwal, P., Hall, J. B., McLeland, Ch. B., Dobrovolskaia, M. A., & McNeil S. E. (2009) Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(6), 428-437. doi: 10.1016/j.addr.2009.03.009
9. Yelenich, O.V., Solopan, S.O., Kolodiazhnyi, T.V., Greneche, J.M., & Belous A.G. (2015) Synthesis of iron oxide nanoparticles by different methods and study of their properties. *Solid State Phenomena*, 230, 108-113. doi: 10.4028/www.scientific.net/SSP.230.108
10. Vakula, A., Tarapov, S., Bereznyak, E., Gladkovskaya, N., Dukhopelnykov, E., & Herus A. (2016) Spectral Investigation of Magnetite Nanoparticles Interaction with Charged Drugs. 9th international Kharkiv symposium on physics and engineering of microwaves, millimeter and submillimeter waves MSMW'2016, Kharkiv, June 21-24, 2016. (pp. A30). doi: 10.1109/MSMW.2016.7538006
11. Nigam, S., Barick, K.C., & Bahadur, D. (2011) Development of citrate-stabilized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 323, 237-243. doi: 10.1016/j.jmmm.2010.09.009
12. Gill, S. C., & von Hippel, P. H. (1989) Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data. *Analytical Biochemistry*, 182(2), 319-326. doi: 10.1016/0003-2697(89)90602-7
13. Barcelo, F., Capo, D., & Portugal, J. (2002) Thermodynamic characterization of the multivalent binding of chartreusin to DNA. *Nucleic Acids Research*, 30(20), 4567-4573. doi: 10.1093/nar/gkf558
14. Yiu, H. H. P., Bouffier, L., Boldrin, P., Long, J., Claridge, J. B., & Rosseinsky, M. J. (2013) Comprehensive Study of DNA Binding on Iron(II,III) Oxide Nanoparticles with a Positively Charged Polyamine Three-Dimensional Coating. *Langmuir*, 29(36), 11354-11365. doi: 10.1021/la400848r
15. Haddad, Y., Xhaxhiu, K., Kopel, P., Hynek, D., Zitka, O., & Adam, V. (2016) The Isolation of DNA by Polycharged Magnetic Particles: An Analysis of the Interaction by Zeta Potential and Particle Size. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), 550. doi: 10.3390/ijms17040550
16. Liu, C. H., Tsao, M. H., Sahoo, S. L., & Wu, W. C. (2017) Magnetic nanoparticles with fluorescence and affinity for DNA sensing and nucleus staining. *RSC Advances*, 7, 5937-5947. doi: 10.1039/C6RA25610D
17. Shahabadi, N., Falsafi, M., Feizi, F., & Khodarahmi, R. (2016) Functionalization of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> nanoparticles with antiviral drug zidovudine: Synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity and DNA interaction studies. *RSC Advances*, 6, 73605-73616. doi: 10.1039/C6RA16564H

Оригінальна стаття

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2019-41-03>

УДК 535.361:535.555:535.573+577.3.0

## ПОЛЯРИЗАЦІЙНО-ІНТЕРФЕРЕНЦІЙНЕ КАРТОГРАФУВАННЯ МЕРЕЖ В ПОЛІКРИСТАЛІЧНИХ ДИФУЗНИХ БІОЛОГІЧНИХ ТКАНИНАХ

О.В. Олар, В.О. Ушенко, М.Ю. Сахновський, Ю.О. Ушенко, О.В. Дуболазов,  
О.Г. Ушенко

*Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,*

*вул. Коцюбинського 2, Чернівці, 58002, Україна*

*e-mail: a.dubolazov@chnu.edu.ua*

Надійшла до редакції 16 квітня 2018 р.

Прийнята 26 жовтня 2018 р.

**Актуальність.** Розроблення нових технік комплексної поляриметричної 3D діагностики полікристалічних мереж біологічних тканин – актуальна задача біомедицини оптики. Таку можливість може забезпечити поєднання традиційних методів Мюллер-матричного та голографічного картографування фазово-неоднорідних шарів. Даний підхід відкриває перспективи дослідження розподілів лінійного та циркулярного двоприменезаломлення і дихроїзму полікристалічних мереж і структур в об'ємі біологічного шару. Така інформація є базисною у визначенні нових (у порівнянні з традиційними даними Мюллер-матричної поляриметрії) критеріїв диференціальної діагностики різноманітних патологічних станів біологічних тканин органів людини.

**Мета роботи.** Метою роботи є розробка та експериментальна апробація комплексу методів стохастичної поляриметрії та інтерферометрії з використанням алгоритмів цифрової голографічної реконструкції амплітудно-фазової структури об'єктних полів для одержання взаємозв'язків між 3D розподілами мап деполяризації та особливостями полікристалічної структури гістологічних зрізів біологічних тканин різної морфологічної будови та фізіологічного стану.

**Матеріали і методи.** В основу методу 3D Мюллер-матричного картографування покладено використання опорної хвилі лазерного випромінювання, яка в схемі оптичного інтерферометра накладається на поляризаційно-неоднорідне зображення біологічного шару.

**Результати.** В процесі порівняльного аналізу мап деполяризації біологічних тканин з різною за геометричними масштабами морфологічною будовою ми виявили різну швидкість наростання ступеня деполяризації.

**Висновки.** Запропоновано та обґрунтовано метод Мюллер-матричного картографування мап деполяризації деполяризуючих шарів біологічних тканин різної морфологічної будови і фізіологічного стану. Визначено залежності величини статистичних моментів 1-го – 4-го порядків, які характеризують пошарові розподіли значень ступеня деполяризації різних типів біологічних тканин. Проведено дослідження можливостей диференціації доброякісних (аденома) і злоякісних (карцинома) змін гістологічних зрізів біопсії тканини простати.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** поляризація; інтерференція; картографування; матриця Мюллера; біологічні тканини.

## POLARIZATION-INTERFERENCE MAPPING OF NETWORKS IN DIFFUSAL POLYCRYSTALLINE BIOLOGICAL TISSUES

O.V. Olar, V.O. Ushenko, M.Yu. Sakhnovsky, Yu.O. Ushenko, O.V. Dubolazov,  
O.G. Ushenko

*Yuri Fedkovich Chernivtsi National University, 2 Kotsyubinskogo st., Chernivtsi, 58002, Ukraine*

**Background:** The development of new techniques for complex polarimetric 3D diagnostics of polycrystalline networks of biological tissues is relevant task of biomedical optics. Such an opportunity can provide a combination of traditional methods of Muller-matrix and holographic mapping of phase-inhomogeneous layers. This approach opens the aspects of studying the distributions of linear and circular birefringence and dichroism of polycrystalline networks and structures in the volume of the biological layer. Such information is the basis for developing new (in comparison with traditional Muller-matrix polarimetry data) criteria for the differential diagnosis of various pathological states of biological tissues

of human organs.

**Objectives:** Development and experimental testing of the complex of Stokes-polarimetry and interferometry methods using algorithms for digital holographic reconstruction of the amplitude-phase structure of object fields for obtaining interrelationships between 3D distributions of depolarization maps and peculiarities of the polycrystalline structure of histological sections of biological tissues of different morphological structures and physiological state.

**Materials and methods:** The basis of the 3D Müller-matrix mapping method is the use of a reference wave of laser radiation, which is superimposed on a polarization-non-uniform image of the biological layer in the scheme of the optical interferometer.

**Results:** In the process of comparative analysis of the map of depolarization of biological tissues with different geometric scales of the morphological structure, we found different rates of growth of the degree of depolarization.

**Conclusions:** The Muller-matrix mapping of depolarization of depolarizing layers of biological tissues of different morphological structure and physiological state is proposed and substantiated. The dependences of the magnitude of the statistical moments of the 1st-4th order, which characterize the layered distributions of the degree of depolarization of different types of biological tissues, are determined. The research of the possibilities of differentiation of benign (adenoma) and malignant (carcinoma) changes of histological sections of the prostate tissue biopsy has been carried out.

**KEY WORDS:** polarization; interference; mapping; Müller matrix; biological tissue.

### ПОЛЯРИЗАЦИОННО-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЕ КАРТОГРАФИРОВАНИЕ СЕТЕЙ В ПОЛИКРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ДИФФУЗНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЯХ

О.В. Олар, В.О. Ушенко, М.Ю. Сахновський, Ю.О. Ушенко, О.В. Дуболазов,  
О.Г. Ушенко

*Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича,  
ул. Коцюбинского, 2, Черновцы, 58002, Украина*

**Актуальность.** Разработка новых техник комплексной поляриметрической 3D диагностики поликристаллических сетей биологических тканей - актуальная задача биомедицинской оптики. Такую возможность может обеспечить сочетание традиционных методов Мюллер-матричного и голографического картографирования фазово-неоднородных слоев. Данный подход открывает перспективы исследования распределений линейного и циркулярного двулучепреломления и дихроизма поликристаллических сетей и структур в объеме биологического слоя. Такая информация является базовой в разработке новых (по сравнению с традиционными данными Мюллер-матричной поляриметрии) критериев дифференциальной диагностики различных патологических состояний биологических тканей органов человека.

**Цель работы.** Разработка и экспериментальная апробация комплекса методов стокс-поляриметрии и интерферометрии с использованием алгоритмов цифровой голографической реконструкции амплитудно-фазовой структуры объектных полей для получения взаимосвязей между 3D делениями карт деполяризации и особенностями поликристаллической структуры гистологических срезов биологических тканей различного морфологического строения и физиологического состояния.

**Материалы и методы.** В основу метода 3D Мюллер-матричного картографирования положено использование опорной волны лазерного излучения, которая в схеме оптического интерферометра накладывается на поляризационно-неоднородное изображение биологического слоя.

**Результаты.** В процессе сравнительного анализа карт деполяризации биологических тканей с различным по геометрическим масштабам морфологическим строением мы обнаружили различную скорость нарастания степени деполяризации.

**Выводы.** Предложен и обоснован метод Мюллер-матричного картографирования карт деполяризации деполяризирующих слоев биологических тканей различного морфологического строения и физиологического состояния. Определены зависимости величины статистических моментов 1-го – 4-го порядков, которые характеризуют послойные распределения значений степени деполяризации различных типов биологических тканей. Проведено исследование возможностей дифференциации доброкачественных (аденома) и злокачественных (карцинома) изменений гистологических срезов биопсии ткани простаты.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** поляризация; интерференция; картографирование; матрица Мюллера; биологические ткани.

На даний час у біомедичній оптиці активно розвиваються методи і засоби поляриметричної діагностики структури біологічних тканин [1-6], яка включає низку оригінальних напрямків:

- дослідження матриць розсіяння [7-11];
- Мюллер-матрична поляриметрия [12-16];
- полярна декомпозиція матриць Мюллера [17, 18];
- двомірне Мюллер-матричне картографування [19-22] у рамках різних модельних наближень [23-26].

Серед усього різноманіття методів і засобів поляриметрії біологічних об'єктів існує декілька загальних речей. По-перше, для опису взаємодії поляризованого світла з такими складними системами використовують найбільш загальні наближення з використанням Мюллер-матричного формалізму [1-18]. По-друге, всі експериментальні та аналітичні результати одержані шляхом вимірювання та аналізу матриць Мюллера представлені у вигляді 1D («індикатриси» [14, 27, 28]) і 2D («Мюллер-матричні зображення» [13, 15, 16]) форматах. Тому актуальним є розробка нових технік комплексної поляриметричної 3D діагностики полікристалічних мереж біологічних тканин. Таку можливість може забезпечити поєднання традиційних методів Мюллер-матричного та голографічного картографування фазово-неоднорідних шарів [29, 30]. Проте, у випадку сильно розсіюючих дифузних шарів далеко не всі елементи матриці Мюллера є зручними для характеристики зразку біологічної тканини. Альтернативою в цьому сенсі є застосування комбінації діагональних Мюллер-матричних елементів або мап деполаризації [13, 31].

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

### *Коротка теорія методу 3D Мюллер-матричного картографування*

В основу методу 3D Мюллер-матричного картографування покладено використання опорної хвилі лазерного випромінювання, яка в схемі оптичного інтерферометра накладається на поляризаційно-неоднорідне зображення біологічного шару. Одержана інтерференційна картина реєструється за допомогою цифрової камери з наступним цифровим голографічним відтворенням 2D розподілів комплексних амплітуд  $|E_x| \exp i(\delta_x)$ ;  $|E_y| \exp i(\delta_y)$  і відповідних параметрів вектора Стокса (співвідношення (3)) об'єктного поля біологічного шару у дискретному наборі фазових площин  $\delta_k(l_k)$ :

$$\begin{aligned}
 S_1 &= |E_x|^2 + |E_y|^2; \\
 S_2 &= |E_x|^2 - |E_y|^2; \\
 S_3 &= 2 \operatorname{Re} |E_x E_y^*| = 2 |E_x| |E_y| \cos \delta_k; \\
 S_4 &= 2 \operatorname{Im} |E_x E_y^*| = 2 |E_x| |E_y| \sin \delta_k.
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

На цій основі можна одержати сукупність пошарових розподілів величини матричних елементів  $M_{ik}(x, y, k\Delta\delta)$  за наступною методикою:

- для векторів Стокса лінійно-поляризованих зондуєчих пучків  $S^0(0^\circ)$ ;  $S^0(90^\circ)$

$$S^0(0^0) = \{M\} \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} M_{11} + M_{12} \\ M_{21} + M_{22} \\ M_{31} + M_{32} \\ M_{41} + M_{42} \end{pmatrix}; S^0(90^0) = \{M\} \begin{pmatrix} 1 \\ -1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} M_{11} - M_{12} \\ M_{21} - M_{22} \\ M_{31} - M_{32} \\ M_{41} - M_{42} \end{pmatrix}; \quad (2)$$

– для векторів Стокса лінійно поляризованих зондуєчих пучків  $S^0(45^0)$ ;  $S^0(135^0)$

$$S^0(45^0) = \{M\} \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} M_{11} + M_{13} \\ M_{21} + M_{23} \\ M_{31} + M_{33} \\ M_{41} + M_{43} \end{pmatrix}; S^0(135^0) = \{M\} \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ -1 \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} M_{11} - M_{13} \\ M_{21} - M_{23} \\ M_{31} - M_{33} \\ M_{41} - M_{43} \end{pmatrix}; \quad (3)$$

– для векторів Стокса право- та ліво циркулярно-поляризованих зондуєчих пучків  $S^0(\otimes)$ ;  $S^0(\oplus)$ :

$$S^0(\otimes) = \{M\} \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} M_{11} + M_{14} \\ M_{21} + M_{24} \\ M_{31} + M_{34} \\ M_{41} + M_{44} \end{pmatrix}; S^0(\oplus) = \{M\} \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ -1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} M_{11} - M_{14} \\ M_{21} - M_{24} \\ M_{31} - M_{34} \\ M_{41} - M_{44} \end{pmatrix}. \quad (4)$$

З виразів (1) – (4) впливають робочі співвідношення для визначення значень елементів матриці Мюллера у «фазовому» перерізі  $\delta^*$

$$\{M(\delta_k)\} = 0,5 \begin{pmatrix} (S_1^0 + S_1^{90}) & (S_1^0 - S_1^{90}) & (S_1^{45} - S_1^{135}) & (S_1^\otimes - S_1^\oplus) \\ (S_2^0 + S_2^{90}) & (S_2^0 - S_2^{90}) & (S_2^{45} - S_2^{135}) & (S_2^\otimes - S_2^\oplus) \\ (S_3^0 + S_3^{90}) & (S_3^0 - S_3^{90}) & (S_3^{45} - S_3^{135}) & (S_3^\otimes - S_3^\oplus) \\ (S_4^0 + S_4^{90}) & (S_4^0 - S_4^{90}) & (S_4^{45} - S_4^{135}) & (S_4^\otimes - S_4^\oplus) \end{pmatrix}. \quad (5)$$

Координатний розподіл (мапа) величини деполаризації у кожному фазовому перерізі визначається наступним співвідношенням [17-19]

$$\Lambda(x, y, \delta_k) = 1 - \frac{1}{3} \{[(S_2^0 - S_2^{90})] + [(S_3^{45} - S_3^{135})] + [(S_4^\otimes + S_4^\oplus)]\}. \quad (6)$$

Кількісно розподіли  $\Lambda(x, y, \delta_k)$  оцінювалися шляхом обчислення сукупності статистичних моментів 1-го – 4-го порядків  $Z_{i=1;2;3;4}$  [14-16] у кожній «фазовій» площині  $\delta_k$ .

### **Оптична схема та методика вимірювань 3D Мюллер-матричної поляриметрії**

На рис. 1 наведено оптичне розташування 3D Мюллер-матричної поляриметрії біологічних шарів.

Паралельний ( $\emptyset = 2 \times 10^3 \mu m$ ) пучок He-Ne ( $\lambda = 0,6328 \mu m$ ) лазера 1, сформований за допомогою коліматора 2, за допомогою 50% світлоподільника 3, розділяється на «опромінюючий» та «опорний». «Опромінюючий» за допомогою обертаючого дзеркала

4 спрямовується крізь поляризаційний фільтр 6–8 у напрямку зразку біологічного шару 9. Поляризаційно-неоднорідне зображення об'єкту 9 об'єктивом 10 проектується у площину цифрової камери 14. «Опорний» пучок дзеркалом 5 спрямовується крізь поляризаційний фільтр 11–13 у площину поляризаційно-неоднорідного зображення об'єкту 9. У результаті формується інтерференційна картина, координатний розподіл інтенсивності якої реєструє цифрова камера 14. Формування станів поляризації «опромінюючого» та «опорного» пучків здійснюється поляризаційними фільтрами 6–8 і 11–13.

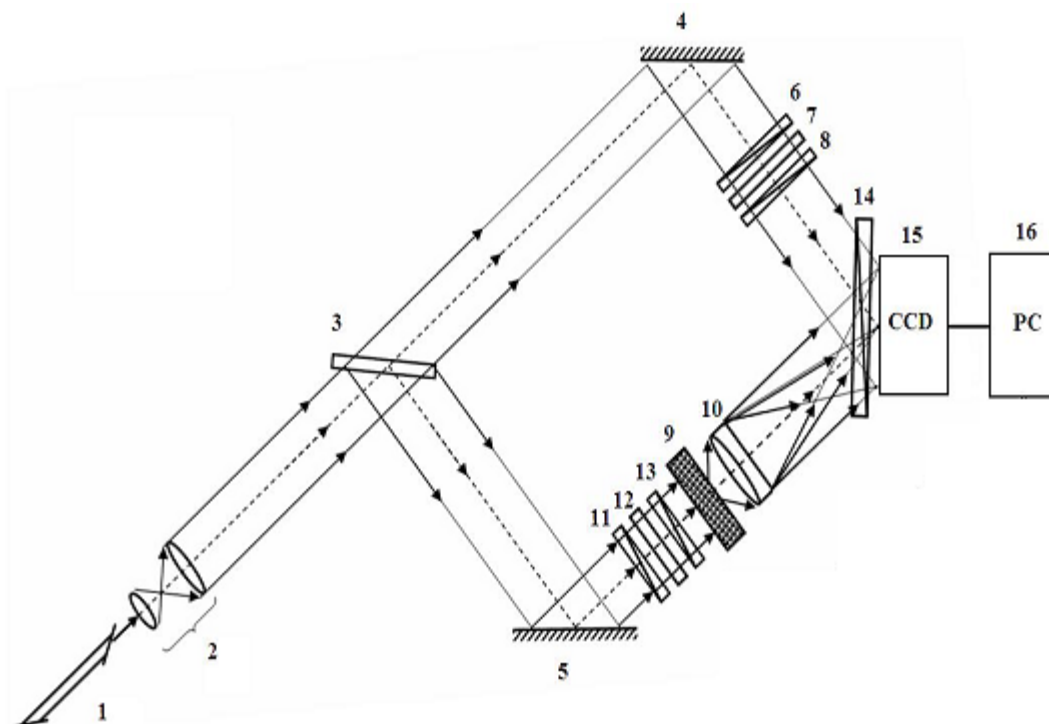


Рис. 1. Схема поляризаційної інтерферометрії 3D розподілів елементів матриці Мюллера. Пояснення в тексті.

Експериментальна методика поляризаційно-інтерференційного визначення елементів матриці Мюллера полягає у наступній сукупності дій:

- формування в опромінюючому та опорному лазерних пучках чотирьох лінійно  $(0^{\circ}; 90^{\circ}; 45^{\circ}; 135^{\circ})$  і двох (право-  $(\otimes)$  і ліво-  $(\oplus)$ ) циркулярно поляризованих станів –  $((0^{\circ} - 0^{\circ}); (90^{\circ} - 90^{\circ}); (45^{\circ} - 45^{\circ}); (135^{\circ} - 135^{\circ}); (\otimes - \otimes); (\oplus - \oplus))$ ;

- реєстрацію кожної парціальної інтерференційної картини крізь поляризатор-аналізатор 14 з послідовною орієнтацією площини пропускання під кутами  $\Omega = 0^{\circ}; \Omega = 90^{\circ}$ ;

- відновлення для кожного парціального інтерференційного розподілу за допомогою інтегрального дифракційного перетворення [30] серії “фазових” координатних розподілів комплексних амплітуд  $\{E_x(x, y); E_y(x, y)\}$  об'єктного поля у площині біологічного шару.

#### **Методика виготовлення зразків**

Вибір техніки виготовлення гістологічних зрізів біологічних тканин у наших поляриметричних дослідженнях оптичної анізотропії пов'язаний з наступними обставинами.

Стандартне дослідження будови біологічної тканини в діагностичних цілях проводиться на зрізах, отриманих з біопсії матеріалу, зафіксованого розчином формаліну, зневодненого і залитого в парафін або інші синтетичні середовища (наприклад, парапласт, гістопласт і ін.) – санні та роторні мікротоми. Процес обробки тканини, що завершується виготовленням зрізів з парафінових блоків, тривалий і займає більше 42 годин [32].

Для поляриметричних досліджень оптичної анізотропії біологічних тканин такі зразки є непридатними. Це обумовлено тим, що фіксуючі матеріали володіють власною анізотропією, що спотворює поляризаційні прояви двоприменезаломлення і дихроїзму досліджуваних зразків біологічних тканин.

Окрім цього, у патологоанатомічній практиці разом з плановими проводяться термінові гістологічні дослідження – інтраопераційні біопсії. Час, що витрачається на отримання висновку в цих випадках, має становити не більше 20 хв. Парафінові зрізи не відповідають даній вимозі.

Для швидкого отримання гістологічного препарату в біопсійній діагностиці застосовують швидке заморожування тканини з подальшим виготовленням зрізів за допомогою кріостату або заморожувальної приставки до мікротому. Така технологія, окрім експресності, забезпечує можливість прямого дослідження фазової та амплітудної анізотропії і тому знайшла застосування у всіх провідних світових лабораторіях поляриметричної діагностики структури біологічних тканин [2-6,10-13].

Головним недоліком методу заморожувальної кріотомії був вплив кристалізації води. Проте, отримання якісного замороженого зрізу можливе за рахунок швидкого заморожування тканини, при якому вода не кристалізується, а переходить в стан аморфного льоду [33].

Рішення зазначеної проблеми знайдено в заморожуванні зразка біоптату у n-гексані [34]. В результаті отримуються зрізи високої якості, що дозволяє проводити не тільки поляриметричні, але світлові мікроскопічні дослідження загального малюнку біологічних тканин, а також деталей їх клітинної будови.

В якості експериментального зразку використовувалися гістологічні зрізи доброякісної ( $\tau = 2.14; \Lambda = 88\%$ ) і злроякісної ( $\tau = 2.14; \Lambda = 88\%$ ) пухлин простати: доброякісна пухлина (аденома) – група 1 (26 зразків); злроякісна пухлина (карцинома) – група 2 (26 зразків).

### ***Принципи диференціальної діагностики***

Оптична технологія диференціальної діагностики таких зразків включає в себе наступні етапи:

1. Визначення серії «фазових» пошарових розподілів  $\Lambda(\delta_k, x, y)$  у межах обох груп зразків.

2. Для кожного «фазового» перерізу  $\delta_k$  обчислюється сукупність статистичних моментів 1-го – 4-го порядків  $Z_{i=1;2;3;4}\{\Lambda(\delta_k, x, y)\}$  [35-43].

3. Будуються для гістологічних зрізів групи 1 і групи 2 «фазові» залежності  $Z_{i=1;2;3;4}\{\Lambda(\delta_1, \delta_2, \dots, \delta_k)\}$ .

4. Визначаються «фазові» площини ( $\delta^*$ ), де реалізуються максимальні відмінності між величинами статистичних моментів ( $\Delta Z_{i=1;2;3;4}^* \equiv \Delta Z_{i=1;2;3;4}(\delta^*) \rightarrow \max$ ).

5. У «фазовій» площині  $\varphi^*$  Визначаються середнє  $\Delta \bar{Z}_{i=1;2;3;4}^*$  та похибка  $\sigma(\Delta Z_i^*)$  у межах гістологічних зрізів з групи 1 і групи 2.



6. З метою можливого клінічного застосування [44,45] для кожного із статистичних моментів  $Z_{i=1;2;3;4}$  обчислюється чутливість ( $Se = \frac{a}{a+b}100\%$ ); специфічність ( $Sp = \frac{c}{c+d}100\%$ ); збалансована точність ( $Ac = \frac{Se+Sp}{2}$ ), де  $a$  і  $b$  кількість правильних і неправильних діагнозів у межах групи 2;  $c$  і  $d$  - теж саме у межах групи 1.

### РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 2 приведені мапи деполяризації  $\Lambda(\delta^*, x, y)$  оптично-товстих гістологічних зрізів аденоми (ліва частина) та карциноми (права частина) простати.

Наведені приклади мап деполяризації оптично-товстих ( $\tau = 1,99 - 2,04$ ) зразків одержані для фазового перерізу  $\delta^* = 0,95$  і відповідають умові  $\Delta Z_{i=1;2;3;4}^* \equiv \Delta Z_{i=1;2;3;4}(\delta^*) \rightarrow \max$ .

У табл. 1 приведені середнє  $\bar{\Delta Z}_{i=1;2;3;4}$  та похибки  $\sigma(\Delta Z_i)$  у межах гістологічних зрізів з групи 1 і групи 2 та обчислена для кожного з статистичних параметрів збалансована точність  $Ac_j(\Delta Z_i), \%$ .

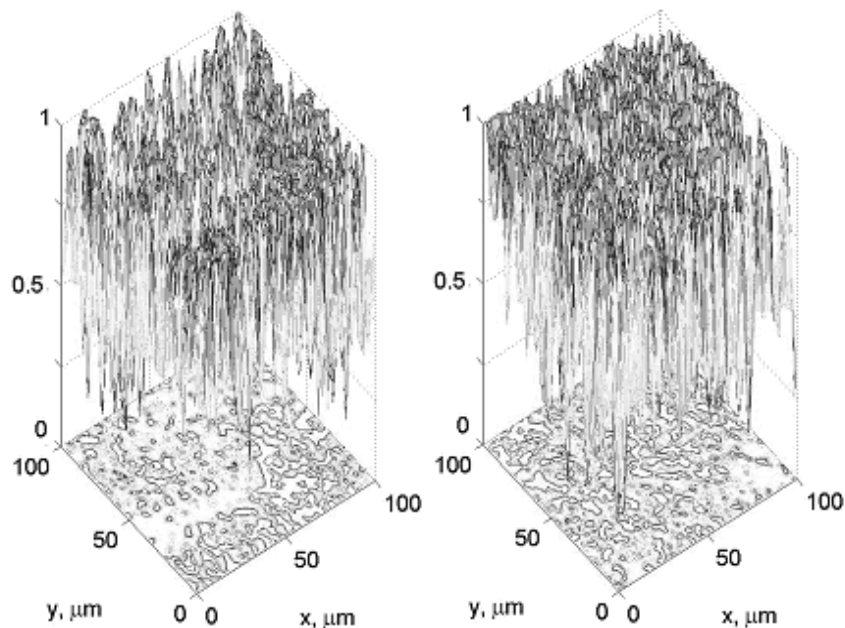


Рис. 2. Розподіли величини ступеня деполяризації оптично-товстих ( $\tau = 1,99 - 2,04$ ) гістологічних зрізів біопсії аденоми (ліворуч) та карциноми (праворуч) простати.

Аналіз одержаних результатів 3D Мюллер-матричного картографування оптично-товстих гістологічних зрізів біопсії доброякісної та злоякісної пухлин простати виявив спільну залежність структури мап деполяризації від зростання рівня фазового перерізу. Так зі збільшенням  $\delta_k \uparrow$  (зростанням кратності світлорозсіяння в об'ємі біологічного шару) має місце наступний сценарій зміни величини статистичних моментів 1-го – 4-го

порядків, які характеризують  $\Lambda(\delta_k, x, y) - \begin{cases} Z_{1;2}(\Lambda(\delta_k, x, y)) \uparrow; \\ Z_{3;4}(\Lambda(\delta_k, x, y)) \downarrow \end{cases}$ . Виявлена закономірність

трансформації статистичної структури мап деполяризації гістологічних зрізів біопсії доброякісної і злоякісної пухлин у різних фазових перерізах 3D – розподілів обумовлена наростанням кратності розсіяння поляризованого лазерного випромінювання оптично-анізотропними структурами тканини простати.

В процесі порівняльного аналізу мап деполяризації біологічних тканин з різною за геометричними масштабами морфологічною будовою ми виявили різну швидкість наростання ступеня деполяризації. У випадку диференціації зразків пухлин простати такий процес корелює з механізмами формування деполяризації в об'ємі злоякісної карциноми, великомасштабна фібрилярна сітка якої зазнає деструктивних змін. За рахунок цього зростає кратність розсіювання на дрібномасштабних структурах і гістограми розподілу величини  $\Lambda^*(\delta_k, x, y)$  згідно центральної граничної теореми [44] прагнуть до «дзвоноподібних» і стають менш вузькими та асиметричними у порівнянні із гістограмами даного параметру, обчисленими для зразку доброякісної пухлини. Таким чином, максимальні відмінності між мапами деполяризації оптично-товстих шарів аденоми і карциноми (рис. 1) реалізуються для певного «проміжного» діапазону фазових перерізів ( $0.75 < \Delta\delta^* < 1.05$ ).

Таблиця 1 ілюструє результати статистичного аналізу розподілів величини  $\Lambda(\delta_k, x, y)$  зразків пухлин простати обох типів у найбільш діагностично-чутливому «фазовому» перерізі  $\delta^* = 0,95$ .

Таблиця 1. Статистичні критерії диференціації пухлин простати на основі мап деполяризації

Параметри ( $\delta^* = 0,95$ )	Аденома – Карцинома	Точність, $A_c, \%$
$\Delta Z_1$	$0,074 \pm 0,004$	71
$\Delta Z_2$	$0,041 \pm 0,003$	68
$\Delta Z_3$	$0,310 \pm 0,017$	83
$\Delta Z_4$	$0,44 \pm 0,029$	87

Сірим виділені статистичні параметри, для яких відмінності між  $\Lambda(\delta_k, x, y)$  і  $\Lambda^*(\delta_k, x, y)$  максимальні. Для даних параметрів згідно канонів доказової медицини [44] вперше досягнуто хороших рівнів збалансованої точності методу 3D Мюллер-матричного картографування оптично-товстих шарів біологічних тканин у диференціальній діагностиці доброякісних і злоякісних пухлин простати –  $A_c(Z_{3;4}(\Lambda(\delta^*))) \sim 83\% - 87\%$ .

Таким чином, нами вперше реалізовано нове поліпшення широко відомих методів поляриметрії 2D Мюллер-матричних зображень біологічних тканин, які узагальнені в авторитетних оглядах [1-6, 10-12], на випадок 3D матричного картографування [29] реальних дифузних біологічних шарів шляхом визначення пошарових мап деполяризації. На цій основі, вперше у світовій практиці поляриметрії біологічних тканин [14-16, 23-28] реалізовано диференціацію деполяризуючих зразків гістологічних зрізів біопсії доброякісних і злоякісних пухлин простати.

## ВИСНОВКИ

Запропоновано та обґрунтовано нові поліпшення методу Мюллер-матричного картографування шляхом відтворення 3D мап деполяризації деполяризуючих дифузних шарів доброякісних і злоякісних пухлин простати.

Завдяки вперше застосованому статистичному аналізу пошарових мап деполаризації виявлено найбільш чутливі до патологічних змін полікристалічної структури простати параметри ( $\Delta Z_{i=1;2;3;4}^* \equiv \Delta Z_{i=1;2;3;4}(\delta^* = 0.95) \rightarrow \max$ ) – статистичні моменти 3-го і 4-го порядків, які характеризують розподіли ступеня деполаризації зразків гістологічних зрізів аденоми і карциноми простати ( $\tau = 1.99 - 2.04$ ;  $\Lambda = 81\% - 85\%$ ).

Досягнуто хорошої ( $\Delta Z_{3;4}(\delta^*, \Lambda) \Rightarrow Ac > 80\%$ ) точності диференціації зразків аденоми і карциноми методом Мюллер-матричного картографування 3D мап деполаризації патологічно зміненої тканини простати.

### КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ


Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

### ПОДЯКА

Дана стаття виконана в рамках науково-дослідної роботи, що фінансується за рахунок коштів державного бюджету Міністерством освіти і науки України (номер бюджетної теми: №0116U001446).

### Authors' ORCID ID

O. V. Olar  <http://orcid.org/0000-0003-1051-2811>

O. V. Dubolazov  <https://orcid.org/0000-0003-1051-2811>

Yu. A. Ushenko  <http://orcid.org/0000-0003-1767-1882>

### REFERENCES

1. De Martino, A. (2009). A polarization-based optical techniques applied to biology and medicine. In *Proc. European Workshop, Ecole Polytechnique, Massy, France*.
2. Ghosh, N., & Vitkin, A. I. (2011). Tissue polarimetry: concepts, challenges, applications, and outlook. *Journal of biomedical optics*, 16(11), 110801.
3. Jacques, S. L. (2016). Polarized light imaging of biological tissues. In *Handbook of biomedical optics* (pp. 669-692). CRC Press.
4. Ghosh, N., Wood, M., & Vitkin, A. (2010). Polarized Light Assessment of Complex Turbid Media Such as Biological Tissues Us-ing Mueller Matrix Decomposition. In *Handbook of photonics for biomedical science* (pp. 289-318). CRC Press.
5. Layden, D., Ghosh, N., & Vitkin, A. (2013). Quantitative polarimetry for tissue characterization and diagnosis, in *Advanced Biophotonics: Tissue Optical Sectioning. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York*, 73-108.
6. Vitkin, A., Ghosh, N., & De Martino, A. (2015). Tissue polarimetry Photonics: Scientific Foundations, Technology and Applications, vol. 4. D.L. Andrews (Eds.).
7. Mishchenko, M. I., Travis, L. D., & Lacis, A. A. (2002). *Scattering, absorption, and emission of light by small particles*. Cambridge university press.
8. Swami, M. K., Patel, H. S., & Gupta, P. K. (2013). Conversion of 3× 3 Mueller matrix to 4× 4 Mueller matrix for non-depolarizing samples. *Optics Communications*, 286, 18-22.
9. Izotova, V. F., Maksimova, I. L., Nefedov, I. S., & Romanov, S. V. (1997). Investigation of Mueller matrices of anisotropic nonhomogeneous layers in application to an optical model of the cornea. *Applied optics*, 36(1), 164-169.
10. Tuchin, V. V. (2015). Tissue optics and photonics: biological tissue structures. *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*, 1(1).
11. Tuchin, V. V. (2015). Tissue optics and photonics: light-tissue interaction. *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*, 1(2).
12. Manhas, S., Swami, M. K., Buddhiant, P., Ghosh, N., Gupta, P. K., & Singh, K. (2006). Mueller matrix approach for determination of optical rotation in chiral turbid media in backscattering geometry. *Optics express*, 14(1), 190-202.
13. Deng, Y., Zeng, S., Lu, Q., & Luo, Q. (2007). Characterization of backscattering Mueller matrix patterns of highly scattering media with triple scattering assumption. *Optics Express*, 15(15), 9672-9680.

14. Ushenko, A. G., & Pishak, V. P. (2004). Laser polarimetry of biological tissue: principles and applications. *Handbook of Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science, 1*, 93-138.
15. Angelsky, O. V., Ushenko, A. G., Ushenko, Y. A., Pishak, V. P., & Peresunko, A. P. (2010). Statistical, correlation, and topological approaches in diagnostics of the structure and physiological state of birefringent biological tissues. In *Handbook of Photonics for Biomedical Science* (pp. 319-358). CRC Press.
16. Ushenko, Y. A., Boychuk, T. M., Bachynsky, V. T., & Mincer, O. P. (2013). Diagnostics of structure and physiological state of birefringent biological tissues: statistical, correlation and topological approaches. *Handbook of Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring, and Materials Science*, 107.
17. Lu, S. Y., & Chipman, R. A. (1996). Interpretation of Mueller matrices based on polar decomposition. *JOSA A, 13*(5), 1106-1113.
18. Guo, Y., Zeng, N., He, H., Yun, T., Du, E., Liao, R., ... & Ma, H. (2013). A study on forward scattering Mueller matrix decomposition in anisotropic medium. *Optics express, 21*(15), 18361-18370.
19. DeBoo, B., Sasian, J., & Chipman, R. (2004). Degree of polarization surfaces and maps for analysis of depolarization. *Optics express, 12*(20), 4941-4958.
20. Buscemi, I. C., & Guyot, S. (2013). Near real-time polarimetric imaging system. *Journal of Biomedical Optics, 18*(11), 116002.
21. Manhas, S., Vizet, J., Deby, S., Vanel, J. C., Boito, P., Verdier, M., ... & Pagnoux, D. (2015). Demonstration of full  $4 \times 4$  Mueller polarimetry through an optical fiber for endoscopic applications. *Optics express, 23*(3), 3047-3054.
22. Pierangelo, A., Manhas, S., Benali, A., Fallet, C., Totobenazara, J. L., Antonelli, M. R., ... & Validire, P. (2013). Multispectral Mueller polarimetric imaging detecting residual cancer and cancer regression after neoadjuvant treatment for colorectal carcinomas. *Journal of biomedical optics, 18*(4), 046014.
23. Wang, L. V., & Wu, H. I. (2012). *Biomedical optics: principles and imaging*. John Wiley & Sons.
24. Boas, D. A., Pitris, C., & Ramanujam, N. (Eds.). (2016). *Handbook of biomedical optics*. CRC press.
25. Vo-Dinh, T. (2014). *Biomedical Photonics Handbook, 3 Volume Set*. CRC press.
26. Tuchin, V. V. (2015). *Tissue optics: Light scattering methods and instruments for medical diagnosis: Third edition*. SPIE Press, Bellingham, Washington.
27. Lu, S. Y., & Chipman, R. A. (1996). Interpretation of Mueller matrices based on polar decomposition. *JOSA A, 13*(5), 1106-1113.
28. Ghosh, N., Wood, M., & Vitkin, A. (2010). Polarized Light Assessment of Complex Turbid Media Such as Biological Tissues Using Mueller Matrix Decomposition. In *Handbook of photonics for biomedical science* (pp. 253-282).
29. Kasaragod, D. K., Lu, Z., Jacobs, J., & Matcher, S. J. (2012). Experimental validation of an extended Jones matrix calculus model to study the 3D structural orientation of the collagen fibers in articular cartilage using polarization-sensitive optical coherence tomography. *Biomedical optics express, 3*(3), 378-387.
30. Yasuno, Y., Ju, M. J., Hong, Y. J., Makita, S., Lim, Y., & Yamanari, M. (2015). Jones Matrix based polarization sensitive optical coherence tomography. *Optical Coherence Tomography: Technology and Applications, 1137-1162*.
31. Ossikovski, R., & Arteaga, O. (2014). Statistical meaning of the differential Mueller matrix of depolarizing homogeneous media. *Optics letters, 39*(15), 4470-4473.
32. Криволапов, Ю. А., & Леенман, Е. Е. (2006). *Морфологическая диагностика лимфом*. КОСТА.
33. Зинкин, А. Н., Зингилевская, Н. Г., & Мусельян, Б. Б. (1997). Криовоздействие в оториноларингологии: методические рекомендации. *Краснодар-1997*.
34. Davis, D. A., Pellowski, D. M., & William Hanke, C. (2004). Preparation of frozen sections. *Dermatologic surgery, 30*(12p1), 1479-1485.
35. Ushenko, V. A., & Dubolazov, A. V. (2013, September). Correlation and self similarity structure of polycrystalline network biological layers Mueller matrices images. In *Applications of Digital Image Processing XXXVI* (Vol. 8856, p. 88562D). International Society for Optics and Photonics.
36. Ushenko, V. A., Pavlyukovich, N. D., & Trifonyuk, L. (2013). Spatial-frequency azimuthally stable cartography of biological polycrystalline networks. *International Journal of Optics, 2013*, 683174. doi: 10.1155/2013/683174.
37. Ushenko, V. A., & Gorsky, M. P. (2013). Complex degree of mutual anisotropy of linear birefringence and optical activity of biological tissues in diagnostics of prostate cancer. *Optics and Spectroscopy, 115*(2), 290-297.
38. Ushenko, Y. A., Ushenko, V. A., Dubolazov, A. V., Balanetskaya, V. O., & Zabolotna, N. I. (2012). Mueller-matrix diagnostics of optical properties of polycrystalline networks of human blood plasma. *Optics and Spectroscopy, 112*(6), 884-892.

39. Ushenko, Y. A., Dubolazov, A. V., Balanetskaya, V. O., Karachevtsev, A. O., & Ushenko, V. A. (2012). Wavelet-analysis of polarization maps of human blood plasma. *Optics and Spectroscopy*, 113(3), 332-343.
40. Ushenko, V. O. (2013). Spatial-frequency polarization phasometry of biological polycrystalline networks. *Optical Memory and Neural Networks*, 22(1), 56-64.
41. Ungurian, V. P., Ivashchuk, O. I., & Ushenko, V. O. (2011, November). Statistical analysis of polarizing maps of blood plasma laser images for the diagnostics of malignant formations. In *Tenth International Conference on Correlation Optics* (Vol. 8338, p. 83381L). International Society for Optics and Photonics.
42. Ushenko, V. A., Dubolazov, O. V., & Karachevtsev, A. O. (2014). Two wavelength Mueller matrix reconstruction of blood plasma films polycrystalline structure in diagnostics of breast cancer. *Applied optics*, 53(10), B128-B139.
43. Prysyzhnyuk, V. P., Ushenko, Y. A., Dubolazov, A. V., Ushenko, A. G., & Ushenko, V. A. (2016). Polarization-dependent laser autofluorescence of the polycrystalline networks of blood plasma films in the task of liver pathology differentiation. *Applied optics*, 55(12), B126-B132.
44. Goodman, J. W. (1975). Statistical properties of laser speckle patterns. In *Laser speckle and related phenomena* (pp. 9-75). Springer, Berlin, Heidelberg.
45. Robinson, S. P. (Ed.). (1996). Principles of forensic medicine. Cambridge University Press. P.188.

Оригінальна стаття

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2019-41-04>

УДК 535.361:535.555+577.3.0

## МЕТОДИ І ЗАСОБИ АЗИМУТАЛЬНО-ІНВАРІАНТНОЇ МЮЛЛЕР-МАТРИЧНОЇ ПОЛЯРИМЕТРІЇ ОПТИЧНО-АНІЗОТРОПНИХ БІОЛОГІЧНИХ ШАРІВ

О.В. Олар, В.О. Ушенко, М.Ю. Сахновський, Ю.О. Ушенко, О.В. Дуболазов,  
О.Г. Ушенко, А.В. Мотрич

*Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,  
вул. Коцюбинського, 2, Чернівці, 58002, Україна  
e-mail: a.dubolazov@chnu.edu.ua*

Надійшла до редакції 16 квітня 2018 р.

Прийнята 26 жовтня 2018 р.

**Актуальність.** Серед багаточисельних методів поляриметричного дослідження структури біологічних тканин особливе місце займає Мюллер-матрична поляриметрія (ММП). Даний метод дає виключно повну інформацію про поляризаційні прояви оптичних властивостей полікристалічної структури біологічних тканин різноманітних органів людини. Новим кроком у розвитку даної методики стало координатне картографування розподілів величини матричних елементів – Мюллер-матричних зображень (ММЗ). Проте, практичне застосування Мюллер-матричного методу у рутинній лабораторній практиці обмежено. Величина 12 із 16 елементів матриці Мюллера є залежною від повороту зразку відносно напрямку опромінення. Тому актуальним є подальший розвиток та узагальнення методик ММП з використанням координатних розподілів набору Мюллер-матричних інваріантів (ММІ) – азимутально незалежних елементів матриці Мюллера, їхніх комбінацій, матричних векторів та кутів між ними.

**Мета роботи.** Робота спрямована на теоретичне обґрунтування та експериментальну розробку методу азимутально-інваріантної поляриметрії частково-деполяризуючих оптично-анізотропних біологічних шарів на основі координатного Мюллер-матричного картографування гістологічних зрізів для диференціальної діагностики змін оптичної анізотропії, які пов'язані з виникненням патологічних станів.

**Результати.** Запропоновано та обґрунтовано метод азимутально-інваріантного Мюллер-матричного картографування на прикладі оптично анізотропних зразків гістологічних зрізів міокарда. Одержано розподіли величини азимутально-інваріантного матричного елементу, суперпозиції матричних елементів та величини матричного вектору.

**Висновки.** Визначено залежності величин статистичних моментів 1-го – 4-го порядків, які характеризують розподіли величин Мюллер-матричних інваріантів (ММІ) гістологічних зрізів міокарда. Проведено з позицій доказової медицини дослідження можливостей диференціації причини настання смерті внаслідок ішемічної хвороби серця (ІХС) та гострої коронарної недостатності (ГКН).

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** поляризація; інтерференція; поляриметрія; матриця Мюллера; біологічні тканини.

## METHODS AND MEANS OF ASYMUTAL-INVARIANT MULLER MATRIX POLYARIMETRY OF OPTICAL AND ANISOTROPIC BIOLOGICAL LAYERS

O.V. Olar, V.O. Ushenko, M.Yu. Sakhnovsky, Yu.O. Ushenko, O.V. Dubolazov,  
O.G. Ushenko, A.V. Motrich

*Yuri Fedkovich Chernivtsi National University, 2, Kotsyubinskogo st., Chernivtsi, 58002, Ukraine*

**Background:** Among the many methods of biological tissues structure polarimetric research, Muller-matrix polarimetry (MMP) has a special place. This method provides exclusively complete information about polarization manifestations of biological tissues of polycrystalline structure of various human organs optical properties. A new step in development of this technique was the coordinate mapping of the magnitude of the matrix elements distribution – Muller-Matrix images (MMI). However, the practical application of the Müller-matrix method is limited in routine laboratory practice. The size of 12 of 16 Müller matrix elements is dependent on the rotation of the sample relative to the direction of irradiation.

© Олар О.В., Ушенко В.О., Сахновський М.Ю., Ушенко Ю.О., Дуболазов О.В.,  
Ушенко О.Г., Мотрич А.В., 2019

Therefore, further development and generalization of the MMP techniques using the coordinate distributions of the Muller-matrix invariant (MMI) set – azimuthally independent elements of the Müller matrix, their combinations, matrix vectors, and the angles between them.

**Objectives:** The work is aimed at the theoretical substantiation and experimental development of the azimuthally invariant polarimetry method of partially depolarizing optical anisotropic biological layers on the basis of coordinate Muller-matrix mapping of histological sections for differential diagnostics of changes in optical anisotropy, which are associated with the emergence of pathological states.

**Results:** The method of azimuthally invariant Muller-matrix mapping of optically anisotropic samples of the myocardium is proposed and grounded. The values of azimuthally invariant matrix element, superposition of matrix elements and the magnitude of the matrix vector distributions are obtained.

**Conclusion:** The magnitude of the 1st-4th order statistical moments' dependences, which characterize the distribution of the Muller-matrix invariant (MMI) of the histological sections of the myocardium are determined. The study of the possibility of differentiating causes of death due to ischemic heart disease (IHD) and acute coronary insufficiency (ACI) conducted from the standpoint of evidence-based medicine.

**KEY WORDS:** polarization, interference, polarimetry; Müller's matrix, biological tissues.

#### МЕТОДЫ И СРЕДСТВА АЗИМУТАЛЬНО-ИНВАРИАНТНОЙ МЮЛЛЕР-МАТРИЧНОЙ ПОЛЯРИМЕТРИИ ОПТИЧЕСКИ-АНИЗОТРОПНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СЛОЕВ

О.В. Олар, В.О. Ушенко, М.Ю. Сахновский, Ю.О. Ушенко, О.В. Дуболазов,

О.Г. Ушенко, А.В. Мотрич

*Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича,  
ул. Коцюбинского, 2, Черновцы, 58002, Украина*

**Актуальность.** Среди многочисленных методов поляриметрического исследования структуры биологических тканей особое место занимает Мюллер-матричная поляриметрия (ММП). Данный метод дает исключительно полную информацию о поляризационных проявлениях оптических свойств поликристаллической структуры биологических тканей различных органов человека. Новым шагом в развитии данной методики стало координатное картографирование распределений величины матричных элементов – Мюллер-матричных изображений (ММИ). Однако, практическое применение Мюллер-матричного метода в рутинной лабораторной практике ограничено. Размер 12 из 16 элементов матрицы Мюллера является зависимым от поворота образца относительно направления облучения. Поэтому актуальным является дальнейшее развитие и обобщение методик ММП с использованием координатных распределений набора Мюллер-матричных инвариантов (ММИ) – азимутально независимых элементов матрицы Мюллера, их комбинаций, матричных векторов и углов между ними.

**Цель работы.** Работа направлена на теоретическое обоснование и экспериментальную разработку метода азимутально-инвариантной поляриметрии частично-деполяризующих оптически анизотропных биологических слоев на основе координатного Мюллер-матричного картографирования гистологических срезов для дифференциальной диагностики изменений оптической анизотропии, связанные с возникновением патологических состояний.

**Результаты.** Предложен и обоснован метод азимутально-инвариантного Мюллер-матричного картографирования на примере оптически анизотропных образцов гистологических срезов миокарда. Получены распределения величины азимутально-инвариантного матричного элемента, суперпозиции матричных элементов и величины матричного вектора.

**Выводы:** Определены зависимости величины статистических моментов 1-го – 4-го порядков, характеризующих распределения величины Мюллер-матричных инвариантов (ММИ) гистологических срезов миокарда. Проведено с позиций доказательной медицины исследование возможности дифференциации причины наступления смерти в результате ишемической болезни сердца (ИБС) и острой коронарной недостаточности (ОКН).

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** поляризация; интерференция; поляриметрия; матрица Мюллера; биологические ткани.

Серед багаточисельних напрямків оптичної діагностики біологічних тканин [1-3] важливе місце займає Мюллер-матрична поляриметрия (ММП) [4-6]. Даний метод дає виключно повну інформацію про поляризаційні прояви оптичних властивостей біологічних тканин. Традиційно методи і засоби ММП розвивалися у межах двох граничних наближень. Перше – пошук взаємозв'язків між кутівими (індикатрисами) і



координатними (Мюллер-матричні зображення – ММЗ) розподілами елементів матриці Мюллера та структурою оптично-товстих, деполаризуючих біологічних тканин [7]. Друге – ММП оптично-тонких, недеполаризуючих біологічних шарів [8-10] з наступним відтворенням розподілів параметрів фазової та амплітудної анізотропії [11-20]. Разом з тим, більшість (12 з 16) елементів матриці Мюллера є азимутально-залежними. Тому актуальним є подальший розвиток та узагальнення методик ММП з використанням набору Мюллер-матричних інваріантів (ММІ).

Робота спрямована на розробку метода азимутально-інваріантної поляриметрії частково-деполаризуючих оптично-анізотропних біологічних шарів. Даний метод базується на визначенні та діагностичному використанні набору фізичних взаємозв'язків між розподілами азимутально-інваріантних поляризаційних параметрів, які характеризують оптичну анізотропію частково-деполаризуючих шарів біологічних тканин, і розподілами параметрів лінійного та циркулярного двоприменезаломлення таких об'єктів.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

### *Мюллер-матричні інваріанти*

Сукупність ММІ, які характеризують оптичну анізотропію біологічних шарів, має наступні аналітичні вирази:

– елементи матриці Мюллера

$$f_{11}, f_{14}, f_{41}, f_{44}; \quad (1)$$

– суперпозиції елементів матриці Мюллера

$$\Phi_{22+33} = (f_{22} + f_{33}), \quad (2)$$

$$\Phi_{23-32} = (f_{23} - f_{32}); \quad (3)$$

– довжини математичних векторів

$$\begin{cases} V_{12+13} = \sqrt{f_{12}^2 + f_{13}^2}, \\ V_{21+31} = \sqrt{f_{21}^2 + f_{31}^2}, \\ V_{42+43} = \sqrt{f_{42}^2 + f_{43}^2}, \\ V_{24+34} = \sqrt{f_{24}^2 + f_{34}^2}; \end{cases} \quad (4)$$

– кути

$$\cos(V_{42+43}, V_{24+34}) = \frac{\sqrt{(f_{42}^2 + f_{43}^2)}}{\sqrt{(f_{24}^2 + f_{34}^2)}}, \quad (5)$$

$$\begin{cases} \{V_{12;13}\} = \frac{1}{\sqrt{f_{12}^2 + f_{13}^2}} \begin{pmatrix} f_{12}^2 - f_{13}^2 \\ 2f_{12}f_{13} \end{pmatrix}, \\ \{V_{21;31}\} = \frac{1}{\sqrt{f_{21}^2 + f_{31}^2}} \begin{pmatrix} f_{21}^2 - f_{31}^2 \\ 2f_{21}f_{31} \end{pmatrix}, \\ \{V_{42;43}\} = \frac{1}{\sqrt{f_{42}^2 + f_{43}^2}} \begin{pmatrix} f_{42}^2 - f_{43}^2 \\ 2f_{42}f_{43} \end{pmatrix}, \\ \{V_{24;34}\} = \frac{1}{\sqrt{f_{24}^2 + f_{34}^2}} \begin{pmatrix} f_{24}^2 - f_{34}^2 \\ 2f_{24}f_{34} \end{pmatrix}, \end{cases} \quad (6)$$

$$V_{22;33;23;32} = \sqrt{(f_{22} - f_{33})^2 + (f_{23} - f_{32})^2}. \quad (7)$$

Таким чином, шляхом використання набору ММІ (співвідношення (1) – (7)) можна розширити можливості Мюллер-матричного картографування на статистичні або скрінінгові лабораторні дослідження зразків біологічних шарів (гістологічні зрізи та полікристалічні плівки) органів людини у різноманітних завданнях біомедичної діагностики.

### **Оптична схема Мюллер-матричної поляриметрії**

На рис. 1 представлена оптична схема системи зображувальної Мюллер-матричної поляриметрії фазово-неоднорідних біологічних об'єктів. Дана система містить наступні функціональні блоки:

– блок лазерного зондування, що складається з He-Ne ( $\lambda = 0,63\mu m$ ) лазера 1 та коліматора 2, який формує слабо інтенсивний ( $W=5,0$  мВт) паралельний опромінюючий пучок діаметром 5 мм;

– блок формування стану поляризації зондуючого лазерного випромінювання, який складається з лінійних поляризаторів 5, 7 (B+W Kaesemann XS-Pro Polarizer MRC Nano) і чвертьхвильової пластинки 6 (Achromatic True Zero-Order Waveplate) та забезпечує формування трьох типів лінійної поляризації ( $\alpha_0 = 0^0; 90^0; 45^0$ ), а також право циркулярно ( $\otimes$ ) поляризованого лазерного випромінювання;

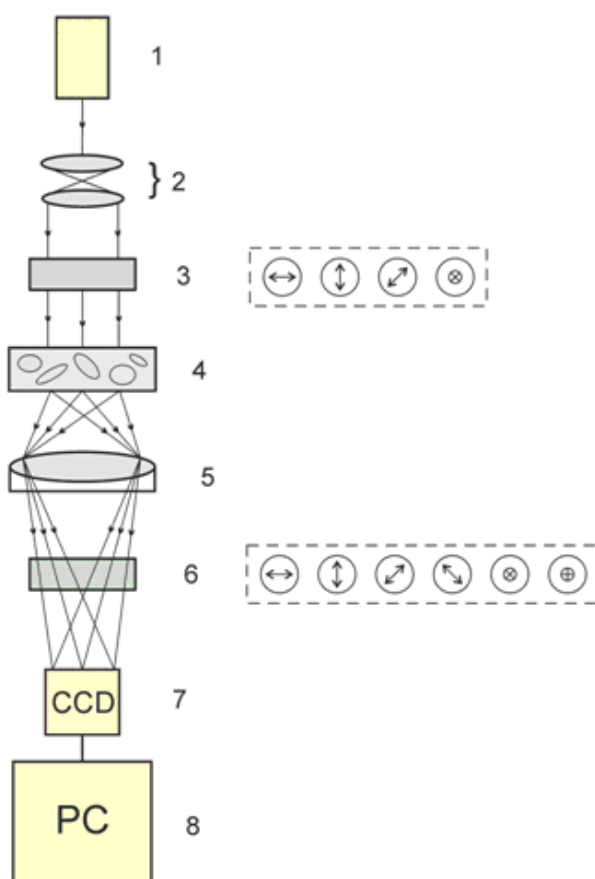


Рис. 1. Оптична схема системи поляризаційної Мюллер-матричної поляриметрії біологічних шарів.  
Пояснення у тексті.

– об'єктний блок, який забезпечує кріплення, юстування та обертання зразку біологічного препарату 8;

– проєкційний блок, який за допомогою поляризаційного мікрооб’єктиву 9 (Nikon CFI Achromat P, фокусна відстань – 30мм, числова апертура – 0,1, збільшення – 4x) забезпечує формування мікроскопічного зображення біологічного препарату 8 в площині цифрової камери 12 (The Imaging Source DMK 41AU02.AS, monochrome 1/2" CCD, Sony ICX205AL (progressive scan); роздільна здатність – 1280x960; розмір світлочутливої площадки – 7600x6200мкм; чутливість – 0,05 lx; динамічний діапазон – 8 bit, SNR – 9 bit);

– блок поляризаційного аналізу містить чвертьхвильву пластинку 10 (Achromatic True Zero-Order Waveplate) і поляризатор 11 (B+W Kaesemann XS-Pro Polarizer MRC Nano) і забезпечує поляризаційний аналіз мікроскопічного зображення біологічного шару 8 за наступним алгоритмом  $\Omega=0^\circ; 90^\circ; 45^\circ; 135^\circ; \otimes; \oplus$ ;

– блок цифрової реєстрації поляризаційно-відфільтрованих мікроскопічних зображень – цифрова CCD камера 12;

– блок обробки даних на базі PC 13 забезпечує обчислення координатних розподілів елементів матриці Мюллера  $f_{ik}(x, y)$  і Мюллер-матричних інваріантів (ММІ – співвідношення (1) – (7)) частково деполаризуючих біологічних шарів.

Методика обчислення у межах кожного пікселя світлочутливої площадки цифрової камери 10 (рис. 1) сукупності елементів матриці Мюллера  $f_{ik}$  зразка частково деполаризуючого біологічного шару базується на традиційних для стокс-поляриметрії алгоритмах, які являють собою суперпозиції величини інтенсивності ортогонально-поляризованих складових амплітуди лазерного випромінювання для різних станів поляризації зондуемого пучка

$$\begin{aligned}
 f_{11} &= 0.5(S_1^0 + S_1^{90}); & f_{21} &= 0.5(S_2^0 + S_2^{90}); \\
 f_{12} &= 0.5(S_1^0 - S_1^{90}); & f_{22} &= 0.5(S_2^0 - S_2^{90}); \\
 f_{13} &= S_1^{45} - f_{11}; & f_{23} &= S_2^{45} - f_{21}; \\
 f_{14} &= S_1^{\otimes} - f_{11}; & f_{24} &= S_2^{\otimes} - f_{21}; \\
 f_{31} &= 0.5(S_3^0 + S_3^{90}); & f_{41} &= 0.5(S_4^0 + S_4^{90}); \\
 f_{32} &= 0.5(S_3^0 - S_3^{90}); & f_{42} &= 0.5(S_4^0 - S_4^{90}); \\
 f_{33} &= S_3^{45} - f_{31}; & f_{43} &= S_4^{45} - f_{41}; \\
 f_{34} &= S_3^{\otimes} - f_{31}; & f_{44} &= S_4^{\otimes} - f_{41}.
 \end{aligned} \tag{8}$$

Тут  $S_{i=2;3;4}^{0;45;90;\otimes}$  – сукупність параметрів вектора Стокса в точках цифрового мікроскопічного зображення зразку частково деполаризуючого біологічного шару, що експериментально визначені для серії лінійно ( $0^\circ; 45^\circ; 90^\circ$ ) та правоциркулярно ( $\otimes$ ) поляризованого зондуемых лазерних пучків за наступними класичними співвідношеннями

$$\begin{aligned}
 S_{i=1}^{0;45;90;\otimes} &= I_0^{0;45;90;\otimes} + I_{90}^{0;45;90;\otimes}; \\
 S_{i=2}^{0;45;90;\otimes} &= I_0^{0;45;90;\otimes} - I_{90}^{0;45;90;\otimes}; \\
 S_{i=3}^{0;45;90;\otimes} &= I_{45}^{0;45;90;\otimes} - I_{135}^{0;45;90;\otimes}; \\
 S_{i=4}^{0;45;90;\otimes} &= I_{\otimes}^{0;45;90;\otimes} + I_{\oplus}^{0;45;90;\otimes}.
 \end{aligned} \tag{9}$$

Тут  $I_{0;45;90;135;\otimes;\oplus}$  – поляризаційно-відфільтровані інтенсивності лазерного випромінювання, перетвореного біологічним об’єктом. Операція фільтрація відповідає наступним експериментальним діям – проходженню об’єктного пучка крізь лінійний

поляризатор 9 з кутами обертання осі пропускання  $\Theta$ :  $0^\circ$ ;  $45^\circ$ ;  $90^\circ$ ;  $135^\circ$ ;  $45^\circ$ ;  $90^\circ$ , а також крізь систему фазової фільтрації “чвертьхвильова пластинка – поляризатор”, що виокремлює право- ( $\otimes$ ) та ліво- ( $\oplus$ ) циркулярно поляризовані складові об’єктного лазерного випромінювання.

Для експериментальної апробації можливостей діагностики змін оптичної анізотропії частково-деполяризуючих шарів біологічних тканин методом азимутально-інваріантного Мюллер-матричного картографування шляхом визначення координатних розподілів сукупності ММІ  $f_{44}$ ;  $\Phi_{22+33} = (f_{22} + f_{33})$  і  $f_{41}; \{V_{12+13}\} = \sqrt{f_{12}^2 + f_{13}^2}$  було сформовано дві групи зразків міокарда:

- померлі внаслідок ішемічної хвороби серця (ІХС) – група 1 (34 зразки);
- померлі внаслідок гострої коронарної недостатності (ГКН) – група 2 (34 зразки).

### **Методика виготовлення зразків**

Вибір техніки виготовлення гістологічних зрізів у наших поляриметричних дослідженнях оптичної анізотропії біологічних тканин пов’язаний з наступними обставинами.

Стандартне дослідження будови біологічної тканини в діагностичних цілях проводиться на зрізах, отриманих з біопсії матеріалу, зафіксованого розчином формаліну, зневодненого і залитого в парафін або інші синтетичні середовища (наприклад, парапласт, гістопласт і ін.) – санні та роторні мікротомі. Процес обробки тканини, що завершується виготовленням зрізів з парафінових блоків, тривалий і займає більше 42 годин [12].

Для поляриметричних досліджень оптичної анізотропії біологічних тканин такі зразки є непридатними. Це обумовлено тим, що фіксуючі матеріали володіють власною анізотропією, що спотворює поляризаційні прояви двоприменезаломлення і дихроїзму досліджуваних зразків біологічних тканин.

Окрім цього, у патологоанатомічній практиці разом з плановими проводяться термінові гістологічні дослідження – інтраопераційні біопсії. Час, що витрачається на отримання висновку в цих випадках, має становити не більше 20 хв. Парафінові зрізи не задовольняють даній вимозі.

Для швидкого отримання гістологічного препарату в біопсійній діагностиці застосовують швидке заморожування тканини з подальшим виготовленням зрізів за допомогою кріостату або заморожувальної приставки до мікротому. Така технологія, окрім експресності, забезпечує можливість прямого дослідження фазової та амплітудної анізотропії і тому знайшла застосування у всіх провідних світових лабораторіях поляриметричної діагностики структури біологічних тканин [1, 4-6].

Головним недоліком методу заморожувальної кріотомомії був вплив кристалізації води. Проте, отримання якісного замороженого зрізу можливе за рахунок швидкого заморожування тканини, при якому вода не кристалізується, а переходить в стан аморфного льоду [13].

Рішення зазначеної проблеми знайдено в заморожуванні зразка біоптату у n-гексані [14]. В результаті отримуються зрізи високої якості, що дозволяє проводити не тільки поляриметричні, але світлові мікроскопічні дослідження загального малюнку біологічних тканин, а також деталей їх клітинної будови.

Гістологічні зрізи біопсії міокарда виготовлялися на заморожувальному мікротомі за стандартною методикою і мали геометричну товщину  $\sim 30 \mu m$ . Діапазон зміни показника оптичної товщини складав  $\tau = 0,21 \div 0,24$ . Ступень деполяризації лежав у межах  $\Lambda = 18\% \div 24\%$ .

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

На серії рисунків (рис. 2 – рис. 5) представлені мапи ((1), (3)) і гістограми ((2), (4)) розподілів величини  $f_{44}$  (рис. 2);  $\Phi_{22+33} = f_{22} + f_{33}$  (рис. 3),  $\{V_{12+13}\} = \sqrt{f_{12}^2 + f_{13}^2}$  (рис. 4) і  $f_{41}$  (рис. 5), які характеризують прояви фазової ( $f_{44}$ ,  $\Phi_{22+33} = f_{22} + f_{33}$ ) та амплітудної  $\{V_{12+13}\} = \sqrt{f_{12}^2 + f_{13}^2}$ ,  $f_{41}$  анізотропії гістологічних зрізів міокарда групи 1 і групи 2.

В таблицях 1-4 наведені середні  $\bar{Z}_i$  величини  $Z_i$ , які характеризують розподіли ММІ, та похибки ( $\pm \sigma$ ) їх визначення.

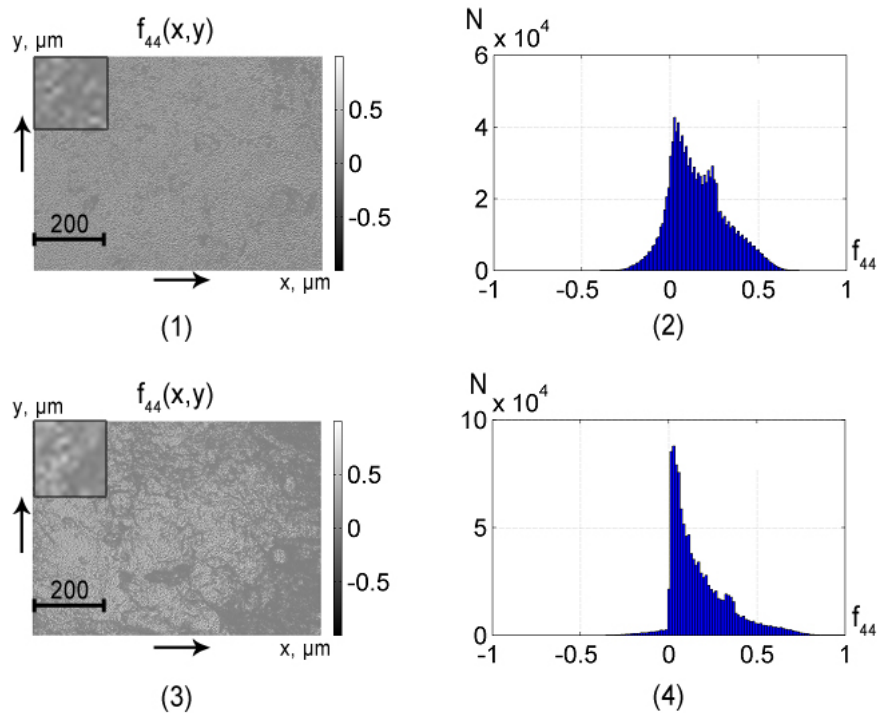


Рис. 2. Мапи (фрагменти (1),(3)) та гістограми розподілу (фрагменти (2),(4)) величини ММІ  $f_{44}$  частково деполяризуючих гістологічних зрізів міокарда групи 1 (фрагменти (1),(2)) і групи 2 (фрагменти (3),(4)).

Таблиця 1. Статистичні моменти 1-го – 4-го порядків, які характеризують розподіли величини  $f_{44}$  гістологічних зрізів міокарда, та збалансована точність методу

$Z_i$	ІХС ( $n = 34$ )	ГКН ( $n = 34$ )	$A_c, \%$
$Z_1$	$0,230 \pm 0,011$	$0,140 \pm 0,008$	76
$Z_2$	$0,180 \pm 0,009$	$0,110 \pm 0,006$	69
$Z_3$	$0,320 \pm 0,018$	$0,530 \pm 0,028$	93
$Z_4$	$0,380 \pm 0,021$	$0,62 \pm 0,04$	95

Таблиця 2. Статистичні моменти 1-го – 4-го порядків, які характеризують розподіли величини ММІ  $\Phi_{22+33} = f_{22} + f_{33}$  гістологічних зрізів міокарда, та збалансована точність методу

$Z_i$	ІХС ( $n = 34$ )	ГКН ( $n = 34$ )	$A_c, \%$
$Z_1$	$0,180 \pm 0,011$	$0,110 \pm 0,007$	74
$Z_2$	$0,170 \pm 0,011$	$0,120 \pm 0,008$	66
$Z_3$	$0,440 \pm 0,026$	$0,57 \pm 0,03$	70
$Z_4$	$0,59 \pm 0,03$	$0,71 \pm 0,04$	72

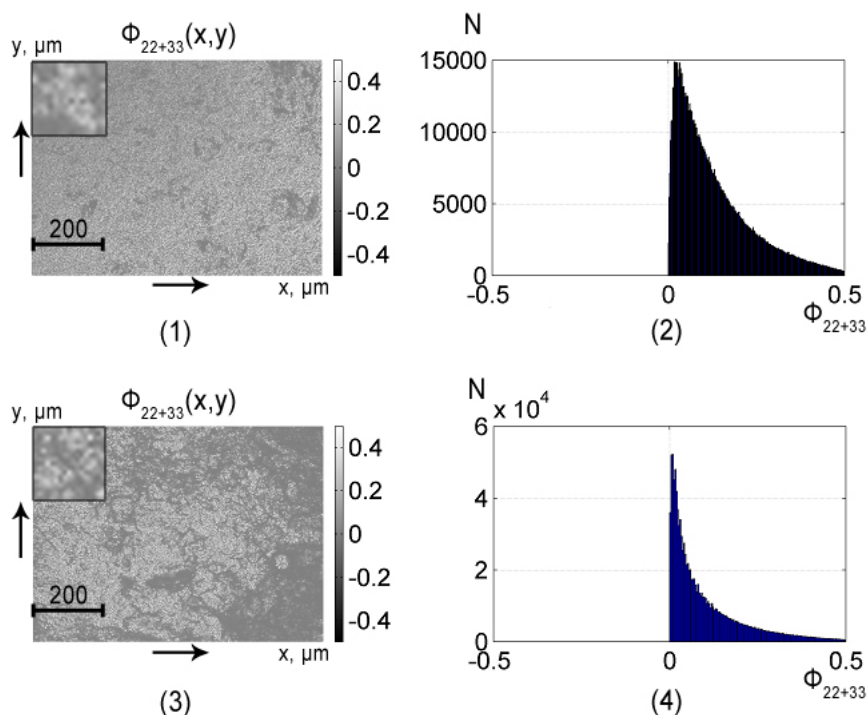


Рис. 3. Мапи (фрагменти (1),(3)) та гістограми розподілу (фрагменти (2),(4)) величини  $\Phi_{22+33} = f_{22} + f_{33}$  частково деполаризуючих гістологічних зрізів міокарда групи 1 (фрагменти (1),(2)) і групи 2 (фрагменти (3),(4)).

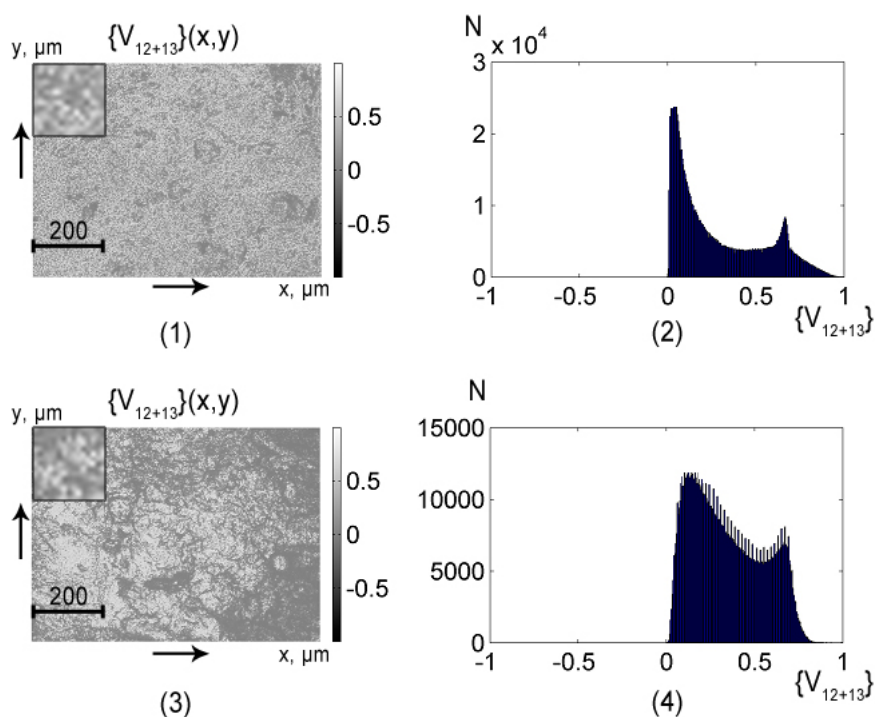


Рис. 4. Мапи (фрагменти (1),(3)) та гістограми розподілу (фрагменти (2),(4)) величини ММІ  $\{V_{12+13}\} = \sqrt{f_{12}^2 + f_{13}^2}$  частково деполаризуючих гістологічних зрізів міокарда групи 1 (фрагменти (1),(2)) і групи 2 (фрагменти (3),(4)).

Таблиця 3. Статистичні моменти 1-го – 4-го порядків, які характеризують розподіли величини ММІ  $\{V_{12+13}\} = \sqrt{f_{12}^2 + f_{13}^2}$  гістологічних зрізів міокарда, та збалансована точність методу

$Z_i$	ІХС ( $n = 34$ )	ГКН ( $n = 34$ )	$A_c, \%$
$Z_1$	$0,290 \pm 0,016$	$0,410 \pm 0,024$	76
$Z_2$	$0,210 \pm 0,013$	$0,360 \pm 0,018$	70
$Z_3$	$0,87 \pm 0,05$	$0,430 \pm 0,028$	92
$Z_4$	$0,92 \pm 0,05$	$0,51 \pm 0,03$	90

Порівняльний аналіз результатів, які одержані методом азимутально-інваріантного Мюллер-матричного картографування частково-деполяризуючих гістологічних зрізів міокарда з групи 1 (ІХС) та групи 2 (ГКН), виявив найбільші відмінності між розподілами величини ММІ лінійного двопронезаломлення  $f_{44}$  (рис. 2) та дихроїзму  $\{V_{12+13}\} = \sqrt{f_{12}^2 + f_{13}^2}$  (рис. 4). Зокрема, максимальні відмінності мають місце для значень статистичних моментів 3-го і 4-го порядків, які характеризують асиметрію ( $Z_3$ ) та ексцес ( $Z_4$ ) розподілів  $f_{44}(x, y)$  (1,65 рази – таблиця 1) і  $\{V_{12+13}\}(x, y)$  (до 2-х разів – таблиця 3). Це забезпечує високий (відмінний  $> 90\%$ ) рівень збалансованої точності [24] диференціації змін оптичної анізотропії міокарда, що обумовлені патологічними змінами його фібрилярної структури.

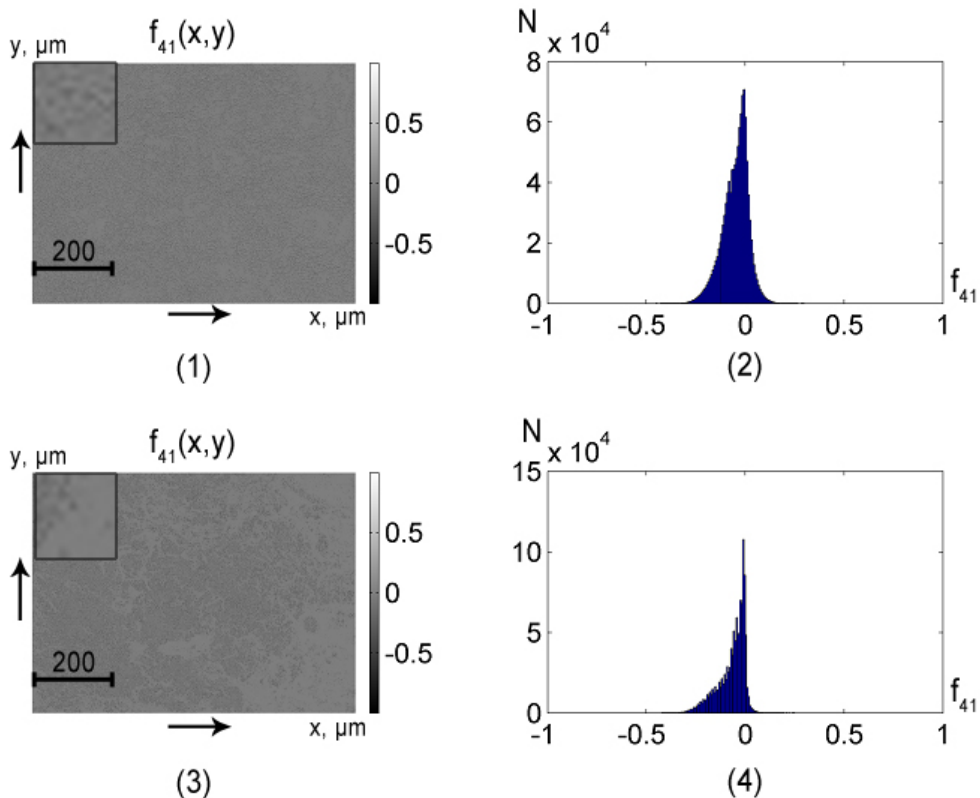


Рис. 5. Мапи (фрагменти (1),(3)) та гістограми розподілу (фрагменти (2),(4)) величини ММІ  $f_{41}$  частково деполаризуючих гістологічних зрізів міокарда групи 1 (фрагменти (1),(2)) і групи 2 (фрагменти (3),(4)).



Таблиця 4. Статистичні моменти 1-го – 4-го порядків, які характеризують розподіли величини MMI  $f_{41}$  гістологічних зрізів міокарда, та збалансована точність методу

$Z_i$	IXС ( $n = 34$ )	ГКН ( $n = 34$ )	$A_c, \%$
$Z_1$	$0,09 \pm 0,006$	$0,06 \pm 0,004$	72
$Z_2$	$0,08 \pm 0,005$	$0,07 \pm 0,005$	62
$Z_3$	$0,64 \pm 0,038$	$0,78 \pm 0,043$	68
$Z_4$	$1,03 \pm 0,058$	$1,27 \pm 0,075$	64

Отже, нами вперше реалізовано нове поліпшення широко відомих методів Мюллер-матричної поляриметрії біологічних тканин, які узагальнені в авторитетних оглядах [1, 4, 5], на випадок азимутально-інваріантного матричного картографування [11] реальних частково деполаризуючих біологічних шарів шляхом визначення набору Мюллер-матричних інваріантів лінійного та циркулярного двопронезаломлення. На цій основі, вперше у світовій практиці поляриметрії біологічних тканин [8-10, 15-23] реалізовано диференціацію некротичних змін полікристалічної структури деполаризуючих зразків міокарда.

### ВИСНОВКИ

Завдяки вперше застосованому статистичному аналізу координатних розподілів Мюллер-матричних інваріантів біологічних шарів встановлено величини та діапазони зміни величини середнього, дисперсії, асиметрії та ексцесу, що характеризують розподіли  $f_{44}$ ;  $\Phi_{22+33} = (f_{22} + f_{33})$  і  $f_{41}$ ;  $\{V_{12+13}\} = \sqrt{f_{12}^2 + f_{13}^2}$  для частково деполаризуючих зразків міокарда ( $\tau = 0,21 - 0,27$ ;  $\Lambda = 29\% - 36\%$ ) з різним ступенем некротичних змін.

Встановлено нові (відсутні на даний час для частково деполаризуючих шарів) критерії диференціації відмінною ( $> 90\%$ ) збалансованою точністю некротичних змін полікристалічної структури міокарда - максимальні відмінності мають місце для значень статистичних моментів 3-го і 4-го порядків, які характеризують асиметрію ( $Z_3$ ) та ексцес ( $Z_4$ ) розподілів  $f_{44}(x, y)$  (1,65 рази) і  $\{V_{12+13}\}(x, y)$  (до 2-х разів).

### КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ


Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

### ПОДЯКА

Дана стаття виконана в рамках науково-дослідної роботи, що фінансується за рахунок коштів державного бюджету Міністерством освіти і науки України (номер бюджетної теми: №0116U001446).

### Authors' ORCID ID

O. V. Olar  <http://orcid.org/0000-0003-1051-2811>

O. V. Dubolazov  <https://orcid.org/0000-0003-1051-2811>

Yu. A. Ushenko  <http://orcid.org/0000-0003-1767-1882>

### REFERENCES

1. Tuchin, V. V., & Tuchin, V. (2007). Tissue optics: light scattering methods and instruments for medical diagnosis.

2. Wang, X., Yao, G., & Wang, L. V. (2002). Monte Carlo model and single-scattering approximation of the propagation of polarized light in turbid media containing glucose. *Applied optics*, 41(4), 792-801.
3. Wang, X., & Wang, L. V. (2002). Propagation of polarized light in birefringent turbid media: a Monte Carlo study. *Journal of Biomedical Optics*, 7(3), 279-291.
4. Ghosh, N., & Vitkin, A. I. (2011). Tissue polarimetry: concepts, challenges, applications, and outlook. *Journal of biomedical optics*, 16(11), 110801.
5. Ghosh, N., Wood, M., & Vitkin, A. (2010). Polarized Light Assessment of Complex Turbid Media Such as Biological Tissues Us-ing Mueller Matrix Decomposition. In *Handbook of photonics for biomedical science* (pp. 253–282). CRC Press.
6. Tynes, H. H., Kattawar, G. W., Zege, E. P., Katsev, I. L., Prikhach, A. S., & Chaikovskaya, L. I. (2001). Monte Carlo and multicomponent approximation methods for vector radiative transfer by use of effective Mueller matrix calculations. *Applied Optics*, 40(3), 400-412.
7. Khlebtsov, N. G., Maksimova, I. L., Meglinski, I., Wang, L. V., & Tuchin, V. V. (2016). Introduction to light scattering by biological objects.
8. Ushenko, A. G., & Pishak, V. P. (2004). Laser polarimetry of biological tissue: principles and applications. *Handbook of Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science*, 1, 93-138.
9. Angelsky, O. V., Ushenko, A. G., Ushenko, Y. A., Pishak, V. P., & Peresunko, A. P. (2010). Statistical, correlation, and topological approaches in diagnostics of the structure and physiological state of birefringent biological tissues. In *Handbook of Photonics for Biomedical Science* (pp. 283-322). CRC Press.
10. Ushenko, Y. A., Boychuk, T. M., Bachynsky, V. T., & Mincer, O. P. (2013). Diagnostics of structure and physiological state of birefringent biological tissues: statistical, correlation and topological approaches. *Handbook of Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring, and Materials Science*.
11. Ushenko, V. A., & Gavrylyak, M. S. (2013, September). Azimuthally invariant Mueller-matrix mapping of biological tissue in differential diagnosis of mechanisms protein molecules networks an sotropy. In *Biosensing and Nanomedicine VI* (Vol. 8812, p. 88120Y). International Society for Optics and Photonics. стр. 6-9.
12. Криволапов, Ю. А., & Леенман, Е. Е. (2006). *Морфологическая диагностика лимфом*. КОСТА. ст.6-9
13. Зинкин, А. Н., Зингилевская, Н. Г., & Мусельян, Б. Б. (1997). Кривовоздействие в оториноларингологии. *Методические рекомендации*.
14. Davis, D. A., Pellowski, D. M., & William Hanke, C. (2004). Preparation of frozen sections. *Dermatologic surgery*, 30(12p1), 1479-1485.
15. Ushenko, V. A., & Gorsky, M. P. (2013). Complex degree of mutual anisotropy of linear birefringence and optical activity of biological tissues in diagnostics of prostate cancer. *Optics and Spectroscopy*, 115(2), 290-297.
16. Ushenko, V. A., & Dubolazov, A. V. (2013, September). Correlation and self similarity structure of polycrystalline network biological layers Mueller matrices images. In *Applications of Digital Image Processing XXXVI* (Vol. 8856, p. 88562D). International Society for Optics and Photonics.
17. Ushenko, Y. A., Ushenko, V. A., Dubolazov, A. V., Balanetskaya, V. O., & Zabolotna, N. I. (2012). Mueller-matrix diagnostics of optical properties of polycrystalline networks of human blood plasma. *Optics and Spectroscopy*, 112(6), 884-892.
18. Ushenko, Y. A., Dubolazov, A. V., Balanetskaya, V. O., Karachevtsev, A. O., & Ushenko, V. A. (2012). Wavelet-analysis of polarization maps of human blood plasma. *Optics and Spectroscopy*, 113(3), 332-343.
19. Ushenko, V. O. (2013). Spatial-frequency polarization phasometry of biological polycrystalline networks. *Optical Memory and Neural Networks*, 22(1), 56-64.
20. Ushenko, V. A., Pavlyukovich, N. D., & Trifonyuk, L. (2013). Spatial-frequency azimuthally stable cartography of biological polycrystalline networks. *International Journal of Optics*, 2013, 683174. doi: 10.1155/2013/683174.
21. Ungurian, V. P., Ivashchuk, O. I., & Ushenko, V. O. (2011, November). Statistical analysis of polarizing maps of blood plasma laser images for the diagnostics of malignant formations. In *Tenth International Conference on Correlation Optics* (Vol. 8338, p. 83381L). International Society for Optics and Photonics.
22. Ushenko, V. A., Dubolazov, O. V., & Karachevtsev, A. O. (2014). Two wavelength Mueller matrix reconstruction of blood plasma films polycrystalline structure in diagnostics of breast cancer. *Applied optics*, 53(10), B128-B139.
23. Prysyazhnyuk, V. P., Ushenko, Y. A., Dubolazov, A. V., Ushenko, A. G., & Ushenko, V. A. (2016). Polarization-dependent laser autofluorescence of the polycrystalline networks of blood plasma films in the task of liver pathology differentiation. *Applied optics*, 55(12), B126-B132.
24. Robinson, S. P. (Ed.). (1996). *Principles of forensic medicine*. Cambridge University Press.

Оригінальна стаття

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2019-41-05>

УДК 577.32+535.34

## КОМП'ЮТЕРНА МЕТОДИКА АНАЛІЗУ СТРУКТУРНО-ДИНАМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ РЕАКЦІЙНИХ ЦЕНТРІВ RHODOBACTER SPHAEROIDES НА ОСНОВІ СИСТЕМИ ДИФЕРЕНЦІАЛЬНИХ РІВНЯНЬ

Ю.М. Барабаш<sup>1</sup>, Т.В. Серденко<sup>1</sup>, П.П. Нокс<sup>2</sup>, О.А. Голуб<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Інститут фізики НАН України, проспект Науки, 46, Київ, 03028, Україна

<sup>2</sup>Московський державний університет імені М.В. Ломоносова,  
вул. Ленінські Гори, 1, Москва, 119991, Російська федерація

<sup>3</sup>Національний університет «Києво-Могилянська академія», вул. Сковороди, 2, Київ, 04070, Україна

E-mail: [ybar@ukr.net](mailto:ybar@ukr.net), [tais.serdenko@gmail.com](mailto:tais.serdenko@gmail.com)

Надійшла до редакції 13 липня 2018 р.

Прийнято 19 грудня 2018 р.

**Актуальність.** Реакції природних об'єктів на зовнішній вплив аналізуються за допомогою рівнянь балансу, якщо такі реакції мають мультиекспоненціальний характер, тобто такий, який можна представити у вигляді суми експонент. Такий характер реакції може бути зумовлений як впливом прихованих параметрів, так і впливом самої реакції на структуру об'єкта. Проблема полягає у тому, що часто не вдається емпірично визначити значення констант швидкостей рівнянь балансу, їх зв'язок з параметрами експоненціальних складових реакції, кінетику заселеності підстанів об'єкта.

**Мета роботи.** Метою роботи є розробка методики детального аналізу реакції об'єкта на зовнішній вплив, яка дозволяє визначити кінетику заселеності можливих підстанів об'єкта за допомогою побудови системи диференціальних рівнянь з постійними коефіцієнтами.

**Матеріали та методи.** У якості об'єкта використовувались ізольовані реакційні центри (РЦ) бактерій *Rhodobacter sphaeroides*, структура яких добре вивчена. При фотозбудженні РЦ їх поведінка аналізується шляхом побудови системи диференціальних рівнянь з постійними коефіцієнтами. Експериментальну кінетику циклічного переносу електрона РЦ апроксимували сумою трьох експоненціальних функцій. Параметри цих функцій використовували для визначення констант швидкостей рівнянь балансу при розв'язанні оптимізаційної задачі градієнтним методом. Задача роботи полягала у дослідженні РЦ за допомогою методу побудови системи диференціальних рівнянь та методу двох експозицій.

**Результати.** Розроблено комп'ютерну процедуру, яка дозволяє використовувати параметри трьох експоненціальних функцій кінетики переносу електрона для визначення значень констант швидкості чотирьох балансних рівнянь, аналізу кінетики заселеності підстанів РЦ. Експериментальна та розрахункова кінетика заселеності донора при фотозбудженні РЦ добре співпадають. Результати двох методів корелюються між собою. Вони показують, що у процесі фотозбудження максимуми заселеностей станів РЦ відповідають діапазону 3–140 с після увімкнення (вимкнення) світла.

**Висновки.** В такому випадку РЦ відповідають системі чотирьох електрон-конформаційних станів. Особливості кінетики заселеності підстанів РЦ характеризують просторово-часові характеристики РЦ.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** реакційні центри; електронний транспорт; електрон-конформаційні стани; структурна саморегуляція; математична модель.

## COMPUTER METHOD TO ANALYZE STRUCTURAL-DYNAMIC PROPERTIES OF RHODOBACTER SPHAEROIDES REACTION CENTERS BASED ON SYSTEM OF DIFFERENTIAL EQUATIONS

Y.M. Barabash<sup>1</sup>, T.V. Serdenko<sup>1</sup>, P.P. Knox<sup>2</sup>, O.A. Golub<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Physics, NAS of Ukraine, 46, Prospect Nauky, Kyiv, 03028, Ukraine

<sup>2</sup>M.V. Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia

<sup>3</sup>National university of "Kyiv-Mohyla academy", 2, Skovorody st., Kyiv, 04070, Ukraine

**Background:** Reactions of the natural objects to external influences can be analyzed using balance equations. If such reactions have a multi-exponential character, they can be represented as a sum of exponent components. Such kind of reaction is due both to the influence of hidden parameters, and the influence of the reaction itself on the structure of the object. The problem is that it is often not possible to determine empirically the values of the constants of the velocities of the balance equation, their relation with the parameters of the exponential components of the reaction, the kinetics of the population of the substates of the object.

**Objectives:** The aim of the work is to develop a method of detailed analysis of the reaction of the object to external influence, which allows to determine the kinetics of the population of possible substates of the object by constructing a system of differential equations with constant coefficients.

**Materials and methods:** Isolated reaction centers (RC) of *Rhodobacter sphaeroides* bacteria, the structure of which is well known, were used as an object. Behavior of the RC under photo-excitation was analyzed by constructing a system of differential equations with constant coefficients. The experimental kinetics of the cyclic electron transfer of the RC was approximated by the sum of three exponential functions. The parameters of these functions were used to determine the balance rate constants solving an optimization problem by a gradient method. The task was to study the RC using the method of constructing the system of differential equations and the method of two exposures.

**Results:** A computer procedure was developed to determine the values of the speed constants of four balance equations, to analyze the kinetics of the population of the bases of the RC using the parameters of three exponential functions of the kinetics of electron transfer. Experimental and calculated kinetics of the donor population after photoexcitation of the RC are in a good agreement. The results of the two methods are correlated. They show that in the process of photo-excitation the maxima of populations of RC states correspond to a range of 3–140 s after the turning on (turning off) the light.

**Conclusion:** RC corresponds to the system of four electron-conformational states. The features of the kinetics of population of the bases of the RC characterize the spatial-temporal characteristics of the RC.

**KEY WORDS:** reaction centers; electron transport; electron-conformational states; structural self-regulation of reaction; mathematical model.

### КОМПЬЮТЕРНАЯ МЕТОДИКА АНАЛИЗА СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ RHODOBACTER SPHAEROIDES НА ОСНОВАНИИ СИСТЕМЫ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫХ УРАВНЕНИЙ

Ю.М. Барабаш<sup>1</sup>, Т.В. Серденко<sup>1</sup>, П.П. Нокс<sup>2</sup>, А.А. Голуб<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт физики НАН Украины, проспект Науки, 46, Киев, 03028, Украина

<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
ул. Ленинские Горы, 1, Москва, 119991, Российская федерация

<sup>3</sup>Национальный университет «Киево-Могилянская академия», ул. Г. Сковороды, 2, Киев, 04070, Украина

**Актуальность.** Если реакция природных объектов на внешнее воздействие имеет мультиэкспоненциальный характер (сумма экспоненциальных составляющих), то её анализируют с помощью уравнений баланса. Такой характер реакции может быть обусловлен как влиянием скрытых параметров объекта, так и влиянием самой реакции на структуру объекта. Проблема возникает из-за того, что часто не удается эмпирически определить значения констант скоростей уравнений баланса, их связь с параметрами экспоненциальных составляющих реакции, кинетику заселенности подсостояний объекта.

**Цель работы.** Целью работы является разработка методики детального анализа реакции объекта на внешнее воздействие, которая с помощью построения системы дифференциальных уравнений с постоянными коэффициентами позволяет определить кинетику заселенности возможных подсостояний объекта.

**Материалы и методы.** В качестве объекта использовались изолированные реакционные центры (РЦ) бактерий *Rhodobacter sphaeroides*. При фотовозбуждении РЦ их поведение анализировали путем построения системы дифференциальных уравнений с постоянными коэффициентами. Экспериментальную кинетику циклического переноса электрона РЦ аппроксимировали суммой из трех экспоненциальных функций. Параметры этих функций использовали для определения констант скоростей уравнений баланса при решении оптимизационной задачи градиентным методом. Задача заключалась в исследовании РЦ с помощью методов построения системы дифференциальных уравнений и метода двух экспозиций.

**Результаты.** В результате разработана компьютерная процедура, которая позволяет использовать параметры трех экспоненциальных функций кинетики переноса электрона для определения значений констант скоростей четырех балансных уравнений, анализа кинетики заселенности

подсостояний РЦ. Показано хорошее совпадение экспериментальной и расчетной кинетики заселенности донора РЦ при их фотовозбуждении. Они показывают, что в процессе фотовозбуждения РЦ максимумы заселенностей состояний РЦ соответствуют диапазону 3–140 с после включения (выключения) света.

**Выводы.** Сделан вывод, что в этом случае РЦ соответствуют системе четырех электрон-конформационных состояний. Особенности кинетики заселенности подсостояний РЦ характеризуют пространственно-временные характеристики РЦ.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** реакционные центры; электронный транспорт, электрон-конформационные состояния; структурная саморегуляция; математическая модель.

Динамічні властивості біологічних макромолекул є важливими для їх функціонування, але вони є досить складними для дослідження. Наприклад, при ферментативному каталізі велике значення мають спряжені електрон-конформаційні взаємодії у білковій глобулі фермента. Подібна ситуація спостерігається і для ізольованих реакційних центрів (РЦ) бактерій *Rhodobacter sphaeroides*, електронні стани яких одночасно впливають та залежать від конформаційного стану білкового комплексу РЦ [1–10]. Тому вони були обрані у якості об'єкта, за допомогою якого виконувалась розробка комп'ютерної процедури дослідження подібних взаємовпливів. Просторово-часові рухи макромолекул РЦ мають складну багатоконпонентну кінетику, яка експериментально проявляється у вигляді основної реакції системи на вплив керуючого параметра (інтенсивність збуджуючого світла РЦ). Кінетика основної реакції РЦ представлена сумою різних експоненціальних функцій з негативними значеннями декрементів (показників експонент), які мають постійне значення під час всього часу спостереження [11–13]. Параметри експоненціальних функцій використовуються для аналізу основної реакції, ефектів структурної саморегуляції РЦ, для ідентифікації незалежних конформаційних підсистем РЦ. Часто значення вагових коефіцієнтів та декрементів експоненціальних компонент залежать один від одного та від характеристики керуючого параметра основної реакції [14–17].

Виникає проблема переходу від параметрів експоненціальних складових основної реакції до констант швидкостей балансних рівнянь, не вдається ідентифікувати значення констант швидкості, кількість та кінетику заселеності незалежних підсистем об'єкта. Математичний вид експоненціальних залежностей через накладені на них умови не має виражених особливостей, що також ускладнює аналіз кінетики основної реакції.

Відомо, що розв'язок системи диференціальних рівнянь з постійними коефіцієнтами виражається у вигляді суми експоненціальних функцій, коли матриця коефіцієнтів не має кратних власних значень. Якщо експериментальну кінетику основної реакції можна описати у вигляді суми експоненціальних функцій, то вона може відповідати деякій системі диференціальних рівнянь. Такі диференціальні рівняння можуть відповідати незалежним підсистемам об'єкта. Експериментальну кінетику циклічного електронного транспорту РЦ апроксимували сумою трьох експоненціальних функцій, це визначає кількість диференціальних рівнянь (три балансні рівняння та рівняння стану). Параметри таких функцій використовували для визначення значень коефіцієнтів чотирьох диференціальних рівнянь, які дорівнюють алгебраїчній сумі констант швидкостей рівнянь балансу РЦ. Значення констант швидкостей рівнянь балансу знаходили шляхом розв'язання оптимізаційної задачі градієнтним методом. Розв'язок системи диференціальних рівнянь визначає кінетику заселеностей підстанів РЦ.

Задача полягала у розробці комп'ютерної процедури (*Delphi*) визначення констант швидкостей балансних рівнянь реакції РЦ та у розрахунку кінетики переносу електрона між станами РЦ. Також у роботі описано метод двох експозицій.

Метою роботи є розробка методики детального аналізу реакції об'єкта на зовнішній вплив, яка за допомогою побудови системи диференціальних рівнянь з постійними коефіцієнтами дозволяє визначити кінетику заселеності станів об'єкта.

### ВИЗНАЧЕННЯ ПАРАМЕТРІВ СИСТЕМИ ДИФЕРЕНЦІАЛЬНИХ РІВНЯНЬ

Використовувались ізольовані РЦ бактерій *Rhodobacter sphaeroides* дикого типу, які були надані кафедрою біофізики МГУ ім. М.В. Ломоносова. Вони суспендувались в 0,01 М Na-P буфері, рН 7,2, який містив 0,05% LDAO [18]. Для проведення досліджень використовували двоканальний спектрометр під управлінням ПК. У каналі вимірювання поглинання використовувалось світло частотою 5 кГц з інтенсивністю ( $0,2 \text{ мВт/см}^2$ ,  $\lambda = 865 \pm 10 \text{ нм}$ ), яке забезпечувало вимірювання поглинання в діапазоні 0–1 з точністю 0,0005/см. У каналі збудження РЦ використовувалось світло з довжиною хвилі  $\lambda = 870 \pm 50 \text{ нм}$ , з інтенсивністю 0–10 мВт/см<sup>2</sup> з кроком від 5 мВт/см<sup>2</sup>. Часова дискретність вимірювань від 0,01 с. Вимірювальна кювета мала розміри  $3 \times 1 \times 2,5 \text{ см}$  при товщині стінок 2 мм. Після розведення суспензії РЦ з концентрацією  $10^{-6} \text{ М}$  витримувалися в темряві при кімнатній температурі протягом 12 годин (темноадаптований стан). Світлоадаптований стан досягався шляхом фотостимулювання РЦ імпульсами світла тривалістю 100 с з інтенсивністю  $7,2 \text{ мВт/см}^2$ . Після закінчення експозиції РЦ і досягнення темного значення поглинання, розчин РЦ додатково витримувався в темряві протягом 1500 с для досягнення рівноважного стану. Потім повторювали освітлення РЦ наступним імпульсом світла. Відносна кількість центрів поглинання, швидкість переходу РЦ з одного стану в інший визначалося по кінетиці вицвітання лінії 865 нм спектра поглинання РЦ і пов'язувалася з нормованою кінетикою переносу електрона з донора на акцептор ( $X_0(t)$ ).

Аналіз експериментальної залежності переносу електрона РЦ виконували в декілька етапів. На першому етапі експериментальну криву ( $X_0(t)$ ) фотоіндукованого електронного транспорту РЦ розбивали на ділянки фотозбудження (окислення донора) та рекомбінації електрона (відновлення донора) після виключення світла. Ці ділянки апроксимували сумою експоненціальних складових з додатними ваговими коефіцієнтами та від'ємними значеннями декрементів:

$$X_0(t) = \sum_i A_i e^{-d_i t}; \sum_i A_i = 1,$$

де  $A_i$  – вага експоненціальної компоненти фотостимульованого переносу електрона РЦ;  $i = 1, 2, 3$ ;  $d_i$  – показник степеня (декремент) компоненти фотостимульованого переносу електрона РЦ.

Застосовували програму розкладу [19] ділянок кінетичної кривої на експоненціальні складові. Програма самостійно знаходила кількість експоненціальних складових та їх параметри при мінімумі середньоквадратичної похибки апроксимації. Результати розкладу кінетичної кривої на експоненціальні компоненти представлені у вигляді сигналу для візуалізації контролю та у вигляді таблиці параметрів експонент.

Аналіз різних ділянок (рис. 1) кінетичних кривих фотозбудження РЦ (окислення та відновлення донора) показав, що експериментальні криві можна добре апроксимувати сумою трьох експонент. Відомо, що система з суми  $N$  однорідних диференціальних рівнянь та рівняння матеріального балансу зводиться до системи, яка може мати розв'язок у вигляді суми  $N-1$  експоненціальних складових. Можна зробити припущення, що кінетичні криві, представлені у вигляді суми трьох різних експоненціальних складових, можуть відповідати розв'язку системи з  $(3+1)$  диференціальних рівнянь з деякими значеннями кінетичних констант. Загальний вигляд кінетичної схеми переносу електрона РЦ показано на рис. 2, де цифри позначають електрон-конформаційні

підстані РЦ. Підстан 0 відповідає перебуванню електрона на донорі РЦ. Підстані 1, 2, 3 – перебування електрона на акцепторі РЦ.

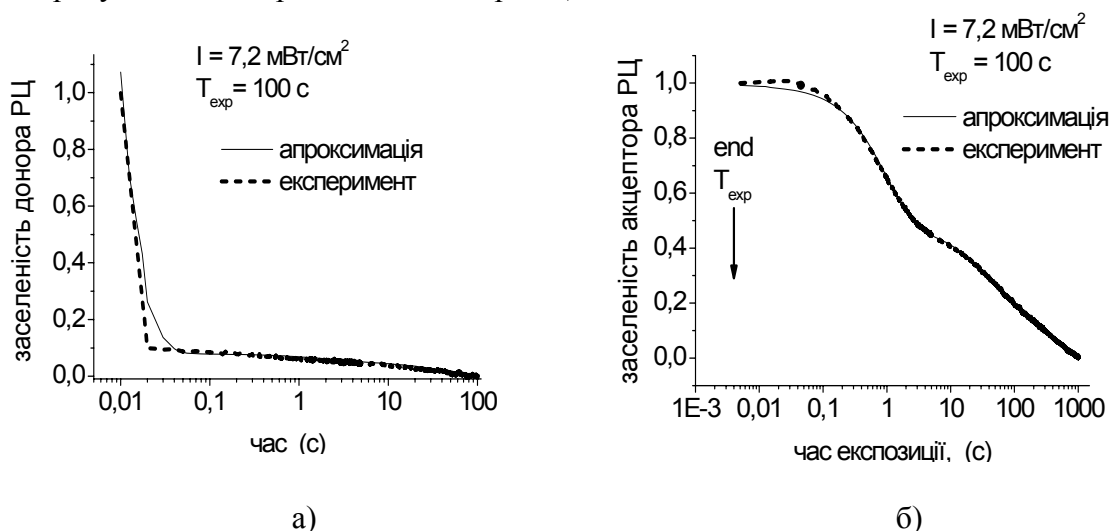


Рис. 1. Кінетика заселеностей донора (а) при фотозбудження РЦ світлом з довжиною хвилі 865 нм та акцептора (б) після закінчення освітлення.

Табл.1. Параметри експоненціальних складових кінетики переносу електрона РЦ

Фотозбудження РЦ	$d_i (\text{с}^{-1})$	$A_1 (\text{y.o.})$	$d_2 (\text{с}^{-1})$	$A_2 (\text{y.o.})$	$d_3 (\text{с}^{-1})$	$A_3 (\text{y.o.})$	дисперсія
Окислення донора	123,62	0,9925	0,5397	0,0249	0,0235	0,0548	0,00443
Відновлення донора	1,1003	0,512	0,0342	0,2264	0,0034	0,2538	0,00118

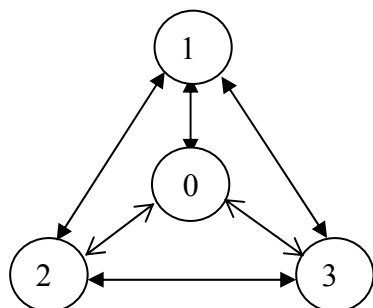


Рис. 2. Кінетична схема переносу електрона в РЦ *Rhodospira rubra*. Стрілки на схемі відображають електрон-конформаційні взаємодії комплексу РЦ. Константи швидкості ( $k_{ij}$ ) диференціальних рівнянь балансу (12 шт.) на рисунку позначено стрілками. Вони відображають швидкість переносу заряду між електрон-конформаційними станами РЦ.

На другому етапі дослідження використовували градієнтний метод розв'язання оптимізаційної задачі, яка полягала у визначення таких значень коефіцієнтів системи диференціальних рівнянь, при яких кінетика заселеності донора (підстан 0) РЦ співпадає з експериментальною кінетикою поглинання РЦ. При розв'язанні оптимізаційної задачі ця кінетика використовувалась у якості цільової функції. Така задача є оберненою та погано обумовленою. Для прямої задачі, коли відомі значення кінетичних константи швидкості системи диференціальних рівнянь, між константами диференціальних рівнянь та розв'язком системи існує взаємно однозначна відповідність. Розв'язок системи має єдине значення. Диференціальні рівняння переносу електрона РЦ з рівнянням стану мають вигляд:

$$\frac{dx_0}{dt} = -(k_{01} + k_{02} + k_{03}) \cdot X_0 + k_{10} \cdot X_1 + k_{20} \cdot X_2 + k_{30} \cdot X_3, \quad (1)$$

$$\frac{dx_1}{dt} = k_{01} \cdot X_0 - (k_{10} + k_{12} + k_{13}) \cdot X_1 + k_{21} \cdot X_2 + k_{31} \cdot X_3, \quad (2)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = k_{02} \cdot X_0 + k_{12} \cdot X_1 - (k_{20} + k_{22} + k_{23}) \cdot X_2 + k_{30} \cdot X_3, \quad (3)$$

$$X_1 + X_2 + X_3 = 1. \quad (4)$$



Загальний розв'язок системи має вигляд:

$$X_i(t) = C_{i,1} \cdot \exp(-d_1 t) + C_{i,2} \cdot \exp(-d_2 t) + C_{i,3} \cdot \exp(-d_3 t),$$

де  $X_i(t)$  – заселеність підстанів РЦ ( $i = 1, 2, 3$ ),  $C_{i,1}$ ;  $C_{i,2}$ ;  $C_{i,3}$  – константи, які визначались значеннями власних векторів матриці констант диференціальних рівнянь та початковими умовами підсистем для процесів збудження та релаксації РЦ,  $k_{ij}$  – кінетичні константи швидкості диференціальних рівнянь балансу, які задають швидкість переносу електрона між підстанами РЦ.

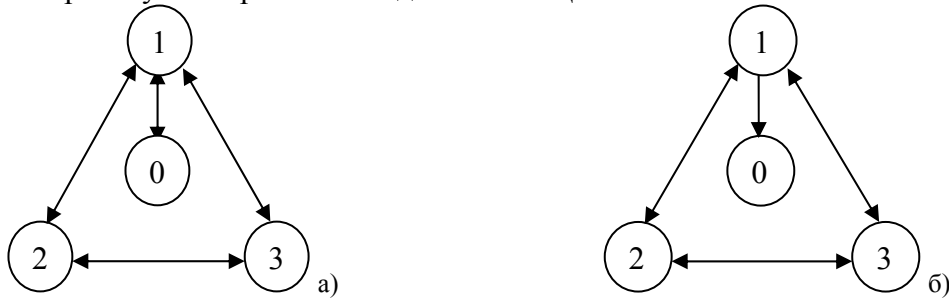


Рис. 3. Кінетична схема початку процесу визначення констант швидкості рівнянь балансу.

Крок зміни констант  $dk_{01}, dk_{10}=0.01 \text{ c}^{-1}, dk_{ij}=10^{-4} \text{ c}^{-1}$  (для  $k_{ij} \neq 0$ ).

а) окислення донора, початкові значення констант швидкості рівнянь балансу:  $k_{02}=k_{03}=0, k_{01}=k_{10}=0.01 \text{ c}^{-1}, k_{20}=k_{30}=k_{21}=k_{31}=10^{-8} \text{ c}^{-1}, k_{12}=k_{13}=k_{12}=k_{12}=10^{-9} \text{ c}^{-1}$ .

б) відновлення донора, початкові значення констант швидкості рівнянь балансу:  $k_{02}=k_{03}=k_{01}=0, k_{10}=0.01 \text{ c}^{-1}, k_{20}=k_{30}=k_{21}=k_{31}=10^{-8} \text{ c}^{-1}, k_{12}=k_{13}=k_{12}=k_{12}=10^{-9} \text{ c}^{-1}$ .

Початкові умови при розрахунку заселеностей підстанів у процесі фотозбудження РЦ мають вигляд:  $X_0(0) = 1; X_1(0) = 0; X_2(0) = 0; X_3(0) = 0$ . Початкові умови для процесу релаксації РЦ дорівнюють значенням заселеностей  $X_0(T_{exp}); X_1(T_{exp}); X_2(T_{exp}); X_3(T_{exp})$  у момент закінчення процесу фотозбудження. Декременти ( $d_i$ ) дорівнюють власним значенням матриць коефіцієнтів диференціальних рівнянь для процесів фотозбудження та релаксації РЦ. При цьому визначник обернених матриць констант диференціальних рівнянь не повинен дорівнювати нулю. Це накладає обмеження на початкове значення констант диференціальних рівнянь (рис. 3 а, б), які використовуються у процесі оптимізації. Процес був побудований наступним чином. У процесі оптимізації спочатку знаходили значення констант диференціальних рівнянь для процесу фотозбудження електрона РЦ. Для цього використовували початкові значення констант швидкості  $k_{ij}$ , розв'язували пряму задачу та знаходили значення параметрів експоненціальних складових загального розв'язку системи диференціальних рівнянь, в тому числі для підсистеми 0. Маючи експериментальні ( $A_i^0, d_i^0$ ) та розраховані ( $A_i^x, d_i^x$ ) значення параметрів експоненціальних складових, визначали їх середньоквадратичну різницю, яка використовувалась у якості критерія оптимізації ( $\Delta_x$ ) який мав вигляд:

$$\Delta_x = \sum \frac{(A_i^0 - A_i^x)^2}{(A_i^0)^2} + \frac{(d_i^0 - d_i^x)^2}{(d_i^0)^2} \quad i = 1, 2, 3. \quad (5)$$

Оптимізували значення  $k_{01}$  при незмінних значеннях інших констант. Оптимізували значення  $k_{10}$  при фіксованому значенні  $k_{01}$  та незмінних значеннях інших констант. Потім оптимізували значення інших констант шляхом послідовного перебору констант  $k_{02}, k_{20}, k_{03}, k_{30}, k_{12}, k_{21}, k_{13}, k_{31}, k_{23}, k_{32}$  при оптимальних значеннях  $k_{01}$  та  $k_{10}$ . Перебір значень констант йшов з заданим кроком у подвійному діапазоні значень найбільшого декременту, так як цільова функція характеризувалась множиною локальних мінімумів. Повторювали 50 разів у тій самій послідовності роботи з  $k_{ij}$ , реестрували набір значень  $k_{ij}$  з найменшою похибкою. Знаходили розв'язок системи

диференціальних рівнянь з оптимальним набором констант, визначали заселеність підстанів для процесу фотозбудження РЦ. Цей розв'язок використовували у якості початкової умови для процесу релаксації РЦ. Подібним чином розв'язувалась задача значень  $k_{ij}$  для процесу релаксації РЦ, для якого використовували свій набір параметрів, експоненціальних складових кінетики рекомбінації електрона.

## РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 4 показано меню програми для розрахунку констант швидкості системи диференціальних рівнянь фотостимульованого переносу електрона.

Exp number  
0

Stop = press the Q key

parameters of the experimental curve

	d1	weight-1	d2	weight-2	d3	weight-3
Oxidation data	-0	0	-0	0	-0	0
Calcul of oxidation	0	0	0	0	0	0
Recovery data	0	0	0	0	0	0
Calcul of recovery	-0	-0	-0	-0	-0	-0

initial parameters of the optimization process

i-j	1-2	2-1	1-3	3-1	1-4	4-1	2-3	3-2	2-4	4-2	3-4	4-3
K <sub>ij</sub>	0.01	0.01	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000001	0.000001	0.000000	0.000001	0.000001
dK <sub>ij</sub>	0.1	0.01	0.001	0.001	0.0011	0.0011	0.001	0.001	0.0011	0.0011	0.001	0.0011

output parameters

	k1-2	k2-1	k2-3	k3-2	k3-4	k4-3	k1-3	k3-1	k2-4	k4-2	k1-4	k4-1
Oxidation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Recovery	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Calculation Save K(i-j) Upload Clearing Save File No delta1 T=f(1\*t) Close

Рис. 4. Меню програми «розрахунок констант швидкості системи диференціальних рівнянь фотостимульованого переносу електрона».

Експериментальна залежність кінетики фотостимульованого переносу електрона як суми експоненціальних складових повинна мати вигляд, як показано на рис. 5. Сигнал має вигляд двох колонок з точкою у якості символу розділення цілої та дробової частин. У першій колонці присутня часова частина (вісь- $X$ ) в секундах, друга колонка – амплітуда сигналу у довільних одиницях. Для запуску програми розрахунків необхідно у верхньому лівому полі меню програми (рис. 4) ввести час кінця експозиції РЦ в цифровому коді. У таблиці «параметри експоненціальної кривої» у верхньому рядку вводиться значення декрементів (зі знаком «мінус») в діапазоні  $0,0001\text{--}50\text{ с}^{-1}$  та вагових коефіцієнтів (зі знаком «плюс») експоненціальних функцій для процесу окислення донора РЦ. У передостанньому рядку цієї таблиці (для процесу релаксації РЦ) вводиться значення декрементів та вагів (зі знаком «мінус»). Якщо значення декременту  $d_1 > 50$ , то необхідно замінити діапазон значень у 10 разів, натискаючи « $T=f(1*t)$ ». Потім натиснути кнопку «Calculation» і ввести адресу файлу з сигналом, що

аналізується. Почнеться процедура знаходження значень констант диференціальних рівнянь. Процес виконання розрахунків відображається на полях верхньої таблиці.

По закінченню розрахунків значення констант диференціальних рівнянь відобразяться у таблиці «output parameters». Значення параметрів експоненціальних складових, розрахованих на основі значень констант диференціальних рівнянь, відобразяться в таблиці «parameters of the experimental curve». Результати розрахунків зберігаються у двох файлах текстового формату шляхом натискання кнопок “Save  $A_i=K(i-j)$ ” та “Save File”. Перша кнопка створює файл таблиці значень констант диференціальних рівнянь (таблиця 2), похибка розрахунків фіксується у правому полі таблиці. Друга кнопка – файл кінетики заселеності підстанів РЦ.

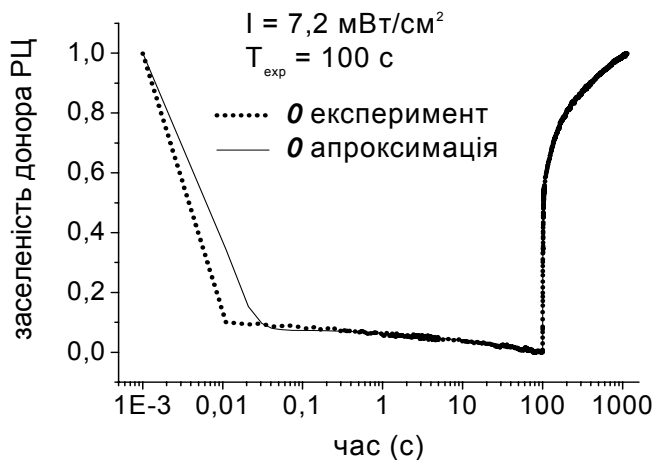


Рис. 5. Кінетика фотостимульованого переносу електрона РЦ. Експериментальна та розрахована залежності заселеності донора ( $\theta$  підстан) РЦ в результаті розв’язання системи диференціальних рівнянь.

Табл. 2. Значення констант швидкості диференціальних рівнянь балансу для етапів окислення донора РЦ (рядок 2) та відновлення донора РЦ (рядок 3). Інтенсивність збуджуючого світла  $7,2 \text{ мВт/см}^2$ , час експозиції РЦ ( $T_{\text{exp}}$ )  $100 \text{ с}$

$k_{ij} (\text{с}^{-1})$	$k_{01}$	$k_{10}$	$k_{12}$	$k_{21}$	$k_{23}$	$k_{32}$	$k_{02}$	$k_{20}$	$k_{13}$	$k_{31}$	$k_{03}$	$k_{30}$	дисперсія
окислення	112,6	9,3	0,07	0,375	1E-5	1E-5	1,18	1E-6	1E-5	1E-5	0,446	1E-5	4E-5
відновлення	0	0,01	0,007	1E-6	1E-6	0,143	0	0,003	0,024	0,315	0	0,635	2,1E-6

На рис. 5 наведено експериментальну кінетику заселеності донора РЦ (підстан  $\theta$ ) у процесі його окислення та відновлення. Також наведено кінетику заселеності цього ж підстану, отриману в результаті роботи програми «розрахунок значень констант диференціальних рівнянь». Середньоквадратична похибка розрахунків ( $disp = 4,5 \cdot 10^{-5}$ ) для ділянки окислення та  $disp = 2,1 \cdot 10^{-4}$  для ділянки відновлення донора РЦ. Час роботи програми приблизно 10 хвилин. За допомогою цієї програми було визначено значення констант для матриць диференціальних рівнянь, кінетика заселеності підстанів РЦ для інших режимів фотозбудження РЦ [20]. У більшості випадків вдається отримати хорошу апроксимацію експериментальної та розрахункової кінетики заселеності донора РЦ (підстан  $\theta$ ) на всьому інтервалі фотостимулювання РЦ. Типовий випадок показано на рис. 6 а, б, де наведено експериментальну та розрахункову залежності  $\theta$  підстану та розрахункові кінетики заселеностей чотирьох підстанів при фотозбудженні РЦ одним імпульсом світла протягом 100 с з інтенсивністю  $7,2 \text{ мВт/см}^2$ . Як правило, кінетика заселеностей підстанів РЦ має особливості, характер яких залежить від параметрів режиму фотостимулювання РЦ. Аналіз цього параметру показує, що кінетика підстанів 1, 2, 3 на відміну від підстану  $\theta$  має виражені особливості. У режимі фотозбудження РЦ максимумами заселеностей підстанів 1, 2 знаходяться на 0,06 с та 6 с після початку фотозбудження. У режимі

релаксації РЦ максимуми заселеності підстанів фіксуються через 3 с, 47 с, зменшення заселеності підстану 3 до нуля відбувається через 3 с, підстану 1 – через 140 с після закінчення фотозбудження при загальному часу релаксації РЦ > 1000 с.

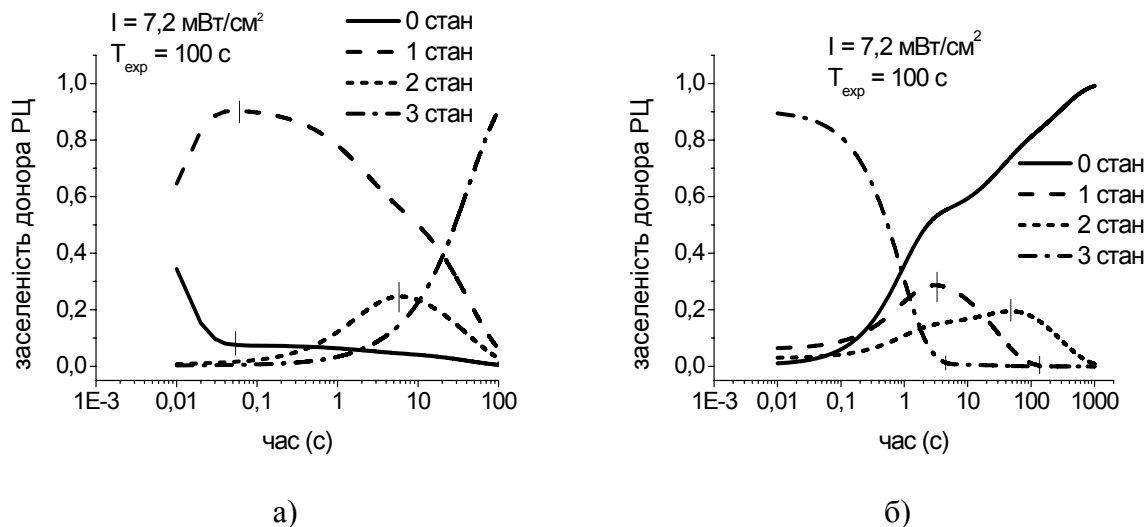


Рис. 6. Кінетика заселеності підстанів РЦ:  
а) ділянка фотозбудження РЦ; б) ділянка релаксації РЦ.

Наявність максимумів заселеності підсистем РЦ дозволяє говорити про присутність протилежних процесів в кінетиці підстанів при їх фотозбудженні та релаксації. Такі процеси можуть бути зумовлені структурними змінами в РЦ при фотостимульованому переносі електрона.

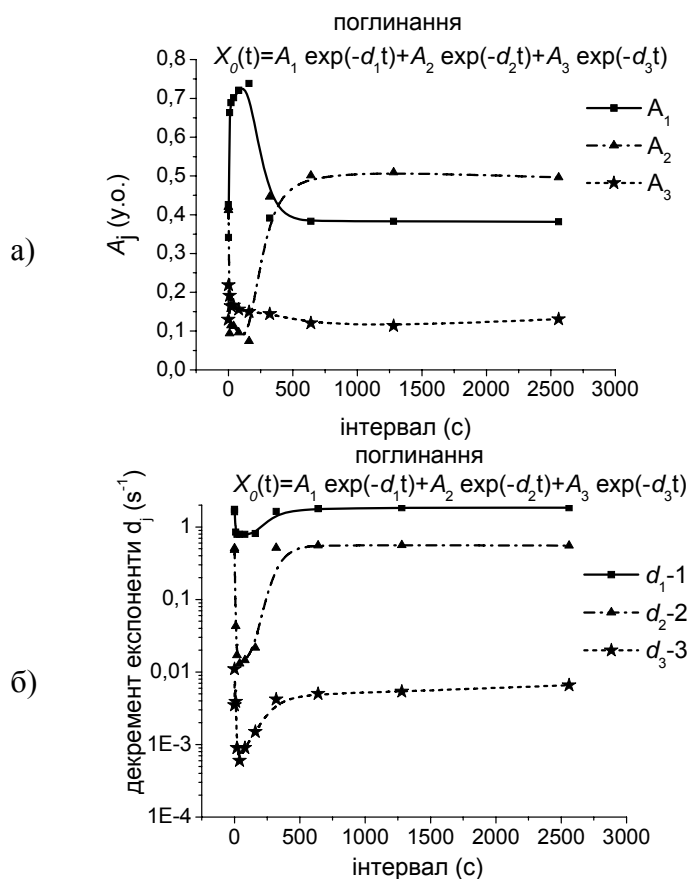


Рис. 7. Метод двох експозицій при фотозбудженні РЦ. Зміна параметрів експоненціальних компонент фотоіндукованого переносу електрона:  
а) зміна значень вагів ( $A_i$ ) та б) декрементів ( $d_i$ ) експоненційних складових релаксації донора РЦ після другого збуджуючого імпульсу в залежності від значення інтервалу між першим та другим імпульсами фотостимуляції РЦ. Інтенсивність імпульсу  $7 \text{ мВт/см}^2$ , тривалість –  $100 \text{ с}$  [20].

Дослідження кінетики фотостимульованого переносу заряду в РЦ з використанням двох послідовних імпульсів світла зі змінним інтервалом між ними [20] показало немонотонну залежність параметрів експоненціальних складових кінетики від величини інтервалу між імпульсами. Дана методика, так як і попередня, дозволяє визначати часові параметри електрон-конформаційних взаємодій РЦ. Порівняння результатів цих методик (рис. 6 б та рис. 7 а, б) показує їх співпадіння. Інтервали 3, 47, 140 с, що відповідають максимумам заселеності підстанів 1 та 2 у процесі релаксації РЦ, співпадають по порядку величини з інтервалом часу (4–100 с) між імпульсами світла збудження РЦ, при якому параметри експоненціальних складових процесу релаксації РЦ мають екстремальні значення. Це підтверджує припущення про те, що поява особливостей у кінетиці заселеностей підстанів РЦ при фотостимульованому переносі заряду пов'язана зі змінами у їх структурі.

### ВИСНОВКИ

Кінетика фотостимульованого електронного переносу електрона в ізольованих реакційних центрах *Rhodobacter sphaeroides* добре описується системою з рівнянням стану та трьох диференціальних рівнянь балансу з двома наборами постійних коефіцієнтів.

Процес фотостимульованого переносу заряду в РЦ задовольняє модель чотирьох незалежних підстанів РЦ, які відповідають чотирьом пов'язаним електрон-конформаційним підстанам.

Кінетика заселеності підстанів РЦ у процесі фотозбудження та релаксації має добре виражені екстремуми (0,06, 3–140 с), що зумовлені ефектами структурної саморегуляції основної реакції у результаті просторово-часових рухів макромолекули РЦ. Екстремуми служать маркерами структурних змін РЦ.

Розроблено програму для визначення констант швидкостей диференціальних рівнянь, коли реакція системи представлена у вигляді трьох різних експоненціальних складових.

### ПОДЯКА

Стаття містить результати досліджень НДР «Дослідження структурних та динамічних властивостей природних та штучних наносистем, що містять біологічні макромолекули та їх комплекси» (№ держреєстрації 0113U000838, 2012–2017).

### КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

### Authors' ORCID ID

Y.M. Barabash  <https://orcid.org/0000-0002-5596-5550>

T.V. Serdenko  <https://orcid.org/0000-0002-1157-6115>

P.P. Knox  <https://orcid.org/0000-0002-7038-5386>

O.A. Golub  <https://orcid.org/0000-0003-1823-2523>

### REFERECES

1. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, R., Huber, R., & Michel, H. (1985). Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3Å resolution. *Nature*, 318, 618–624.
2. Allen, J. P., Feher, G., Yeates, T. O., Komiyama, H., & Rees, D. C. (1987). Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: the protein subunits. *PNAS*, 84(17), 6162–6166.
3. Feher, G., Allen, J. P., Okamura, M. Y., & Ree, D. C. (1989). Structure and function of bacterial photosynthetic reaction centres. *Nature*, (339), 111–116.

4. Graige, M. S., Feher, G., & Okamura, M. Y. (1998). Conformational gating of the electron transfer reaction  $Q_a^-Q_b \rightarrow Q_aQ_b^-$  in bacterial reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* determined by a driving force assay. *PNAS*, 95(20), 11679-11684.
5. Qiang, Xu, & Gunner, M. R. (2001). Trapping Conformational Intermediate States in the Reaction Center Protein from Photosynthetic Bacteria. *Biochemistry*, 40(10), 323-324.
6. Andreasson, U., & Andreasson, L. E. (2003). Characterization of a semi-stable, charge-separated state in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynth Res.*, 75(3), 223-233.
7. Deshmukh, S. S., Akhaverin, H., Williams, J. C., Allen, J. P., & Kalman, L. (2011). Light-induced conformational changes in photosynthetic reaction centers: Impact of Detergent and Lipids on the Electronic Structure of the Primary Electron Donor. *Biochemistry*, 50(3), 5249-5262.
8. Deshmukh, S. S., Williams, J. C., Allen, J. P., & Kalman, L. (2011). Light-induced conformational changes in photosynthetic reaction centers: dielectric relaxation in the vicinity of the dimer. *Biochemistry*, 50(3), 834-834.
9. Rubin, A.B. (2017). *Compendium of Biophysics*. New York: John Wiley & Sons.
10. Croce, R., van Grondelle, R., van Amerongen, H., van Stokkum, I. (2018). *Light Harvesting in Photosynthesis*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
11. Goushcha, A. O., Kharkyanen, V. N., Scott, G. W., & Holzwarth, A.R. (2000). Self-regulation phenomena in bacterial reaction centers 1. General theory. *Biophys. J.*, 79, 1237-1252.
12. Christophorov, L. N., & Kharkyanen, V. N. (2005). Synergetic Mechanisms of Structural Regulation of the Electron Transfer and Other Reactions of Biological Macromolecules. *Chemical Physics*, 319, 330-341.
13. Maroti, P., & Wraight, C. A. (2008). The redox midpoint potential of the primary quinone of reaction center sinchromatophores of *Rhodobacter sphaeroides* is independent. *Eur Biophys J.*, 37, 1207-1217.
14. Goushcha, A. O., Manzo, A. J., Kharkyanen, V. N., van Grondelle, R., & Scott G. W. (2004). Light-induced equilibration kinetic sinmembrane-bound photosynthetic reaction centers: non linear dynamic effects in multiple scattering media. *J Phys Chem B.*, 108(8), 2717-2725.
15. Kharkyanen, V. N., Barabash, Y., M., Berezetskaya, N. M., Lukashev, E., P., Knox, P., P., & Christophorov, L. N. (2011). Peculiarities of light-induced slow protein dynamic in the photosynthetic reaction center. *Chemical Physics Letters*, 512, 113-117.
16. Manzo, A. J., Goushcha, A. O., Berezetska, N. M., Kharkyanen, V. N., & Scott, G. W. (2011). Charge recombination time distribution sinphotosynthetic reaction centers exposed to alternating intervals of photoexcitation and dark relaxation. *J. Phys. Chem. B.*, 115(26), 8534-8544.
17. Sipka, G., & Maroti, P. (2018). Photoprotection in intact cells of photosynthetic bacteria: quenching of bacteriochlorophyll fluorescence by carotenoid triplets. *Photosynth Res.*, 136, 17-30.
18. Zakharova, N. I., & Churbanova, I. Yu. (2000). Methods of isolation of reaction center preparations from photosynthetic purple bacteria. *Biochemistry*, 65, 181-193.
19. Barabash, Y. M., & Lyamets, A. K. (2016). A method of decomposition of the basic reaction of biological macromolecules into exponential components. *Nanoscale Research Letters*, 11, 544. URL: <https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/s11671-016-1758-1>.
20. Serdenko, T. V., Barabash, Y. M., Knox, P. P., & Seifullina, N. Kh. (2016). The kinetic model for slow photoinduced electron transport in the reaction centers of purple bacteria. *Nanoscale Research Letters*, 11, 286. URL: <https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/s11671-016-1502-x>.

## 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". Потім розміщується розділ **Authors' ORCID ID**, у якому автори вказують адреси своїх профілів ORCID.

Літературні посилання нумеруються в порядку цитування в тексті, номер посилання пишеться у квадратних дужках. Не допускаються посилання на неопубліковані роботи, підручники та навчальні посібники. Список літератури (шрифт 10 pt.) розміщується за основним текстом статті, виділяється як розділ **REFERENCES** і оформлюється згідно з міжнародним стилем оформлення списку наукових публікацій Vancouver. Приклади оформлення бібліографічних посилань можна подивитись на сайті журналу у розділі «Керівництво для авторів»: <https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/about/submissions>

**Рукописи оформлені не у відповідності до наведених правил не розглядатимуться!**



## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Electronic files of the contributions (created in MS Word 2007 and later versions) written in English, 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." The next section should be **Authors' ORCID ID** in which you should include ORCID internet addresses of all authors.

References to the literature should be cited in the text consecutively by Arabic numerals in square brackets. The citation of unpublished papers, textbooks and tutorials are prohibited. List of references (10 pt) should be given at the end of the manuscript as a separate section **REFERENCES**, formatted according to the Vancouver style for scientific publications.

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

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

Наукове видання

“Біофізичний вісник”

Вип. 41

Збірник наукових праць

Укр., рос. та англ. мовами.

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

Підписано до друку 04.02.2019. Формат 60×84 1/8.  
Папір офсетний. Друк ризографічний.  
Ум. друк. арк. 6,32. Обл.-вид. арк. 7,35. Наклад 50 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