

ISSN 2075-3810

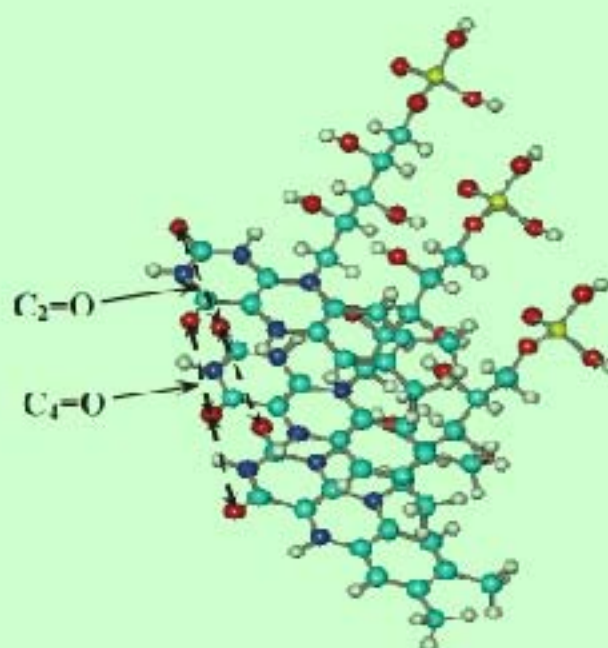
ISSN 2075-3829



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



**BIOPHYSICAL**  
**BULLETIN**



1'2018

**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 39 (1) Issue**

Заснований 1998 р.

Founded in 1998

**Харків 2018 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 № 6 від 29 травня 2018 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,

Даугавпілський 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

**Толсторуків 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

- D.V. Piatnytskyi, S.N. Volkov**  
Complexes of hydrogen peroxide and DNA phosphate group in quantum chemical calculations 5-14
- V.A. Pashynska, N.M. Zholobak, M.V. Kosevich, A. Gomory, P.K. Holubiev, A.I. Marynin**  
Study of intermolecular interactions of antiviral agent tilorone with RNA and nucleosides 15-26
- О.В. Ващенко, Л.В. Будянская, Н.А. Касян, Л.Н. Лисецкий**  
Мембранотропное действие лауриновой кислоты, фенспирида и каолина в модельных липидных мембранах: роль липидного состава 27-41

## МЕДИЧНА ФІЗИКА

- Н.П. Мустецов, С.С. Лапта**  
Адаптированный алгоритм работы имплантируемого дозатора инсулина 42-50

## МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

- D.M. Glibitskiy**  
Modeling of protein and salt redistribution during drying of a solution from a square cell 51-70
- С.В. Нарожный, И.Ф. Коваленко, Д.А. Мангасаров, М.И. Щетинский, О.А. Нардид**  
Получение альгинатных микросфер различного размера под влиянием электростатического поля методом электрораспыления 71-80

## ХРОНІКА

- Пам'яті професора Юрія Павловича Благого 81-82

**CONTENTS****MOLECULAR BIOPHYSICS**

- D.V. Piatnytskyi, S.N. Volkov**  
Complexes of hydrogen peroxide and DNA phosphate group in quantum chemical calculations 5-14
- V.A. Pashynska, N.M. Zholobak, M.V. Kosevich, A. Gomory, P.K. Holubiev, A.I. Marynin**  
Study of intermolecular interactions of antiviral agent tilorone with RNA and nucleosides 15-26
- O.V. Vashchenko, L.V. Budianska, N.A. Kasian, L.N. Lisetski**  
Membranotropic action of lauric acid, fenspiride and kaoline in model lipid membranes: effects of lipid composition 27-41

**MEDICAL PHYSICS**

- N.P. Mustetsov, S.S. Lapta**  
Adaptive algorithm of implantable insulin pump operation 42-50

**METHODS OF BIOPHYSICAL INVESTIGATIONS**

- D.M. Glibitskiy**  
Modeling of protein and salt redistribution during drying of a solution from a square cell 51-70
- S.V. Narozhnyi, I.F. Kovalenko, D.A. Mangasarov, M.I. Schetinsky, O.A. Nardid**  
Production of alginate microspheres of various sizes under the influence of an electrostatic field with the help of electrospray method 71-80

**CHRONICLE**

- In memory of Professor Yuri P. Blagoi 81-82

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2018-39-01>

UDC 539.199+577.3

## COMPLEXES OF HYDROGEN PEROXIDE AND DNA PHOSPHATE GROUP IN QUANTUM CHEMICAL CALCULATIONS

D.V. Piatnytskyi, S.N. Volkov

*Bogolyubov Institute for Theoretical Physics, 14-b, Metrolohichna Str., Kyiv, 03143, Ukraine.*

e-mail: [dvyat@bitp.kiev.ua](mailto:dvyat@bitp.kiev.ua)

Submitted December 5, 2017

Accepted February 9, 2018

**Background:** Molecules of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) can be formed during radiolysis process in water medium after irradiation. A hypothesis about the possible role of hydrogen peroxide in blocking of processes of nonspecific DNA recognition by proteins is proposed in [1]. As one of the most long-living products,  $H_2O_2$  molecules can diffuse considerable distances in the intracellular medium and reach DNA in the cell nucleus and form complexes with macromolecule phosphate groups. To confirm this hypothesis, the quantum chemical calculations of complexes structure of hydrogen peroxide molecule with atomic groups of the DNA backbone are performed.

**Objectives:** To determine the optimal geometries and formation energies of stable complexes of hydrogen peroxide with DNA phosphate group. To perform a comparative analysis of hydrogen peroxide and water molecules binding to phosphate group based on quantum chemical calculations.

**Materials and Methods:** The complexes which consist of phosphate group, hydrogen peroxide, water molecules, and sodium counterion are analyzed. The optimization of complex geometry and energy calculations is performed using the methods of quantum chemistry within Gaussian 03 software: HF/6-31+G(d,p), MP2/6-31+G(d,p), B3LYP/6-31+G(d,p).

**Results:** This research shows that the hydrogen peroxide molecule as well as water molecule can form stable complexes with phosphate group, especially with the presence of sodium counterion  $Na^+$ . The results of complex formation calculations with atom-atom potential functions method are confirmed. It is shown that the presence of sodium counterion significantly influences the geometry of the hydrogen peroxide complex with the phosphate group. The performed calculations indicate the possibility of hydrogen peroxide geometry change in the processes of complex formation.

**Conclusions:** The obtained results confirm the possibility of stable complexes forming for hydrogen peroxide and phosphate group. Prolonged situation of  $H_2O_2$  molecule near the DNA backbone may block the nucleic-protein recognition processes as well as damage the macromolecule via decay into OH-radicals in close proximity to double helix.

**KEY WORDS:** hydrogen peroxide; DNA phosphate group; stable complexes; quantum chemical calculations.

## КОМПЛЕКСИ ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ І ФОСФАТНОЇ ГРУПИ ДНК В КВАНТОВО-ХІМІЧНИХ РОЗРАХУНКАХ

Д.В. П'ятницький, С.Н. Волков

*Інститут теоретичної фізики ім. М.М. Боголюбова НАН України,*

*вул. Метрологічна, 14 б, Київ, 03143, Україна*

**Актуальність.** Молекули пероксиду водню ( $H_2O_2$ ) можуть утворюватись в процесі радіолізу в водному середовищі після опромінення. Висунута гіпотеза [1] про можливу роль пероксиду водню в блокуванні процесів неспецифічного впізнавання ДНК білками. Як один з найбільш довго живучих продуктів, молекули  $H_2O_2$  можуть дифундувати на значні відстані у внутрішньоклітинному середовищі, досягати ДНК в ядрі клітини і утворювати комплекси з фосфатними групами ДНК. Для підтвердження гіпотези в роботі виконано квантово-хімічні розрахунки структури комплексів молекули пероксиду водню з атомними групами остову ДНК.

**Мета роботи.** Визначення оптимальної геометрії та енергії утворення стабільних комплексів пероксиду водню з фосфатною групою ДНК. Провести порівняльний аналіз зв'язування пероксиду водню та молекули води з фосфатною групою на основі квантово-хімічних розрахунків.

**Матеріали і методи.** Розглядаються комплекси, що складаються з фосфатної групи, молекул пероксиду водню та води, протионів натрію. Виконано оптимізацію просторових геометрій комплексів та розрахунок енергій з використанням методів квантової хімії в рамках пакету Gaussian 03: HF/6-31+G(d,p), MP2/6-31+G(d,p), B3LYP/6-31+G(d,p).

**Результати.** Показано, що молекула пероксиду водню може утворювати комплекси з фосфатною групою не гірше за молекулу води, особливо в присутності протиіону натрію  $\text{Na}^+$ . Підтвержені результати розрахунків комплексоутворення з використанням методу атом-атомних потенціальних функцій. Показано, що присутність протиіону натрію суттєво впливає на геометрію комплексу пероксиду водню з фосфатною групою. Проведені розрахунки вказують на можливість зміни геометрії молекули пероксиду водню у процесі комплексоутворення.

**Висновки.** Отримані результати підтверджують можливість утворення стабільних комплексів пероксиду водню з фосфатною групою ДНК. Тривале знаходження молекули  $\text{H}_2\text{O}_2$  поряд з остовом ДНК може блокувати процеси нуклеїново-білкового впізнання, а також призвести до пошкодження макромолекули внаслідок розпаду пероксиду на ОН-радикали безпосередньо біля подвійної спіралі.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** пероксид водню; фосфатна група ДНК; стабільні комплекси; квантово-хімічні розрахунки.

## КОМПЛЕКСЫ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И ФОСФАТНОЙ ГРУППЫ ДНК В КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИХ РАСЧЕТАХ

Д.В. Пятницкий, С.Н. Волков

*Институт теоретической физики им. Н.Н. Боголюбова НАН Украины,  
ул. Метрологическая, 14 б, Киев, 03143, Украина.*

**Актуальность.** Молекулы пероксида водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) могут образовываться в процессе радиолитического распада в водной среде после облучения. Выдвинута гипотеза [1] о возможной роли пероксида водорода в блокировании процессов неспецифического узнавания ДНК белками. Как один из наиболее долгоживущих продуктов, молекулы  $\text{H}_2\text{O}_2$  могут диффундировать на значительные расстояния во внутриклеточной среде, достигать ДНК в ядре клетки и образовывать комплексы с фосфатными группами ДНК. Для подтверждения гипотезы в работе выполнены квантово-химические расчеты структуры комплексов молекулы пероксида водорода с атомными группами остова ДНК.

**Цель работы.** Определение оптимальной геометрии и энергии образования стабильных комплексов пероксида водорода с фосфатной группой ДНК. Провести сравнительный анализ связывания пероксида водорода и молекулы воды с фосфатной группой на основе квантово-химических расчетов.

**Материалы и методы.** Рассматриваются комплексы, состоящие из фосфатной группы, молекул пероксида водорода и воды, противоионов натрия. Выполнена оптимизация пространственных геометрий комплексов и расчет энергий с использованием методов квантовой химии в рамках пакета Gaussian 03: HF/6-31+G(d,p), MP2/6-31+G(d,p), B3LYP/6-31+G(d,p).

**Результаты.** Показано, что молекула пероксида водорода может образовывать комплексы с фосфатной группой ДНК не хуже, чем молекула воды, особенно в присутствии противоиона натрия  $\text{Na}^+$ . Подтверждены результаты расчетов комплексообразования с использованием метода атом-атомных потенциальных функций. Показано, что присутствие противоиона натрия существенно влияет на геометрию комплекса пероксида водорода с фосфатной группой. Проведенные расчеты указывают на возможность изменения геометрии молекулы пероксида водорода в процессе комплексообразования.

**Выводы.** Полученные результаты подтверждают возможность образования стабильных комплексов пероксида водорода с фосфатной группой. Длительное нахождение молекулы  $\text{H}_2\text{O}_2$  рядом с остовом ДНК может блокировать процессы нуклеиново-белкового узнавания, а также привести к повреждению макромолекулы вследствие распада пероксида на ОН-радикалы в непосредственной близости возле двойной спирали.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** пероксид водорода; фосфатная группа ДНК; стабильные комплексы; квантово-химические расчеты.

The interaction of small molecules with DNA double helix is the subject of special interest along last years. It is well known that some molecules can perform the important functions on regulation of the genetic activity of DNA in living cells. The understanding of mechanisms of these molecules action on DNA can be used for the development of new treatment methods and pharmacological drugs.

The interaction of hydrogen peroxide molecule with DNA has the significant interest. The peroxide molecules can be formed in water medium during the process of water radiolysis (see, for example, [2]) as a long-living product [3, 4]. Water radiolysis takes place when water volume is irradiated by different particles. The molecules of water medium decay

into ions, radicals and molecular products (reactive oxygen species). In living cell radiolysis products interact with DNA macromolecule [5]. It is considered, that the most dangerous product is hydroxyl radical, because it induces double strand breaks which means complete destruction of DNA [6]. However, it is shown in Monte Carlo calculations [3, 4] that OH-radicals recombine quickly (during physico-chemical stage of radiolysis [2]) and so they interact with DNA macromolecule only if situated in close proximity. On the contrary, the hydrogen peroxide molecule can exist in intracellular medium for longer time and can diffuse on significant distances. So the  $\text{H}_2\text{O}_2$  molecule has bigger probability to “find” DNA macromolecule in solution after irradiation. If peroxide is situated closely to DNA backbone it can decay into OH-radical via Fenton-type reaction [7] and thus damage it or it can somehow block DNA transcription. Such a mechanism of possible DNA damage in particle therapy was proposed in [1]. As considered, the DNA phosphate group can be the most probable site of interaction with molecules of medium, and particularly the  $\text{H}_2\text{O}_2$  molecules.

It can be expected that study of interaction of hydrogen peroxide with DNA phosphate group can improve the methods of cancer treatment. Particle cancer therapy has especially good results when protons or heavy charged ions are used, because of well-known Bragg effect [8]. There are mechanisms of DNA damage in the processes of particle cancer therapy [9], among which are damage by secondary electrons and free radicals or the processes with shock waves [10]. But the question about physical mechanism which causes destruction of cancer cells remains yet opened [11]. It should be noted that in the works about alternative method of cancer therapy [12], the emphasis is made on hydrogen peroxide molecules forming in the cellular medium after injection of ascorbic acid. And also there are some experimental conclusions about selective damaging of cancer cells by hydrogen peroxide apart from healthy [13].

In the present work the quantum-chemical calculations are carried out for complexes which consist of hydrogen peroxide and water molecules, phosphate group and sodium counterion. We consider isolated phosphate group, but charges on its atoms are taken to correspond to the distribution of charges on the atoms of the sugar-phosphate DNA backbone. We take into account sodium counterion, because under physiological conditions DNA phosphate groups are usually neutralized by counterions of the solution. The optimized geometries of single molecules, double and triple complexes are obtained, energies are calculated. The Hartree-Fock, density functional theory and MP2 methods are used. Results presented in this work continue our earlier calculations from [1], where atom-atom potential functions method was used.

The calculations made in the present work are more accurate than calculations from [1]. The geometry optimizations in complexes provided with much better quality, the flexibility of molecules is taken into account (molecules can slightly change their structure in different complexes), all atoms in phosphate group are considered.

### METHOD OF CALCULATION

Quantum-chemical calculations of single molecules and complexes are performed with Hartree-Fock theory (HF/6-31+G(d,p)), Møller-Plesset perturbation theory (MP2/6-31+G(d,p)) and density functional theory (B3LYP/6-31+G(d,p)) together with geometry optimizations. The Gaussian 03 software is used in calculations [14], Facio software is used for visualization [15].

Thus, as a first step, the geometry optimizations for single objects (molecules  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}$ , phosphate group) are made. Then the calculations are made for double complexes –  $\text{H}_2\text{O}_2\text{-PO}_4^-$ ,  $\text{H}_2\text{O-PO}_4^-$ ,  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}$  and  $\text{Na}^+\text{-PO}_4^-$ . Geometry optimizations are performed, interaction energies are calculated. And, at last, there are calculations of energies and geometries for triple complexes  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}_2\text{-PO}_4^-$ ,  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O-PO}_4^-$ . The main purpose of



this work is comparison of peroxide-phosphate interaction with water-phosphate interaction with and without sodium counterion.

In the present work we consider the interaction energy of double complex AB as a difference between electronic energy of AB and its components A and B

$$\Delta E_{AB} = E_{AB}(AB) - E_A(A) - E_B(B). \quad (1)$$

For triple complex ABC we have

$$\Delta E_{ABC} = E_{ABC}(ABC) - E_A(A) - E_B(B) - E_C(C). \quad (2)$$

The basis set is presented in brackets. To avoid the basis set superposition error the counterpoise correction is made [16]

$$\Delta E_{AB}^{CP} = E_{AB}(AB) - E_A(AB) - E_B(AB), \quad (3)$$

$$\Delta E_{ABC}^{CP} = E_{ABC}(ABC) - E_A(ABC) - E_B(ABC) - E_C(ABC). \quad (4)$$

Also deformation energy should be introduced because of difference between the geometries of isolated molecules and of those within complexes

$$E_{def} = \sum_i (E_i^{complex} - E_i^{isolated}), \quad (5)$$

which is a difference between electronic energies of molecule in complex and isolated molecule. Then interaction energy in complex can be calculated by formula

$$\Delta E = \Delta E^{CP} + E_{def}. \quad (6)$$

In the present work we used formula (6) to calculate interaction energies in double complexes ( $\text{H}_2\text{O}_2\text{-PO}_4^-$ ,  $\text{H}_2\text{O-PO}_4^-$ ,  $\text{Na}^+\text{-PO}_4^-$ ,  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}$ ) and triple complexes ( $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}_2\text{-PO}_4^-$ ,  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O-PO}_4^-$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

Geometry optimizations of hydrogen peroxide and water molecules, and phosphate group  $\text{PO}_4^-$  are performed in methods HF/6-31+G(d,p), MP2/6-31+G(d,p), B3LYP/6-31+G(d,p).

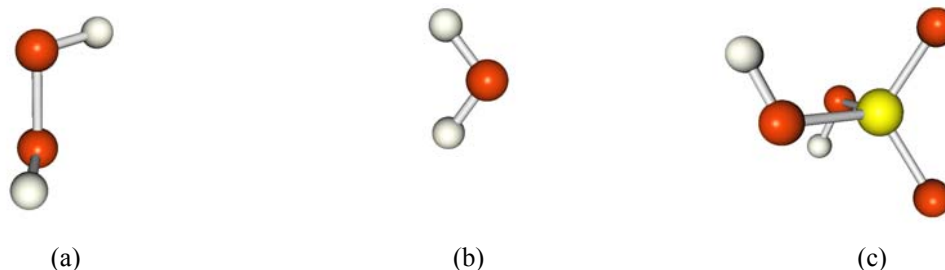


Fig. 1. Hydrogen peroxide (a), water (b) molecules, phosphate group (c).  
Oxygen atoms are shown in red, hydrogen – white, phosphor – yellow.

The hydrogen peroxide molecule (Fig. 1(a)) is symmetric and characterized by distances between two oxygen atoms and between oxygen and hydrogen atoms, by two equal angles O-

O-H and by dihedral angle H-O-O-H. The values of these distances and angles obtained from geometry optimizations are presented in Table 1.

Table 1. Geometry of hydrogen peroxide molecule  $\text{H}_2\text{O}_2$

	<b>O-O</b> (Å)	<b>H-O</b> (Å)	<b>∠O-O-H</b> (°)	Dihedral angle (°)
HF/ 6-31+G(d,p)	1.39	0.95	102.7	116.8
B3LYP/ 6-31+G(d,p)	1.46	0.97	100.3	119.4
MP2/ 6-31+G(d,p)	1.47	0.97	99	121.4

The distances and angles shown in Table 1 are close to each other for different methods of optimizations, and also they are comparable with values obtained in [17] by similar calculations. It should be mentioned that the dihedral angle H-O-O-H can be very sensitive to environment. Thus it can be considerably different for isolated molecule and molecule in complex.

The calculations for water molecule are analogous, results are presented in Table 2. These results are also close to each other for different types of calculations.

The geometry of phosphate group is more complicated (Fig. 1(c)). So we do not present all distances and angles, just the distance between two oxygen atoms, which contain negative charge. Group  $\text{PO}_4^-$  considered as a part of DNA backbone, but two hydrogen atoms are placed instead of bounds to backbone (towards atoms C3' and C5'). The charge of  $\text{PO}_4^-$  is  $-1$  of elementary electronic charge. It is interesting to study the interaction of hydrogen peroxide and water molecules, sodium counterion relatively to two negatively charged oxygen atoms. The distances between these oxygen atoms are shown in Table 2 for different methods of calculations, though they are nearly equal.

Table 2. Geometry of water molecule and distance between two oxygen atoms in  $\text{PO}_4^-$

	<b>H-O</b> (Å)	<b>∠O-O-H</b> (°)	<b>O-O in <math>\text{PO}_4^-</math></b> (Å)
HF/6-31+G(d,p)	0.94	107.2	2.62
B3LYP/6- 31+G(d,p)	0.97	105.7	2.69
MP2/6-31+G(d,p)	0.96	105.4	2.70

### Double complexes

Complexes  $\text{H}_2\text{O}_2\text{-PO}_4^-$ ,  $\text{H}_2\text{O-PO}_4^-$ ,  $\text{Na}^+\text{-PO}_4^-$ ,  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}_2$  and  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}$  are considered. The geometry optimizations are carried out for these complexes, energies of interaction are calculated.

Let us consider the double complexes  $\text{H}_2\text{O}_2\text{-PO}_4^-$  and  $\text{H}_2\text{O-PO}_4^-$ . Their optimized geometries are shown on Fig. 2. It should be mentioned, that we take into account only complexes, where peroxide or water molecules are situated near two "opened" oxygen atoms (on the right side of  $\text{PO}_4^-$  on Fig. 2), because group  $\text{PO}_4^-$  is considered as a part of DNA backbone.

Double complexes have the geometries (Fig. 2) where hydrogen peroxide or water molecule is situated almost symmetrically near oxygen atoms of  $\text{PO}_4^-$ . In the case of hydrogen peroxide there are two hydrogen bonds (upper and lower symmetrically), because average distance between neighbor oxygen atom (from  $\text{PO}_4^-$ ) and hydrogen (from  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) is

1.85 Å, angle O-H-O 163°. The hydrogen peroxide molecule is compressed – its dihedral angle smaller than in Table 1 and is close to 55°. Such a change in dihedral angle makes a contribution into deformation energy (about 3-4 kcal/mol for different methods). On the contrary, the water molecule does not form hydrogen bonds with oxygen atoms of  $\text{PO}_4^-$  because of its smaller size, but it is also situated symmetrically to them. For water molecule the symmetrical distances  $\text{O}(\text{PO}_4^-)\text{-H}(\text{H}_2\text{O})$  are more than 2.1 Å and angles O-H-O are near 145° and these geometries are insufficient for forming of hydrogen bonds.

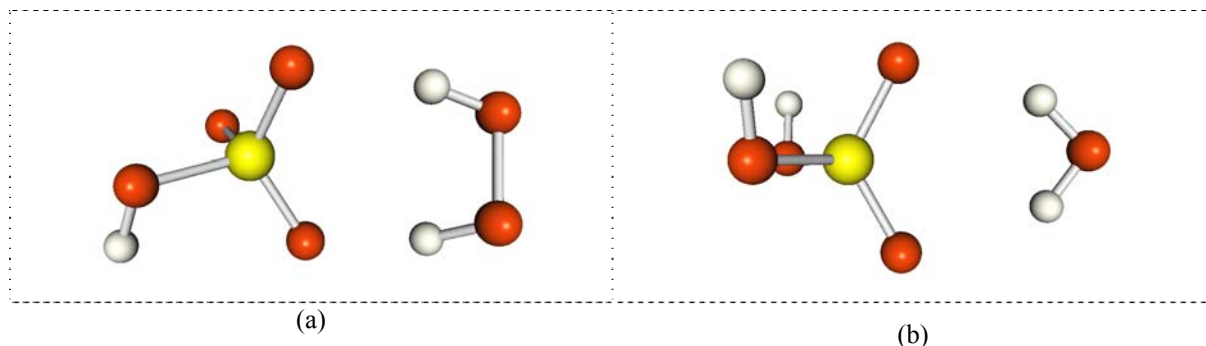


Fig. 2. Complexes  $\text{H}_2\text{O}_2\text{-PO}_4^-$  (a) and  $\text{H}_2\text{O-PO}_4^-$  (b).

Interaction energies of complexes  $\text{H}_2\text{O}_2\text{-PO}_4^-$  and  $\text{H}_2\text{O-PO}_4^-$  are shown in Table 3. From Table 4 one can see that the energies of complex with hydrogen peroxide molecule and phosphate group are larger for every method of calculation. Complexes of water molecule and  $\text{PO}_4^-$  have smaller energy. The hydrogen peroxide molecule is larger than water molecule and it is more convenient for hydrogen peroxide to form two symmetric hydrogen bonds with phosphate group.

Table 3. Energies of  $\text{H}_2\text{O}_2\text{-PO}_4^-$  and  $\text{H}_2\text{O-PO}_4^-$  double complexes (energies – kcal/mol)

	$\text{H}_2\text{O}_2\text{-PO}_4^-$	$\text{H}_2\text{O-PO}_4^-$
HF/6-31+G(d,p)	-20.8	-14.8
B3LYP/6-31+G(d,p)	-21.3	-14.4
MP2/6-31+G(d,p)	-21.4	-15.0

The double complexes with sodium counterion are also considered in the present work. These are complexes  $\text{Na}^+\text{-PO}_4^-$ ,  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}_2$  and  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}$ . Optimized geometries of complexes are shown on Fig. 3. In the complex of sodium counterion and phosphate group the distance  $\text{Na}^+\text{-P}$  is 2.68 Å (mean for three methods). Distances  $\text{Na}^+\text{-O}$  for complexes  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}_2$  and  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}$  are 2.38 Å and 2.24 Å correspondingly. For comparison, the distances calculated by atom-atom potential function method [1] were 2.8 Å ( $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}_2$  complex) and 2.7 Å ( $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}$  complex).

The energies of  $\text{Na}^+\text{-PO}_4^-$ ,  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}_2$  and  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}$  complexes are shown in Table 4. It should be mentioned that the complex of sodium and phosphate group is the most strongly bounded, whereas molecules of peroxide and water interact with sodium counterion almost equally. The results of previous calculations [1] gave the energies -122 kcal/mol ( $\text{Na}^+\text{-PO}_4^-$ ), -14 kcal/mol ( $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}_2$ ) and -12 kcal/mol ( $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}$ ).

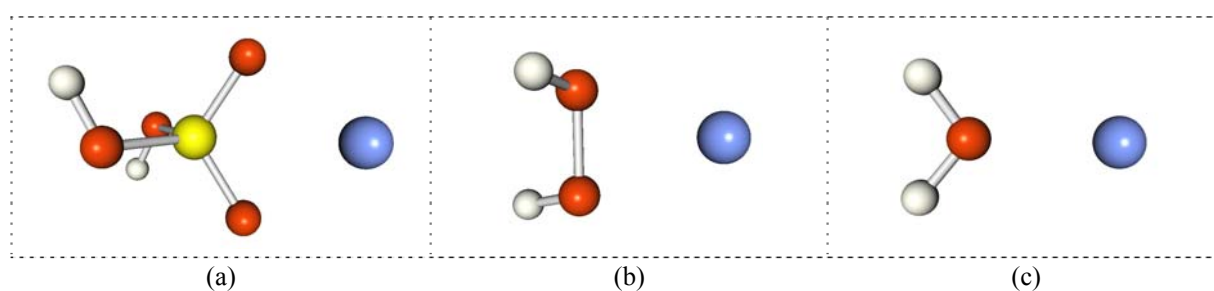


Fig. 3. Complexes  $\text{Na}^+\text{-PO}_4^-$  (a),  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}_2$  (b), and  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}$  (c). Sodium counterion is shown in blue.

Table 4. Energies of complexes  $\text{Na}^+\text{-PO}_4^-$ ,  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}_2$  and  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}$  (kcal/mol)

	$\text{Na}^+\text{-PO}_4^-$	$\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}_2$	$\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}$
HF/6-31+G(d,p)	-135.9	-24.1	-24.9
B3LYP/6-31+G(d,p)	-134.8	-24.4	-25.0
MP2/6-31+G(d,p)	-130.7	-22.6	-23.6

The energies of  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}_2$  complex obtained from quantum-chemical calculations are slightly smaller than energies of  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}$  complex, whereas for calculation with atom-atom potential functions method these values are vice versa. This difference can be explained by flexibility of hydrogen peroxide molecule. In quantum-chemical calculation  $\text{H}_2\text{O}_2$  can change its geometry (especially, dihedral angle) near the counterion, while the geometry change in water molecule is less significant. In method used in [1] the molecules  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}$  were rigid and did not change their geometries.

### Triple complexes

Triple complexes  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}_2\text{-PO}_4^-$  and  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O-PO}_4^-$  is studied. It is interesting to add sodium counterion to double complexes  $\text{H}_2\text{O}_2\text{-PO}_4^-$  and  $\text{H}_2\text{O-PO}_4^-$ , because sodium interacts with phosphate stronger than molecules  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}$ , and sodium counterions are always present in the solution in natural conditions. Optimized structures of such complexes are shown on Fig. 4. We consider sodium counterion and hydrogen peroxide or water molecules to be placed near two “opened” oxygen atoms of  $\text{PO}_4^-$  (to the right of phosphate group on Fig. 4).

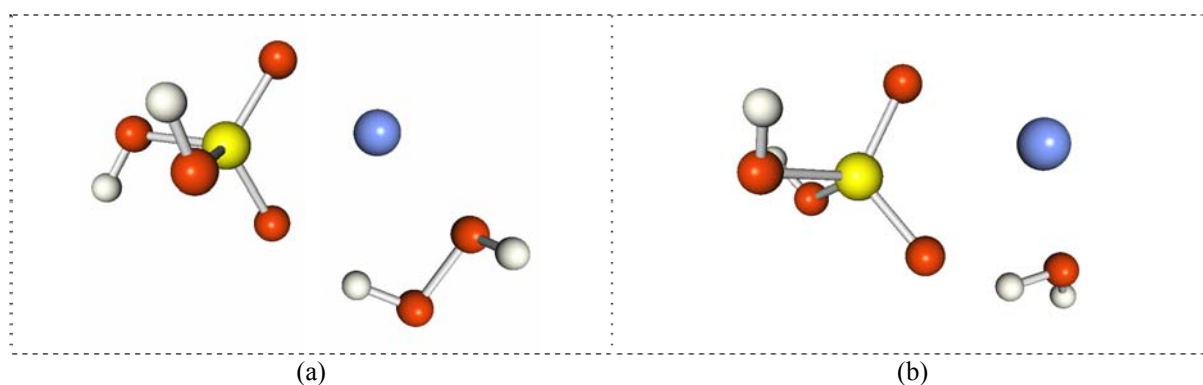


Fig. 4. Complexes  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O}_2\text{-PO}_4^-$  (a) and  $\text{Na}^+\text{-H}_2\text{O-PO}_4^-$  (b).

These geometries are almost similar for different type of calculation. Geometry optimization shows that adding of sodium counterion into double complexes  $\text{H}_2\text{O}_2\text{-PO}_4^-$  and  $\text{H}_2\text{O-PO}_4^-$  leads to displacement of peroxide or water molecule while sodium is situated

closer to  $\text{PO}_4^-$ . Molecule  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\text{H}_2\text{O}$ ) forms one hydrogen bond with phosphate group. It is natural that sodium counterion is situated close to  $\text{PO}_4^-$ , because it has positive charge and oxygen atoms of  $\text{PO}_4^-$  have negative and also sodium repulses positively charged hydrogen atoms of peroxide or water molecules which form hydrogen bonds with  $\text{PO}_4^-$ . It should be noted that in previous work [1] optimal geometries were different, but optimization with efficient quantum-chemical methods shows that such a geometries are not minima of potential surface and geometries (Fig. 4) are more energetically convenient. Interaction energies of complexes  $\text{Na}^+-\text{H}_2\text{O}_2-\text{PO}_4^-$  and  $\text{Na}^+-\text{H}_2\text{O}-\text{PO}_4^-$  are shown in Table 5. One can see that both complexes are bound. Complex with hydrogen peroxide is bound slightly stronger than complex with water molecule.

Table 5. Energies of complexes  $\text{Na}^+-\text{H}_2\text{O}_2-\text{PO}_4^-$  and  $\text{Na}^+-\text{H}_2\text{O}-\text{PO}_4^-$  (energies – kcal/mol)

	$\text{Na}^+-\text{H}_2\text{O}_2-\text{PO}_4^-$	$\text{Na}^+-\text{H}_2\text{O}-\text{PO}_4^-$
HF/6-31+G(d,p)	-154.0	-151.4
B3LYP/6-31+G(d,p)	-154.0	-152.1
MP2/6-31+G(d,p)	-148.2	-148.0

These results are qualitatively similar to results from [1], obtained in atom-atom potential functions method, where energies of complexes  $\text{Na}^+-\text{H}_2\text{O}_2-\text{PO}_4^-$  and  $\text{Na}^+-\text{H}_2\text{O}-\text{PO}_4^-$  were -130.3 kcal/mol and -129.2 kcal/mol correspondingly. But there are different geometries of complexes [1]. The triple complex  $\text{Na}^+-\text{H}_2\text{O}_2-\text{PO}_4^-$  with geometry similar to [1] is not optimal and has energy near -147 kcal/mol, whereas its energy in geometry Fig. 4(a) is -154 kcal/mol for HF/6-31+G(d,p) calculation.

## CONCLUSIONS

The main result of the present work is showing that hydrogen peroxide molecule can form stable complexes with phosphate group of DNA with or without sodium counterion. Energetically it is similar to water molecule. But since the  $\text{H}_2\text{O}_2$  molecule has bigger mass it can stay near DNA backbone for longer time. Thus, there are two possible ways for peroxide to interact with DNA backbone near phosphate groups – decay via Fenton reaction or direct transcription blocking.

As a future prospect we plan to investigate such complexes with water solution model to obtain results more close to natural conditions. It is also interesting to analyze the behavior of hydrogen peroxide molecules near DNA within molecular dynamics calculation.

## ACKNOWLEDGMENTS

The present work is partially supported by the program “Grid infrastructure and Grid technologies for scientific and applied applications” (project number 0117U003429).

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

## Author’s ORCID ID

D.V. Piatnytskyi  0000-0002-8809-005X

## REFERENCES

1. Piatnytskyi D. V., Zdorevskyi O. O., Perepelytsya S. M., Volkov S. N. Understanding the mechanism of DNA deactivation in ion therapy of cancer cells: hydrogen peroxide action // *Eur. Phys. J. D.* 2015. Vol. 69, P. 255.
2. Le Caer S. Water Radiolysis: Influence of oxide surfaces on  $\text{H}_2$  production under ionizing radiation // *Water.* 2011. Vol. 3, P. 235–253.

3. Kreipl M. S., Friedland W., Paretzke H. G. Time- and space-resolved Monte Carlo study of water radiolysis for photon, electron and ion irradiation // *Radiat. Environ. Biophys.* 2009. Vol. 48, P. 11–20.
4. Uehara S., Nikjoo H. Monte Carlo simulation of water radiolysis for low-energy charged particles // *J. Radiat. Res.* 2006. Vol. 47, P. 69–81.
5. Manda G., Nechifor M. T., Neagu T.-M. Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies // *Current Chemical Biology.* 2009. Vol. 3, P. 342–366.
6. Timofeev-Ressovsky N. W., Savich A. V., Shal'nov M. I. Introduction to Molecular Radiobiology: Physico-Chemical Foundations. Moscow: Medicina, 1981. 320 p. (in Russian)
7. Fenton H. J. H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron // *J. Chem. Soc., Trans.* 1894. Vol. 65, P. 899–911.
8. Kraft G. Tumor therapy with heavy charged particles // *Progress in Particle and Nuclear Physics.* 2000. Vol. 45, P. S473–S544.
9. Solov'yov A. V., Surdutovich E., Scifoni E., Mishustin I., Greiner W. Physics of ion beam cancer therapy: A multiscale approach / *Phys. Rev. E.* 2009. Vol. 79, P. 011909.
10. Surdutovich E., Yakubovich A. V., Solov'yov A. V. Biodamage via shock waves initiated by irradiation with ions // *Sci. Rep.* 2013. Vol. 3, P. 1289.
11. Krämer M., Durante M. Ion beam transport calculations and treatment plans in particle therapy // *Eur. Phys. J. D.* 2010. Vol. 60, P. 195–202.
12. Parrow N. L., Leshin J. A., Levine M. Parenteral ascorbate as a cancer therapeutic: a reassessment based on pharmacokinetics // *Antioxidants & Redox Signaling.* 2013. Vol. 19, N 17, P. 2141–2156.
13. Chen Q., Espey M. G., Krishna M. C., Mitchell J. B., Corpe C. P., Buettner G. R., Shacter E., Levine M. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues / *PNAS.* 2005. Vol. 102, N 38, P. 13604–13609.
14. Gaussian 03, Revision C.02. Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Montgomery Jr. J. A., Vreven T., Kudin K. N., Burant J. C., Millam J. M., Iyengar S. S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M., Scalmani G., Rega N., Petersson G. A., Nakatsuji H., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Klene M., Li X., Knox J. E., Hratchian H. P., Cross J. B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O., Austin A. J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Ayala P. Y., Morokuma K., Voth G. A., Salvador P., Dannenberg J. J., Zakrzewski V. G., Dapprich S., Daniels A. D., Strain M. C., Farkas O., Malick D. K., Rabuck A. D., Raghavachari K., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cui Q., Baboul A. G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B. B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Martin R. L., Fox D. J., Keith T., Al-Laham M. A., Peng C. Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P. M. W., Johnson B., Chen W., Wong M. W., Gonzalez C., and Pople J. A., Gaussian Inc., Wallingford CT, 2004.
15. Suenaga M. Facio: new computational chemistry environment for PC GAMESS // *Journal of Computer Chemistry, Japan.* 2005. Vol. 4 (1), P. 25–32.
16. Boys S. F., Bernardi F. The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors // *Mol. Phys.* 1970. Vol. 19 (4), P. 553–566.
17. Gonzalez L., Mo O., Yanez M. High-level *ab initio* versus DFT calculations on (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O complexes as prototypes of multiple hydrogen bond systems // *J. Comput. Chem.* 1997. Vol. 18, P. 1124–1135.

#### REFERENCES

1. Piatnytskyi, D. V., Zdorevskyi, O. O., Perepelytsya, S. M., & Volkov, S. N. (2015). Understanding the mechanism of DNA deactivation in ion therapy of cancer cells: hydrogen peroxide action. *Eur. Phys. J. D*, 69, 255. doi: 10.1140/epjd/e2015-60210-9.
2. Le Caer, S. (2011). Water Radiolysis: Influence of oxide surfaces on H<sub>2</sub> production under ionizing radiation. *Water*, 3, 235–253. doi: 10.3390/w3010235.
3. Kreipl, M. S., Friedland, W., & Paretzke, H. G. (2009). Time- and space-resolved Monte Carlo study of water radiolysis for photon, electron and ion irradiation. *Radiat. Environ. Biophys.*, 48, 11–20. doi: 10.1007/s00411-008-0194-8.
4. Uehara, S., & Nikjoo, H. (2006). Monte Carlo simulation of water radiolysis for low-energy charged particles. *J. Radiat. Res.*, 47, 69–81. doi: 10.1269/jrr.47.69.
5. Manda, G., Nechifor, M. T., & Neagu, T.-M. (2009). Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies. *Current Chemical Biology*, 3, 22–46. doi: 10.2174/2212796810903010022.
6. Timofeev-Ressovsky, N. W., Savich, A. V., & Shal'nov, M. I. (1981). *Vvedenie v molekulyarnuyu radiobiologiyu: fiziko-himicheskie osnovy.* Moskva: Meditsina. (in Russian).
7. Fenton, H. J. H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. (1894). *J. Chem. Soc., Trans.*, 65, 899–911. doi: 10.1039/CT8946500899.

8. Kraft, G. Tumor therapy with heavy charged particles. (2000). *Progress in Particle and Nuclear Physics*, 45, S473–S544. doi: 10.1016/S0146-6410(00)00112-5.
9. Solov'yov, A. V., Surdutovich, E., Scifoni, E., Mishustin, I., & Greiner, W. (2009). Physics of ion beam cancer therapy: A multiscale approach. *Phys. Rev. E*, 79, 011909. doi: 10.1103/PhysRevE.79.011909.
10. Surdutovich, E., Yakubovich, A. V., & Solov'yov, A. V. Biodamage via shock waves initiated by irradiation with ions. (2013). *Sci. Rep.*, 3, 1289. doi: 10.1038/srep01289.
11. Krämer, M., & Durante, M. Ion beam transport calculations and treatment plans in particle therapy. (2010). *Eur. Phys. J. D*, 60, 195–202. doi: 10.1140/epjd/e2010-00077-8.
12. Parrow, N. L., Leshin, J. A., & Levine, M. Parenteral ascorbate as a cancer therapeutic: a reassessment based on pharmacokinetics. (2013). *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(17), 2141–2156. doi: 10.1089/ars.2013.5372.
13. Chen, Q., Espey, M. G., Krishna, M. C., Mitchell, J. B., Corpe, C. P., Buettner, G. R., ... Levine, M. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. (2005). *PNAS*, 102(38), 13604–13609. doi: 10.1073/pnas.0506390102.
14. Gaussian 03, Revision C.02. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., ... Pople, J. A., Gaussian Inc., Wallingford CT, 2004.
15. Suenaga, M. Facio: new computational chemistry environment for PC GAMESS. (2005). *Journal of Computer Chemistry, Japan*, 4(1), 25–32. doi: 10.2477/jccj.4.25.
16. Boys, S. F., & Bernardi, F. The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. (1970). *Mol. Phys.*, 19(4), 553–566. doi: 10.1080/00268977000101561.
17. Gonzalez, L., Mo, O., & Yanez, M. High-level *ab initio* versus DFT calculations on  $(\text{H}_2\text{O}_2)_2$  and  $\text{H}_2\text{O}_2\text{-H}_2\text{O}$  complexes as prototypes of multiple hydrogen bond systems. (1997). *J. Comput. Chem.*, 18, 1124–1135. doi: 10.1002/(SICI)1096-987X(19970715)18:9<1124::AID-JCC2>3.0.CO;2-T.



<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2018-39-02>

UDC 577.32:615.28:544.173

## STUDY OF INTERMOLECULAR INTERACTIONS OF ANTIVIRAL AGENT TILORONE WITH RNA AND NUCLEOSIDES

V.A. Pashynska<sup>1</sup>, N.M. Zholobak<sup>2</sup>, M.V. Kosevich<sup>1</sup>, A. Gomory<sup>3</sup>, P.K. Holubiev<sup>4</sup>,  
A.I. Marynin<sup>4</sup>

<sup>1</sup> B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, 47, Nauky Ave., Kharkov, 61103, Ukraine

e-mail: [pashynska@ilt.kharkov.ua](mailto:pashynska@ilt.kharkov.ua)

<sup>2</sup> D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine, 154, Acad. Zabolotnoho str., 03680, Kyiv, Ukraine

e-mail: [n.zholobak@gmail.com](mailto:n.zholobak@gmail.com)

<sup>3</sup> Institute of Organic Chemistry of Research Centre for Natural Sciences of the Hungarian Academy of Sciences, Magyar tudosok korutja, 2, Budapest, H-1117, Hungary;

<sup>4</sup> National University of Food Technologies, 68, Volodymyrska str., 01601, Kyiv, Ukraine

Submitted January 29, 2017

Accepted February 23, 2018

**Background:** While antiviral and interferon-inducing agent tilorone is used as a reactant of a number of popular pharmacological preparations, the molecular mechanisms of its biological antiviral activity are under discussions among the specialists. That is why the molecular level model studies of interactions of tilorone with targeting biomolecules and their components are considered to be urgent and useful for understanding the molecular mechanisms of the agent biological activity.

**Objectives:** The current model study is devoted to mechanistic examining of the intermolecular interactions of tilorone with its possible biomolecular targets which are believed to be nucleic acids and such their components as nucleosides containing purine or pyrimidine nitrogen bases.

**Materials and methods:** The objects of the study are model systems composed of tilorone dihydrochloride (Til•2HCl) and its potential targeting biomolecules: single-stranded RNA (ssRNA) obtained from *Saccharomyces cerevisiae* yeast or nucleosides - adenosine (Ado), thymidine (Thd), or uridine (Urd). Dynamic light scattering (DLS) measurements aimed at observation of drug-biomolecules aggregation is applied to the system (tilorone+ssRNA) (1:10 molar ratio) in RNA-free phosphate buffered saline solution (with 10% fetal bovine serum). Electrospray ionization (ESI) mass spectrometry is used to examine the intermolecular interactions in the binary (tilorone + nucleoside) (Ado, or Thd, or Urd in 1:10 molar ratio) and triple (tilorone + Ado + Urd) (1:10:10 molar ratio) systems dissolved in polar solvent methanol.

**Results:** The obtained DSL data demonstrate that under conditions similar to the physiological ones, introduction of tilorone into the ssRNA solution results in formation of tilorone+ssRNA aggregates which more than 10 times exceed in size the particles observed in the ssRNA solution itself. The ESI mass spectrometry experiments reveal that while the mass spectra of all studied (tilorone + nucleoside) model systems contain ions characteristic of the individual components of the mixtures, in the spectra of (tilorone + Urd) system the ions of stable ion-molecular clusters of uridine with tilorone dication  $\text{Urd}\cdot\text{Til}\cdot 2\text{H}^{2+}$  are recorded. The examining of the three-component model system (tilorone + Ado + Urd) testifies to the selectivity of tilorone binding: while the peak of noncovalent complex of  $\text{Urd}\cdot\text{Til}\cdot 2\text{H}^{2+}$  is detected, any peaks of the complexes of Ado with tilorone are not found in the mass spectrum.

**Conclusions:** Formation of large-scale molecular aggregates of tilorone with ssRNA in the solutions which are similar to the physiological solution in physical and chemical characteristics is revealed in the performed DLS investigation. Creation of stable  $\text{Urd}\cdot\text{Til}\cdot 2\text{H}^{2+}$  noncovalent complexes in (tilorone + nucleoside) model systems was demonstrated by ESI mass spectrometry, while the complexes of tilorone with Ado and Thd are not detected in the experiments. It testifies to the possibility of formation of stable noncovalent complexes of tilorone with ssRNA and their components in biological systems, and pointed at Urd as one of the potential centers of specific binding of RNA molecules with tilorone.

**KEY WORDS:** tilorone; RNA; nucleosides; intermolecular interactions; dynamic light scattering; mass spectrometry.



**ВИВЧЕННЯ МІЖМОЛЕКУЛЯРНОЇ ВЗАЄМОДІЇ АНТИВІРУСНОГО АГЕНТУ  
ТИЛОРОНУ З РНК ТА НУКЛЕОЗИДАМИ****Пашинська В.А.<sup>1</sup>, Жолобак Н.М.<sup>2</sup>, Косевич М.В.<sup>1</sup>, Гоморі А.<sup>3</sup>,  
Голубєв П.К.<sup>4</sup>, Маринін А. І.<sup>4</sup>**<sup>1</sup>Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна Національної академії наук України,  
47, пр. Науки, Харків, 61103, Українаe-mail: [pashynska@ilt.kharkov.ua](mailto:pashynska@ilt.kharkov.ua)<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України,  
154, вул. Академіка Заболотного, Київ, 03680, Українаe-mail: [n.zholobak@gmail.com](mailto:n.zholobak@gmail.com)<sup>3</sup>Інститут органічної хімії Наукового центру природничих наук Угорської академії наук,  
Magyar tudosok korutja, 2, Budapest, H-1117, Hungary;<sup>4</sup>Національний університет харчових технологій, 68, вул. Володимирська, Київ, 0160, Україна

**Актуальність.** Незважаючи на застосування антивірусного та інтерферон-індукуючого агента тилорону в якості діючої речовини ряду сучасних фармакологічних препаратів, молекулярні механізми його антивірусної дії залишаються предметом наукової дискусії. Тому дослідження на молекулярному рівні взаємодії тилорону з біомолекулами-мішенями та їх компонентами є актуальними та важливими з точки зору встановлення молекулярних механізмів його біологічної активності.

**Мета роботи.** Метою роботи стало вивчення міжмолекулярних взаємодій тилорону з потенційними біомолекулами-мішенями: нуклеїновими кислотами та їх компонентами – нуклеозидами, що можуть містити, як пуринові, так і піримідинові азотисті основи.

**Матеріали і методи.** Об'єктами дослідження було обрано модельні системи, що містили тилорону дигідрохлорид та потенційні молекули-мішені одноланцюгові РНК (ssRNA), які було отримано з дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, або нуклеозиди: аденозин (Ado), тимідин (Thd), чи уридин (Urd). Маючи за мету вивчення можливої агрегації тилорону з біомолекулами, методом динамічного розсіювання світла було досліджено систему (тилорон+РНК) (молярне співвідношення компонентів 1:10) у розчині, в складі якого – натрій-фосфатний буфер з додаванням 10% сироватки крові теляти. Метод мас-спектрометрії з іонізацією електророзпиленням було застосовано для дослідження міжмолекулярних взаємодій в модельних бінарних системах (тилорон+нуклеозид) (Ado або Thd, або Urd, молярне співвідношення 1:10) та трьохкомпонентній системі (тилорон + Ado + Urd) (молярне співвідношення 1:10:10), які було розчинено в полярному розчиннику – метанолі.

**Результати.** Дані, отримані методом динамічного розсіювання світла, свідчать, що в умовах, наближених до фізіологічних, введення тилорону у розчин РНК призводить до формування в системі молекулярних агрегатів тилорон+ssRNA, які у 10 разів перевищують за розміром частинки, присутні у вихідному розчині РНК. Результати мас-спектрометричного експерименту показують, що мас-спектри усіх досліджених бінарних систем (тилорон+нуклеозид) містять піки іонів, які характерні для індивідуальних компонентів сумішей, а в спектрі системи (тилорон + Urd) поряд з вищезазначеним реєструється досить інтенсивний сигнал стабільного іон-молекулярного кластеру  $\text{Urd}\cdot\text{Til}\cdot 2\text{H}^{2+}$ . Мас-спектрометричне дослідження трьохкомпонентної модельної системи (тилорон + Ado + Urd) підтвердило дані щодо можливої вибіркової зв'язування тилорону з нуклеозидами, оскільки при наявності у спектрі сигналу нековалентного комплексу  $\text{Urd}\cdot\text{Til}\cdot 2\text{H}^{2+}$  піки кластерів Ado з тилороном в спектрі не виявлено.

**Висновки.** Методом динамічного розсіювання світла показано формування великорозмірних молекулярних агрегатів тилорону з РНК у розчині, який за фізико-хімічними параметрами наближений до фізіологічного. В дослідженнях методом мас-спектрометрії з іонізацією електророзпиленням виявлено утворення стабільних нековалентних комплексів  $\text{Urd}\cdot\text{Til}\cdot 2\text{H}^{2+}$  в модельних системах (тилорон + нуклеозид), утворення комплексів тилорону з Ado чи Thd не зареєстровано. Отримані дані свідчать про можливість формування стабільних нековалентних комплексів тилорону з одноланцюговими РНК та їх компонентами в біологічних системах та вказують на Urd як на один з потенційних центрів специфічного зв'язування молекул РНК з тилороном.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** тилорон; РНК; нуклеозиди; міжмолекулярна взаємодія; динамічне розсіювання світла; мас-спектрометрія.

## ИЗУЧЕНИЕ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТИВОВИРУСНОГО АГЕНТА ТИЛОРОНА С РНК И НУКЛЕОЗИДАМИ

Пашинская В.А.<sup>1</sup>, Жолобак Н.М.<sup>2</sup>, Косевич М.В.<sup>1</sup>, Гомори А.<sup>3</sup>,  
Голубев П.К.<sup>4</sup>, Маринин А.И.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина Национальной академии наук Украины,

47, пр. Науки, Харьков, 61103, Украина, [pashynska@ilt.kharkov.ua](mailto:pashynska@ilt.kharkov.ua);

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного Национальной академии наук Украины, 154, ул. Академика Заболотного, Киев, 03680, Украина, [n.zholobak2018@gmail.com](mailto:n.zholobak2018@gmail.com);

<sup>3</sup>Институт органической химии Научного центра естественных наук Венгерской академии наук, Magyar tudosok korutja, 2, Budapest, H-1117, Hungary;

<sup>4</sup>Национальный университет пищевых технологий, 68, ул. Владимирская, Киев, 0160, Украина

**Актуальность.** Несмотря на использование противовирусного и интерферон-индуцирующего агента тилорона в качестве действующего вещества ряда современных фармакологических препаратов, молекулярные механизмы его противовирусного действия остаются предметом научной дискуссии. Поэтому исследования на молекулярном уровне взаимодействий тилорона с потенциальными биомолекулами-мишенями и их компонентами являются актуальными и важными для определения молекулярных механизмов его биологической активности.

**Цель работы.** Целью настоящей работы стало изучение межмолекулярного взаимодействия тилорона с потенциальными биомолекулами-мишенями: нуклеиновыми кислотами и их компонентами нуклеозидами, содержащими как пуриновые, так и пиримидиновые азотистые основания.

**Материалы и методы.** Объектами исследования были выбраны модельные системы, состоявшие из дигидрохлорида тилорона и его потенциальных молекул-мишеней одноцепочечных РНК (ssRNA), полученных из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, или нуклеозидов: аденозина (Ado), тимидина (Thd), или уридина (Urd). С целью изучения возможной агрегации тилорона с биомолекулами методом динамического светорассеяния была исследована система (тилорон + РНК) (молярное соотношение компонентов 1:10) в растворе натрий-фосфатного буфера с добавлением 10% сыворотки крови телят. Метод масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением был использован для исследования межмолекулярных взаимодействий в модельных бинарных системах (тилорон+нуклеозид) (Ado или Thd, или Urd, молярное соотношение 1:10) и трехкомпонентной системе (тилорон + Ado + Urd) (молярное соотношение 1:10:10), растворенных в полярном растворителе метаноле.

**Результаты.** Данные, полученные методом динамического светорассеяния, свидетельствуют, что в условиях, приближенных к физиологическим, введение тилорона в раствор РНК вызывало формирование в модельной системе агрегатов тилорон+ssRNA, которые более чем в 10 раз превышали по размеру частицы, присутствовавшие в исходном растворе РНК. Экспериментальные результаты, полученные методом масс-спектрометрии, демонстрируют, что масс-спектры всех исследованных бинарных систем (тилорон+нуклеозид) содержат пики ионов, характерных для индивидуальных компонентов смеси, а в спектре системы (тилорон + Urd), наряду с этим, обнаружен достаточно интенсивный сигнал стабильного ион-молекулярного кластера  $\text{Urd}\cdot\text{Til}\cdot 2\text{H}^{2+}$ . Масс-спектрометрическое исследование трехкомпонентной модельной системы (тилорон + Ado + Urd) подтвердило данные о возможной селективности связывания тилорона с нуклеозидами, поскольку при наличии в спектре системы пика нековалентного комплекса  $\text{Urd}\cdot\text{Til}\cdot 2\text{H}^{2+}$  пики кластеров Ado с тилороном в спектре не обнаружены.

**Выводы.** Методом динамического светорассеяния показано формирование крупных молекулярных агрегатов тилорона с РНК в растворе, близком по физико-химическим параметрам к физиологическому. В исследованиях методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением продемонстрировано образование стабильных нековалентных комплексов  $\text{Urd}\cdot\text{Til}\cdot 2\text{H}^{2+}$  в модельных системах (тилорон + нуклеозид). Комплексы тилорона с Ado и Thd в спектрах не зарегистрированы. Полученные данные свидетельствуют о возможности формирования стабильных нековалентных комплексов тилорона с одноцепочечными РНК и их компонентами в биологических системах и указывают на Urd как на один из потенциальных центров специфического связывания молекул РНК с тилороном.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** тилорон; РНК; нуклеозиды; межмолекулярные взаимодействия; динамическое светорассеяние; масс-спектрометрия.

Tilorone is known as an effective antiviral and interferon-inducing agent from the seventies of the last century [1-3]. Tilorone is a reactant of the national pharmaceutical preparation Amixin IC (InterChem SLC, Odessa, Ukraine) and some other preparations which

are widely used in the treatment of a number of viral infections and some other diseases [4-8]. The interferon-inducing action of tilorone and, in particular, stimulation of synthesis of all three types of interferon in a human body is considered as the basic mechanism of the preparation activity [9].

However, in spite of active usage of tilorone in medical practice in Ukraine and some others FSU countries, the discussions about its efficiency and investigations of its pharmacological activity as well as toxicity are currently continued [10-12]. For example, there is investigation testified to miscoordination of interferon-inducing and antiviral effects of tilorone [13]. The problem of molecular mechanisms of antiviral tilorone activity is remaining open since it is still not clear whether this activity is related just to interferon-inducing activity or it is also connected with other intracellular cascade reactions and intermolecular interactions. That is why the molecular level model studies of interactions of tilorone with potential targeting biomolecules and their components are considered to be helpful in understanding the molecular mechanisms of the agent biological activity, which is necessary for development of more efficient and less toxic medicines. In particular, one of the existing hypotheses about nucleic acids and their constituents as potential molecular targets for tilorone binding requires experimental confirmation.

The current study is devoted to examining the mechanistic intermolecular interactions of tilorone with its possible molecular targets in the viral and host cells, which are believed to be RNA and nucleosides. An experimental investigation of biologically significant intermolecular interactions of tilorone with ssRNA and a number of nucleosides (adenosine (Ado), thymidine (Thd), and uridine (Urd)) has been performed by dynamic light scattering (DLS) and electrospray (ESI) ionization mass spectrometry methods.

## MATERIALS AND METHODS

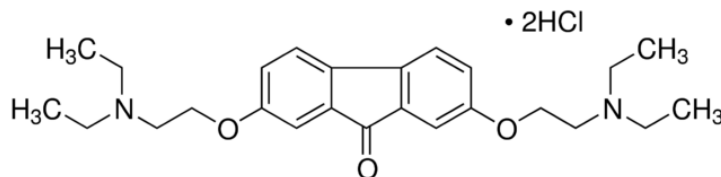
### Materials

Tilorone – 2,7-bis[2-(diethylamino)ethoxy]-9-fluorenone dihydrochloride from the Sigma-Aldrich company (Germany) was used in all experimental investigations. The chemical structure of tilorone dihydrochloride (Til•2HCl) is presented in Scheme 1.

Single-stranded RNA (ssRNA) for DLS experiments was obtained from *Saccharomyces cerevisiae* yeast as described in [14]. The following dilution buffer composition was used as a solvent: RNA-free phosphate buffered saline solution (PBS, Sigma, USA) and 10% (volume to volume) of fetal bovine serum (FBS, Sigma, USA), pH=7.4. After preparation of solutions of tilorone ( $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  or  $2.07\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and ssRNA ( $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in the above mentioned solvent, they were *ex tempore* filtered through  $0.2 \mu\text{m}$  syringe filter Minisart® NML with surfactant-free cellulose acetate (SFCA) (Sartorius AG, Germany). The samples of the model system (tilorone + ssRNA) were prepared just before DLS measurements by mixing of the two solutions to obtain the final molar ratio of tilorone to ssRNA as 1:10.

Adenosine (Ado), thymidine (Thd), and uridine (Urd) nucleosides and methanol (MeOH) for mass spectrometric experiments were purchased from the Sigma-Aldrich company (Germany). Initial solutions of tilorone and nucleosides (5 mM) were prepared in methanol (polar solvent which is commonly used in ESI mass spectrometry) and used for preparation of binary (tilorone + nucleoside) (1:10 molar ratio) and triple (tilorone + Ado + Urd) (1:10:10 molar ratio) model systems. In our study we did not investigate the model systems including guanosine, since from our previous experimental experience we know that guanine derivatives have less solubility in polar solvents in comparison with other nucleosides. It could result in distortion of mass spectrometric information about intermolecular interactions in the multicomponent model systems containing guanosine.

The mixtures were kept at the room temperature for at least 10 minutes before the ESI mass spectrometric analysis. The spraying procedure required dilution of the solutions to be studied to the final 250  $\mu\text{M}$  concentration of the diluted components of the model systems in each solution.



Scheme 1. Tilorone dihydrochloride (Til•2HCl) chemical structure (adapted from the web site of the Sigma-Aldrich supplier <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/220957?lang=en&region=UA>).

### Dynamic light scattering

Dynamic light scattering (DLS) method, which is also known as photon correlation spectroscopy, is a powerful tool for studying the size distribution of molecular particles, and in particular their aggregates, basing on their diffusion behavior in solution. The diffusion coefficient, and hence the hydrodynamic radii calculated from it, depends on the size and shape of the particles present in solutions.

The particles sizes and distribution as well as polydispersity indexes (PDI) of solutions of ssRNA and (tilorone + ssRNA) mixture in the dilution buffer are measured using Malvern Zetasizer Nano-ZS instrument (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) and analyzed by Zetasizer software (Malvern Instruments). For each sample a separate disposable polystyrene cuvette (Sarstedt AG & Co., Germany) is used. Water is used as a dispersant. All DSL measurements are carried out at a standard temperature of +25°C, and three measurements with at least 10 sub-runs are performed for each sample.

The Zetasizer software supplied with the instrument provides a number of analysis tools to study aggregation by the DLS. “Size Distribution by Intensity” and “Size Distribution by Volume” are the most widely used tools. The Size Distribution by Intensity method is suitable for detection of high molecular weight particles including aggregates, which scatter light disproportionately relative to smaller particles, enabling detection despite their relatively low concentration in a sample [15]. The Size Distribution by Volume method is used in our study with the aim to investigate of characteristics of the particles of ssRNA and aggregates in (tilorone + ssRNA) system in the dilution buffer.

### ESI mass spectrometry

Electrospray ionization (ESI) mass spectra of the systems studied are obtained in the positive ion mode using triple quadrupole (QqQ) Micromass Quattro Micro mass spectrometer (Waters, Manchester, UK) equipped with the electrospray ion source. This source is operated in the standard ESI mode. The ESI source temperature is set to 120°C and the desolvation temperature is 200°C. The spraying capillary is operated at 3.5 kV. The cone voltage (CV) value of 10 V is used. The analyzed solutions (20  $\mu\text{L}$ ) are injected into the mass spectrometer at a constant flow rate of 0.2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  of methanol solvent. The ESI spectra are recorded in the mass range of  $m/z$  100-2000. Data acquisition and processing are performed using MassLynx 4.1 software (Waters, Manchester, UK).

## RESULTS AND DISCUSSION

### DSL experimental study

DLS method was applied to examine the size characteristics of the particles present in solutions of ssRNA and (tilorone + ssRNA) system (1:10 molar ratio) in the dilution

buffer. The obtained (PDI) and Size Distribution by Intensity values are summarized in Table 1.

Table 1. Polydispersity Index (PDI), Size Distribution by Intensity and Z-Average data for solutions of ssRNA and (tilorone + ssRNA) in dilution buffer \*

Parameter	ssRNA solution	(tilorone + ssRNA) system (1:10 molar ratio)
PDI	0.192±0.009	0.330±0.062
Size Distribution by Intensity		
Pk 1	Mean Int (d, nm)	152.6±1.99
	Area Int (%)	100
Pk 2	Mean Int (d, nm)	5096±474.4
	Area Int (%)	25±18
Z-Ave	nm	126.43±1.63
		not applicable

\*Notes: the results are presented as Mean and St Deviation; the Size Distribution by Intensity data are represented as a certain number of peaks (Pk 1-2) corresponding to the populations of particles of certain size (Mean Int – d, nm) and their input into the total scattering intensity (Area Int – %). Z-Average size (Z-Ave) is harmonic intensity averaged particle diameter.

The summarized data on the particles Size Distribution by Volume are presented in Table 2.

Table 2. Particles Size Distribution by Volume in solutions of ssRNA and (tilorone + ssRNA)

Solutions	Particles Size Distribution (d, nm ± St Dev) by Volume
ssRNA	132.1±67.1
(tilorone + ssRNA)	1711.0±351.0

Statistic graphs of the particles size distributions in solutions of ssRNA and (tilorone + ssRNA) system by volume are presented in Fig. 1.

The experimental results demonstrate that ssRNA solution in the dilution buffer is quite monodisperse system, since it contains particles of similar sizes. Indeed, the mean diameter of these particles is between 150 and 154 nm and the size distribution is narrow, as is evidenced by the polydispersity index values (ranging from 0.18 to 0.20) (Table 1). The data obtained for PDI and Size Distribution by Intensity for the ssRNA solution most probably point to creation of similar sizes molecules aggregates of ssRNA with Bovine Serum Albumin (BSA) and/or other molecules existing in the used buffer solution (Pk1 in Table 1, peak in the statistic graph, Fig. 1). Value of Z-average (also known as the “cumulants mean”) testifies to the monodispersity of the ssRNA solution sample too.

Introduction of tilorone solution into the solution of ssRNA in the buffer resulted in almost twice reliable increase of PDI values (range of PDI value is 0.27 – 0.39) comparing with the values for the ssRNA solution itself. In the statistic graph of (tilorone + ssRNA) system (Fig. 1) there are two peaks showing the presence of two different size particles populations in the system. The first peak (which input into the total scattering intensity is 75%) is most probably related to aggregates of tilorone with the initial particles of ssRNA, and mean diameter of the aggregates is more than 10 times exceeds the mean diameter of the particles in the ssRNA solution itself. The second peak (with input into the total scattering intensity of 25%) is related to bigger aggregates of the system components (obviously, including BSA and other serum components) with the mean diameter ranging between 4.62 and 5.57 μm.

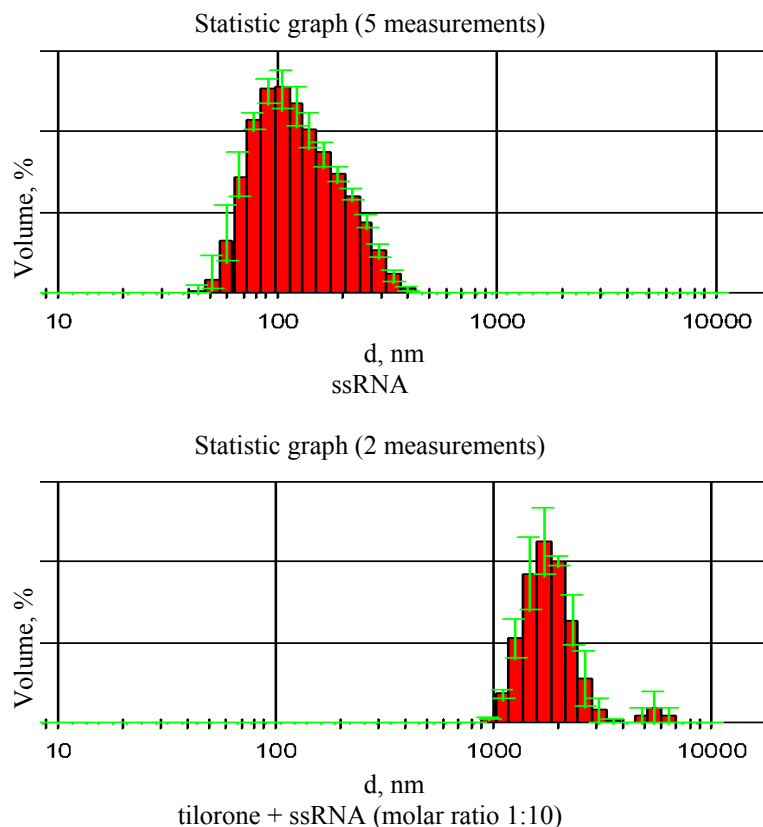


Fig. 1. Particles size distribution in solutions of ssRNA and (tilorone+ssRNA) system by volume. The results are presented as Mean with Max-Min error bar.

It should be noted that in our investigation, with the purpose of obtaining reliable results for sizes distribution and taking into account the ranges of the equipment sensitivity, we take solutions which contained more high concentrations of tilorone and ssRNA than usually are used for biological objects *in vitro* [16, 17].

Thus, the obtained DSL data demonstrate that under conditions similar to the physiological ones, the introduction of tilorone into the system of ssRNA solution in the buffer results in active aggregation of tilorone with the ssRNA particles and in enlargement of the aggregates likely contained tilorone, ssRNA and other components of the used dilution buffer. Earlier it was showed that (tilorone + ssRNA) complex with 1:10 components ratio demonstrated significant antiviral activity [16], and also induced interferon formation *in vitro* [17] as well as *in vivo* [18]. The data obtained in the current and earlier investigations are in a good agreement with the modern ideas about the effect of double-stranded allogenic RNA of different length on the formation of interferon-mediated or interferon independent antiviral resistance of the cells [19, 20].

To confirm the (tilorone + ssRNA) noncovalent complexation at the monomer level and with the purpose to find the possible RNA components which can be considered as centers of tilorone binding to the nucleic acid molecules, the following ESI mass spectrometry study of interactions of tilorone with nucleosides was performed.

### ESI mass spectrometry investigations

At the first stage of the ESI mass spectrometric experimental study solution of tilorone in methanol was investigated. The characteristic mass spectrum of tilorone is presented in Fig. 2. It contains the abundant peak of the tilorone dication  $\text{Til}\cdot 2\text{H}^{2+}$  ( $m/z$  206.3) and set of clusters of tilorone with various number of protons and chlorine anions.

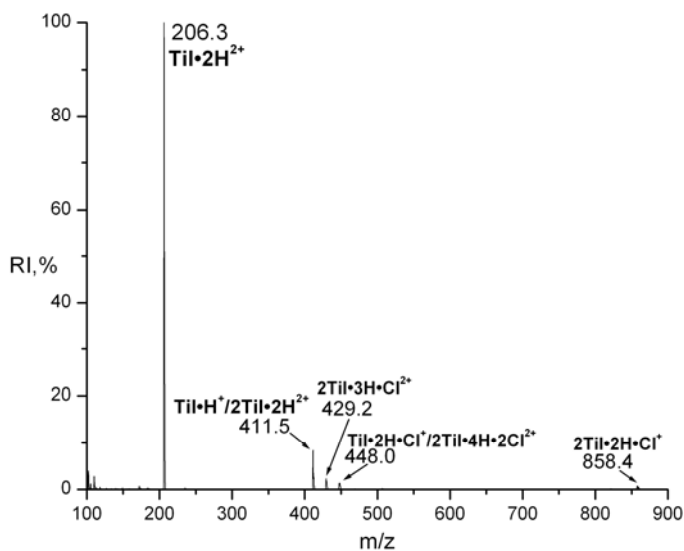


Fig. 2. Positive ion ESI mass spectrum of tilorone solution in methanol.

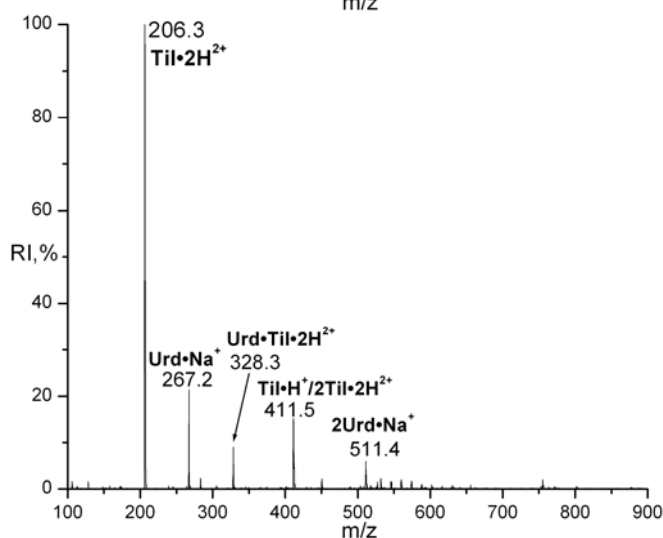


Fig. 3. ESI mass spectrum of (tilorone + Uridine) (1:10 molar ratio) model system in methanol solvent.

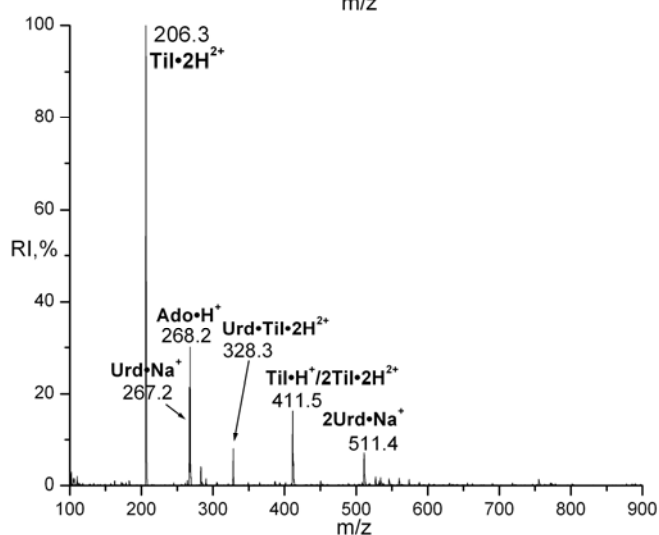


Fig. 4. ESI mass spectrum of (tilorone + Adenine + Uridine) (1:10:10) model system in methanol solvent.

At the next stage the intermolecular interactions of tilorone with selected nucleosides Ado, Thd, and Urd were examined by the ESI mass spectrometry probing of methanol solutions of (tilorone + nucleoside) mixtures in 1:10 molar ratio. In the current measurements, we applied the ESI approach, which we developed and effectively harnessed in our previous investigations [21-25] for the study of intermolecular interactions of biologically active compounds, including drugs, with the targeting biological molecules.

The mass spectra of all studied model systems (tilorone + nucleoside) contain ions characteristic of the individual components of the mixtures. At the same time, the most interesting result from the biophysical point of view relates to observation in the spectra of (tilorone + Urd) system (Fig. 3) the ions of stable ion-molecular clusters of uridine with tilorone dication. The presence of the peak of doubly charged ion  $\text{Urd}\cdot\text{Til}\cdot 2\text{H}^{2+}$  ( $m/z$  328.3) with relative intensity about 10% in the ESI mass spectrum testifies to the formation of stable noncovalent complexes of uridine with tilorone in solution. It is notable that in the other model systems examined the formation of such complexes of tilorone with adenosine or thymidine is not detected by the ESI method.

To check the idea about selectivity of tilorone interaction with uridine we examined a three-component model system of (tilorone+Ado+Urd) (1:10:10 molar ration). The ESI mass spectrum of the triple system (Fig. 4) contains characteristic peaks of tilorone, adenosine, and uridine. The signal of the cluster of tilorone with uridine the peak of  $\text{Urd}\cdot\text{Til}\cdot 2\text{H}^{2+}$  at  $m/z$  328.3 has been detected too, while the peak of the complex  $\text{Ado}\cdot\text{Til}\cdot 2\text{H}^{2+}$  with expected  $m/z$  339.4 or other peaks of any noncovalent complexes of adenosine with tilorone have not been found in the spectrum.

To determine the structural and energetic parameters of the registered in the mass spectrometry experiments noncovalent complexes of tilorone with uridine we are planning to perform quantum-mechanical calculations in our following study, similarly to approach developed in [23-25]. However, right now we can suggest that registered  $\text{Urd}\cdot\text{Til}\cdot 2\text{H}^{2+}$  complexes can be stabilized by electrostatic interactions of partially negatively charged two carbonyl groups of uridine and positively charged quaternary ammonium groups of tilorone. The partially negatively charged carbonyl groups of thymidine may be less sterically accessible, because of methylation of C<sub>5</sub> of pyrimidine cycle in thymidine, that can cause less stability of noncovalent complexes of tilorone with thymidine (the complexes are not recorded in the mass spectrum). As for adenosine, in its structure there are no carbonyl groups with significant partial negative charge, and therefore electrostatic interactions of adenosine with positively charged protonated groups of tilorone will be weaker in comparison with the ones for uridine.

Taking into account that uridine is affiliated just with RNA (but not DNA) the obtained data testifies to the possible specificity of interactions of tilorone with the RNA (not DNA) components, which can be important for revealing the mechanisms of the tilorone biological activity.

## CONCLUSIONS

The performed DLS investigations reveal the formation of large-scale molecular aggregates of tilorone with ssRNA in the buffer solution contained RNA-free phosphate buffered saline solution and 10% of fetal bovine serum, which is similar to the physiological solution in physical and chemical characteristics. The addition of tilorone into the ssRNA solution in the buffer in the molar ratio of 1:10 results in the formation of complexes of ssRNA particles with tilorone with the mean diameter of 10 times larger than the diameter of the particles in the ssRNA solution itself. We suggest that similar complexation of tilorone with ssRNA could take place in real biological systems and could provoke the tilorone antiviral effect as well as induce activation of interferon-mediated or interferon independent pathways of formation of antiviral resistance of the host cells.

The ESI mass spectrometric study of the model systems of (tilorone + nucleosides) (Ado, Urd, or Thd) demonstrates the formation of stable noncovalent complexes  $\text{Urd}\cdot\text{Til}\cdot 2\text{H}^{2+}$ , while the complexes of tilorone with Ado and Thd are not detected in the experiments. It testifies to the possibility of formation of stable noncovalent complexes of tilorone with the RNA and their components in biological systems and pointed at Urd as one of the potential



centers of specific binding of tilorone to the RNA molecules. Such intermolecular interactions of tilorone with viral RNA and/or with RNA in the host cells could be considered as the molecular mechanism of antiviral activity of tilorone as well as the molecular basis of the possible drug toxicity for the host cells.

### ACKNOWLEDGEMENTS


Authors acknowledge the program of cooperation between the National Academy of Sciences of Ukraine and Hungarian Academy of Sciences for the financial support of the visit to the Institute of Organic Chemistry of Research Center of Natural Sciences of the Hungarian Academy of Sciences in Budapest (Hungary), where the mass spectrometry experiments were done. Authors also thank Dr. Ivanov A. from B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine for the nucleosides samples providing.


### CONFLICT OF INTERESTS


The authors declare that there is no conflict of interest.


#### Authors' ORCID ID


V.A. Pashynska  <https://orcid.org/0000-0001-9786-6828>

N.M. Zholobak  <https://orcid.org/0000-0003-2792-9787>

M.V. Kosevich  <http://orcid.org/0000-0003-0257-4588>

A. Gomory  <https://orcid.org/0000-0001-5216-0135>

P.K. Holubiev  <https://orcid.org/0000-0003-3437-4986>

A.I. Marynin  <https://orcid.org/0000-0001-6692-7472>

### REFERENCES

1. Krueger R. E., Mayer G. D. Tilorone hydrochloride: an orally active antiviral agent // *Science*. 1970. Vol. 16(3951). P. 1213-1214. doi: 10.1126/science.169.3951.1213.
2. Mayer G. D., Krueger R. E. Tilorone hydrochloride: mode of action // *Science*. 1970. Vol. 169(3951). P. 1214-1215. doi: 10.1126/science.169.3951.1214
3. Stringfellow D. A., Glasgow L. A. Tilorone hydrochloride: an oral interferon-inducing agent // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1972. Vol. 2(2). P. 73-78. doi: 10.1128/AAC.2.2.73
4. Ekins S., Lingerfelt M. A., Comer E. A., Freiberg A. N., Mirsalis J. C., O'Loughlin K., Harutyunyan A., McFarlane C., Green C. E., Madrid P. B. Efficacy of Tilorone Dihydrochloride against Ebola Virus Infection // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018. Vol.62(2). pii: e01711- e01717. doi:10.1128/AAC.01711-17
5. Калюжин О. В. Тилорон как средство выбора для профилактики и лечения острых респираторных вирусных инфекций // *Лечащий врач*. 2013. №1. С. 1-6. <https://www.lvrach.ru/2013/10/15435831/>.
6. Peniche A. G., Osorio Y., Renslo A. R., Frantz D. E., Melby P. C., Travi, B.L. Development of an ex vivo lymph node explant model for identification of novel molecules active against *Leishmania major* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014. Vol. 58(1). P. 78-87. doi: 10.1128/AAC.00887-13.
7. Wissing M. D., Dadon T., Kim E., Piontek K. B., Shim J. S., Kaelber N. S., Liu J. O., Kachhap S. K., Nelkin B. D. Small-molecule screening of PC3 prostate cancer cells identifies tilorone dihydrochloride to selectively inhibit cell growth based on cyclin-dependent kinase 5 expression // *Oncology Reports*. 2014. Vol. 32. P. 419-424. doi: 10.3892/or.2014.3174.
8. Zhou D., Tuo W., Hu H., Xu J., Chen H., Rao Z., Xiao Y., Hua X., Liu P. Synthesis and activity evaluation of tilorone analogs as potential anticancer agents // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013. Vol. 64. P. 432-441. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.03.050.
9. Григорян С. С., Исаева Е. И., Бакалов В. В., Осипова Е. А., Бевз А. Ю., Простяков И. В., Надоров С. А. Амиксин – индукция интерферонов альфа, бета, гамма и лямбда в сыворотке крови и легочной ткани // *РМЖ «Медицинское обозрение»*. 2015. №2. С.93-99.
10. Zhuk M., Sumriy S. K., Zhuk O. V. Elimination kinetics of synthetic interferon inducer tilorone in experimental animals // *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*. 2017. Vol. 11(2). P. 127-131. doi: 10.26444/jpcr/81165.
11. Ratan R. R., Siddiq A., Aminova L., Langley B., McConoughey S., Karpisheva K.,... Gazaryan, I. Small molecule activation of adaptive gene expression: tilorone or its analogs are novel potent activators of

- hypoxia inducible factor-1 that provide prophylaxis against stroke and spinal cord injury // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008. Vol. 1147 (1). P. 383-394. doi: 10.1196/annals.1427.033.
12. Feng J., Weitner M., Shi W., Zhang S., Sullivan D., Zhang Y. Identification of Additional Anti-Persister Activity against *Borrelia burgdorferi* from an FDA Drug Library // *Antibiotics*. 2015. Vol. 4(3). P. 397–410. doi: 10.3390/antibiotics4030397.
  13. Giron D. J., Schmidt J. P., Pindak F. F. Tilorone hydrochloride: lack of correlation between interferon induction and viral protection // *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 1972. Vol. 1(1). P. 78-79. doi: 10.1128/AAC.1.1.78.
  14. Chatterjee S. S., Chakraborty T. Isolation of bacterial RNA from cultures // In D. Lin (Ed.) *Handbook of nucleic acid purification*. Boca Raton: CRC Press Taylor@Francis Group, 2009. P. 107-128.
  15. Stetefeld J., McKenna S., Patel T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences // *Biophysical Reviews*. 2016. Vol. 8 (4). P. 409-427. doi: 10.1007/s12551-016-0218-6.
  16. Karpov A.V., Zholobak N. M., Spivak N. Y., Rybalko S. L., Antonenko S. V., Krivokhatskaya L. D. Virus-inhibitory effect of a yeast RNA – tilorone molecular complex in cell cultures // *Acta virologica*. 2001. Vol. 45(3). P. 181-184.
  17. Карпов А. В., Жолобак Н. М. Изучение интерферогенных свойств комплексов РНК-тилорон в культуре клеток // *Антибиотики и химиотерапия*. 1995. Т. 40, №5. С. 20-23.
  18. Карпов А. В., Жолобак Н. М. Продукция интерферонов I типа в организме под действием молекулярных комплексов дрожжевая РНК-тилорон // *Вопросы вирусологии*. 1996. Т.41, № 1. С. 13-16.
  19. Pirher N., Ivicak K., Pohar J., Bencina M., Jerala R. A second binding site for double-stranded RNA in TLR3 and consequences for interferon activation // *Nature Structural & Molecular Biology*. 2008. Vol. 15(7). P. 761-763. doi: 10.1038/nsmb.1453
  20. DeWitte-Orr S. J., Mehta D. R., Collins S. E., Suthar M. S., Gale M., Mossman K. L. Long Double-Stranded RNA Induces an Antiviral Response Independent of IFN Regulatory Factor 3, IFN- $\beta$  Promoter Stimulator 1, and IFN // *The Journal of Immunology*. 2009. Vol. 183(10). P. 6545-6553. doi: 10.4049/jimmunol.0900867.
  21. Pashynska V. A., Kosevich M. V., Van den Heuvel H., Claeys M. Characterization of noncovalent complexes of antimalarial agents of the artemisinin type and Fe(III)-heme by electrospray ionization mass spectrometry and collisional activation tandem mass spectrometry // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2004. Vol. 15. P. 1181-1190.
  22. Pashynska V. A., Kosevich M. V., Gomory A., Vekey K. Investigations of the formation of noncovalent complexes between antimicrobial agent ethonium with membrane phospholipids by electrospray ionization mass spectrometry // *Mass-Spectrometria*. 2012. Vol. 9(2). P. 121-128.
  23. Pashynska V., Kosevich M., Stepanian S., Adamowicz L. Noncovalent complexes of tetramethylammonium with chlorine anion and 2,5-dihydroxybenzoic acid as models of the interaction of quaternary ammonium biologically active compounds with their molecular targets. A theoretical study // *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 2007. Vol. 815. P. 55-62. doi:10.1016/j.theochem.2007.03.019.
  24. Pashynska V., Stepanian S., Gomory A., Vekey K., Adamowicz L. Competing intermolecular interactions of artemisinin-type agents and aspirin with membrane phospholipids: Combined model mass spectrometry and quantum-chemical study // *Chemical Physics*. 2015. Vol. 455. P. 81-87. doi:10.1016/j.chemphys.2015.04.014.
  25. Pashynska V., Stepanian S., Gomory A., Vekey K., Adamowicz L. New cardioprotective agent flokalin and its supramolecular complexes with target amino acids: An integrated mass-spectrometry and quantum-chemical study // *Journal of Molecular Structure*. 2017. Vol. 1146. P. 441-449. doi:10.1016/j.molstruc.2017.06.007.

#### REFERENCES

1. Krueger, R.E., Mayer, G.D. (1970) Tilorone hydrochloride: an orally active antiviral agent. *Science*, 16(3951), 1213-1214. doi: 10.1126/science.169.3951.1213.
2. Mayer, G.D., Krueger, R.E. (1970). Tilorone hydrochloride: mode of action. *Science*, 169(3951), 1214-1215. doi: 10.1126/science.169.3951.1214.
3. Stringfellow, D.A., Glasgow, L.A. (1972). Tilorone hydrochloride: an oral interferon-inducing agent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2(2), 73-78. doi: 10.1128/AAC.2.2.73.
4. Ekins, S., Lingerfelt, M.A., Comer, E.A., Freiberg, A.N., Mirsalis, J.C., O'Loughlin, K., Harutyunyan, A., McFarlane, C., Green, C.E., Madrid, P.B. (2018). Efficacy of Tilorone Dihydrochloride against Ebola Virus Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(2), e01711-e01717. doi:10.1128/AAC.01711-17.
5. Kalugin, O.V. (2013). Tilorone as a chosen preparation for prevention and treatment of acute respiratory viral infections. *Lechebnoe delo*, (10), 1-6. (in Russian) <https://www.lvrach.ru/2013/10/15435831/>.
6. Peniche, A.G., Osorio, Y., Renslo, A.R., Frantz, D.E., Melby, P.C., Travi, B.L. (2014). Development of an ex vivo lymph node explant model for identification of novel molecules active against *Leishmania major*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 78-87. doi: 10.1128/AAC.00887-13.

7. Wissing, M.D., Dadon, T., Kim, E., Piontek, K.B., Shim, J.S., Kaelber, N.S., Liu, J.O., Kachhap, S.K., Nelkin, B.D. (2014). Small-molecule screening of PC3 prostate cancer cells identifies tilorone dihydrochloride to selectively inhibit cell growth based on cyclin-dependent kinase 5 expression. *Oncology Reports*, 32, 419-424. doi: 10.3892/or.2014.3174.
8. Zhou, D., Tuo, W., Hu, H., Xu, J., Chen, H., Rao, Z., Xiao, Y., Hua, X., Liu, P. (2013). Synthesis and activity evaluation of tilorone analogs as potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 64, 432-441. doi:10.1016/j.ejmech.2013.03.050.
9. Grigoryan, S.S., Isaeva, E.I., Bakalov, V.V., Osipova, E.A., Prostoyakov, I.V., Nadorov, S.A. (2015). Amixin: induction of interferons- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$  and - $\lambda$  in serum and lung tissue. *Russkii Meditsinskii Zhurnal*, (2), 93-99. (in Russian)
10. Zhuk, M., Sumriy, S.K., Zhuk, O.V. (2017). Elimination kinetics of synthetic interferon inducer tilorone in experimental animals. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 11(2), 127-131. doi: 10.26444/jpcr/81165.
11. Ratan, R.R., Siddiq, A., Aminova, L., Langley, B., McConoughey, S., Karpisheva, K., Gazaryan, I. (2008). Small molecule activation of adaptive gene expression: tilorone or its analogs are novel potent activators of hypoxia inducible factor-1 that provide prophylaxis against stroke and spinal cord injury. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147(1), 383-394. doi: 10.1196/annals.1427.033.
12. Feng, J., Weitner, M., Shi, W., Zhang, S., Sullivan, D., Zhang, Y. (2015). Identification of Additional Anti-Persister Activity against *Borrelia burgdorferi* from an FDA Drug Library. *Antibiotics*, 4 (3), 397-410. doi: 10.3390/antibiotics4030397.
13. Giron, D.J., Schmidt, J.P., Pindak, F.F. (1972). Tilorone hydrochloride: lack of correlation between interferon induction and viral protection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1(1), 78-79. doi: 10.1128/AAC.1.1.78.
14. Chatterjee, S.S., & Chakraborty, T. (2009). Isolation of bacterial RNA from cultures. In D. Lin (Ed.) *Handbook of nucleic acid purification* (pp. 107-128). Boca Raton: CRC Press Taylor@Francis Group.
15. Stetefeld, J., McKenna, S., Patel, T.R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8(4), 409-427. doi: 10.1007/s12551-016-0218-6.
16. Karpov, A.V., Zholobak, N.M., Spivak, N.Y., Rybalko, S.L., Antonenko, S.V., Krivokhatskaya, L.D. (2001). Virus-inhibitory effect of a yeast RNA – tilorone molecular complex in cell cultures. *Acta virologica*, 45(3), 181-184.
17. Karpov, A.V., & Zholobak, N.M. (1995). The interferonogenic properties of yeast RNA-tilorone complexes in a cell culture. *Antibiotiki i khimioterapiia*, 40(5), 20-23. (in Russian)
18. Karpov, A.V., Zholobak, N.M. (1996). Production of type I interferons in the body exposed to yeast RNA-tilorone molecular complexes. *Voprosy virusologii*, 41(1), 13-16. (in Russian)
19. Pirher, N., Ivicak, K., Pohar, J., Bencina, M., Jerala, R. (2008). A second binding site for double-stranded RNA in TLR3 and consequences for interferon activation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(7), 761-763. doi: 10.1038/nsmb.1453.
20. DeWitte-Orr, S.J., Mehta, D.R., Collins, S.E., Suthar, M.S., Gale, M., Mossman, K.L. (2009). Long Double-Stranded RNA Induces an Antiviral Response Independent of IFN Regulatory Factor 3, IFN- $\beta$  Promoter Stimulator 1, and IFN. *The Journal of Immunology*, 183(10), 6545-6553. doi: 10.4049/jimmunol.0900867.
21. Pashynska, V.A., Kosevich, M.V., Van den Heuvel, H., Claeys, M. (2004). Characterization of noncovalent complexes of antimalarial agents of the artemisinin type and Fe(III)-heme by electrospray ionization mass spectrometry and collisional activation tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15, 1181-1190.
22. Pashynska, V.A., Kosevich, M.V., Gomory, A., Vekey, K. (2012). Investigations of the formation of noncovalent complexes between antimicrobial agent ethonium with membrane phospholipids by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass-Spectrometria*, 9(2), 121-128.
23. Pashynska, V., Kosevich, M., Stepanian S., Adamowicz L. (2007). Noncovalent complexes of tetramethylammonium with chlorine anion and 2,5-dihydroxybenzoic acid as models of the interaction of quaternary ammonium biologically active compounds with their molecular targets. A theoretical study. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 815, 55-62. doi:10.1016/j.theochem.2007.03.019.
24. Pashynska, V., Stepanian, S., Gomory, A., Vekey, K., Adamowicz L. (2015). Competing intermolecular interactions of artemisinin-type agents and aspirin with membrane phospholipids: Combined model mass spectrometry and quantum-chemical study. *Chemical Physics*, 455, 81-87. doi:10.1016/j.chemphys.2015.04.014.
25. Pashynska, V., Stepanian, S., Gomory, A., Vekey, K., Adamowicz L. (2017). New cardioprotective agent flokalin and its supramolecular complexes with target amino acids: An integrated mass-spectrometry and quantum-chemical study. *Journal of Molecular Structure*, 1146, 441-449. doi:10.1016/j.molstruc.2017.06.007.

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2018-39-03>

УДК 544.016.2:[577.352:615.31]

## МЕМБРАНОТРОПНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛАУРИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ФЕНСПИРИДА И КАОЛИНА В МОДЕЛЬНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ: РОЛЬ ЛИПИДНОГО СОСТАВА

О.В. Ващенко, Л.В. Будянская, Н.А. Касян, Л.Н. Лисецкий

*Институт сцинтилляционных материалов НТК «Институт монокристаллов НАН Украины»,  
пр. Науки, 60, Харьков, 61072, Украина*  
[olga\\_v@isma.kharkov.ua](mailto:olga_v@isma.kharkov.ua)

Поступила в редакцию 16 марта 2018 г.

Принята 16 апреля 2018 г.

**Актуальность.** Модельные липидные мембраны в настоящее время широко используются для исследования мембранотропного действия (МД) многих лекарственных веществ, а также для создания липосомальных форм фармпрепаратов. Вместе с тем, известно, что липидный состав мембран может существенно влиять на взаимодействие лекарственных веществ с мембраной.

**Цель работы.** Сравнение МД некоторых лекарственных веществ в модельных мембранах различного липидного состава.

**Материалы и методы.** Методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) исследовано влияние лауриновой кислоты, фенспирида и каолина на характеристики фазовых переходов модельных мембран на основе гидратированных фосфолипидов. Наряду со «стандартной» мембраной на основе *L*- $\alpha$ -дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ), была использована мембрана ДПФХ, содержащая церамиды (ДПФХ-Ц), а также мембрана, содержащая ДПФХ, *L*- $\alpha$ -дипальмитоилфосфатидилэтаноламин и холестерин (ДПФХ-ДПФЭ-Х). Согласно литературным данным, мембраны ДПФХ и ДПФХ-Ц фазово однородны, тогда как в мембране ДПФХ-ДПФЭ-Х сосуществуют две липидные фазы различного состава.

**Результаты.** Показано, что фенспирид во всех трёх типах мембран имеет практически одинаковое МД. Для лауриновой кислоты МД было качественно сходно в мембранах ДПФХ и ДПФХ-Ц, тогда как в мембране ДПФХ-ДПФЭ-Х наблюдались принципиально иные эффекты. Что касается каолина, то различия в его МД наблюдались уже между мембранами ДПФХ и ДПФХ-Ц (повышение температур фазовых переходов в ДПФХ-Ц и тенденция к их снижению – в ДПФХ). В мембране ДПФХ-ДПФЭ-Х каолин приводит к заметному снижению температур фазовых переходов в обеих липидных фазах наряду с взаимно противоположными изменениями в кооперативности.

**Выводы.** На примерах отдельных веществ показано, что сильное разупорядочивающее МД может оказаться практически не зависящим от липидного состава мембран. Показано, что изменение кооперативности и перераспределение липидов в мембране может быть вызвано не только процессами встраивания стронных компонентов в объём бислоя, но и их адсорбцией на поверхности мембраны. Полученные результаты могут быть полезны при подборе состава модельных мембран для исследования МД лекарственных веществ.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** лекарственные вещества; мембранотропное действие; модельные липидные мембраны; липидный состав; дифференциальная сканирующая калориметрия.

## МЕМБРАНОТРОПНА ДІЯ ЛАУРИНОВОЇ КИСЛОТИ, ФЕНСПІРИДУ ТА КАОЛІНУ У МОДЕЛЬНИХ ЛІПІДНИХ МЕМБРАНАХ: РОЛЬ ЛІПІДНОГО СКЛАДУ

О.В. Ващенко, Л.В. Будянська, Н.А. Касян, Л.М. Лисецкий

*Институт сцинтилляционных материалов НАНУ, пр. Науки, 60, Харьков, 61072, Украина*

**Актуальність.** Модельні ліпідні мембрани у теперішній час широко застосовуються для досліджень мембранотропної дії (МД) багатьох лікарських речовин, а також для створення ліпосомальних форм фармпрепаратів. Разом із тим, відомо, що ліпідний склад мембран може суттєво впливати на взаємодію лікарських речовин з мембраною.

**Мета роботи.** Порівняння МД деяких лікарських речовин на модельні мембрани різного ліпідного складу.

**Матеріали і методи.** Методом диференціальної скануючої калориметрії (ДСК) досліджено вплив лауринової кислоти, фенспіриду та каоліну на характеристики фазових переходів модельних

ліпідних мембран на основі гідратованих фосфоліпідів. Разом із «стандартною» мембраною на основі *L*- $\alpha$ -діпальмітоїлфосфатидилхоліну (ДПФХ) була використана мембрана ДПФХ, що містила цереброзиди (ДПФХ-Ц), а також мембрана що містила ДПФХ, *L*- $\alpha$ -діпальмітоїлфосфатидилетаноламін та холестерин (ДПФХ-ДПФЕ-Х). Згідно літературним даним, мембрани ДПФХ та ДПФХ-Ц є фазово однорідними, тоді як у мембрані ДПФХ-ДПФЕ-Х співіснують дві ліпідні фази різного складу.

**Результати.** Показано, що фенспірид в усіх трьох типах мембран мав майже однакову МД. Для лауринової кислоти МД виявилася якісно подібною в мембранах ДПФХ та ДПФХ-Ц, тоді як у мембрані ДПФХ-ДПФЕ-Х спостерігалися принципово інші ефекти. Щодо каоліну, то відмінності у його МД спостерігалися між мембранами ДПФХ та ДПФХ-Ц (підвищення температур переходів у ДПФХ-Ц та тенденція до їх зниження у ДПФХ). У мембрані ДПФХ-ДПФЕ-Х каолін призводить до помітного зниження температур фазових переходів разом із взаємно протилежними змінами у кооперативності.

**Висновки.** На прикладах окремих речовин показано, що сильна розупорядковувальна мембранотропна дія може виявитися майже незалежною від ліпідного складу мембрани. Показано, що зміни кооперативності та перерозподілення ліпідів у мембрані може бути спричинено не тільки процесами вбудовування сторонніх компонентів у об'єм бішару, але й їхньою адсорбцією на поверхні мембрани. Отримані результати можуть стати корисними при підборі складу модельних мембран для дослідження мембранотропної дії лікарських речовин.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** лікарські речовини; модельні ліпідні мембрани; мембранотропна дія; ліпідний склад; диференціальна скануюча калориметрія.

#### MEMBRANOTROPIC ACTION OF LAURIC ACID, FENSPIRIDE AND KAOLINE IN MODEL LIPID MEMBRANES: ROLE OF LIPID COMPOSITION

O.V. Vashchenko, L.V. Budianska, N.A. Kasian, L.N. Lisetski

*Institute for Scintillation Materials NAS of Ukraine, 60 Nauky Ave., 61072 Kharkov, Ukraine*

**Background:** Model lipid membranes are widely used nowadays to elucidate membranotropic action (MA) of pharmaceuticals as well as for development of liposomal drugs. Meanwhile, membrane lipid composition could substantially affect a drug-membrane interaction.

**Objectives:** Comparison of MA of certain pharmaceuticals on model membranes with various lipid compositions.

**Materials and methods:** By means of differential scanning calorimetry (DSC) lauric acid, fenspiride and kaolin were studied with respect of their effects on phase transitions of model membranes based on hydrated phospholipids. Along with "standard" membrane based on *L*- $\alpha$ -dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), a membrane containing cerebroside (DPPC-C) was used, as well as one composed of DPPC, *L*- $\alpha$ -dipalmitoylphosphatidylethanolamine and cholesterol (DPPC-DPPE-Chol). According to literature, DPPC and DPPC-C membranes are characterized by lipid phase homogeneity, as distinct from membrane DPPC-DPPE-Chol, where two different lipid phases coexist both below and above phase transition region.

**Results:** It was shown that fenspiride manifested similar MA on membranes of all three types. MA of lauric acid in DPPC and DPPC-C membranes were qualitatively similar, whereas, in DPPC-DPPE-Chol membrane, different effects were observed. As to kaolin, distinctions in its MA were observed even between DPPC and DPPC-C membranes, namely, elevation of phase transition temperatures in DPPC-C membrane and a tendency to their reduction in DPPC one. In DPPC-DPPE-Chol membrane, kaolin markedly lowered phase transition temperatures coupled with opposite changes in cooperativity.

**Conclusions:** By the examples of separated substances it was shown that strong disordering MA may be practically independent on lipid composition of membrane. Lipid rearrangement and cooperativity changes in membrane can be induced not only by incorporation of guest substances in the bulk, but also by their adsorption on membrane surface. The obtained results could be useful in adjustment of model membrane composition for MA studies of different pharmaceuticals.

**KEY WORDS:** pharmaceuticals; membranotropic action; model lipid membranes; lipid composition; differential scanning calorimetry.

Исследование мембранотропного действия лекарственных веществ составляет одну из важных задач современной биофизики. Для многих классов лекарственных веществ установлена непосредственная связь между их терапевтическим эффектом и способностью проникать через липидный бислой [1-3]. Учитывая, что липидный бислой оказывает существенное влияние на связывание и функционирование мембранных белков, выполняя в том числе и каталитические функции [4, 5], проникновение лекарств через биомембраны представляется важным не только с точки

зрения терапевтического процесса, но и опосредованного воздействия на жизнедеятельность клетки. Кроме того, известно, что подбор липидного состава липосом весьма существенен для оптимизации доставки лекарств [6-9]. Поэтому в настоящее время в качестве моделей всё более широко используются липидные композиции различного состава, для которых, несмотря на сложность, уже установлены некоторые общие физико-химические закономерности [7, 10-12].

Идеей настоящей работы было сравнительное исследование действия сторонних компонентов в мембранах различного липидного состава. Для исследований были выбраны лекарственные вещества с различными механизмами взаимодействия с мембраной: как встраивание в объём (лауриновая кислота и фенспирид), так и адсорбция на поверхности (каолин).

В работе исследованы следующие типы модельных липидных мембран:

- 1) мембрана ДПФХ, широко используемая для модельных исследований и рассматриваемая многими авторами как «стандарт» [10];
- 2) мембрана ДПФХ-Ц, содержащая ДПФХ и 5 масс.% цероброзидов для имитации липидного состава кожных покровов [13];
- 3) мембрана ДПФХ-ДПФЭ-Х, содержащая ДПФХ, ДПФЭ и холестерин в соотношении 45 : 45 : 10 по массе, приближённая по составу к мембранам эритроцитов [14].

Подбор липидного состава мембран был обусловлен практическими целями. Липидные бислои составляют основной барьер для диффузии сторонних компонентов через кожные покровы [13, 15]. Кроме того, цероброзины и фосфолипиды широко используются в настоящее время, как в лекарственных препаратах, так и в косметике, поэтому их композиции интенсивно изучаются с помощью современных физических методов [16]. С другой стороны, фазовые состояния, индуцируемые сторонними молекулами (к примеру, олеиновой кислотой [17] и ризином [18]) в мембранах, содержащих керамины, могут быть чрезвычайно важной составляющей их действия на кожные покровы.

Трёхкомпонентные мембраны, содержащие «высокотемпературный» и «низкотемпературный» липиды, а также холестерин считаются хорошими моделями внешнего полуслоя мембран млекопитающих [19]. ДПФХ и ДПФЭ относятся к главнейшим классам липидов клеточных мембран [20]. Холестерин, в избытке присутствующий в мембранах млекопитающих, имеет важную регуляторную функцию, модулируя физические свойства биомембран [21].

В литературе имеется ряд работ, посвящённых влиянию белков и других молекул на мембраны различного липидного состава. Так, в работе [22] показано, что степень связывания интегрального белка спектрина с мембранами ФХ-ФЭ с одинаковыми углеводородными радикалами снижалась по мере удлинения радикала, хотя эффект повышения давления при введении спектрина при этом увеличивался. В то же время, для ненасыщенных липидов указанный эффект был в несколько раз меньше. Встраивание спектрина в мембрану облегчалось с повышением концентрации холестерина, который изменял константу связывания с мембраной, но не сродство к ней. Авторы объясняют наблюдаемый эффект тем, что границы липидных фаз, количество которых в присутствии холестерина существенно увеличивается, служат местами связывания спектрина.

В мембранах чистого ДПФЭ для гидрофильных космотропных веществ, таких как сахароза и глицерин, установлено снижение температуры  $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$  перехода и повышение температуры перехода  $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ , т. е. сужение температурного интервала существования  $L_{\alpha}$ -фазы [23]. Указанный эффект уменьшался с повышением длины цепей ФЭ и снижением степени космотропности добавки. Для гидрофильных хаотропных веществ, таких как, к примеру, NaSCN, эффект был обратным: расширение интервала существования  $L_{\alpha}$ -фазы. В той же работе для космотропной сахарозы установлено уменьшение параметра  $dT_m/dc$  для перехода  $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$  с повышением длины

цепи в ФЭ, а также повышение указанного параметра при переходе от более гидратированного ДПФХ к менее гидратированному ДПФЭ.

В общем случае на связывание сторонней молекулы с мембраной оказывает влияние как структура её поверхности (природа головок), так и структура её гидрофобной части (длина хвостов), что детально показано на примере дигитонина [24]. Положение сторонней молекулы в бислое, согласно [10] определяется гидрофильно-гидрофобным балансом, конформацией молекулы, электростатическим потенциалом и гидратацией поверхности. На этот баланс, в свою очередь, влияет структура гидрофильной и гидрофобной частей липидов, а также фазовое состояние бислоя. Именно эти факторы определяют латеральное взаимодействие липидов и, в конечном итоге, – проницаемость и сорбционную ёмкость бислоя по отношению к данной молекуле.

Ввиду всего вышесказанного становится ясным, что липидный состав мембран является существенным фактором взаимодействия молекул с бислоем и работы в этом направлении являются весьма актуальными.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для приготовления липидных мембран использованы следующие химически чистые вещества: *L*- $\alpha$ -дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) (Avanti Polar Lipids), *L*- $\alpha$ -дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (ДПФЭ) (Fluka) и холестерин (Sigma), а также Ceramides LS 3773 (BASF), содержащие 25% фосфолипидов и 75% цереброзидов (церамидов, содержащих в своей полярной части сахарид). В качестве добавок использовали х. ч. фенспирид и лауриновую кислоту в концентрациях до 5 масс.%. В работе также был исследован каолин – тонкодисперсная глинистая порода, состоящая в основном из каолинита  $Al_2Si_2O_5(OH)_4$  ( $Al_2O_3$  39,5%;  $SiO_2$  46,54%;  $H_2O$  13,96% по массе [25]). Концентрация каолина составляла до 20 масс.% от массы липидов. Геометрические размеры молекул ( $x \geq y \geq z$ ) были получены методом РМБ с помощью свободного ПО MORAC2016. На их основе был рассчитан коэффициент анизотропии  $k = (x - y)/(x + y)$  [26], информативный параметр, характеризующий форму молекулы: для сферы  $k = 0$ , для тонкого стержня  $k \rightarrow 1$ .

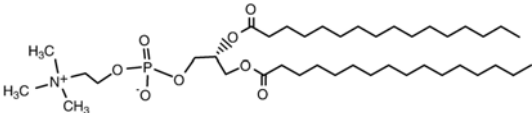
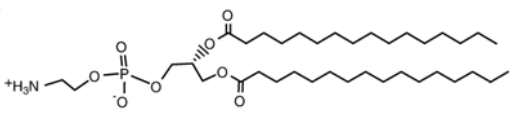
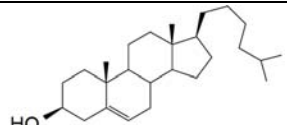
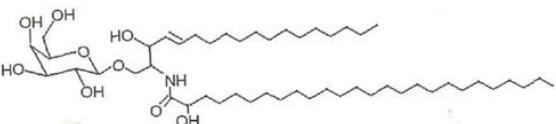
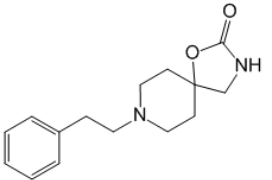
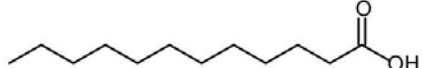
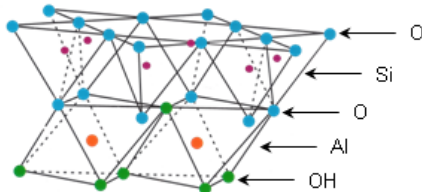
Краткая информация об используемых веществах представлена в табл. 1. Для цереброзидов, ввиду неоднородности состава, определение молекулярных параметров не проводилось; представлена структура наиболее распространённого представителя цереброзидов в мембранах мозга. Для приготовления мультибислойных мембран, содержащих 60% воды, к липидам в кристаллической форме добавляли требуемое количество воды либо такое же количество раствора исследуемых водорастворимых веществ. Нерастворимые в воде вещества предварительно растворяли в очищенном этиловом спирте вместе с липидами, затем удаляли растворитель с помощью концентратора «Concentrator Plus» (Eppendorf) и далее готовили по вышеописанной процедуре.

Исследования проводили методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) с помощью калориметра «Mettler DSC 1» (Mettler-Toledo). Для каждой из исследованных систем проводили 2 цикла «охлаждение – нагревание» со скоростью сканирования 2 К/мин в диапазоне 20 ÷ 70 °С. На основании полученных ДСК-термограмм были определены следующие параметры фазовых переходов в исследуемых модельных мембранах: температура ( $T_p$ ,  $T_m$ ,  $T_m^b$ ,  $T_m^s$ ), а энтальпия ( $\Delta H_p$ ,  $\Delta H_m$ ,  $\Delta H_m^b$ ,  $\Delta H_m^s$ ), полуширина ( $\Delta T_{p/2}$ ,  $\Delta T_{m/2}$ ,  $\Delta T_{m^b/2}$ ,  $\Delta T_{m^s/2}$ ), гистерезис ( $h_p$ ,  $h_m$ ,  $h_m^b$ ,  $h_m^s$ ) и асимметрия ( $a_m$ ,  $a_p$ ). Индекс «m» относится к основному переходу (плавлению) мембраны ( $L_{\beta'} \leftrightarrow L_{\alpha}$ ), индекс «p» – к предпереходу ( $L_{\beta'} \leftrightarrow P_{\beta'}$ ), индекс «s» – к высокотемпературному, узкому пику перехода в мембране ФХ-ФЭ-Хол ( $L_{\beta} \leftrightarrow L_{\alpha}$ ), индекс «b» – к широкому низкотемпературному пику перехода в этой же мембране ( $L_{\beta} \leftrightarrow L_o$ ). Идентификация термодинамических фаз проведена на основе [21, 27, 28].



## Мембранотропное действие лауриновой кислоты, фенспирида и каолина...

Таблица 1. Структура и некоторые молекулярные параметры используемых веществ: молекулярная масса (М), коэффициент липофильности (XlogP3), коэффициент анизотрии (k), максимальный линейный размер (x).

Вещество	Структура	М, Да	XlogP3	k	x, Å
ДПФХ		734	13,5	0,62	31,9
ДПФЭ		692	10,8	0,59	31,9
Холестерин		386,7	8,7	0,30	15,6
Цереброзиды		–	–	–	–
Фенспирид		260,3	2,1	0,44	13,5
Лауриновая кислота		200,3	4,2	0,71	16,8
Каолин		–	–	–	–

Определение мольной энтальпии в мембранах ДПФХ и ДПФХ-Ц проводили в расчёте на количество ДПФХ, а в мембране ДПФХ-ДПФЭ-Х – в расчёте на общее количество ДПФХ и ДПФЭ. Значение гистерезиса для всех мембран получали как разность температур переходов при нагревании и охлаждении; значение асимметрии – как разность температуры максимума и середины полуширины пика перехода. Для пиков, полученных путём расщепления в мембране ДПФХ-ДПФЭ-Х, определение значения асимметрии не представлялось целесообразным ввиду их заданной гауссовой (симметричной) формы. Экспериментальные погрешности измерений приведены на рисунках в графическом виде.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Характеристика мембран

Состав и термодинамические параметры исходных модельных мембран представлены в табл. 2., а соответствующие ДСК-термограммы приведены на рис. 1. Как можно видеть, при добавлении цереброзидов в ДПФХ наблюдается снижение  $T_m$  и



особенно  $T_p$  (см. табл. 2), что, по всей видимости, отражает повышение степени гидратации поверхности мембраны. Такое предположение хорошо согласуется с данными [29, 30] о том, что энергия межмолекулярного взаимодействия между разными типами липидов в смесях ДПФХ-Ц оказывается меньше средней энергии взаимодействия, а средняя площадь на молекулу – больше. Небольшое уширение пика характерно для липидных смесей [31] и отражает уменьшение кооперативности [31, 34]. В указанных работах также установлено, что цереброзиды хорошо смешиваются с ДПФХ и образуют однофазную липидную систему во всём концентрационном диапазоне, поэтому данную мембрану можно рассматривать как однофазную систему.

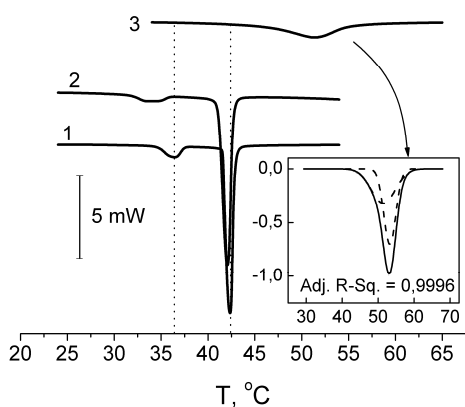


Рис. 1. ДСК-термограммы модельных липидных мембран: 1 – ДПФХ, 2 – ДПФХ-Ц, 3 – ДПФХ-ДПФЭ-Х. На врезке: разложение пика фазового перехода мембраны ДПФХ-ДПФЭ-Х на 2 компоненты.

Мембрана ДПФХ-ДПФЭ-Х, в отличие от ДПФХ-Ц, демонстрирует двухфазное поведение, характерное для смесей фосфатидилхолинов (ФХ) и фосфатидилэтанол-аминов (ФЭ) при данном соотношении компонентов [33, 36], и даёт два калориметрических пика с максимумами 51,4 и 53,2 °С, практически равные по площади (см. табл. 2).

Таблица 2. Термодинамические параметры мембран по данным ДСК при нагревании. Для мембран ДПФХ и ДПФХ-Ц приведены значения в формате «основной переход / предпереход», для мембраны ДПФХ-ДПФЭ-Х – значения в формате «широкий пик / узкий пик»

Мембрана	Температура перехода, °С	Энтальпия, кДж/моль	Полуширина, °С	Гистерезис, °С	Асимметрия, °С
ДПФХ	42,0 / 36,3	34,0 / 4,5	0,8 / 1,8	1,3 / 5,9	-0,1 / 0,3
ДПФХ-Ц	41,7 / 33,4	36,5 / 3,6	0,9 / 3,0	1,4 / 5,3	0 / -0,3
ДПФХ-ДПФЭ-Х	51,4 / 53,2	25,0 / 33,6	11,8 / 3,3	0,7 / 0,6	- / -

Фазовые диаграммы ДПФЭ-ДПФХ были подробно исследованы в [35], где показано, что при эквимолярном соотношении компонентов кооперативность фазового перехода снижается на порядок (уширение пика), а  $T_m$  практически не отклоняется от аддитивности. Смесей ФХ и ФЭ с эквивалентными насыщенными цепями более плотно упакованы, что отражается в повышении поверхностного давления и уменьшении площади сечения на молекулу [36]. Таким образом, ДПФЭ оказывает конденсирующее действие на мембрану ДПФХ, что отражается в повышении температуры фазового перехода. Следует добавить также, что ФЭ относят к липидам, стимулирующим образование рафтов в мембране [37]. Действительно, по данным флуоресцентной микроскопии [38, 39], в смесях ДПФХ-ДПФЭ образуются домены с характерным размером десятки микрон. В мембране ДПФХ-ДПФЭ-Х при данном соотношении компонентов сосуществуют  $L_\alpha$ - и  $L_o$ -фазы [19], причём гетерогенность наблюдается на микроскопическом уровне во всех термодинамических фазах, как ниже, так и выше температуры фазового перехода (хотя в последнем случае она существенно меньше [40]). Таким образом, есть основания анализировать поведение каждого наблюдаемого пика в отдельности.

В работе [41] предложена упрощённая геометрическая модель для описания упаковки липидов в мембранах сложного состава. Молекула ДПФЭ в липидной мембране имеет почти цилиндрическую форму, тогда как ДПФХ – конусовидную (гидрофильная часть больше). Холестерин же, напротив, имеет конусовидную форму с расширенной гидрофобной частью и, в отличие от фосфолипидов с большой конформационной подвижностью цепей, практически не изменяет площади сечения при изменении давления. При добавлении к ДПФХ как холестерин, так и ДПФЭ оказывают конденсирующее действие, более выраженное для холестерина. В работе выдвинута концепция взаимно компенсирующей упаковки, которая, применительно к данному случаю, указывает на большее сродство холестерина к ДПФХ, чем к ДПФЭ, что подтверждается и шириной високотемпературного пика, близкой к таковой для бинарной смеси [35]. Такая трактовка согласуется и с эмпирическим правилом, согласно которому холестерин преимущественно взаимодействует с более низкоплавким липидом, причём ФХ имеет существенное преимущество перед ФЭ [40].

Двухкомпонентное разложение исходного ДСК-пика (см. врезку на рис. 1) представлялось наиболее рациональным, поскольку в чистом ДПФХ при данном содержании холестерина (~ 20 моль %) «холестерин-обеднённая» фаза практически исчезает и остаётся только «холестерин-обогащённая» [42]. Принимая во внимание всё вышесказанное, можно отнести широкий пик к липидной фазе «ДПФЭ+Х в ДПФХ», а узкий – к фазе «ДПФХ в ДПФЭ».

### Действие фенспирида

Фенспирид во всех исследованных мембранах вызывал примерно одинаковое линейное снижение температур фазового перехода с повышением его содержания в системе (рис. 2).

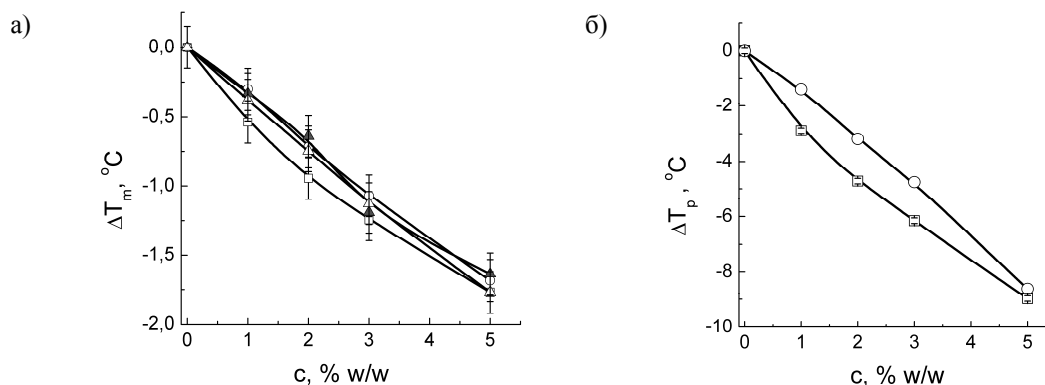


Рис. 2. Мембранотропное действие фенспирида: изменение температуры плавления (а) и предперехода (б) в мембранах ДПФХ (□), ДПФХ-Ц (○) и ДПФХ-ДПФЭ-Х (△) при нагревании.

В этом мембранотропное действие фенспирида весьма сходно с влиянием циклических соединений (в частности, бифенила) в термотропных жидких кристаллах [43], обусловленным нарушением степени упорядоченности молекул матрицы. При этом гистерезис во всех типах мембран оставался небольшим (в пределах 1° С).

Сильное деструктурирующее действие фенспирида обусловлено особенностями его химической структуры. Фенспирид – полужёсткая молекула, чуть меньшая по длине, чем холестерин (см. табл. 2). Строение полярной части фенспирида даёт основание предположить, что он, как и холестерин [44], расположен ниже поверхности мембраны, но не достигает её центра. При этом жёсткий бензольный фрагмент молекулы на гибкой алкильной цепочке обладает повышенной свободой вращения, которая, в сочетании с небольшим значением липофильности, приводит к значительному нарушению упаковки липидов.

### Действие лауриновой кислоты

Лауриновая кислота (ЛК) обладает противомикробной активностью, в частности, против пневмококков и стрептококков, причём наибольшей среди всех насыщенных ЖК, что делает её перспективной для использования в медицинских целях [45]. Установлено, что антимикробная активность жирных кислот определяется длиной и степенью насыщенности их цепей, что позволяет предположить её непосредственную связь с мембранотропным действием.

Действие лауриновой кислоты в мембранах ДПФХ и ДПФХ-Ц типично для всех длинноцепочечных жирных кислот в ФХ [46, 47]: повышение температуры фазовых переходов. Из рис. 3 видно, что особенно сильно увеличивается температура предперехода, тогда как полуширина пика предперехода уменьшается. Интересно, что в присутствии цереброзидов форма пика перехода сильно нарушается, что, по всей видимости, связано с изменением кинетики формирования Р<sub>β</sub>-фазы [48], а при добавлении лауриновой кислоты – восстанавливается до исходного значения (рис. 3, в). Таким образом, цереброзиды и лауриновая кислота, являясь компонентами кожного покрова [13], взаимно компенсируют действие друг друга, что вполне объяснимо в рамках модели [41]. О похожих взаимодействиях сообщается и в работе [44].

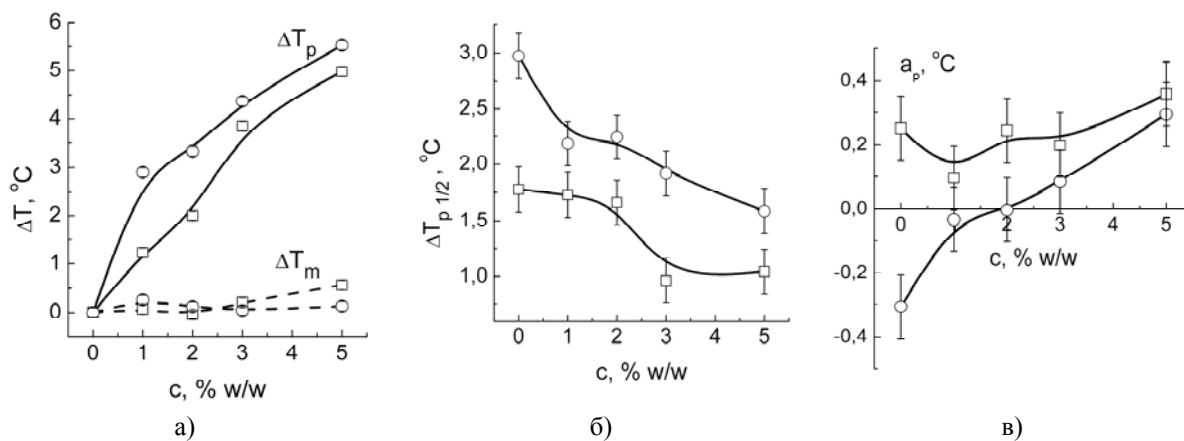


Рис. 3. Мембранотропное действие лауриновой кислоты: изменение температур фазовых переходов (а), полуширины (б) и асимметрии (в) предперехода в мембранах ДПФХ (□) и ДПФХ-Ц (○) при нагревании.

Лауриновая кислота в мембране ДПФХ-ДПФЭ-Х по-разному влияет на узкий и широкий пики (рис. 4).

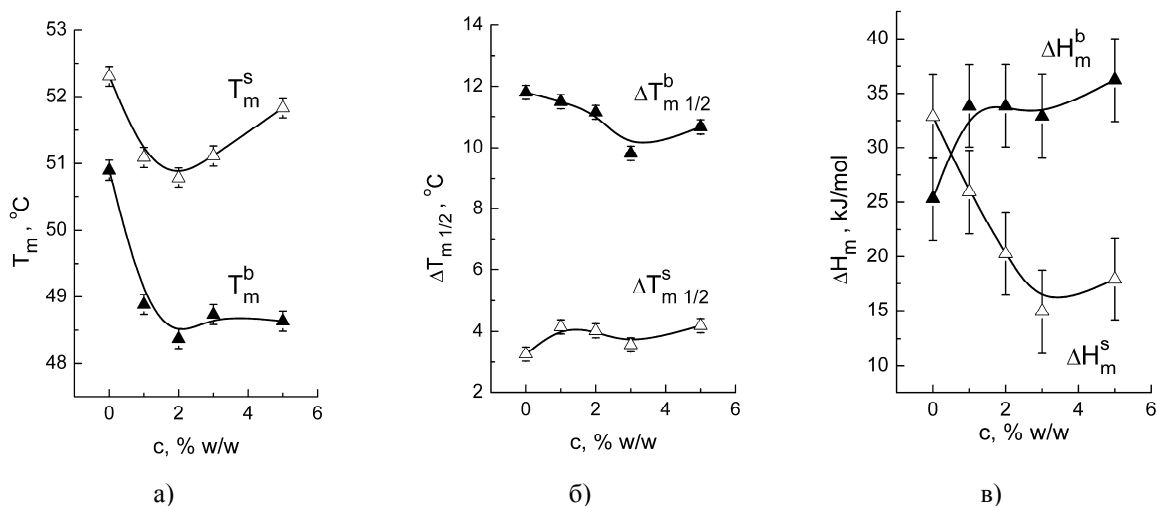


Рис. 4. Влияние лауриновой кислоты на температуру (а), полуширину (б) и энтальпию (в) пиков фазовых переходов в мембране ДПФХ-ДПФЭ-Х: ▲ – широкий пик, Δ – узкий пик.

Для узкого пика наблюдается немонотонная концентрационная зависимость  $T_m^s$  с минимумом при 2 % ЛК, а для широкого пика зависимость  $T_m^b(c)$  при тех же концентрациях выходит на насыщение. С повышением концентрации ЛК полуширина узкого пика растёт, а широкого – уменьшается. При этом энтальпия широкого пика растёт за счёт снижения энтальпии узкого пика, тогда как суммарная энтальпия обоих пиков в пределах погрешности не меняется. Наблюдаемые изменения свидетельствуют о том, что ЛК встраивается в обе липидные фазы, но оказывает на них качественно разное влияние. Поскольку наибольшие изменения термодинамических параметров наблюдаются для широкого пика, можно предположить, что ЛК лучше встраивается в низкотемпературную фазу липидов, обогащённую ФХ. Это согласуется с данными [49] о том, что жирные кислоты имеют большее сродство к ФХ по сравнению с ФЭ.

### Действие каолина

Действие каолина на мембраны ДПФХ и ДПФХ-Ц качественно различно. В присутствии каолина наблюдается снижение  $T_m$  и  $T_p$  в мембране ДПФХ и увеличение этих параметров в мембране ДПФХ-Ц (рис. 5). При этом полуширина в ДПФХ не меняется, в ДПФХ-Ц уменьшается в сторону значений этого параметра для мембраны ДПФХ, а гистерезис и асимметрия не меняются в обеих мембранах (данные не приведены). Более существенное влияние каолина на  $T_p$  указывает на его взаимодействие с полярной поверхностью мембран. Известно, что частички каолина хорошо адсорбируют ДПФХ на своей поверхности, в результате чего биологическое действие каолина существенно изменяется [50-52]. Наблюдаемые различия можно объяснить изменением гидратации мембран в результате адсорбции, которая повышается для мембраны ДПФХ и снижается для мембраны ДПФХ-Ц.

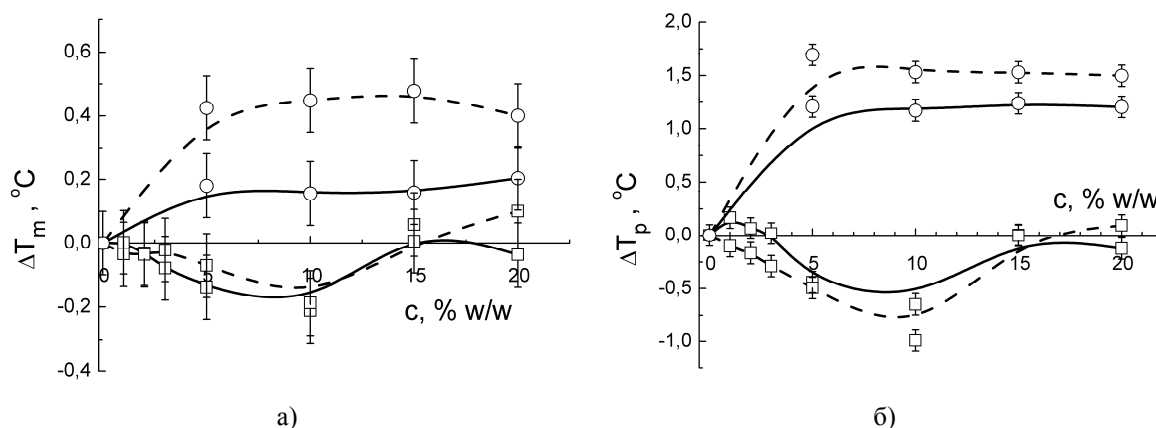


Рис. 5. Мембранотропное действие каолина: сдвиги температур плавления (а) и предперехода (б) в мембранах ДПФХ (□) и ДПФХ-Ц (○): сплошная линия – нагревание, пунктирная – охлаждение.

В мембране ДПФХ-ДПФЭ-Х каолин индуцировал изменения в обеих липидных фазах (рис. 6). Температура плавления узкого и широкого пика снижалась в присутствии каолина во всём исследованном концентрационном диапазоне, причём гораздо больше, чем для мембраны ДПФХ ( $\Delta T_m^s = -1,2$  °C,  $\Delta T_m^b = -1,6$  °C, тогда как для ДПФХ  $\Delta T_m = -0,2$  °C). В целом эти изменения согласуются с данной выше трактовкой изменения гидратации мембраны при адсорбции на каолине, однако, надо учитывать, что гидратация липидных композиций весьма неоднородна [53]. С повышением концентрации каолина наблюдался рост  $\Delta H_m^b$  и уменьшение  $\Delta H_m^s$ .

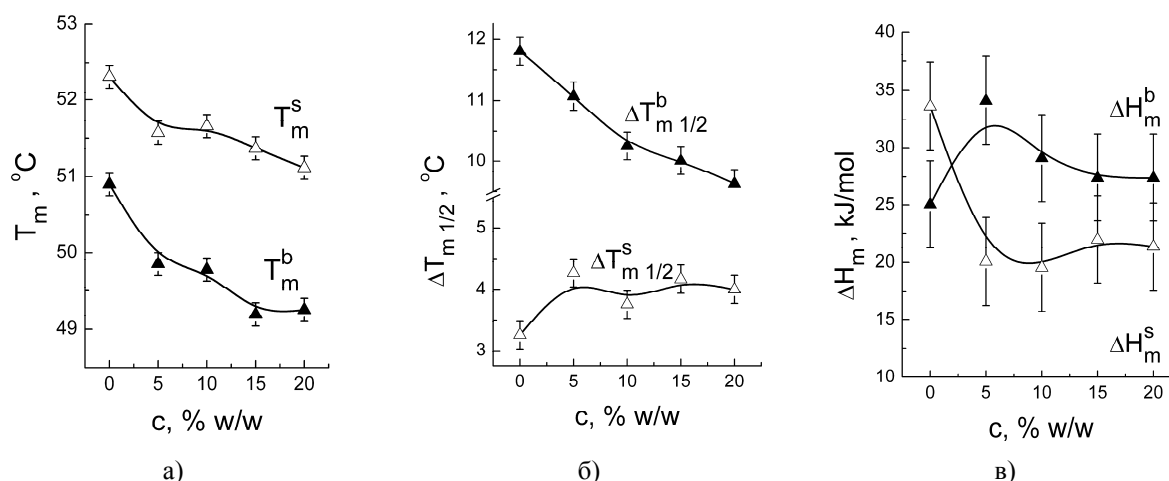


Рис. 6. Влияние каолина на температуру (а), полуширину (б) и энтальпию (в) пиков фазовых переходов в мембране ДПФХ-ДПФЭ-Х: ▲ – широкий пик, Δ – узкий пик.

Изменения значений полуширины (рис. 6, б) свидетельствует об изменениях кооперативности фазового перехода [1], имеющих противоположный характер в разных липидных фазах: в низкотемпературной трёхкомпонентной фазе кооперативность повышается, тогда как в высокотемпературной – снижается. Совокупность наблюдаемых изменений может также свидетельствовать о перераспределении липидов между фазами. По всей видимости, холестерин частично перераспределяется из низкотемпературной в высокотемпературную фазу. Латеральное перераспределение (сортировка) липидов хорошо известна при встраивании в мембрану белков [54, 55] и происходит, в частности, по механизму гидрофобного соответствия [56]. Латеральная неоднородность липидов в мембране (образующаяся, в том числе, и под действием сторонних молекул) приводит к перераспределению гидратации липидов и считается одним из ключевых факторов, влияющих на стабильность мембраны в целом [57]. Известно и обратное явление: трегалоза (высокогидрофильное вещество, локализуемое на поверхности мембраны) ограничивает фазовое разделение в липидных смесях с холестерином [20]. Таким образом, перераспределение липидов в мембране возможно как в случае встраивания сторонней молекулы в бислои, так и в случае адсорбции на поверхности, что и наблюдается, по всей видимости, в присутствии каолина.

## ВЫВОДЫ

Показано, что мембранотропное действие (МД) различных веществ может существенно различаться при использовании модельных мембран различного липидного состава (ДПФХ, ДПФХ-цереброзиды, ДПФХ-ДПФЭ-холестерин). Установлено, что фенспирид имеет практически одинаковое МД во всех трёх типах мембран. Для лауриновой кислоты МД в ДПФХ и ДПФХ-Ц также качественно аналогично; при этом в мембране ДПФХ имеет место компенсация МД лауриновой кислоты и цереброзида. Действие лауриновой кислоты в мембране ДПФХ-ДПФЭ-Х оказывается принципиально иным: температуры фазовых переходов немонотонно снижаются. МД каолина различно во всех типах мембран. В мембране ДПФХ-Ц наблюдается повышение температур переходов, тогда как в ДПФХ – тенденция к их снижению. В мембране ДПФХ-ДПФЭ-Х каолин приводит к заметному снижению температур фазовых переходов и перераспределению липидов в двухфазной области. Таким образом, показано, что изменение кооперативности и перераспределение

липидов в мембране может быть вызвано не только процессами встраивания сторонних компонентов в объём бислоя, но и их адсорбцией на поверхности мембраны. Полученные результаты могут быть полезны при подборе состава модельных мембран для исследования МД лекарственных веществ.

### БЛАГОДАРНОСТИ


Авторы благодарят за сотрудничество компанию «Интерхим» (Одесса).


### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ


Авторы подтверждают, что опубликованный в данной статье материал не является предметом конфликта интересов.

### Authors' ORCID ID

O.V. Vashchenko  <https://orcid.org/0000-0002-7447-9080>

L.V. Budianska  <https://orcid.org/0000-0003-4967-1035>

N.A. Kasian  <https://orcid.org/0000-0002-4739-2684>

L.N. Lisetski  <https://orcid.org/0000-0003-4341-832X>

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Харакоз Д.П. О возможной физиологической роли фазового перехода «жидкое–твёрдое» в биологических мембранах // Усп. биол. химии. 2001. № 41(2). С. 333.
2. Schreier S., Malheiros S.V., de Paula E. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects // Biochim. Biophys. Acta. 2000. Vol. 1508. P. 210.
3. Tsuchiya H., Mizogami M. Interaction of local anesthetics with biomembranes consisting of phospholipids and cholesterol: mechanistic and clinical implications for anesthetic and cardiotoxic effects // Anesth. Res. Pract. 2013. Vol. 2013. Article ID 297141 (18 pp). DOI: 10.1155/2013/297141.
4. Sargent D.F., Schwyzer R. Membrane lipid phase as catalyst for peptide-receptor interactions // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biochemistry. 1986. Vol. 83. P. 5774-5778.
5. Mantsch H.H., McElhaney R.N. Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy // Chem. Phys. Lipids. 1991. Vol. 57. P. 213-226.
6. Campbell R.B., Balasubramanian S.V., Straubinger R.M. Influence of cationic lipids on the stability and membrane properties of paclitaxel-containing liposomes // J. Pharm. Sci. 2001. Vol. 90. P. 1091-1105.
7. Campbell R.B., Balasubramanian S.V., Straubinger R.M. Phospholipid-cationic lipid interactions: influences on membrane and vesicle properties // Biochim. Biophys. Acta. 2001. Vol. 1512. P. 27-39.
8. Honerkamp-Smith A.R., Veatch S.L., Keller S.L. An introduction to critical points for biophysicists; observations of compositional heterogeneity in lipid membranes // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1788. P. 53–63.
9. Manca M.L., Sinico C., Maccioni A.M., Diez O., Fadda A.M., Manconi M. Composition influence on pulmonary delivery of rifampicin liposomes // Pharmaceutics. 2012. Vol. 4(4). P. 590-606.
10. Mannock D.A., Lewis R.N.A.H., McMullen T., McElhaney R.N.. The effect of variations in phospholipid and sterol structure on the nature of lipid – sterol interactions in lipid bilayer model membranes // Chem. Phys. Lipids. 2010. Vol. 163(6). P. 403–448.
11. Ali S., Minchey S., Janoff A., Mayhew E. A differential scanning calorimetry study of phosphocholines mixed with paclitaxel and its bromoacylated taxanes // Biophys. J. 2000. Vol. 78. P. 246–256.
12. Ostroumova O.S., Efimova S.S., Mikhailova E.V., Schagina L.V. The interaction of dipole modifiers with amphotericin-ergosterol complexes. Effects of phospholipid and sphingolipid membrane composition // Eur. Biophys. J. 2014. Vol. 43(4). P. 207-215. DOI 10.1007/s00249-014-0946-0.
13. Bouwstra J.A., Dubbelaar F.E.R., Gooris G.S., Ponc M. The lipid organisation in the skin barrier // Acta Derm. Venereol. 2000. Vol. 208. P. 23 - 30.
14. Brasitus TA, Schachter D. Lipid composition and fluidity of rat enterocyte basolateral membranes. Regional differences // Biochim. Biophys. Acta. 1984. Vol. 774(1). P. 138-146.
15. Groen D., Gooris G. S., Bouwstra J. A. New insights into the stratum corneum lipid organization by X-ray diffraction analysis // Biophys. J. 2009. Vol. 97. P. 2242–2249.
16. Kiselev, M.A. Methods for lipid nanostructure investigation at neutron and synchrotron sources // Phys. Part. Nuclei. 2011. Vol. 42(2). P. 302-331.
17. Engström S., Ekelund K., Engblom J., Eriksson L., Sparr E., Wennerström H. The skin barrier from a lipid perspective // Acta Derm. Venereol. 2000. Vol. 208. P. 31 –35.
18. Picquart M, Nicolas E, Lavialle F. Membrane-damaging action of ricin on DPPC and DPPC-cerebrosides assemblies. A Raman and FTIR analysis // Eur. Biophys. J. 1989. Vol. 17(3). P.143-149.

19. Feigenson G. W. Phase diagrams and lipid domains in multicomponent lipid bilayer mixtures // *Biochim. Biophys. Acta*. 2009. Vol. 1788. P. 47–52.
20. Ohtake S., Schebor C., Palecek S. P., de Pablo J. J. Phase behavior of freeze-dried phospholipid–cholesterol mixtures stabilized with trehalose // *Biochim. Biophys. Acta*. 2005. Vol. 1713. P. 57 – 64.
21. McMullen T., Lewis R., McElhaney H.R. Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines // *Biochemistry*. 1993. Vol. 32. P. 516 – 522.
22. Diakowski W., Ozimek Ł., Bielska E., Bem S., Langner M., Sikorski A.F. Cholesterol affects spectrin–phospholipid interactions in a manner different from changes resulting from alterations in membrane fluidity due to fatty acyl chain composition // *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. Vol. 1758. P. 4 – 11.
23. Koynova R., Brankov J., Tenchov B. Modulation of lipid phase behavior by kosmotropic and chaotropic solutes. Experiment and thermodynamic theory // *Eur. Biophys. J.* 1997. Vol. 25. P. 261–274.
24. Orczyk M., Wojciechowski K., Brezesinski G. Disordering effects of digitonin on phospholipid monolayers // *Langmuir*. 2017. Vol. 33 (15). P. 3871–3881.
25. Требования промышленности к качеству минерального сырья: Справочник для геологов / под ред. А. А. Вейхера. Вып. 54: Глины и каолин. М. : Госгеолтехиздат. 1962. 94 с.
26. Sadchenko A. O., Vashchenko O. V., Kasian N. A., Budianska, L. V., Lisetski, L. N. Correlations between molecular parameters of guest substances and their effect on model lipid membranes // *Func. Mater.* 2016. Vol. 23 (2). P. 230-235.
27. The structure of biological membranes, 2<sup>nd</sup> Ed. / Ed. P.L. Yeagle, 1991. pp. 1248. Chapt. 2. Lewis R.N.A.H., McElhaney R.N. The mesomorphic phase behavior of lipid bilayers. P. 53-71.
28. Koynova R., Caffrey M. Phases and phase transitions of the hydrated phosphatidylethanolamines // *Chem. Phys. Lipids*. 1994. Vol. 69. P. 1-34.
29. Ikeda Y., Inagaki M., Yamada K., Miyamoto T., Higuchi R., Shibata O. Langmuir monolayers of cerebroside with different head groups originated from sea cucumber: Binary systems with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) // *Coll. Surf. B: Biointerfaces*. 2009. Vol. 72. P. 272–283.
30. Nakahara H., Nakamura S., Nakamura K., Inagaki M., Asoc M., Higuchi R., Shibata O. Cerebroside Langmuir monolayers originated from the echinoderms I. Binary systems of cerebroside and phospholipids // *Coll. Surf. B: Biointerfaces*. 2005. Vol. 42. P. 157–174.
31. Chapman D., Urbina J. Biomembrane Phase Transitions. Studies of lipid-water systems using differential scanning calorimetry // *J. Biol. Chem.* 1974. Vol. 249. № 8. P. 2512-2521.
32. Mouritsen O.G., Jorgensen K. Dynamical order and disorder in lipid bilayers // *Chem. Phys. Lipids*. 1994. Vol. 73. P. 3–25.
33. Losada-Pérez P., Mertens N., de Medio-Vasconcelos B., Slenders E., Leys J., Peeters M., van Grinsven B., Gruber J., Glorieux C., Pfeiffer H., Wagner P., Thoen J. Phase transitions of binary lipid mixtures: a combined study by adiabatic scanning calorimetry and quartz crystal microbalance with dissipation monitorings // *Adv. Cond. Mat. Phys.* 2015. Vol. 2015. Article ID 479318. 14 pp.
34. Caffrey M., Hing F. S. A temperature gradient method for lipid phase diagram construction using time-resolved X-ray diffraction // *Biophys. J.* 1987. Vol. 51. P. 37-46.
35. Blume A., Ackermann T. A calorimetric study of the lipid phase transitions in aqueous dispersions of phosphorylcholine-phosphorylethanolamine mixtures // *FEBS Lett.* 1974. Vol. 43. № 1. P. 71-74.
36. Bouchet A. M., Frias M. A., Lairion F., Martini F., Almaleck H., Gordillo G., Disalvo E. A. Structural and dynamical surface properties of phosphatidylethanolamine containing membranes // *Chem. Phys. Lipids*. 1982. Vol.30. P. 229-259.
37. Brown D. A., London E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. No. 23. P. 17221–17224.
38. Bagatolli L. A., Gratton E. Direct observation of lipid domains in free-standing bilayers using two-photon excitation fluorescence microscopy // *J. Fluoresc.* 2001. Vol. 11. No. 3. P. 141–160.
39. Bagatolli L., Kumar P. B. S. Phase behavior of multicomponent membranes: Experimental and computational techniques// *Soft Matter*. 2009. Vol. 5. P. 3234–3248.
40. McElhaney R. N. The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes // *Chem. Phys. Lipids*. 1982. Vol. 30. P. 229-259.
41. Israelachvili J. N., Mitchell D. J. A model for the packing of lipids in bilayer membranes // *Biochim. Biophys. Acta*. 1975. Vol. 389. P. 13-19.
42. Benesch M. G. K., Lewis R. N. A. H., Mannock D. A., McElhaney R. N. A DSC and FTIR spectroscopic study of the effects of the epimeric cholestan-3-ols and cholestan-3-one on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes: Comparison with their 5-cholesten analogs // *Chem. Phys. Lipids*. 2015. Vol. 187. P. 34–49.
43. Denolf K., Cordoyiannis G., Glorieux C., Thoen J. Effect of nonmesogenic impurities on the liquid crystalline phase transitions of octylcyanobiphenyl // *Phys. Rev.* 2007. E. 76. 051702.

44. Mojumdar E. H., Groen D., Gooris G. S., Barlow D. J., Lawrence M. J., Deme B., Bouwstra J. A. Localization of cholesterol and fatty acid in a model lipid membrane: a neutron diffraction approach // *Biophys. J.* 2013. Vol. 105. P. 911–919.
45. Рыбин В. Г., Блинов Ю. Г. Антимикробные свойства липидов // *Известия Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра.* 2001. №. 129, С. 179-196.
46. Seddon J. M., Templer R. H., Warrender N. A., Huang Z., Cevc G., Marsh D. Phosphatidylcholine–fatty acid membranes: effects of headgroup hydration on the phase behaviour and structural parameters of the gel and inverse hexagonal (H<sub>II</sub>) / phases // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. Vol. 1327. P. 131–147.
47. Bothun G. D., Boltz L., Kurniawana Y., Scholz C. Cooperative effects of fatty acids and n-butanol on lipid membranephase behavior // *Coll. Surf. B: Biointerfaces.* 2016. Vol. 139. P. 62–67.
48. Kaasgaard T., Leidy C., Crowe J. H., Mouritsen O. G., Jørgensen K. Temperature-controlled structure and kinetics of ripple phases in one- and two-component supported lipid bilayers // *Biophys. J.* 2003. Vol. 85. P. 350–360.
49. Woldseth B., Christensen E., Christophersen B. O. Incorporation of stearic acid (18:0) and palmitic acid (16:0) in phospholipid molecular species studied in isolated rat liver // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. Vol. 1167. P. 296-302.
50. Cellular and molecular effects of mineral and synthetic dusts and fibers / Ed. Davis J. M. G. and Jaurand M.-C., Springer-Verlag. Berlin – Heidelberg. 1994.
51. Gao N, Keane M. J, Ong T, Wallace W. E. Effects of simulated pulmonary surfactant on the cytotoxicity and DNA-damaging activity of respirable quartz and kaolin // *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2000. Vol. 60(3). P. 153-67.
52. Gao N, Keane M. J, Ong T, Ye J., Miller W. E., Wallace W. E. Effects of phospholipid surfactant on apoptosis induction by respirable quartz and kaolin in NR8383 rat pulmonary macrophages // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001. Vol. 175. P. 217–225.
53. Miller I. R., Bach D., Wachtel E. J., Eisenstein M. Interrelation between hydration and interheadgroup interaction in phospholipids // *Bioelectrochemistry.* 2002. Vol. 58. P. 193– 196.
54. Dumas F., Sperotto M. M., Lebrun M.-C., Tocanne J.-F., Mouritsen O.G. Molecular sorting of lipids by bacteriorhodopsin in dilauroylphosphatidylcholine/distearoylphosphatidylcholine lipid bilayers // *Phys. Rev. E.* 2007. Vol. 76. 051702.
55. Prenner E. J., Lewis R. N. A. H., Kondejewski L. H., Hodges R. S., McElhaney R. N. Differential scanning calorimetric study of the effect of the antimicrobial peptide gramicidin S on the thermotropic phase behavior of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol lipid bilayer membranes // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. Vol. 1417. P. 211-223.
56. Killian J. A. Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. Vol. 1376. P. 401-416.
57. Riske K. A., Domingues C. C., Casadei B. R., Mattei B., Carità A. C., Lira R. B., Preté P. S. C., de Paula E. Biophysical approaches in the study of biomembrane solubilization: quantitative assessment and the role of lateral inhomogeneity // *Biophys. Rev.* 2017. Vol. 9. P. 649–667.

#### REFERENCES

1. Kharakoz, D.P. (2001). O vozmozhnoi fiziologicheskoi roli fazovogo perekhoda “zhidkoe – tverdoe” v biologicheskikh membranakh. *Uspekhi biologicheskoi khimii*, 41(2), 333–364. (In Russian)
2. Schreier, S., Malheiros, S.V., de Paula, E. (2000). Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1508, 210–234.
3. Tsuchiya, H., Mizogami, M. (2013). Interaction of local anesthetics with biomembranes consisting of phospholipids and cholesterol: mechanistic and clinical implications for anesthetic and cardiotoxic effects. *Anesthesiology Research and Practice*. DOI: 10.1155/2013/297141.
4. Sargent, D.F., Schwyzer, R. (1986). Membrane lipid phase as catalyst for peptide-receptor interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences, Biochemistry*, 83, 5774–5778.
5. Mantsch, H.H., McElhaney, R.N. (1991). Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*, 57, 213–226.
6. Campbell, R.B., Balasubramanian, S.V., Straubinger, R.M. (2001). Influence of cationic lipids on the stability and membrane properties of paclitaxel-containing liposomes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90, 1091–1105.
7. Campbell, R.B., Balasubramanian, S.V., Straubinger, R.M. (2001). Phospholipid-cationic lipid interactions: influences on membrane and vesicle properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1512, 27–39.
8. Honerkamp-Smith, A.R., Veatch, S.L., Keller, S.L. (2009). An introduction to critical points for biophysicists; observations of compositional heterogeneity in lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788, 53–63.
9. Manca, M.L., Sinico, C., Maccioni, A.M., Diez, O., Fadda, A.M., Manconi, M. (2012). Composition influence on pulmonary delivery of rifampicin liposomes. *Pharmaceutics*, 4(4), 590–606.



10. Mannoek, D.A., Lewis, R.N.A.H., McMullen, T., McElhaney, R.N. (2010). The effect of variations in phospholipid and sterol structure on the nature of lipid – sterol interactions in lipid bilayer model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 163(6), 403–448.
11. Ali, S., Minchey, S., Janoff, A., Mayhew, E. (2000). A differential scanning calorimetry study of phosphocholines mixed with paclitaxel and its bromoacylated taxanes. *Biophysical Journal*, 78, 246–256.
12. Ostroumova, O.S., Efimova, S.S., Mikhailova, E.V., Schagina, L.V. (2014). The interaction of dipole modifiers with amphotericin-ergosterol complexes. Effects of phospholipid and sphingolipid membrane composition. *European Biophysics Journal*, 43(4), 207–215. DOI 10.1007/s00249-014-0946-0.
13. Bouwstra, J.A., Dubbelaar, F.E.R., Gooris, G.S., Ponc, M. (2000). The lipid organisation in the skin barrier. *Acta Dermato-Venereologica*, 208, 23–30.
14. Brasitus, T.A., Schachter, D. (1984). Lipid composition and fluidity of rat enterocyte basolateral membranes. Regional differences. *Biochimica et Biophysica Acta*, 774(1), 138–146.
15. Groen, D., Gooris, G.S., Bouwstra, J.A. (2009). New insights into the stratum corneum lipid organization by X-ray diffraction analysis. *Biophysical Journal*, 97, 2242–2249.
16. Kiselev, M.A. (2011). Methods for lipid nanostructure investigation at neutron and synchrotron sources. *Physics of Particles and Nuclei*, 42(2), 302–331.
17. Engström, S., Ekelund, K., Engblom, J., Eriksson, L., Sparr, E., Wennerström, H. (2000). The skin barrier from a lipid perspective. *Acta Dermato-Venereologica*, 208, 31–35.
18. Picquart, M., Nicolas, E., Laviolle, F. (1989). Membrane-damaging action of ricin on DPPC and DPPC-cerebrosides assemblies. A Raman and FTIR analysis. *European Biophysics Journal*, 17(3), 143–149.
19. Feigenson, G.W. (2009). Phase diagrams and lipid domains in multicomponent lipid bilayer mixtures. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788, 47–52.
20. Ohtake, S., Schebor, C., Palecek, S.P., de Pablo, J.J. (2005). Phase behavior of freeze-dried phospholipid–cholesterol mixtures stabilized with trehalose. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1713, 57–64.
21. McMullen, T., Lewis, R., McElhaney, H.R. (1993). Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines. *Biochemistry*, 32, 516–522.
22. Diakowski, W., Ozimek, Ł., Bielska, E., Bem, S., Langner, M., Sikorski, A.F. (2006). Cholesterol affects spectrin–phospholipid interactions in a manner different from changes resulting from alterations in membrane fluidity due to fatty acyl chain composition. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758, 4–11.
23. Koynova, R., Brankov, J., Tenchov, B. (1997). Modulation of lipid phase behavior by kosmotropic and chaotropic solutes. Experiment and thermodynamic theory. *European Biophysics Journal*, 25, 261–274.
24. Orczyk, M., Wojciechowski, K., Brezesinski, G. (2017). Disordering effects of digitonin on phospholipid monolayers. *Langmuir*, 33(15), 3871–3881.
25. Veikher, A.A. (Ed.). (1962). *Trebovaniia promyshlennosti k kachestvu mineralnogo syria: Spravochnik dlia geologov. Gliny i kaolin*. Moscow: Gosgeoltekhizdat, 54. (In Russian)
26. Sadchenko, A.O., Vashchenko, O.V., Kasian, N.A., Budianska, L.V., Lisetski, L.N. (2016). Correlations between molecular parameters of guest substances and their effect on model lipid membranes. *Functional Materials*, 23 (2), 230–235.
27. Yeagle, P.L. (Ed.). (1991). The structure of biological membranes, 2<sup>nd</sup> Ed. The mesomorphic phase behavior of lipid bilayers. *CRC Press*. 53–71.
28. Koynova, R., Caffrey, M. (1994). Phases and phase transitions of the hydrated phosphatidylethanolamines. *Chemistry and Physics of Lipids*, 69, 1–34.
29. Ikeda, Y., Inagaki, M., Yamada, K., Miyamoto, T., Higuchi, R., Shibata, O. (2009). Langmuir monolayers of cerebroside with different head groups originated from sea cucumber: Binary systems with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72, 272–283.
30. Nakahara, H., Nakamura, S., Nakamura, K., Inagaki, M., Asoc, M., Higuchi, R., Shibata, O. (2005). Cerebroside Langmuir monolayers originated from the echinoderms I. Binary systems of cerebrosides and phospholipids. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 42, 157–174.
31. Chapman, D., Urbina, J. (1974). Biomembrane Phase Transitions. Studies of lipid-water systems using differential scanning calorimetry. *Journal of Biological Chemistry*, 249(8), 2512–2521.
32. Mouritsen, O.G., Jorgensen, K. (1994). Dynamical order and disorder in lipid bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 73, 3–25.
33. Losada-Pérez, P., Mertens, N., de Medio-Vasconcelos, B., Slenders, E., Leys, J., Peeters, M., ... Thoen, J. (2015). Phase transitions of binary lipid mixtures: a combined study by adiabatic scanning calorimetry and quartz crystal microbalance with dissipation monitorings. *Advances in Condensed Matter Physics*, 2015. Article ID 479318.
34. Caffrey, M., Hing, F.S. (1987). A temperature gradient method for lipid phase diagram construction using time-resolved X-ray diffraction. *Biophysical Journal*, 51, 37–46.

35. Blume, A., Ackermann, T. (1974). A calorimetric study of the lipid phase transitions in aqueous dispersions of phosphorylcholine-phosphorylethanolamine mixtures. *FEBS Letters*, 43(1), 71–74.
36. Bouchet, A.M., Frias, M.A., Lairion, F., Martini, F., Almaleck, H., Gordillo, G., Disalvo, E.A. (1982). Structural and dynamical surface properties of phosphatidylethanolamine containing membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 30, 229–259.
37. Brown, D.A., London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *Journal of Biological Chemistry*, 275(23), 17221–17224.
38. Bagatolli, L.A., Gratton, E. (2001). Direct observation of lipid domains in free-standing bilayers using two-photon excitation fluorescence microscopy. *Journal of Fluorescence*, 11(3), 141–160.
39. Bagatolli, L., Kumar, P.B.S. (2009). Phase behavior of multicomponent membranes: Experimental and computational techniques. *Soft Matter*, 5, 3234–3248.
40. McElhaney, R.N. (1982). The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 30, 229–259.
41. Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J. (1975). A model for the packing of lipids in bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 389, 13–19.
42. Benesch, M.G.K., Lewis, R.N.A.H., Mannock, D.A., McElhaney, R.N. (2015). A DSC and FTIR spectroscopic study of the effects of the epimeric cholestan-3-ols and cholestan-3-one on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes: Comparison with their 5-cholesten analogs. *Chemistry and Physics of Lipids*, 187, 34–49.
43. Denolf, K., Cordoyiannis, G., Glorieux, C., Thoen, J. (2007). Effect of nonmesogenic impurities on the liquid crystalline phase transitions of octylcyanobiphenyl. *Physical Review*, 76, 051702.
44. Mojumdar E.H., Groen D., Gooris G.S., Barlow D.J., Lawrence M.J., Deme B., Bouwstra J.A. (2013). Localization of cholesterol and fatty acid in a model lipid membrane: a neutron diffraction approach. *Biophysical Journal*, 105, 911–919.
45. Rybin, V.G., Blinov, Iu.G. (2001). Antimikrobnye svoistva lipidov. *Izvestiia Tikhookeanskogo Rybokhoziaistvennogo Nauchno-Issledovatel'skogo Tsentra*, 129, 179–196. (In Russian)
46. Seddon, J.M., Templer, R.H., Warrender, N.A., Huang, Z., Cevc, G., Marsh, D. (1997). Phosphatidylcholine–fatty acid membranes: effects of headgroup hydration on the phase behaviour and structural parameters of the gel and inverse hexagonal ( $H_{II}$ ) / phases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1327, 131–147.
47. Bothun, G.D., Boltz, L., Kurniawana, Y., Scholz, C. (2016). Cooperative effects of fatty acids and n-butanol on lipid membranephase behavior. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 139, 62–67.
48. Kaasgaard, T., Leidy, C., Crowe, J.H., Mouritsen, O.G., Jørgensen, K. (2003). Temperature-controlled structure and kinetics of ripple phases in one- and two-component supported lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 85, 350–360.
49. Woldseth, B., Christensen, E., Christophersen, B.O. (1993). Incorporation of stearic acid (18:0) and palmitic acid (16:0) in phospholipid molecular species studied in isolated rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1167, 296–302.
50. Davis, J.M.G., Jaurand, M.-C. (Ed.). (1994). *Cellular and molecular effects of mineral and synthetic dusts and fibers*. Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg.
51. Gao, N., Keane, M.J., Ong, T., Wallace, W.E. (2000). Effects of simulated pulmonary surfactant on the cytotoxicity and DNA-damaging activity of respirable quartz and kaolin. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 60(3), 153–167.
52. Gao, N., Keane, M.J., Ong, T., Ye, J., Miller, W.E., Wallace, W.E. (2001). Effects of phospholipid surfactant on apoptosis induction by respirable quartz and kaolin in NR8383 rat pulmonary macrophages. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 175, 217–225.
53. Miller, I.R., Bach, D., Wachtel, E.J., Eisenstein, M. (2002). Interrelation between hydration and interheadgroup interaction in phospholipids. *Bioelectrochemistry*, 58, 193–196.
54. Dumas, F., Sperotto, M.M., Lebrun, M.-C., Tocanne, J.-F., Mouritsen, O.G. (2007). Molecular sorting of lipids by bacteriorhodopsin in dilauroylphosphatidylcholine/distearoylphosphatidylcholine lipid bilayers. *Physical Review E*, 76, 051702.
55. Prenner, E.J., Lewis, R.N.A.H., Kondejewski, L.H., Hodges, R.S., McElhaney, R.N. (1999). Differential scanning calorimetric study of the effect of the antimicrobial peptide gramicidin S on the thermotropic phase behavior of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol lipid bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1417, 211–223.
56. Killian, J.A. (1998). Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1376, 401–416.
57. Riske, K.A., Domingues, C.C., Casadei, B.R., Mattei, B., Carità, A.C., Lira, R.B., Preté, P.S.C., de Paula, E. (2017). Biophysical approaches in the study of biomembrane solubilization: quantitative assessment and the role of lateral inhomogeneity. *Biophysical Reviews*, 9, 649–667.

<http://doi.org/10.26565/2075-3810-2018-39-04>

УДК 577.31+51-76

## АДАПТИРОВАННЫЙ АЛГОРИТМ РАБОТЫ ИМПЛАНТИРУЕМОГО ДОЗАТОРА ИНСУЛИНА

Н.П. Мустецов<sup>1</sup>, С.С. Лапта<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, майдан Свободы, 5, 61022, Харьков, Украина

[mustetsov@ukr.net](mailto:mustetsov@ukr.net)

<sup>2</sup>Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт», ул. Кирпичева, 2, 61002, Харьков, Украина

[stanislav69@ukr.net](mailto:stanislav69@ukr.net)

Поступила в редакцию 9 ноября 2017 г.

Принята 1 февраля 2018 г.

**Актуальность.** Сахарный диабет занимает одно из первых мест среди причин смертности. Это обусловлено, прежде всего, индивидуальным характером протекания заболевания. Алгоритм процедуры терапии (введения инсулина) определяет врач на основе модельных представлений о динамике процесса регуляции гликемии. Существующие модели имеют ограничения, связанные со сложностью учета индивидуальных особенностей пациента и ограниченным числом контролируемых показателей организма человека. Поэтому разработка более адекватных моделей гликемии и алгоритмов введения инсулина, позволяющих учитывать текущее состояние пациента, является актуальной задачей.

**Цель работы.** Целью работы является развитие теории математического моделирования сложных систем и разработка адаптивного алгоритма работы имплантируемого дозатора инсулина на основе предлагаемой модели динамики уровня глюкозы в крови человека.

**Материалы и методы.** Для обоснования модели гликемии использованы методы структурной и параметрической идентификации моделей гомеостатических систем в классе дифференциальных и интегральных уравнений, что позволяет получить модель, воспроизводящую данные экспериментальных исследований. Для проверки эффективности разработанного алгоритма использованы экспериментальные данные динамики гликемии пациентов больных сахарным диабетом первого типа.

**Результаты.** Численные эксперименты показали эффективность предложенной модели динамики уровня глюкозы в крови человека для разработки алгоритма нормализации гликемии с помощью имплантируемого дозатора инсулина. Преимуществом предлагаемого алгоритма является возможность поддержки уровня глюкозы в крови пациента независимо от режима питания.

**Выводы.** В результате численных экспериментов была показана эффективность использования разработанной модели динамики уровня глюкозы в крови человека для создания алгоритма работы имплантируемого дозатора инсулина. При известной динамике уровня глюкозы пациента, создание индивидуального алгоритма введения инсулина позволяет нормализовать концентрацию глюкозы в крови независимо от режима питания, в отличие от существующих дозаторов инсулина, работающих по жесткой программе и требующих придерживаться режимов питания.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** алгоритм; диабет сахарный; глюкоза; гликемия; инсулин; структурная идентификация; математическое моделирование.

## АДАПТИВНИЙ АЛГОРИТМ РОБОТИ ДОЗАТОРУ ІНСУЛІНА, ЩО ІМПЛАНТУЄТЬСЯ

М.П. Мустецов<sup>1</sup>, С.С. Лапта<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, майдан Свободи, 5, 61022, Харків, Україна

<sup>2</sup>Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», вул. Кирпичова, 2, 61002, Харків, Україна

**Актуальність.** Цукровий діабет посідає одне з перших місць серед причин смертності. Це обумовлено, перш за все, індивідуальним характером протікання захворювання. Алгоритм процедури терапії (введення інсуліну) визначає лікар на основі модельних уявлень про динаміку процесу регуляції глікемії. Існуючі моделі мають обмеження, пов'язані зі складністю врахування індивідуальних особливостей пацієнтата обмеженням числом контрольованих показників організму

людини. Тому розробка більш адекватних моделей глікемії і алгоритмів введення інсуліну, що дозволяють враховувати поточний стан пацієнта, є актуальним завданням.

**Мета роботи.** Метою роботи є розвиток теорії математичного моделювання складних систем і розробка адаптивного алгоритму роботи дозатору інсуліну, що імплантується, на основі запропонованої моделі динаміки рівня глюкози в крові людини.

**Матеріали та методи.** Для обґрунтування моделі глікемії використані методи структурної та параметричної ідентифікації моделей гомеостатичних систем в класі диференціальних і інтегральних рівнянь, що дозволяє отримати модель, яка відтворює дані експериментальних досліджень. Для перевірки ефективності розробленого алгоритму використані експериментальні дані динаміки глікемії пацієнтів хворих на цукровий діабет першого типу.

**Результати.** Чисельні експерименти показали ефективність запропонованої моделі динаміки рівня глюкози в крові людини для розробки алгоритму нормалізації глікемії за допомогою дозатора інсуліну, що імплантується. Перевагою запропонованого алгоритму є можливість підтримки рівня глюкози в крові пацієнта незалежно від режиму харчування.

**Висновки.** В результаті чисельних експериментів була показана ефективність використання розробленої моделі динаміки рівня глюкози в крові людини для створення алгоритму роботи дозатора інсуліну, що імплантується. При відомій динаміці рівня глюкози пацієнта, створення індивідуального алгоритму введення інсуліну дозволяє нормалізувати концентрацію глюкози в крові незалежно від режиму харчування, на відміну від існуючих дозаторів інсуліну, що працюють за жорсткою програмою і вимагають дотримуватися режиму харчування.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** алгоритм; діабет цукровий; глюкоза; глікемія; інсулін; структурна ідентифікація; математичне моделювання.

## ADAPTIVE ALGORITHM OF IMPLANTABLE INSULIN PUMP OPERATION

N.P. Mustetsov<sup>1</sup>, S.S. Lapta<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>National Technical University "Kharkiv Politechnical Institute", 2 Kyrpychova St., 61002, Kharkiv, Ukraine

**Relevance:** Diabetes mellitus is one of the leading causes of death. Low survival rates are caused by many individual complications during the time course of a disease. Usually, the therapeutic algorithm of insulin administration is prescribed by a doctor on the basis of general model assumptions on the dynamics of glycaemic regulation process. Existing models have limitations, due to the complexity of taking into account the individual characteristics of a patient and limited number of monitored indicators of human body. Therefore the development of more adequate models of glycaemia and algorithms for the introduction of insulin, which take into account the current state of a patient, is an actual task.

**Objective:** The purpose of work is the development of a mathematical model and an adaptive algorithm for operation of implantable insulin administrating device on the basis of the offered model of dynamics of glucose concentration in human blood.

**Materials and methods:** To substantiate suggested model of glycaemia we have used methods of structural and parametric identification of homeostatic systems based on differential and integral equations. This approach made it possible to achieve compliance of our proposed model with experimental data obtained for the patients with type 1 diabetes.

**Results:** Numerical experiments have shown the effectiveness of supposed model of glucose level dynamics in human blood for the development of an algorithm for normalizing glycaemia with the help of implantable insulin dispenser. The advantage of proposed algorithm is the ability to maintain the glucose level in patient's blood regardless of diet.

**Conclusions:** Adoption of the developed dynamic model of glucose level in human blood provides a starting point for creation of operating algorithm for implanted insulin dosage device. For the known dynamics of glucose in patient's body, exploitation of our individual adaptive algorithm of insulin administration allows to normalize the level of glucose in patient's blood irrespective of diet, in contrast to the existing insulin pumps, which work according to the set program and require patient to adhere to the prescribed diet.

**KEY WORDS:** algorithm; diabetes; glucose; glycaemia; insulin; structural identification; mathematical modeling.

Сахарный диабет (СД) занимает одно из первых мест по распространенности и возможной тяжести протекания в острой форме. В настоящее время СД является практически неизлечимой болезнью. При отсутствии лечения СД приводит к осложнениям, в том числе смертельно опасным (инфаркт миокарда, инсульт). К сожалению, СД диагностируется часто в случае, когда уже имеются нарушения в регуляции углеводного обмена в организме человека [1]. Особенности течения

заболевания изучены достаточно хорошо, а его острая форма успешно компенсируется инъекциями инсулина, но проблема предотвращения поздних осложнений СД все еще не решена. Более того, поздние осложнения СД неизбежны даже при соблюдении лучших современных методик его терапии.

Полностью вылечить СД невозможно, но его можно компенсировать, понижая уровень глюкозы в крови пациента медикаментозно. При этом большое значение помимо средних опытных рекомендаций по выбору режима инъекций инсулина имеет опыт врача и адекватный учет особенностей функционирования организма конкретного пациента. Однако, противоречивую в своей постановке задачу эффективной компенсации СД и недопущения смертельно опасных состояний не удается эффективно решить методами классической инсулинотерапии.

Перспективным направлением в решении этой задачи является использование имплантируемых (носимых) дозаторов инсулина, обеспечивающих близкую к естественной концентрацию глюкозы в крови. Дозатор представляет собой альтернативный способ доставки инсулина с помощью инъекций не шприцом, а посредством катетера, установленного подкожно и соединенного с резервуаром и блоком памяти, содержащим информацию о количестве инсулина, который необходимо ввести.

В основе работы инсулинового дозатора (помпы) лежит базисно-болюсный принцип подачи инсулина. Дозатор обеспечивает постоянное подкожное введение инсулина малыми дозами. Схема введения инсулина помпой максимально соответствуют ритму работы здоровой поджелудочной железы, что обеспечивает оптимальный контроль уровня сахара в течение 24 часов [2, 3]. Применение дозаторов эффективно только для хорошо обученных и дисциплинированных пациентов. Это обусловлено необходимостью контроля уровня гликемии (на начальном этапе до десяти раз в сутки) и ежедневной работы врача с пациентом [4]. Программирование инсулиновой помпы – длительный процесс, начинающийся с момента расчета начальных настроек, и длится практически все время применения дозатора. Эндокринолог решает две задачи, это подбор стартовых режимов работы инсулиновой помпы и адаптацию исходной программы ее работы под индивидуальные особенности пациента. Расчет стартовых настроек инсулиновой помпы производится по одному из многочисленных алгоритмов и формул [5-7], с учетом веса пациента, необходимой суточной дозы инсулина, количества углеводов в пище и др. Существующие программы управления дозаторами предусматривают примитивное поддержание уровня гликемии в крови, в лучшем случае, в заданных пределах.

Целью работы является разработка системы управления имплантируемым дозатором инсулина, обеспечивающей физиологически адекватную регуляцию углеводного обмена в организме пациента и предотвращение гипогликемических состояний и поздних осложнений диабета.

### **ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ. МОДЕЛЬ**

Существующие имплантируемые дозаторы инсулина, как техническая подсистема биотехнической системы (БТС) «пациент – дозатор инсулина», построены на основе модели саморегуляции (рис. 1). Их работа происходит по принципу обратной отрицательной связи – по рассогласованию регулируемой переменной от заданной уставки. Нефизиологичность их работы обусловлена, прежде всего, использованием в качестве этой уставки некоторого фиксированного (желаемого) значения уровня гликемии.

В действительности фиксированный уровень глюкозы наблюдается в организме лишь в базальном состоянии (после ночного голодания). В норме он находится в

пределах: 60-100 мг% (мг глюкозы на 100 г крови). Даже кратковременное его понижение до 40 мг% грозит голоданием центральной нервной системы, а при его продлении – гипогликемической комой. Смысл верхней границы базальной нормы в 100 мг% состоит в том, что при ее хроническом, даже незначительном, превышении развиваются типичные поздние осложнения СД [1]. При этом кратковременное повышение уровня глюкозы в крови человека после еды до 160 мг%, необходимое для получения энергии его жизнедеятельности, происходит без каких-либо негативных последствий.



Рис. 1. Схема автоматического регулятора по отклонению моделирования гомеостатической регуляции в организме по Новосельцеву [3].

Очевидно, что обеспечить физиологичность работы имплантируемого дозатора инсулина невозможно ни в случае заданной уставки по допустимому уровню глюкозы, ни при задании полосы допустимых его значений. Т.е. уставка должна быть динамичной, обеспечивать желаемый средний профиль уровня глюкозы у здорового человека, с учетом индивидуальных особенностей и режима питания пациента.

Формирование динамической уставки возможно путем математического моделирования динамики глюкозы или системы регуляции углеводного обмена здорового человека. Таких моделей, в последние десятилетия, было предложено десятки [8]. Однако, лишь одна из них, точнее целое семейство моделей, построенных по единому принципу и отличающихся между собой уровнем структуризации, оказалась наиболее физиологически адекватной и работоспособной [9]. Ниже приведена система двух дифференциальных уравнений первого порядка с запаздывающим аргументом динамики глюкозы и инсулина для наиболее детализированной модели:

$$\begin{cases} y'(t) = (1 - \alpha_v) f_v(t) + (1 - r \alpha_v) f_p(t) - \lambda \varphi_v(t) - \lambda \psi \varphi_d(t) - \beta^- Es(y(t - \tau)) + \\ + \beta^+ Es(-y(t - \tau)) - \gamma Es(y(t - 1)) - \delta Es(g(t - 1) - g^*), & t \geq 0, \\ j'(t) = \eta(f_v(t) + r f_p(t)) + \varphi_v(t) + \psi \varphi_d(t) + \mu Es(y(t - \tau)) + \xi Es(y(t - 1)) - \\ - \zeta j(t - 1), & t \geq 0, \\ y(t) = \phi(t), \quad j(t) = \omega(t), & -\tau \leq t < 0, \end{cases} \quad (1)$$

где  $t$  – время в минутах;  $y(t)$  и  $j(t)$  – отклонения текущего значения глюкозы  $g(t)$  и инсулина  $i(t)$  от их базальных значений  $g_b, i_b$ ;  $f_{v,p}(t)$  – скорость внутривенного (или перорального) поступления глюкозы в кровь;  $\varphi_{v,d}(t)$  – скорость внутривенного (подкожного) поступления в кровь инсулина;  $Es(z) = z e(z)$  – пороговая функция, где  $e(z)$  – единичная функция Хевисайда;  $\varphi(t)$  и  $\omega(t)$  – начальные функции, необходимые для однозначности решений дифференциальных уравнений с запаздывающим аргументом. В модели учтены все основные факторы регуляции углеводного обмена: секреция инсулина и его гипогликемизирующее (глюкозопонижающее) действие, характеризуемое параметрами  $\alpha_v, \beta, \lambda$ ; гипергликемизирующее действие контррегуляторных гормонов с параметром  $\beta^+$ ; наличие глюкозы в моче (глюкозурия),

описываемая параметрами  $\delta$  и  $g^*$ , а также инсулиннезависимая утилизация глюкозы с параметром  $\gamma$ .

Достоинством модели является учет запаздывания  $\tau$ , присущего второй фазе секреции инсулина поджелудочной железой, и запаздывание в одну минуту, обусловленное временем оборота крови по кровеносному руслу (на этом запаздывании построен численный метод анализа уравнений (1) [10]). Эта модель адекватно воспроизводит клинические данные о динамике глюкозы в крови человека в течении суток при выбранном режиме питания (рис. 2).

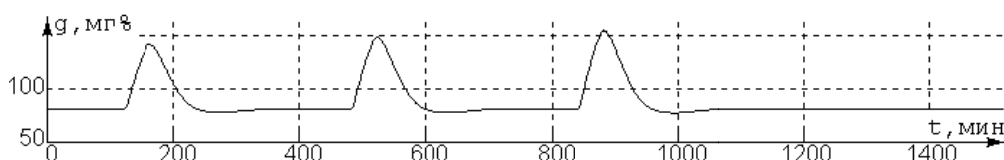


Рис. 2. Суточный профиль динамики глюкозы в норме в соответствии с моделью (1).

Полученную гликемическую кривую здорового человека уже можно было бы использовать в качестве динамической уставки имплантируемого дозатора инсулина пациента при условии, что он будет придерживаться режима питания, выбранного при настройке модели. Чтобы не создавать пациенту проблемы и обеспечить ему свободу в режиме питания необходимо снабдить имплантируемый дозатор инсулина блоком управления, работающем на основе математической модели системы регуляции углеводного обмена здорового человека, адаптированной к реальной функции всасывания глюкозы в кровь пациента  $f(t)$  после приема пищи.

Предлагаемая структура биотехнической системы «пациент – дозатор инсулина», обеспечивающей автоматическую нормальную коррекцию системы регуляции углеводного обмена представлена на рис. 3 а. Процесс коррекции регулируемой динамики гликемии  $G$  пациента описывается уравнением:

$$\frac{dG}{dt} = f(t) - \kappa(G - g), \quad \kappa = \lambda\theta > 0. \quad (2)$$

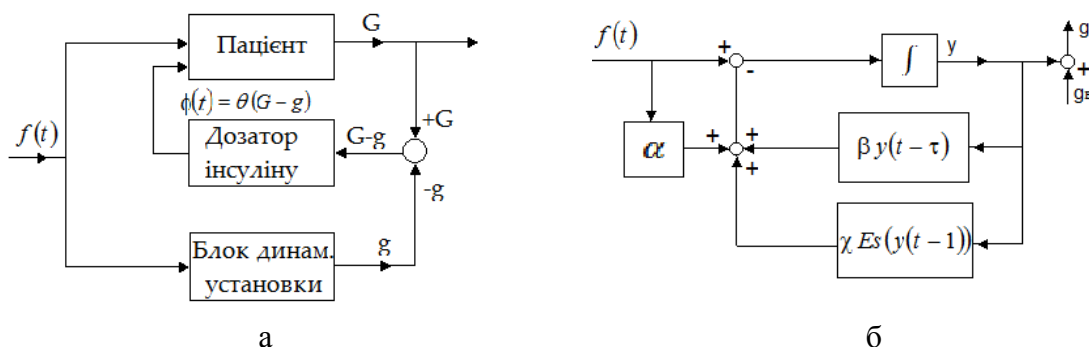


Рис. 3. Структурная схема БТС «пациент-дозатор инсулина».

Принципиальное отличие предлагаемого алгоритма работы дозатора в следующем. В существующих дозаторах ввод инсулина производится по жесткой программе или для обеспечения уровня гликемии в заданных пределах. В нашем случае задача состоит в обеспечении не уровня гликемии, а ее динамики, с учетом текущего уровня глюкозы и режима питания.

Непосредственное использование математической модели (1) для использования в управляющем блоке имплантируемого дозатора инсулина затруднительно. Упрощение модели возможно, если пренебречь качеством описания контрегуляторной гипергликемической коррекции уровня глюкозы, приписать ее параметрам значения,

присущие инсулиновой гипогликемической регуляции, и также объединить описание глюкозурии с инсулин-независимой утилизацией глюкозы, оставив лишь гликемический выход модели (1). Полученную таким образом упрощенную модель блока динамической установки можно представить в виде схемы (рис. 3 б). Особенностью модели является тот факт, что работа автоматического имплантируемого дозатора инсулина зависит от динамической уставки, т.е. репера, значение которого изменяется в зависимости от состояния пациента и режима питания:

$$y'(t) = (1 - \alpha)f(t) - \beta y(t - \tau) - \chi Es(y(t - 1)). \quad (3)$$

Дифференциальное уравнение (2), представленное в виде:

$$\frac{dG}{dt} + \kappa G = f(t) + \kappa g,$$

легко интегрируется [5]:

$$G(t) = e^{-\kappa t} \left\{ G_0 + \int_0^t e^{\kappa s} [f(s) + \kappa g(s)] ds \right\} = G_0 e^{-\kappa t} + e^{-\kappa t} \int_0^t e^{\kappa s} [f(s) + \kappa g(s)] ds.$$

Здесь  $G_0$  – начальное значение уровня гликемии  $G$  пациента, динамику которого необходимо корректировать по динамическому модельному реперу (уставке):

$$g(t) = g_b + y(t)$$

где  $g_b$  – ее базальное значение, равное среднему базальному уровню гликемии здорового человека в 80 мг%;  $y(t)$  – решение уравнения (3);  $f(t)$  – описание интенсивности действительного поступления глюкозы в кровь пациента из кишечника в течение продолжительного времени.

Как показано в работе [1], в случае типичного трехразового питания с завтраком в 8 часов утра, обедом в 14 часов и ужином в 20 часов, функцию  $f(t)$  можно представить в виде трапециевидного импульса с экспоненциально спадающим задним фронтом

$$f_p(t) = H \begin{cases} 0, & t < 0, \\ \frac{t}{d}, & 0 \leq t < d, \\ 1, & d \leq t < T, \\ e^{-m(t-T)}, & t \geq T, \end{cases}$$

где  $H, d, T, m$  – числовые параметры со значениями:  $d = 5$  мин,  $m = 0,1$  мин<sup>-1</sup>,  $T = 35$  мин;  $H = 26,10$  мг% мин<sup>-1</sup>;  $H = 28,71$  мг% мин<sup>-1</sup>;  $H = 31,32$  мг% мин<sup>-1</sup>.

## ПРОВЕДЕНИЕ ЧИСЛЕННОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

Для проведения численного эксперимента были выбраны следующие параметры поведения пациента в течении суток (1440 минут):

- начало моделирования – 6:00;
- завтрак в 8:00 (120 минута);
- обед в 14:00 (480 минута);
- ужин в 20:00 (840 минута).

Скорость снижения уровня гликемии  $GF$  в мг%/мин определяется интенсивностью внутривенной инфузии инсулина  $i'$  в мкЕд/мин по формуле:

$$GF = -0,1 \cdot i'.$$

Результаты моделирования работы автоматического имплантируемого дозатора инсулина, адаптированного к нормальной работе поджелудочной железы при различных базальных уровнях концентрации глюкозы в крови пациента, приведены на рис. 4, 5.



Численные эксперименты проводились при следующих параметрах модели:

- базальный уровень глюкозы в «норме»  $g_b$  – 80 мг%;
- базальный уровень гипергликемии  $GG_b$  – два варианта (180 мг% и 280 мг);
- момент начала коррекции (параметр  $T$ ) в минутах T200 (140) T400 (340) – техническая сдвигка на 60 минут;
- скорость снижения уровня гипергликемии до достижения нормального гликемического профиля (параметр  $GF$ ), который принимает значения:  $GF0.2$  ( $GF=0,2$  мг%/мин);  $GF0.3$ ;  $GF0.5$ ;  $GF1.0$ ;  $GF1.5$ ;  $GF3.0$ ; – практически мгновенно.

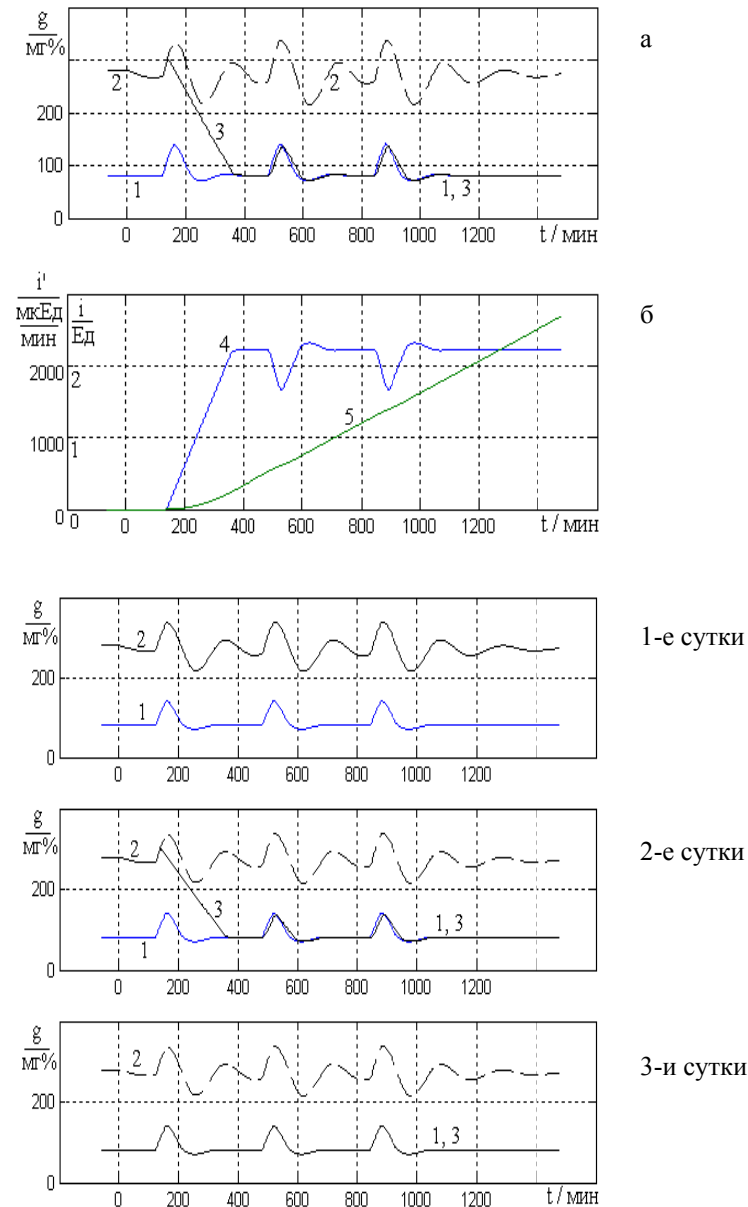


Рис. 4. Модель нормализации суточного гликемического профиля пациента с СД средней тяжести при помощи внутривенного дозатора инсулина (а – гликемические, б – инсулинемические кривые).

Рис. 5. Многосуточная нормализация уровня гликемии  $g$  в мг% с помощью внутривенного дозатора инсулина.

На рисунках приняты следующие обозначения:

1 – нормальный гликемический профиль  $g$  в мг%, к которому производится корректировка с помощью дозатора инсулина;

2 – реальный гипергликемический суточный профиль пациента с СД средней тяжести;

3 – изменение суточного гликемического профиля пациента с СД  $Gg$  в мг% в процессе коррекции;

4 – интенсивность внутривенной инфузии инсулина в мкЕд/мин (равномерно возрастающая на прямолинейном участке и соответствующая невязке ( $G - g$ ) в дальнейшем);

5 – кривая полного количества введенного инсулина от начала коррекции.

### ВЫВОДЫ

В результате численных экспериментов была показана эффективность разработанной модели динамики уровня глюкозы в крови человека. Показано, что нормализация уровня глюкозы возможна в случае известной динамики ее в крови пациента.

Введение инсулина в соответствии с индивидуальным алгоритмом (кривая 4) позволяет нормализовать концентрацию глюкозы в крови независимо от режима питания пациента, в отличие от существующих алгоритмов работы дозаторов инсулина, работающих по жесткой программе и требующих придерживаться режимов питания.

Работа имплантируемого дозатора инсулина должна осуществляться в следующей последовательности:

- измерение динамики уровня глюкозы в течение суток;
- введение инсулина по индивидуальному алгоритму, позволяющему стабилизировать уровень концентрации глюкозы на длительный период.

Практическая реализация разработанного алгоритма работы имплантируемого дозатора возможна, учитывая современные технологии измерения текущего уровня глюкозы в крови человека.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках НИР №0115U000462 «Разработка теоретических основ синтеза биотехнических систем поддержки гомеостаза».

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают, что опубликованный в данной статье материал не является предметом конфликта интересов.

### Author's ORCID ID

N.P. Mustetsov  <https://orcid.org/0000-0002-4491-1880>

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балаболкин М. И. Диабетология. Москва: Медицина, 2000. 672 с.
2. Древаль А. В., Адасько В. А., Галицкий А. Б. Испытание носимого дозатора инсулина в клинических условиях // Медицинская техника. 1984. № 3. С.18-22.
3. Филиппов Ю.И., Ибрагимова Л.И., Пекарева Е.В. Расчет доз инсулина с помощью инсулиновой помпы: оптимизация настроек «калькуляторов болусов» // Сахарный диабет. 2012. №3. С. 74–80.
4. Bode B.W., Strange P. Efficacy, safety and pump compatibility of insulin as part used in continuous subcutaneous insulin infusion therapy in patients with type 1 diabetes // Diabetes Care. 2001. 24. P 69–72.
5. Garg S. K., Schwartz S., Edelman S.V. Improved glucose excursions using an implantable real-time continuous glucose sensor in adults with type1 diabetes // Diabetes Care. 2004. 27. P 734–738.
6. Linkeschova R., Raoul M., Bottt U., Berger M. Better diabetes control, quality of life and less severe hypoglycemia with insulin pump treatment // Diabetologia 2003. 43 (suppl. 1). P 748.
7. Linkeschova R., Raoul M., Bottt U., Berger M., Spraul M. Less severe hypoglycaemia, better metabolic control, and improved quality of life in type 1 diabetes mellitus with continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) therapy: an observational study of 100 consecutive patients followed for a mean of 2 years // Diabetic Medicine, 2002. P. 746–751.
8. Новосельцев В. И. Теория управления и биосистемы. Москва: Наука, 1978. 320 с.
9. Антомонов Ю.Г., Кифоренко С.И., Микульская И.А., Пароконная Н.К. Математическая теория системы сахара крови. Киев: Наукова думка, 1971. 84 с.

10. Лапта С. И., Лапта С. С., Соловьева О. И. Функционально-структурное математическое моделирование сложных гомеостатических систем. Харьков: Изд-во. ХНЭУ, 2009. 332 с.

#### REFERENCES

1. Balabolkin, M. (2000) *Diabetology*. Moscow: Medicine, (in Russian)
2. Dreval, A., Adasko, V., Galitsky, A. (1984) In the test of a wearable insulin doser in a clinical setting. *Medical Technology*. 3. P. 18-22. (in Russian)
3. Filippov, Yu., Ibragimova, L., Pekareva, E. (2012) Calculation of insulin doses with an insulin pump: optimization of the settings of "bolus calculators" *Diabetes mellitus*. No 3. P. 74-80.
4. Bode, B.W., Strange, P. Efficacy, safety and pump compatibility of insulin as part used in continuous subcutaneous insulin infusion therapy in patients with type 1 diabetes // *Diabetes Care*. 2001. 24. P. 69–72.
5. Garg, S., Schwartz, S., Edelman, S. Improved glucose excursions using an implantable real-time continuous glucose sensor in adults with type1 diabetes // *Diabetes Care*. 2004. 27. P. 734–738.
6. Linkeschova, R., Raoul, M., Bottt, U., Berger M. (2003) Better diabetes control, quality of life and less severe hypoglycemia with insulin pump treatment // *Diabetologia*. 43 (suppl. 1). P. 748.
7. Linkeschova, R., Raoul, M., Bottt, U., Berger, M., Spraul, M. (2002) Less severe hypoglycaemia, better metabolic control, and improved quality of life in type 1 diabetes mellitus with continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) therapy: an observational study of 100 consecutive patients followed for a mean of 2 years // *Diabetic Medicine*. P. 746–751.
8. Novosel'tsev, V.I. (1978) *Theory of Control and Biosystems*. Moscow: Nauka. (in Russian)
9. Antonomov, Yu.G., Kiforenko, S.I., Mikulskaya, I.A., Parokonnaya, N.K. 1971 ) *Mathematical theory of the blood sugar system*. Kiev: Naukova Dumka. (in Ukrainian)
10. Lapta, S.I., Lapta, S.S., Solovyova, O.I. (2009) *Functional-structural mathematical modeling of complex homeostatic systems*. Kharkov: Kharkiv University of Economics. (in Ukrainian)

## MODELING OF PROTEIN AND SALT REDISTRIBUTION DURING DRYING OF A SOLUTION FROM A SQUARE CELL

**D.M. Glibitskiy**

*O. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of the National Academy of Sciences of Ukraine,  
12, Acad. Proskura St., 61085, Kharkiv 61022, Ukraine*

e-mail: [dima.glib@gmail.com](mailto:dima.glib@gmail.com)

Submitted April 1, 2018

Accepted April 10, 2018

**Background:** Drying of biological fluids and saline biopolymer solutions is an actively researched topic, since the textures of the films remaining on the substrate after evaporation carry information about the state of the organism or biopolymer. Earlier, we have shown that the texture area and the amount of zigzag crystallization patterns depend on the structural state of the biopolymer. Models of flows and particle redistribution in a round sessile drop have been described by multiple authors, but in our experiments the solution completely fills a square cell to its walls, which results in different drying conditions and dynamics.

**Objectives:** Conducting a numerical simulation of liquid evaporation and the corresponding redistribution of BSA and NaCl particles for a square  $20 \times 1 \times 20 \text{ mm}^3$  cell.

**Materials and methods:** Liquid evaporation was simulated in the OpenFOAM continuous media modeling package using the interThermalPhaseChangeFoam module, and the redistribution of the particle concentrations (BSA,  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ ) in the solution was simulated using the method of biased random walk on a discrete Cartesian lattice.

**Results:** According to the obtained results, for most of the drying time, the flows in the liquid are from the corners of the cell and from the diagonals to the walls of the cell, which leads to the accumulation of a significant fraction of the particles near the walls. When the liquid-air interface in the central part of the cell reaches the bottom, the surface tension forces quickly withdraw the solution to the cell walls, although a small amount of liquid can remain as a drop in the center. After complete drying, the majority of BSA and NaCl particles that did not settle at the cell walls were found to be concentrated at a distance of 1-3 mm from the cell walls, in the form of a rounded band. A small amount of BSA is also present in the central part of the cell, while the remainder of the salt is uniformly distributed over the entire area of the cell due to its greater diffusivity.

**Conclusions:** Taking into account the experimental distributions of textures, these results support the hypotheses that textures are not formed in the absence of a biopolymer, and that zigzag patterns are formed in locations with high drying rate.

**KEY WORDS:** evaporation; modeling; protein; salt; square cell.

## МОДЕЛЮВАННЯ ПЕРЕРОЗПОДІЛУ БІЛКА І СОЛІ ПРИ ВИСУШУВАННІ РОЗЧИНУ З КВАДРАТНОЇ КЮВЕТИ

**Д.М. Глибицький**

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

**Актуальність.** Висихання біологічних рідин та сольових розчинів біополімерів є активно досліджуваною темою, оскільки текстури плівок, що залишаються на підложці після випаровування, несуть інформацію про стан організму або біополімера. В наших попередніх роботах було показано, що площа текстур та здатність до формування зигзагоподібних патернів кристалізації залежать від структурного стану біополімера. Моделювання течій та перерозподілу часток для стандартного випадку круглої сидячої краплі проводилося багатьма авторами, але в наших експериментах розчин повністю заповнює квадратну кювету до рівня її стінок, що створює інші умови випаровування та хід процесу висихання.

**Мета роботи.** Провести чисельне моделювання випаровування рідини та викликаного ним руху частинок БСА і NaCl для квадратної кювети  $20 \times 1 \times 20 \text{ mm}^3$ .

**Матеріали і методи.** Моделювання випаровування рідини здійснювалося у пакеті моделювання суцільних середовищ OpenFOAM із застосуванням модулю interThermalPhaseChangeFoam, а

перерозподіл концентрацій часток (БСА,  $\text{Na}^+$  і  $\text{Cl}^-$ ) у розчині моделювався методом зміщеного випадкового блукання на дискретній Декартовій решітці.

**Результати.** Згідно з отриманими результатами, впродовж основного часу сушки течії у рідині направлені від кутів до центра кювети та від діагоналей до стінок кювети, що призводить до накопичення значної долі частинок біля стінок. Коли поверхня рідини у центральній частині кювети торкається дна, сили поверхневого натягу швидко відтягують розчин до стінок кювети, хоча невелика кількість рідини може залишитися у центрі у вигляді краплі. Після повного висихання, основна кількість частинок БСА і  $\text{NaCl}$ , що не осіла біля стінок кювети, виявилася зосередженою на відстані 1–3 мм від країв кювети у вигляді закругленої смуги. Невелика кількість БСА також присутня у центральній частині кювети, тоді як решта солі рівномірно розподілена по всій площі кювети завдяки більшій дифузивності.

**Висновки.** Беручи до уваги експериментальні розподіли текстур, ці результати свідчать на користь гіпотез, що текстури не утворюються за відсутності біополімера, а зигзагоподібні патерни формуються у ділянках з високою швидкістю висушування.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** випаровування; моделювання; білок; сіль; квадратна кювета.

### МОДЕЛИРОВАНИЕ ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА И СОЛИ ПРИ ВЫСУШИВАНИИ РАСТВОРА ИЗ КВАДРАТНОЙ КЮВЕТЫ

Д.М. Глибицкий

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

**Актуальность.** Высыхание биологических жидкостей и солевых растворов биополимеров – активно исследуемая область, так как текстуры пленок, остающиеся на подложке после испарения, несут информацию о состоянии организма или биополимера. Ранее нами было показано, что площадь текстур и способность к формированию зигзагоподобных паттернов кристаллизации зависят от структурного состояния биополимера. Моделирование течений и перераспределения частиц для стандартного случая круглой сидячей капли проводилось многими авторами, но в наших экспериментах раствор полностью заполняет квадратную кювету до уровня ее стенок, что создает другие условия испарения и ход процесса высыхания.

**Цель работы.** Провести численное моделирование испарения жидкости и вызванного им движения частиц БСА и  $\text{NaCl}$  для квадратной кюветы  $20 \times 1 \times 20 \text{ мм}^3$ .

**Материалы и методы.** Моделирование испарения жидкости выполнялось в пакете моделирования сплошных сред OpenFOAM с применением модуля interThermalPhaseChangeFoam, а перераспределение концентраций частиц (БСА,  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ ) в растворе моделировалось методом смещенного случайного блуждания на дискретной Декартовой решетке.

**Результаты.** Согласно полученным результатам, в течение основного времени сушки течения в жидкости направлены от углов к центру кюветы и от диагоналей к стенкам кюветы, что приводит к накоплению значительной доли частиц у стенок. Когда поверхность жидкости в центральной части кюветы касается дна, силы поверхностного натяжения быстро оттягивают раствор к стенкам кюветы, хотя небольшое количество жидкости может остаться в центре в виде капли. После полного высыхания, основное количество частиц БСА и  $\text{NaCl}$ , которое не осело у стенок кюветы, оказалось сосредоточенным на расстоянии 1-3 мм от краев кюветы в виде закругленной полосы. Небольшое количество БСА также присутствует в центральной части кюветы, тогда как остаток соли равномерно распределен по всей площади кюветы из-за большей диффузивности.

**Выводы.** Принимая во внимание экспериментальные распределения текстур, эти результаты свидетельствуют в пользу гипотез, что текстуры не образуются при отсутствии биополимера, а зигзагоподобные паттерны формируются на участках с высокой скоростью сушки.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** испарение; моделирование; белок; соль; квадратная кювета.

Evaporation of colloidal solutions has promising applications in a number of industries, such as medicine [1-3], agriculture [4, 5] and microelectronics [6, 7]. Films obtained as a result of the evaporation of biological fluids or saline solutions of biopolymers were investigated by various authors [8-14]; in particular, our experiments have shown that the structural state of the biopolymer affects the area of visible textures [15] and the number of zigzag crystallization patterns on the film [16-18].

Mechanisms of drying of colloid-salt solution droplets, as well as mechanisms of pattern formation on the resulting films, are an actively studied subject [19-24]. However, instead of the standard method of sessile droplet evaporation, we use a flat cell filled with solution to

improve reproducibility of the contours and the areas of the obtained films. This changes the evaporation conditions and the course of drying compared to the free drop, which does not let us draw direct analogies with the existing models of particle redistribution in the drying droplet. Due to the fact that the geometry of our cell (square 20x20 mm<sup>2</sup> cell with 1 mm high walls) cannot be reduced to an axially symmetric 2D case, the theoretical analysis of the problem is considerably complicated; therefore, in this study we conducted a numerical simulation of fluid evaporation and of the corresponding particle motion for a square cell.

### MODEL

As a first approximation, the following assumptions were made during the simulation:

1. Available concentrations of protein and salt do not affect the overall course of hydrodynamics and evaporation: for most of the drying time, the mass fraction of BSA (bovine serum albumin) and NaCl in the solution is very low (about 0.2-2%), so their effect on viscosity, thermal conductivity, surface tension, and other physical and chemical properties of the solvent can be considered negligible; accordingly, liquid evaporation can be simulated separately from particle redistribution.
2. Inhibition of the Marangoni effect: although in theory the contribution of the Marangoni flows must be noticeable in evaporating droplets of pure water, in practice their effect is very weak due to residual contamination by surface-active substances [25].
3. The effect of contact line pinning is ignored (due to the complexity of modeling this phenomenon in the OpenFOAM package).
4. Absence of particle aggregation: the present concentration of NaCl salt is not large enough to completely compensate the charge of BSA, so during the simulation it was assumed that protein molecules effectively do not aggregate.

#### Simulation of fluid evaporation in a square cell

The simulation of fluid evaporation was performed in the OpenFOAM continuous media finite element modeling package. For hydrodynamic problems with two phases this package uses a volume-of-fluid method, where the amount of liquid in each spatial element of the computational domain is represented by the "volume-of-fluid" quantity  $\alpha$ . To model the phenomena of mass and heat transport, surface tension and phase transition, the interThermalPhaseChangeFoam module [26, 27] was used, which solves the conservation equations for mass (using the Poisson equation), momentum (taking into account viscous forces, pressure, surface tension and gravity), thermal energy (taking into account the convection and heat conduction phenomena) and volume-of-fluid (with corrections to compress the interface and counteract numerical diffusion).

The cells we use for obtaining films have a volume of 20x1x20 mm<sup>3</sup>. Since the initial volume of the solution is 0.5 ml, the height of the liquid can reach 1.3 mm, so an additional 1 mm of air above the cell was included in the computational domain. To accelerate the simulation, the domain was limited to a rectangular volume of 10x2x10 mm<sup>3</sup> along the axes X, Y and Z, respectively (Fig. 1), which corresponds to a quarter of the cell. This volume was divided into cubic 0.1x0.1x0.1 mm<sup>3</sup> finite elements in the form of a three-dimensional grid (100x20x100 elements along the corresponding axes).

To assign the boundary conditions, the surface of the computational domain was divided into 4 areas: the XY side, the YZ side, the surface below 1 mm ("cell") and the surface above 1 mm ("air"). The boundary conditions for these areas are given in the Table 1.

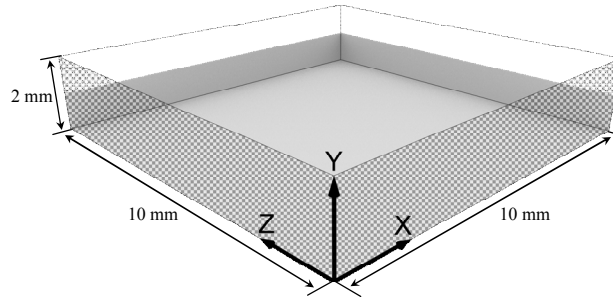


Fig. 1. The computational domain and the coordinate system used in the calculations.

Table 1. Boundary conditions for the values used in modeling of evaporation.  $\nabla_{\vec{N}}$  denotes the gradient in the direction normal to the boundary surface. The value of the wetting angle was taken from [28], the temperature corresponds to the experimental values [16, 17], and the rest of the boundary conditions were chosen in accordance with the conventional practices [29]

	"Cell" area	"Air" area	XY and YZ sides
Volume-of-fluid $\alpha$	Wetting angle = $36.7^\circ$	Outside: $\nabla_{\vec{N}}\alpha = 0$ ; inside: $\alpha = 0$	Symmetry planes
Enthalpy $H$	$\nabla_{\vec{N}}H = 0$	$\nabla_{\vec{N}}H = 0$	Symmetry planes
Difference between static and hydraulic pressure $p - \rho gh$	$\nabla_{\vec{N}}(p - \rho gh) = 0$	$p - \rho gh = 0$	Symmetry planes
Velocity $\vec{U}$	$\vec{U} = (0, 0, 0)$	$\nabla_{\vec{N}}\vec{U} = 0$	Symmetry planes
Temperature $T$	$T = 40^\circ\text{C}$	$T = 40^\circ\text{C}$	Symmetry planes

Initial values for the fields  $H$ ,  $p - \rho gh$ ,  $\vec{U}$  and  $T$  for the whole domain were initialized as 0 J, 0 Pa, 0 m/s and  $40^\circ\text{C}$ , respectively.

In our experiments, it was observed that after  $t_{\text{exp}} = 20$  min in the drying chamber,  $0.060 \pm 0.003$  g of a solution evaporates from the cell, and  $0.224 \pm 0.003$  g after  $t_{\text{exp}} = 80$  min. Correspondingly, 0.5 ml of a solution completely evaporates in 3 hours on average.

Due to the simulation taking a lot of time to compute, it was decided to start with 0.333 ml of water (which corresponds to  $t_{\text{exp}} = 1$  hour). Assuming that the nature of the currents within the liquid stays the same for most of the drying time, this shouldn't significantly affect the final deposition distributions. To account for the liquid meniscus, which forms near the cell walls due to surface tension, the field  $\alpha$  was initialized using the formula (1)

$$\alpha(x, y, z) = \min(\max((h(x, z) - y)/L_E + 0.5, 0), 1), \quad (1)$$

$$h(x, z) = h_C - (h_C - h_W) \cdot \min((w_{C/2} - \max(|x|, |z|))/w_M, 1)^P,$$

where  $L_E = 0.1$  mm is the size of the finite element,  $h_C = 1$  mm is the height of the cell walls,  $w_{C/2} = 10$  mm is the half-width of the cell; the rest of the parameters were chosen empirically to approximate the surface of 0.333 ml of liquid:  $h_W = 0.75$  mm (height of the liquid at the cell center),  $w_M = 3.5$  mm (width of the meniscus),  $P = 1/3$  (empirical coefficient determining the shape of the meniscus). The  $\min()$  and  $\max()$  denote the minimum and maximum of a set of values, respectively (the same notation is used throughout the paper).

The simulation was performed using the incompressible Newtonian fluid and laminar flow approximations, the Brackbill surface tension model [30] and the "Interface Equilibrium – No Dilatation" phase change model [26]. The properties of the liquid and gaseous phases that were used in the simulation are given in the Table 2.

Table 2. Physical properties of water and its vapor at 40 °C

Kinematic viscosity of water, m <sup>2</sup> /s	0.658 · 10 <sup>-6</sup>	[31]
Density of water, kg/m <sup>3</sup>	992	[31]
Thermal conductivity of water, W/(m · K)	0.631	[31]
Specific heat of water, J/(kg · K)	4178	[31]
Kinematic viscosity of water vapor, m <sup>2</sup> /s	20.5 · 10 <sup>-6</sup>	[31]
Density of water vapor, kg/m <sup>3</sup>	0.598	[31]
Thermal conductivity of water vapor, W/(m · K)	0.025	[31]
Specific heat of water vapor, J/(kg · K)	2077	[31]
Surface tension, kg/s <sup>2</sup>	0.0695	[32]
Phase change enthalpy, J/kg	2264705	[33]

Since the direction of the phase change (i.e., whether evaporation or condensation takes place) in interThermalPhaseChangeFoam [26, 27] is determined by the difference between the temperature of the finite element  $T$  and the saturation temperature  $T_{sat}$  of the liquid, we had to set the saturation temperature lower than the temperature of the cell ( $T_{sat} = 10$  °C to reduce the computational time) and to use a model which did not incorporate formation of vapor bubbles. As a result, the rate of evaporation in the simulation was 2-3 orders of magnitude higher than in the experiment; however, the qualitative nature of the obtained currents can still be useful as a first approximation in particle redistribution modeling. In order to correlate the simulation results with the experiment, simulation time  $t_{sim}$  was matched to the "experimental time"  $t_{exp}$  based on the volume of water remaining in the cell (2):

$$t_{exp} = t_{total} \left( 1 - \frac{4V_E}{V_0} \sum_{i,j,k} \alpha(i,j,k) \right), \quad (2)$$

where the total drying time  $t_{total} = 10800$  s, the volume of the finite element  $V_E = 10^{-12}$  m<sup>3</sup>, the initial volume of the solution  $V_0 = 5 \cdot 10^{-7}$  m<sup>3</sup>,  $(i, j, k)$  is the three-dimensional index of the corresponding finite element. In the simulation of particle redistribution, velocity values  $\vec{U}$  were also scaled accordingly.

### Modeling of redistribution of colloidal particles and dissolved salt

To simulate the particle redistribution in the solution, biased random walk on a discrete Cartesian lattice (with cubical elements) was used, where the probability of particle movement between adjacent lattice cells depends on the vector of fluid velocity (the details are laid out in the "Calculation of the probability of particle motion" section). The same number of elements (100x20x100) was used as the size of the discrete lattice. BSA and salt concentrations were initialized as evenly distributed over the volume of the liquid; assuming that the nature of the currents within the liquid stays the same for most of the drying time, this shouldn't significantly affect the final deposition distributions.



The algorithm for simulating particle motion was based on the ideas described in [34, 35]. The overall structure of the algorithm is depicted in Fig. 2.

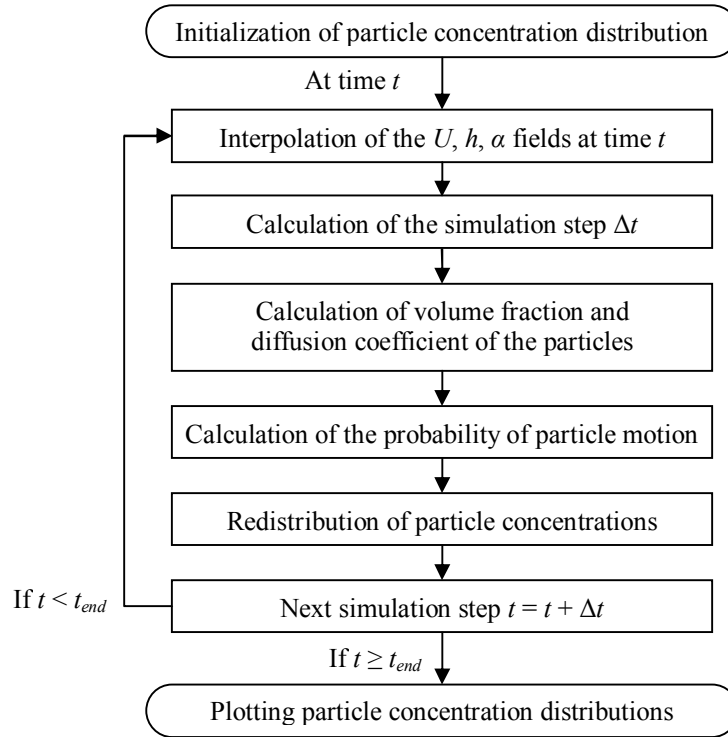


Fig. 2. Block diagram of the algorithm for simulation of particle redistribution.

During the simulation, BSA molecules and dissolved salt ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) were considered separate types of particles. Initial concentrations and physical parameters of these particles are shown in Table. 3

Table 3. Parameters of particles used in calculations. For BSA,  $r_p$  was taken from [36],  $V_p$  from [37],  $m_p$  from [38]. For  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ ,  $r_p$  was taken from [39],  $V_p$  was calculated as the volume of spheres of Van der Waals radius [40], and  $m_p$  was taken from [41]

Parameter	BSA	$\text{Na}^+$	$\text{Cl}^-$
Concentration $C_0$ , mol/m <sup>3</sup>	$7.5 \cdot 10^{-3}$	20	20
Stokes radius $r_p$ , m	$4 \cdot 10^{-9}$	$1.84 \cdot 10^{-10}$	$1.21 \cdot 10^{-10}$
Volume $V_p$ , m <sup>3</sup>	$8.09 \cdot 10^{-26}$	$4.90 \cdot 10^{-29}$	$2.24 \cdot 10^{-29}$
Mass $m_p$ , kg	$1.10 \cdot 10^{-22}$	$3.82 \cdot 10^{-26}$	$5.89 \cdot 10^{-26}$

### Interpolation of the $U$ , $h$ , $\alpha$ fields at time $t$

The fields of velocities  $\vec{U}_t$  and volume-of-fluid  $\alpha_t$  at a time  $t$  were obtained by linear interpolation of snapshots (3-5), which were recorded at regular intervals during the simulation of fluid evaporation. Since water-air interface can move more than one lattice cell per snapshot, interpolation of the field  $\alpha$  was not performed directly. Instead, a height-map  $h_n$  was constructed for each  $\alpha_n$  snapshot, and the field  $\alpha_t$  at time  $t$  was calculated from the interpolated height-map  $h_t$  (5):

$$\vec{U}_t(x, y, z) = (1 - \tau) \cdot \vec{U}_n(x, y, z) + \tau \cdot \vec{U}_{n+1}(x, y, z), \quad (3)$$

$$h_t(x, z) = (1 - \tau) \cdot h_n(x, z) + \tau \cdot h_{n+1}(x, z), \quad (4)$$

$$\alpha_t(x, y, z) = \min(\max((h_t(x, z) - y) / L_E + 0.5, 0), 1), \quad (5)$$

where  $\vec{U}_n$ ,  $h_n$  are snapshots of the velocity field and the height-map at the time  $t_n$ , the interpolation coefficient  $\tau = (t - t_n) / (t_{n+1} - t_n)$ , the size of the finite element  $L_E = 0.1$  mm.

### Calculation of the simulation step $\Delta t$

The simulation of motion of colloidal particles was performed using the  $t_{\text{exp}}$  time scale (i.e. it started at  $t_{\text{exp}} = 1$  hour and ended at  $t_{\text{exp}} = 3$  hours) and a variable time step.

To ensure the correctness of the calculations, the duration of the simulation step  $\Delta t$  must be such that the distance traveled by any particle during the step is not larger than the linear size of the lattice element  $L_E$ :

$$\Delta t \cdot U_{\text{max}} < L_E, \quad (6)$$

where  $U_{\text{max}}$  is the maximum projection of velocity in this simulation step

$$U_{\text{max}}(i, j, k) = \max(|U_x(i, j, k)|, |U_y(i, j, k)|, |U_z(i, j, k)|), \quad (7)$$

$$U_{\text{max}} = \max(U_{\text{max}}(i, j, k) : i = 1, \dots, N_i; j = 1, \dots, N_j; k = 1, \dots, N_k).$$

It was decided to limit the maximal particle distance per step to 1/3 of lattice element size, as a compromise between the simulation fidelity and the time spent on computation. Correspondingly,

$$\Delta t = \frac{1}{3} \frac{L_E}{U_{\text{max}}}. \quad (8)$$

### Calculation of volume fraction and diffusion coefficient of the particles

Each element of the lattice may contain colloidal particles (BSA) and ions of dissolved salt ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ). In contrast to the papers [34, 35], the number of particles in this case is too large for them to be modeled individually. Thus particle movement was simulated as the redistribution of the amount of substance between the adjacent lattice elements.

If we consider colloidal (BSA) and dissolved ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) particles to be solid spheres, their amount in the lattice element is limited by the condition

$$\phi_{\text{total}}(i, j, k) < \phi_{\text{max}}. \quad (9)$$

where  $\phi_{\text{total}}(i, j, k)$  is the total volume fraction in the lattice element  $(i, j, k)$ ,  $\phi_{\text{max}}$  is the maximum packing fraction. When  $\phi_{\text{total}}$  approaches  $\phi_{\text{max}}$ , the particles within the element (BSA,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) are packed so densely that their movement becomes virtually impossible.

The total volume fraction is the sum of volume fractions  $\phi_p(i, j, k)$  of each type of particle  $p$

$$\phi_{\text{total}}(i, j, k) = \sum_p \phi_p(i, j, k). \quad (10)$$

$\phi_p(i, j, k)$ , in turn, is calculated as

$$\phi_p(i, j, k) = n_p(i, j, k) \cdot N_A \cdot V_p / V_E, \quad (11)$$

where  $n_p(i, j, k)$  is the amount of substance of particles of type  $p$  in the corresponding lattice element,  $N_A$  is the Avogadro number,  $V_p$  is the volume of a particle of type  $p$ ,  $V_E$  is the volume of the lattice element.

The value of  $\phi_{\max}$  is determined by the packing geometry, which depends on the shape and size distribution of the particles, but not on the particle size. For solid spheres, the theoretical value is usually taken  $\phi_{\max} = 0.64$  [42], which corresponds to random close packing. However, according to the experimental studies of solid sphere dispersions [43, 44], molecular mobility disappears when the volume fraction reaches the value of colloidal glass transition  $\phi_g$  [43, 44]. For monodisperse solid spheres  $\phi_g = 0.58$  [45, 46].

Our system is polydisperse (BSA,  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  particles have different size), so  $\phi_{\max}$  of each lattice element will depend on its content. Since  $\phi_{\max}$  estimation formula appears to only exist for the bi-disperse case in the published literature [47], here we use it under the assumption that  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  can be reasonably treated as one species (compared to BSA):

$$\phi_{\max} = \min\left(\frac{\phi_{\max \text{ mono}}}{1 - w \cdot (1 - \phi_{\max \text{ mono}})}, \frac{\phi_{\max \text{ mono}}}{w}\right), \quad (12)$$

$$w = \phi_{\text{large}} / (\phi_{\text{large}} + \phi_{\text{small}}), \quad (13)$$

where  $\phi_{\max \text{ mono}}$  is the maximum packing fraction of a monodisperse system ( $\phi_g$  in this case),  $\phi_{\text{large}}$  is the volume fraction of large particles,  $\phi_{\text{small}}$  is the volume fraction of small particles.

Freedom of particle movement in a lattice element  $(i, j, k)$  can be characterized as

$$\Phi(i, j, k) = 1 - \frac{\phi_{\text{total}}(i, j, k)}{\phi_{\max}}. \quad (14)$$

This value modulates the number of particles that can move between the lattice elements in a single simulation step, and is also used in the Krieger and Dougherty's semi-empirical formula [48] for calculating local viscosity of the dispersion:

$$\mu(i, j, k) = \mu_F \cdot \left(1 - \frac{\phi_{\text{total}}(i, j, k)}{\phi_{\max}}\right)^{-\phi_{\max}}, \quad (15)$$

where  $\mu_F$  is the dynamic viscosity of the liquid.

In addition to fluid advection, the particles can also move between lattice elements due to diffusion. The diffusion coefficient  $D_p$  for a spherical particle  $p$  can be estimated from the Stokes-Einstein equation:

$$D_p(i, j, k) = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \mu(i, j, k) \cdot r_p}, \quad (16)$$

where  $k_B$  is the Boltzmann constant,  $T$  is the temperature,  $r_p$  is the Stokes particle radius.

### Calculation of the probability of particle motion

When simulating random walk on a grid, during one simulation step a single particle may, with a certain probability  $P$ , move into one of the neighboring lattice elements or stay in place (mutually exclusive events). In the case of a large number of particles, these probabilities can be considered proportional to the amount of substance  $\Delta n$  that has moved in the corresponding direction:

$$\frac{\Delta n(i, j, k, \Delta i, \Delta j, \Delta k)}{n(i, j, k)} \approx P(i, j, k, \Delta i, \Delta j, \Delta k), \quad (17)$$

where  $n(i, j, k)$  is the amount of substance in a lattice element with a three-dimensional index  $(i, j, k)$ , and  $\Delta i, \Delta j, \Delta k \in \{-1, 0, 1\}$  denote the direction of particle movement.

For biased random walk, particle movement along the direction of the flow should be more likely than the movement in the opposite direction. Three methods for calculating the corresponding probabilities were considered.

### Particle motion probability calculation: method 1

The first method was described in [34], where the probabilities of particle movement depended only on the velocity field:

$$\begin{aligned} P_{\pm x} &= \frac{1}{2N} \left( 1 \pm \frac{U_x}{U_{\max}} \right), \\ P_{\pm y} &= \frac{1}{2N} \left( 1 \pm \frac{U_y}{U_{\max}} \right), \\ P_{\pm z} &= \frac{1}{2N} \left( 1 \pm \frac{U_z}{U_{\max}} \right), \end{aligned} \quad (18)$$

$$P_w = 1 - (P_{-x} + P_{+x} + P_{-y} + P_{+y} + P_{-z} + P_{+z}),$$

where  $P_{-x}, P_{+x}, P_{-y}, P_{+y}, P_{-z}, P_{+z}$  are the probabilities of movement in the direction of the corresponding axes,  $P_w$  is the probability of the particle staying in place,  $N = 3$  is the dimensionality of space,  $U_x, U_y, U_z$  are the components of the velocity field vector at a given point,  $U_{\max}$  is the maximum projection of velocity in this simulation step.

To take into account the duration of the simulation step, the probabilities of transitions were calculated in the following way:

$$\begin{aligned} P_{\pm x} &= \left( \frac{\Delta t \cdot |U_x(i, j, k)|}{L_E} \right) \cdot \left( \frac{1 \pm U_x(i, j, k)/U_{\max}}{6} \right), \\ P_{\pm y} &= \left( \frac{\Delta t \cdot |U_y(i, j, k)|}{L_E} \right) \cdot \left( \frac{1 \pm U_y(i, j, k)/U_{\max}}{6} \right), \\ P_{\pm z} &= \left( \frac{\Delta t \cdot |U_z(i, j, k)|}{L_E} \right) \cdot \left( \frac{1 \pm U_z(i, j, k)/U_{\max}}{6} \right), \end{aligned} \quad (19)$$

$$P_{\text{sum}} = P_{-x} + P_{+x} + P_{-y} + P_{+y} + P_{-z} + P_{+z},$$

$$P(i, j, k, \pm 1, 0, 0) = P_{\pm x} / \max(P_{\text{sum}}, 1),$$

$$P(i, j, k, 0, \pm 1, 0) = P_{\pm y} / \max(P_{\text{sum}}, 1),$$

$$P(i, j, k, 0, 0, \pm 1) = P_{\pm z} / \max(P_{\text{sum}}, 1),$$

$$P(i, j, k, 0, 0, 0) = 1 - \min(P_{\text{sum}}, 1),$$

where  $\Delta t$  is the simulation step duration,  $L_E$  is the size of the lattice element.

### Particle motion probability calculation: method 2

The idea of the second method was taken from the paper [35], according to which the probability of particle movement between lattice elements is proportional to the Boltzmann distribution:

$$P_S \propto \exp(-E_S/k_B T), \quad (20)$$

where  $P_S$  is the probability of finding a particle in the state  $S$ ,  $E_S$  is the energy of state  $S$ ,  $k_B$  is the Boltzmann constant,  $T$  is the temperature,  $\exp()$  is the exponential function.

In this case, the  $E_S$  corresponds to the work that a particle must perform against the Stokes' drag to move to a certain distance in a given direction:

$$E_S(\vec{v}) = -6\pi \cdot \mu \cdot r_p \cdot (\vec{U} \cdot \vec{v}), \quad (21)$$

where  $\vec{U}$  is the vector of liquid velocity at a given point,  $\vec{v}$  is the direction vector along which the particle may move during the simulation step  $\Delta t$

$$\vec{v} = \overline{\Delta ijk} \cdot (\Delta t \cdot |\vec{U}|), \quad (22)$$

where  $\overline{\Delta ijk}$  is the unit vector in the direction of the neighboring lattice element (or a zero vector in the case of the particle remaining in place).

Combining the equations (20-22), we obtain

$$\begin{aligned} P_{\pm x} &= C \cdot \exp\left(\pm \frac{6\pi \mu r_p \cdot U_x \cdot (\Delta t \cdot |U_x|)}{k_B T}\right) = C \cdot \exp\left(\pm \frac{U_x \cdot (\Delta t \cdot |U_x|)}{D_p}\right), \\ P_{\pm y} &= C \cdot \exp\left(\pm \frac{6\pi \mu r_p \cdot U_y \cdot (\Delta t \cdot |U_y|)}{k_B T}\right) = C \cdot \exp\left(\pm \frac{U_y \cdot (\Delta t \cdot |U_y|)}{D_p}\right), \\ P_{\pm z} &= C \cdot \exp\left(\pm \frac{6\pi \mu r_p \cdot U_z \cdot (\Delta t \cdot |U_z|)}{k_B T}\right) = C \cdot \exp\left(\pm \frac{U_z \cdot (\Delta t \cdot |U_z|)}{D_p}\right), \\ P_w &= C \cdot \exp\left(\frac{6\pi \mu r_p \cdot \vec{U} \cdot \vec{0}}{k_B T}\right) = C \cdot 1, \end{aligned} \quad (23)$$

where  $P_{-x}$ ,  $P_{+x}$ ,  $P_{-y}$ ,  $P_{+y}$ ,  $P_{-z}$ ,  $P_{+z}$  are the probabilities of movement in the direction of the corresponding axes,  $P_w$  is the probability of the particle staying in place,  $U_x$ ,  $U_y$ ,  $U_z$  are the components of the velocity field vector at a given point,  $D_p$  is the diffusion coefficient at a given point,  $C$  is an arbitrary constant. Accordingly,

$$\begin{aligned} P_{sum} &= P_{-x} + P_{+x} + P_{-y} + P_{+y} + P_{-z} + P_{+z} + P_w, \\ P(i, j, k, \pm 1, 0, 0) &= P_{\pm x} / P_{sum}, \\ P(i, j, k, 0, \pm 1, 0) &= P_{\pm y} / P_{sum}, \\ P(i, j, k, 0, 0, \pm 1) &= P_{\pm z} / P_{sum}, \\ P(i, j, k, 0, 0, 0) &= P_w / P_{sum}. \end{aligned} \quad (24)$$

### Particle motion probability calculation: method 3

In the third method of probability calculation, a simplified geometric interpretation of particle motion was used (Fig. 3). Assuming that at a time  $t$  the particles uniformly fill the volume  $V_E = L_E^3$  of the  $(i, j, k)$  element, and during the simulation step  $\Delta t$  their movement consists of translation along the fluid velocity vector  $(\Delta t \cdot \vec{U})$  and random Brownian displacement (up to a distance  $\sqrt{6D_p \Delta t}$ ), then at the moment  $t + \Delta t$  these particles will approximately occupy the cubic volume  $V'$

$$V' \approx (L_E + 2\sqrt{6D_p \Delta t})^3, \quad (25)$$

which will partially intersect with several lattice elements.

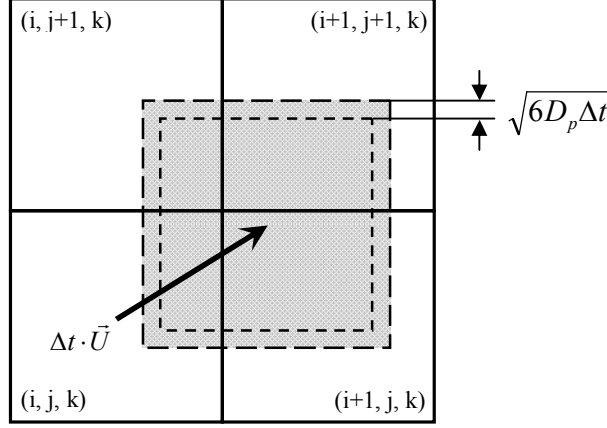


Fig. 3. Schematic illustration of particle motion in the third method of probability calculation.

Accordingly, the probability of particles to remain in the element  $(i, j, k)$  or to move to a neighboring lattice element will be proportional to the volume of the intersection of the cube  $V'$  with the volume of the corresponding cubic element:

$$\begin{aligned} B_{\pm x} &= \max(L_E \cdot (\Delta i \pm 0.5), \Delta t \cdot U_x \pm \sqrt{6D_p \Delta t}), \\ B_{\pm y} &= \max(L_E \cdot (\Delta j \pm 0.5), \Delta t \cdot U_y \pm \sqrt{6D_p \Delta t}), \\ B_{\pm z} &= \max(L_E \cdot (\Delta k \pm 0.5), \Delta t \cdot U_z \pm \sqrt{6D_p \Delta t}), \\ L_x &= \max(B_{+x} - B_{-x}, 0), \\ L_y &= \max(B_{+y} - B_{-y}, 0), \\ L_z &= \max(B_{+z} - B_{-z}, 0), \\ P(i, j, k, \Delta i, \Delta j, \Delta k) &= \frac{L_x \cdot L_y \cdot L_z}{V'}. \end{aligned} \quad (26)$$

#### Additional rules for calculating probabilities and redistribution of concentrations

The following additional rules were also used in the modeling of particle redistribution.

In the case when a lattice element contains no water ( $\alpha(i, j, k) = 0$ ), the particles of this element are only allowed to move vertically down (or remain in place, if  $j = 0$ ). It simulates the effect of gravity and prevents the movement of particles in completely dried regions.

On the boundaries of the computational domain, particle motion is limited by the corresponding boundary conditions (motion beyond the cell walls and the cell bottom is prohibited, and is reflected at the symmetry planes). Other types of particle interaction with the cell walls and bottom (e.g. sticking to the surface) were not modeled in this study.

Since particles can not move beyond the liquid-air boundary and should be less likely to move to densely packed lattice elements, the motion in the direction of the neighboring elements is also limited as follows:

$$\begin{aligned} P(i, j, k, \Delta i, \Delta j, \Delta k) &= \Phi(i + \Delta i, j + \Delta j, k + \Delta k) \times \\ &\times \min(P(i, j, k, \Delta i, \Delta j, \Delta k), \alpha(i + \Delta i, j + \Delta j, k + \Delta k)) \end{aligned} \quad (27)$$

where  $\alpha$  is the amount of fluid in the element,  $\Phi$  is the degree of mobility (14).

After applying these rules, the probability sum can be less than one, so the probability of particles remaining in the element  $(i, j, k)$  is recalculated as

$$P'(i, j, k, 0, 0, 0) = 1 - \sum_{\Delta i} \sum_{\Delta j} \sum_{\Delta k} P'(i, j, k, \Delta i, \Delta j, \Delta k), \quad (\Delta i, \Delta j, \Delta k) \neq (0, 0, 0). \quad (28)$$

In the absence of an external electric field, the concentrations of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  ions, averaged over the volume of the cubic lattice element, can always be considered the same, so during the simulation, the redistribution of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  particles between the lattice elements was synchronized.

To prevent accumulation of rounding errors, at the end of each simulation step the amount of substance of BSA,  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  in the lattice elements was normalized to maintain the total number of the corresponding particles.

### RESULTS AND DISCUSSION

The course of liquid evaporation, obtained as a result of numerical simulation, is shown in Fig. 4-7. Until the surface of the liquid reached the bottom of the cell, the convective flows in the solution exhibit the character illustrated in Fig. 4: a diagonal flow from the corner to the center of the cell, as well as the circulation between the diagonal and the cell walls (spiraling toward the cell corner).

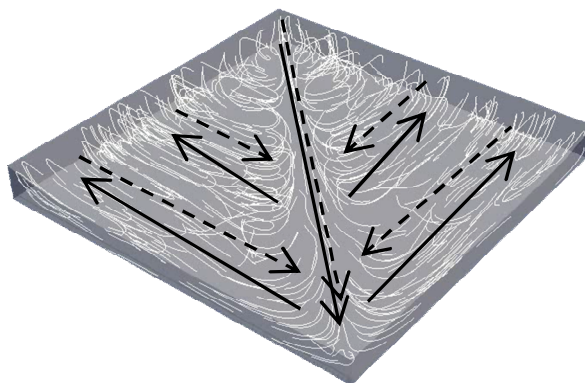


Fig. 4. Flow directions at the time  $t_{\text{exp}} = 1$  hour 13 min. Solid arrows denote the currents along the cell bottom, and dotted arrows denote the currents along the surface of the liquid.

As the evaporation progresses, the flow becomes more chaotic (Fig. 5a), but its general character is maintained almost up to 2/3 of the total drying time (Fig. 5b).

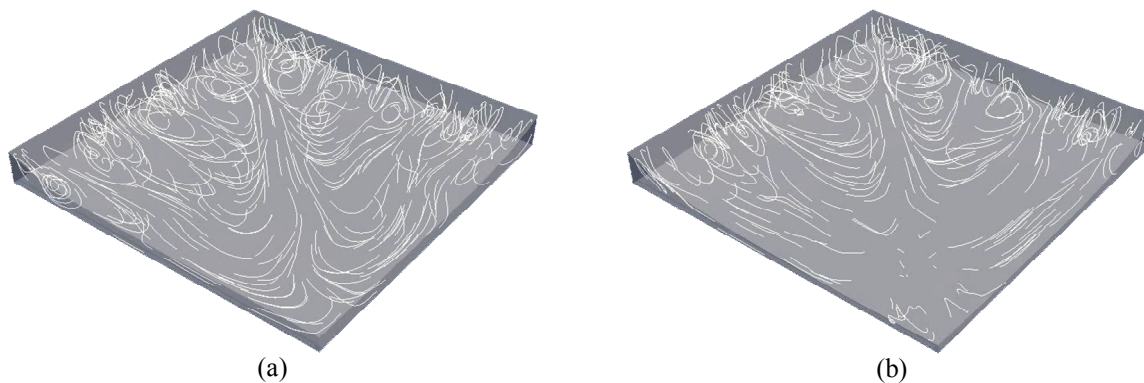


Fig. 5. Flow directions at the time (a)  $t_{\text{exp}} = 1$  hour 36 min, (b)  $t_{\text{exp}} = 1$  hour 53 min.

When the liquid-air interface at a certain point reaches the cell bottom (Fig. 6a), the surface tension forces quickly withdraw the solution to the cell walls, although a small amount of liquid can remain as a drop in the center (Fig. 6b).

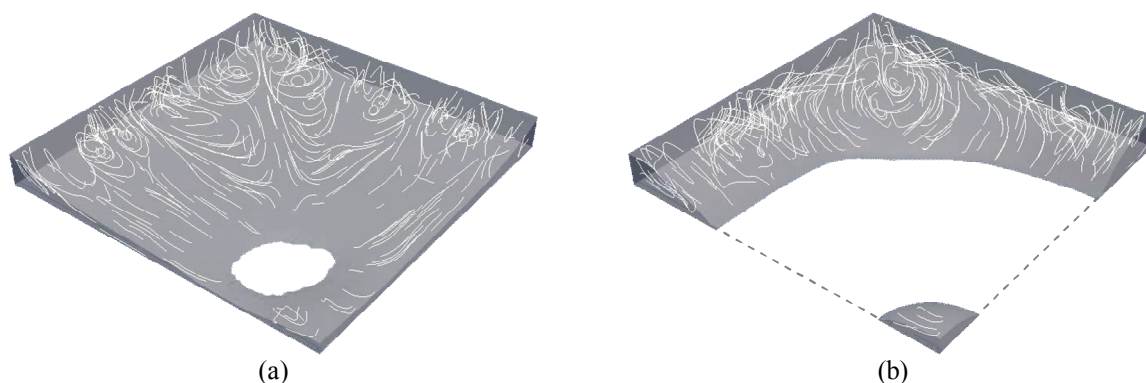


Fig. 6. Formation of a "hole" in the liquid surface (a),  $t_{\text{exp}} = 1$  hour 54 min;

the central part of the cell is left without liquid, except for a drop in the middle (b),  $t_{\text{exp}} = 1$  hour 56 min.

After this, the flows stabilize, resulting in a circulation between the cell bottom, the cell walls and the surface of the liquid (Fig. 7a), and the rest of the time the liquid dries toward the cell walls (Fig. 7b).

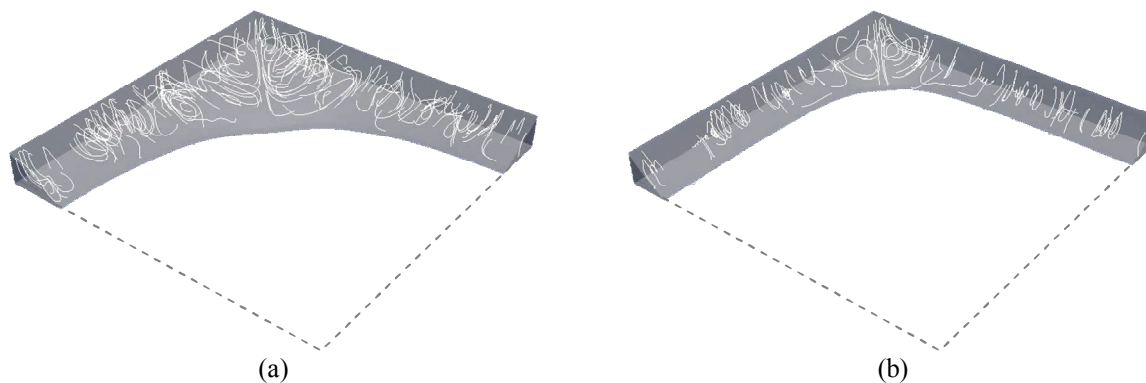


Fig. 7. Flow directions and fluid profile at the time (a)  $t_{\text{exp}} = 2$  hours 19 min, (b)  $t_{\text{exp}} = 2$  hours 42 min.

The distribution of protein and salt concentrations for the first method of probability calculation is shown in Fig. 8 (a, b), respectively. Since the probability of particle movement in this method depends only on the fluid velocity field, the resulting BSA and NaCl distributions are the same. At distances  $< 1$  mm from the cell walls, there is an increased concentration of particles; at a distance of 1-3 mm from the walls (where the solution recedes after the "hole" is formed in the liquid surface), the distribution is slightly smaller and uneven; at a distance of 3-7 mm (the central part that quickly lost all the liquid) the distribution is relatively homogenous; finally, there is a diagonal strip of slightly lower concentration, which likely reflects the nature of the diagonal currents.



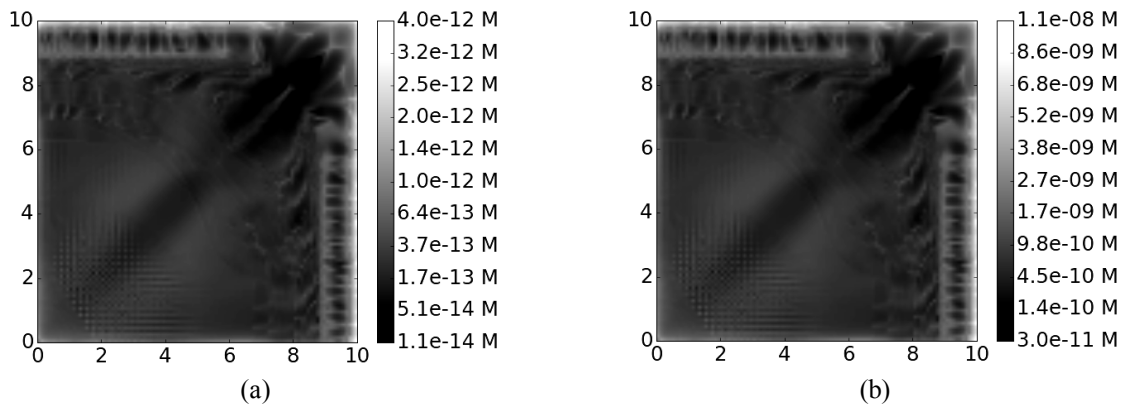


Fig. 8. Distribution of BSA (a) and NaCl (b) for the 1st method of probability calculation. Cell center is in the bottom left corner of the image.

The second (Fig. 9) and the third (Fig. 10) probability calculation methods take into account particle diffusivity, therefore they give slightly different and substantially less uniform distributions for protein and salt. Except for a few points at the cell walls with excessive concentration of particles, BSA and NaCl are mainly concentrated in a rounded band that is located at a distance of 1-3 mm from the cell walls. Unlike protein (Fig. 9a, 10a), a notable amount of salt is also uniformly present outside of this band (Fig. 9b, 10b), due to greater diffusivity of NaCl particles.

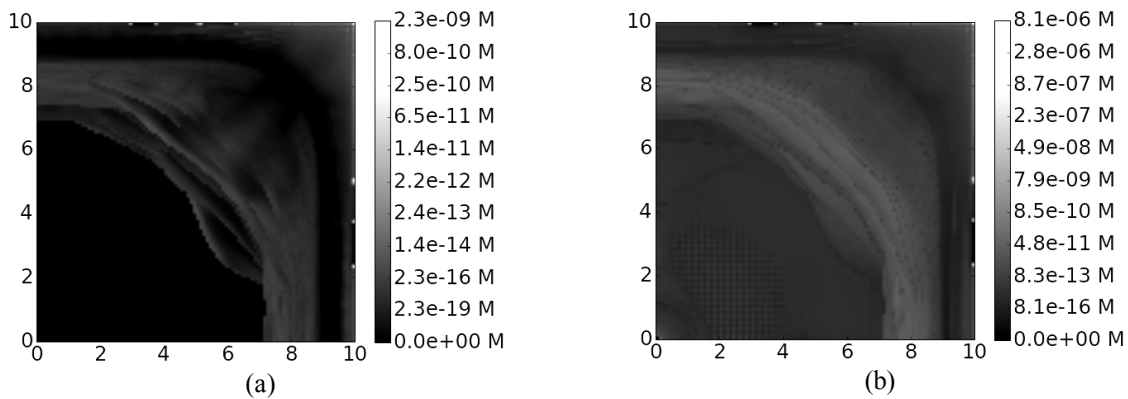


Fig. 9. Distribution of BSA (a) and NaCl (b) for the 2nd method of probability calculation. Cell center is in the bottom left corner of the image.

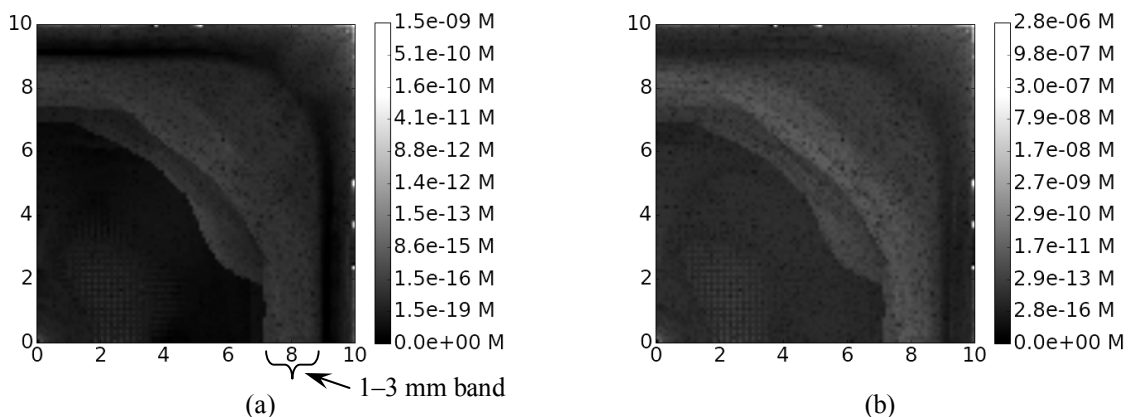


Fig. 10. Distribution of BSA (a) and NaCl (b) for the 3rd method of probability calculation. Cell center is in the bottom left corner of the image.

These results indicate that the weakness of method 1 (not accounting for particle diffusivity) is much more severe than the weakness of method 2 (exponential dependence of particle motion probability on the fluid velocity). Since method 3 lacks these disadvantages, we expect the results obtained with it to be the most accurate among the three.

Finally, comparing the results of the simulation with the experimental distributions of textures on films (Fig. 11a, 11b), and zigzag patterns (Z-patterns) in particular (Fig. 12b), the following observations can be made:

1. Textures stop forming at a distance of 1-1.5 mm from the cell edges, which approximately corresponds to the boundary of the 1-3 mm band in Fig. 9 and Fig. 10. Since pure salt solutions (without biopolymer) do not create textures [16], the simulation results suggest that very low BSA concentration between the 1-3 mm band and the cell walls is a likely reason for why textures do not cover the whole area of the cell.

2. Z-patterns (Fig. 12a) are concentrated approximately at the same distance from the cell edges as the distance to which the simulated liquid retreats after the "hole in water" is formed. Z-patterns are also practically absent in a small central part of the cell, which approximately corresponds to the droplet that separated from the main body of liquid (Fig. 12c). This suggests that rapid drying is one of the main prerequisites for the formation of Z-patterns.

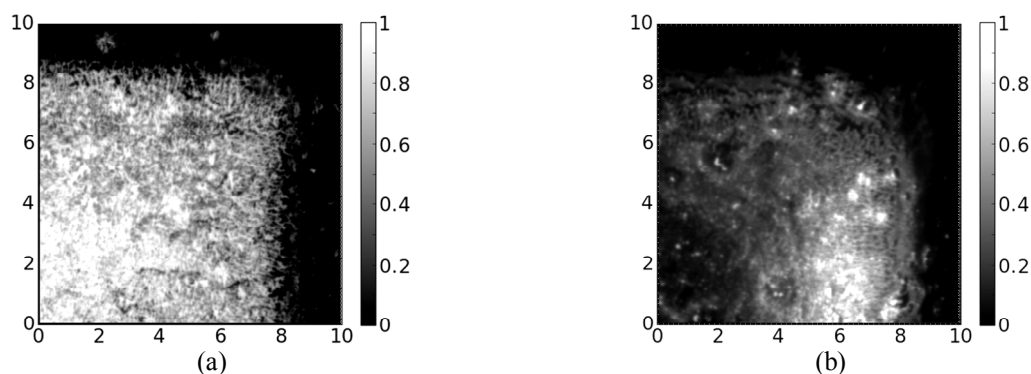


Fig. 11. Texture density distribution on the films of (a) BSA + NaCl and (b) HSA + NaCl. Cell center is in the bottom left corner of the image.

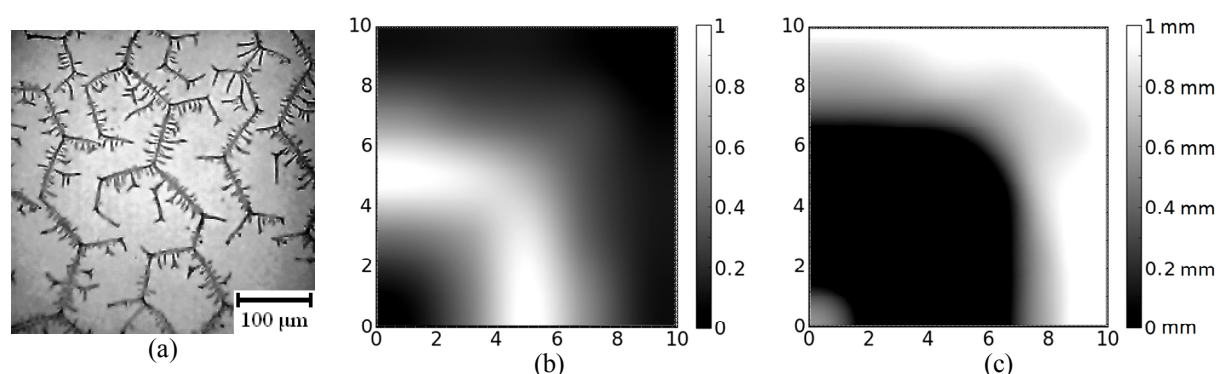


Fig. 12. (a) An example of zigzag patterns; (b) normalized interpolated distribution of zigzag pattern density on BSA + NaCl films (symmetric averaging of 19 films [16-18]); (c) height-map of the liquid surface at the time  $t_{\text{exp}} = 1 \text{ hour } 56 \text{ min } 35 \text{ s}$ . Cell center in (b) and (c) is in the bottom left corner of the image.

## CONCLUSIONS

Thus, the distributions of BSA and NaCl, obtained via a simulation of solution drying in a square cell, approximately correspond to the experimental texture distributions on the cell surface. The results support the hypotheses that the area of the textures depends on the local biopolymer concentration, and that zigzag patterns are formed in locations with high drying

rate. In the future, we intend to combine fluid dynamics and particle motion and account for additional phenomena to improve the accuracy of the model.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no competing interests.

### Author's ORCID ID

D.M. Glibitskiy  <https://orcid.org/0000-0002-1000-7770>

### REFERENCES

1. Chen R., Zhang L., Zang D., Shen W. Blood Drop Patterns: Formation and Applications // *Adv. Col. Interf. Sci.* 2016. Vol. 231. P. 1–14. DOI: 10.1016/j.cis.2016.01.008
2. Brutin D., Sobac D., Loquet B., Sampol J. Pattern formation in drying drops of blood // *J. Fluid Mech.* 2011. Vol. 667. P. 85–95. DOI: 10.1017/S0022112010005070
3. Killeen A. A., Ossina N., McGlennen R. C., Minnerath S., Borgos J., Alexandrov V., Sarvazyan A. Protein Self-Organization Patterns in Dried Serum Reveal Changes in B-Cell Disorders // *Mol. Diagn. Ther.* 2006. Vol. 10(6). P. 371–380. DOI: 10.1007/BF03256214
4. Kokornaczyk M. O., Dinelli G., Marotti I., Benedettelli S., Nani D., Betti L. Self-Organized Crystallization Patterns from Evaporating Droplets of Common Wheat Grain Leakages as a Potential Tool for Quality Analysis // *Sci. World J.* 2011. Vol. 11. P. 1712–1725. DOI: 10.1100/2011/937149
5. Busscher N., Kahl J., Andersen J. O., Huber M., Mergardt G., Doesburg P., Paulsen M., Ploeger A. Standardization of the Biocrystallization Method for Carrot Samples // *Biol. Agric. Hortic.* 2010. Vol. 27. P. 1–23. DOI: 10.1080/01448765.2010.10510427
6. Khatir N. M., Banihashemian S. M., Periasamy V., Majid W. H., Rahman S. A., Shahhosseini F. DNA Strand Patterns on Aluminium Thin Films // *Sensors.* 2011. Vol. 11. P. 6719–6727. DOI: 10.3390/s110706719
7. Dai S., Zhang X., Du Z., Dang H. Fabrication of nanopatterned DNA films by Langmuir–Blodgett technique // *Mater. Lett.* 2005. Vol. 59. P. 423–429. DOI: 10.1016/j.matlet.2004.09.038
8. Mayeres C. H., Lee S. A., Pinnick D. A., Carter B. J., Kim J. A study of Na-DNA films containing NaCl via scanning electron and tunneling microscopies // *Biopolymers.* 1995. Vol. 36. P. 669–673. DOI: 10.1002/bip.360360512
9. Lazar A. N., Shahgaldian P., Coleman A. W. Anion Recognition Effects in the Structuring of Bovine Serum Albumin Films // *J. Supramol. Chem.* 2001. Vol. 1. P. 193–199.
10. Chen G., Mohamed G. J. Complex protein patterns formation via salt-induced self-assembly and droplet evaporation // *Eur. Phys. J. E.* 2010. Vol. 33. P. 19–26. DOI: 10.1140/epje/i2010-10649-4
11. Sclavi B., Peticolas W. L., Powell J. W. Fractal-like patterns in DNA films, B form at 0% relative humidity, and antiheteronomous DNA: an IR study // *Biopolymers.* 1994. Vol. 34. P. 1105–1113.
12. Annarelli C. C., Reyes L., Fornazero J., Bert J., Cohen R., Coleman A. W. Ion and molecular recognition effects on the crystallisation of bovine serum albumin-salt mixtures // *Cryst. Eng.* 2000. Vol. 3. P. 173–194.
13. Gorr H. M., Zueger J. M., McAdams D. R., Barnard J. A. Salt-induced pattern formation in evaporating droplets of lysozyme solutions // *Col. Surf. B: Biointerfaces.* 2013. Vol. 103. P. 59–66. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.09.043
14. Yakhno T. A. Sodium chloride crystallization from drying drops of albumin-salt solutions with different albumin concentrations // *Tech. Phys.* 2015. Vol. 60(11). P. 1601–1608. DOI: 10.1134/S1063784215110262
15. Glibitskiy G. M., Jelali V. V., Semenov M. O., Roshal A. D., Glibitskiy D. M., Volyanskiy O. Yu., Zegrya G. G. Interaction of DNA with Silver Nanoparticles // *Ukr. J. Phys.* 2012. Vol. 57(7). P. 695–699.
16. Glibitskiy G. M., Glibitskiy D. M., Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Roshal A. D., Semenov M. A., Gasan A. I. Textures on the surface of BSA films with different concentrations of sodium halides and water state in solution // *Nanoscale Res. Lett.* 2015. Vol. 10(1). Article ID 155. DOI: 10.1186/s11671-015-0860-0
17. Glibitskiy D. M., Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Cheipesh T. A., Roshal A. D., Zibarov A. M., Shestopalova A. V., Semenov M. A., Glibitskiy G. M. Effect of gamma-irradiation of bovine serum albumin solution on the formation of zigzag film textures // *Rad. Phys. Chem.* 2018. Vol. 144. P. 231–237. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2017.08.019
18. Glibitskiy D. M., Gorobchenko O. A., Nikolov O. T., Shestopalova A. V., Semenov M. A. Characterization of zigzag patterns on the surface of bovine serum albumin films // *Biophys. Bull.* 2017. Vol. 37(1). P. 16–29.

19. Tarasevich Yu. Yu., Vodolazskaya I. V., Bondarenko O. P. Modeling of spatial–temporal distribution of the components in the drying sessile droplet of biological fluid // *Col. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*. 2013. Vol. 432. P. 99–103.
20. Choudhury M. D., Dutta T., Tarafdar S. Pattern formation in droplets of starch gels containing NaCl dried on different surfaces // *Col. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*. 2013. Vol. 432. P. 110–118. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2013.04.064
21. Darwich S., Mougin K., Haidara H. From highly ramified, large scale dendrite patterns of drying “alginate/Au NPs” solutions to capillary fabrication of lab-scale composite hydrogel microfibers // *Soft Mat.* 2012. Vol. 8. P. 1155–1162. DOI: 10.1039/C1SM06623D
22. Raz E., Lipson E., Ben-Jacob E. New periodic morphologies observed during dendritic growth of ammonium chloride crystals in thin layers // *J. Cryst. Growth*. 1991. Vol. 108. P. 637–647. DOI: 10.1016/0022-0248(91)90243-X
23. Bhardwaj R., Fang X., Somasundaran P., Attinger D. Self-Assembly of Colloidal Particles from Evaporating Droplets: Role of DLVO Interactions and Proposition of a Phase Diagram // *Langmuir*. 2010. Vol. 26(11). P. 7833–7842. DOI: 10.1021/la9047227
24. Zhong X., Crivoi A., Duan F. Sessile nanofluid droplet drying // *Adv. Col. Interf. Sci.* 2015. Vol. 217. P. 13–30. DOI: 10.1016/j.cis.2014.12.003
25. Hua H., Larson R. G. Marangoni Effect Reverses Coffee-Ring Depositions // *J. Phys. Chem. B*. 2006. Vol. 110. P. 7090–7094. DOI: 10.1021/jp0609232
26. Nabil M., Rattner A. S. interThermalPhaseChangeFoam – A framework for two-phase flow simulations with thermally driven phase change // *SoftwareX*. 2016. Vol. 5. P. 216–226. DOI: 10.1016/j.softx.2016.10.002
27. Rattner A. S., Garimella S. Simple Mechanistically Consistent Formulation for Volume-of-Fluid Based Computations of Condensing Flows // *J. Heat Transfer*. 2014. Vol. 136. P. 071501-1–071501-9. DOI: 10.1115/1.4026808
28. Engländer T., Wiegel D., Naji L., Arnold K. Dehydration of Glass Surfaces Studied by Contact Angle Measurements // *J. Col. Interf. Sci.* 1996. Vol. 179(2). P. 635–636. DOI: 10.1006/jcis.1996.0260
29. OpenFOAM v5 User Guide: 5.2 Boundaries. URL: <https://cfdirect.com/openfoam/user-guide/boundaries/> (retrieved 2018-04-05).
30. Brackbill J. U., Kothe D. B., Zemach C. A continuum method for modeling surface-tension // *J. Comput. Phys.* 1992. Vol. 100(2). P. 335–354.
31. Wagner W., Pruss A. The IAPWS Formulation 1995 for the Thermodynamic Properties of Ordinary Water Substance for General and Scientific Use // *J. Phys. Chem. Ref. Data*. 2002. Vol. 31. P. 387–535.
32. Dean J. A., Lange N. A. Lange's Handbook of Chemistry. 15th edition. McGraw-Hill Professional, 1999. 1424 p.
33. Cox J. D., Wagman D. D., Medvedev V. A. CODATA – Key Values for Thermodynamics, aus der Reihe: CODATA, Series on Thermodynamic Properties. New York, Washington, Philadelphia, London : Hemisphere Publishing Corporation, 1989. 271 p.
34. Crivoi A., Duan F. Three-dimensional Monte Carlo model of the coffee-ring effect in evaporating colloidal droplets // *Sci. Rep.* 2014. Vol. 4. Article ID 4310. DOI: 10.1038/srep04310
35. Jung N., Seo H. W., Leo P. H., Kim J., Kim P., Yoo C. S. Surfactant effects on droplet dynamics and deposition patterns: A lattice gas model // *Soft Mat.* 2017. Vol. 13. P. 6529–6541. DOI: 10.1039/C7SM01224A.
36. Jachimska B., Pajor A. Physico-chemical characterization of bovine serum albumin in solution and as deposited on surfaces // *Bioelectrochem.* 2012. Vol. 87. P. 138–146. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2011.09.004
37. Putnam F. W. The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control. Vol. 1. 2nd ed. New York : Acad. Press, 1975. 497 p.
38. Wise S. A., Watters R. L. Bovine Serum Albumin (7% Solution). Certificate of Analysis // United States National Institute of Standards & Technology. URL: <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/927d.pdf> (retrieved 2010-06-30).
39. Hussain A. A., Abashar M. E. E., Al-Mutaz I. S. Effect of Ion Sizes on Separation Characteristics of Nanofiltration Membrane Systems // *J. King Saud Univ.* 2006. Vol. 19. Eng. Sci. 1. P. 1–19.
40. Bondi A. Van der Waals Volumes and Radii // *J. Phys. Chem.* 1964. Vol. 68(3). P. 441–451. DOI: 10.1021/j100785a001
41. Meija J., Coplen T. B., Berglund M., Brand W. A., De Bièvre P., Gröning M., Holden N. E., Irrgeher J., Loss R. D., Walczyk T., Prohaska T. Atomic weights of the elements 2013 (IUPAC Technical Report) // *Pure Appl. Chem.* 2016. Vol. 88(3). P. 265–291. DOI: 10.1515/pac-2015-0305
42. Buscall R., D’Haene P., Mewis J. Maximum density for flow of dispersions of near monodisperse spherical-particles // *Langmuir*. 1994. Vol. 10. P. 1439–1441. DOI: 10.1021/la00017a020
43. Pusey P. N., van Megen W. Phase behavior of concentrated suspensions of nearly hard colloidal spheres // *Nat.* 1986. Vol. 320. P. 340–342. DOI: 10.1038/320340a0

44. van Megen W., Underwood S. M. Glass transition in colloidal hard spheres: Measurement and mode-coupling-theory analysis of the coherent intermediate scattering function // *Phys. Rev. E*. 1994. Vol. 49. P. 4206–4220. DOI: 10.1103/PhysRevE.49.4206
45. Meeker S. P., Poon W. C. K., Pusey P. N. Concentration dependence of the low-shear viscosity of suspensions of hard-sphere colloids // *Phys. Rev. E*. 1997. Vol. 55. P. 5718–5722. DOI: 10.1103/PhysRevE.55.5718
46. Phan S.-E., Russel W. B., Cheng Z., Zhu J. Phase transition, equation of state, and limiting shear viscosities of hard sphere dispersions // *Phys. Rev. E*. 1996. Vol. 54. P. 6633–6645. DOI: 10.1103/PhysRevE.54.6633
47. Farr R. S., Groot R. D. Close packing density of polydisperse hard spheres // *J. Chem. Phys.* 2009. Vol. 131. P. 244104. DOI: 10.1063/1.3276799
48. Krieger I. M., Dougherty T. J. A mechanism for non-Newtonian flow in suspensions of rigid spheres // *Trans. Soc. Rheol.* 1959. Vol. 3. P. 137–152. DOI: 10.1122/1.548848

#### REFERENCES

1. Chen, R., Zhang, L., Zang, D., & Shen, W. (2016). Blood Drop Patterns: Formation and Applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 231, 1-14. doi: 10.1016/j.cis.2016.01.008
2. Brutin, D., Sobac, D., Loquet, B., & Sampol, J. (2011). Pattern formation in drying drops of blood. *Journal of Fluid Mechanics*, 667, 85-95. doi: 10.1017/S0022112010005070
3. Killeen, A. A., Ossina, N., McGlennen, R. C., Minnerath, S., Borgos, J., Alexandrov, V., & Sarvazyan, A. (2006). Protein Self-Organization Patterns in Dried Serum Reveal Changes in B-Cell Disorders. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 10(6), 371-380. doi: 10.1007/BF03256214
4. Kokornaczyk, M. O., Dinelli, G., Marotti, I., Benedettelli, S., Nani, D., & Betti, L. (2011). Self-Organized Crystallization Patterns from Evaporating Droplets of Common Wheat Grain Leakages as a Potential Tool for Quality Analysis. *The Scientific World Journal*, 11, 1712-1725. doi: 10.1100/2011/937149
5. Busscher, N., Kahl, J., Andersen, J. O., Huber, M., Mergardt, G., Doesburg, P., ...Ploeger A. (2010). Standardization of the Biocrystallization Method for Carrot Samples. *Biological Agriculture and Horticulture*, 27, 1-23. doi: 10.1080/01448765.2010.10510427
6. Khatir, N. M., Banihashemian, S. M., Periasamy, V., Majid, W. H., Rahman, S. A., & Shahhosseini, F. (2011). DNA Strand Patterns on Aluminium Thin Films. *Sensors*, 11, 6719-6727. doi: 10.3390/s110706719
7. Dai, S., Zhang, X., Du, Z., & Dang, H. (2005). Fabrication of nanopatterned DNA films by Langmuir-Blodgett technique. *Materials Letters*, 59, 423-429. doi: 10.1016/j.matlet.2004.09.038
8. Mayeres, C. H., Lee, S. A., Pinnick, D. A., Carter, B. J., & Kim, J. (1995). A study of Na-DNA films containing NaCl via scanning electron and tunneling microscopies. *Biopolymers*, 36, 669-673. doi: 10.1002/bip.360360512
9. Lazar, A. N., Shahgaldian, P., & Coleman, A. W. (2001). Anion Recognition Effects in the Structuring of Bovine Serum Albumin Films. *Journal of Supramolecular Chemistry*, 1, 193-199.
10. Chen, G., & Mohamed, G. J. (2010). Complex protein patterns formation via salt-induced self-assembly and droplet evaporation. *European Physical Journal. E.*, 33, 19-26. doi: 10.1140/epje/i2010-10649-4
11. Sclavi, B., Peticolas, W. L., & Powell, J. W. (1994). Fractal-like patterns in DNA films, B form at 0% relative humidity, and antiheteronomous DNA: an IR study. *Biopolymers*, 34, 1105-1113.
12. Annarelli, C. C., Reyes, L., Fornazero, J., Bert, J., Cohen, R., & Coleman, A. W. (2000). Ion and molecular recognition effects on the crystallisation of bovine serum albumin-salt mixtures. *Crystal Engineering*, 3, 173-194.
13. Gorr, H. M., Zueger, J. M., McAdams, D. R., & Barnard, J. A. (2013). Salt-induced pattern formation in evaporating droplets of lysozyme solutions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 59-66. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.09.043
14. Yakhno, T. A. (2015). Sodium chloride crystallization from drying drops of albumin-salt solutions with different albumin concentrations. *Technical Physics*, 60(11), 1601-1608. doi: 10.1134/S1063784215110262
15. Glibitskiy, G. M., Jelali, V. V., Semenov, M. O., Roshal, A. D., Glibitskiy, D. M., Volyanskiy, O. Yu., & Zegrya, G. G. (2012). Interaction of DNA with Silver Nanoparticles. *Ukrainian Journal of Physics*, 57(7), 695-699.
16. Glibitskiy, G. M., Glibitskiy, D. M., Gorobchenko, O. A., Nikolov, O. T., Roshal, A. D., Semenov, M. A., & Gasan, A. I. (2015). Textures on the surface of BSA films with different concentrations of sodium halides and water state in solution. *Nanoscale Research Letters*, 10(1), Article ID 155. doi: 10.1186/s11671-015-0860-0
17. Glibitskiy, D. M., Gorobchenko, O. A., Nikolov, O. T., Cheipesh, T. A., Roshal, A. D., Zibarov, A. M., ...Glibitskiy G. M. (2018). Effect of gamma-irradiation of bovine serum albumin solution on the formation of zigzag film textures. *Radiation Physics and Chemistry*, 144, 231-237. doi: 10.1016/j.radphyschem.2017.08.019

18. Glibitskiy, D. M., Gorobchenko, O. A., Nikolov, O. T., Shestopalova, A. V., & Semenov, M. A. (2017). Characterization of zigzag patterns on the surface of bovine serum albumin films. *Biophysical Bulletin*, 37(1), 16-29.
19. Tarasevich, Yu. Yu., Vodolazskaya, I. V., & Bondarenko, O. P. (2013). Modeling of spatial-temporal distribution of the components in the drying sessile droplet of biological fluid. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 432, 99-103.
20. Choudhury, M. D., Dutta, T., & Tarafdar, S. (2013). Pattern formation in droplets of starch gels containing NaCl dried on different surfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 432, 110-118. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2013.04.064
21. Darwich, S., Mougin, K., & Haidara, H. (2012). From highly ramified, large scale dendrite patterns of drying “alginate/Au NPs” solutions to capillary fabrication of lab-scale composite hydrogel microfibers. *Soft Matter*, 8, 1155-1162. doi: 10.1039/C1SM06623D
22. Raz, E., Lipson, E., & Ben-Jacob, E. (1991). New periodic morphologies observed during dendritic growth of ammonium chloride crystals in thin layers. *Journal of Crystal Growth*, 108, 637-647. doi: 10.1016/0022-0248(91)90243-X
23. Bhardwaj, R., Fang, X., Somasundaran, P., & Attinger, D. (2010). Self-Assembly of Colloidal Particles from Evaporating Droplets: Role of DLVO Interactions and Proposition of a Phase Diagram. *Langmuir*, 26(11), 7833-7842. doi: 10.1021/la9047227
24. Zhong, X., Crivoi, A., & Duan, F. (2015). Sessile nanofluid droplet drying. *Advances in Colloid and Interface Science*, 217, 13-30. doi: 10.1016/j.cis.2014.12.003
25. Hua, H., & Larson, R. G. (2006). Marangoni Effect Reverses Coffee-Ring Depositions. *Journal of Physical Chemistry B*, 110, 7090-7094. doi: 10.1021/jp0609232
26. Nabil, M., & Rattner, A. S. (2016). interThermalPhaseChangeFoam – A framework for two-phase flow simulations with thermally driven phase change. *SoftwareX*, 5, 216-226. doi: 10.1016/j.softx.2016.10.002
27. Rattner, A. S., & Garimella, S. (2014). Simple Mechanistically Consistent Formulation for Volume-of-Fluid Based Computations of Condensing Flows. *Journal of Heat Transfer*, 136, 071501-1 - 071501-9. doi: 10.1115/1.4026808
28. Engländer, T., Wiegel, D., Naji, L., & Arnold, K. (1996). Dehydration of Glass Surfaces Studied by Contact Angle Measurements. *Journal of Colloid and Interface Science*, 179(2), 635-636. doi: 10.1006/jcis.1996.0260
29. OpenFOAM v5 User Guide: 5.2 Boundaries. Retrieved from <https://cfd.direct/openfoam/user-guide/boundaries/>
30. Brackbill, J. U., Kothe, D. B., & Zemach, C. (1992). A continuum method for modeling surface-tension. *Journal of Computational Physics*, 100(2), 335-354.
31. Wagner, W., & Pruss, A. (2002). The IAPWS Formulation 1995 for the Thermodynamic Properties of Ordinary Water Substance for General and Scientific Use. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 31, 387-535.
32. Dean, J. A., & Lange, N. A. (1999). *Lange's Handbook of Chemistry* (15th ed.). New York, N.Y.: McGraw-Hill Professional.
33. Cox, J. D., Wagman, D. D., & Medvedev, V. A. (1989). *CODATA – Key Values for Thermodynamics, aus der Reihe: CODATA, Series on Thermodynamic Properties*. New York, Washington, Philadelphia, London: Hemisphere Publishing Corporation.
34. Crivoi, A., & Duan, F. (2014). Three-dimensional Monte Carlo model of the coffee-ring effect in evaporating colloidal droplets. *Scientific Reports*, 4, Article ID 4310. doi: 10.1038/srep04310
35. Jung, N., Seo, H. W., Leo, P. H., Kim, J., Kim, P., & Yoo, C. S. (2017). Surfactant effects on droplet dynamics and deposition patterns: A lattice gas model. *Soft Matter*, 13, 6529-6541. doi: 10.1039/C7SM01224A.
36. Jachimaska, B., & Pajor, A. (2012). Physico-chemical characterization of bovine serum albumin in solution and as deposited on surfaces. *Bioelectrochemistry*, 87, 138-146. doi: 10.1016/j.bioelechem.2011.09.004
37. Putnam, F. W. (1975). *The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control*. Vol. 1 (2nd ed). New York: Acad. Press.
38. Wise, S. A., & Watters, R. L. (2014). Bovine Serum Albumin (7% Solution). Certificate of Analysis. *United States National Institute of Standards & Technology*. Retrieved from <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/927d.pdf>
39. Hussain, A. A., Abashar, M. E. E., & Al-Mutaz, I. S. (2006). Effect of Ion Sizes on Separation Characteristics of Nanofiltration Membrane Systems. *Journal of King Saud University*, 19, Eng. Sci. 1. 1-19.
40. Bondi, A. (1964). Van der Waals Volumes and Radii. *Journal of Physical Chemistry*, 68(3), 441-451. doi: 10.1021/j100785a001

- 
41. Meija, J., Coplen, T. B., Berglund, M., Brand, W. A., De Bièvre, P., Gröning, M., ...Prohaska, T. (2016). Atomic weights of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 88(3), 265-291. doi: 10.1515/pac-2015-0305
  42. Buscall, R., D'Haene, P., & Mewis, J. (1994). Maximum density for flow of dispersions of near monodisperse spherical-particles. *Langmuir*, 10, 1439-1441. doi: 10.1021/la00017a020
  43. Pusey, P. N., & van Megen, W. (1986). Phase behavior of concentrated suspensions of nearly hard colloidal spheres. *Nature*, 320, 340-342. doi: 10.1038/320340a0
  44. Megen, W. van, & Underwood, S. M. (1994). Glass transition in colloidal hard spheres: Measurement and mode-coupling-theory analysis of the coherent intermediate scattering function. *Physical Review E*, 49, 4206-4220. doi: 10.1103/PhysRevE.49.4206
  45. Meeker, S. P., Poon, W. C. K., & Pusey, P. N. (1997). Concentration dependence of the low-shear viscosity of suspensions of hard-sphere colloids. *Physical Review E*, 55, 5718-5722. doi: 10.1103/PhysRevE.55.5718
  46. Phan, S.-E., Russel, W. B., Cheng, Z., & Zhu, J. (1996). Phase transition, equation of state, and limiting shear viscosities of hard sphere dispersions. *Physical Review E*, 54, 6633-6645. doi: 10.1103/PhysRevE.54.6633
  47. Farr, R. S., & Groot, R. D. (2009). Close packing density of polydisperse hard spheres. *Journal of Chemical Physics*, 131, 244104. doi: 10.1063/1.3276799
  48. Krieger, I. M., & Dougherty, T. J. (1959). A mechanism for non-Newtonian flow in suspensions of rigid spheres. *Transactions of the Society of Rheology*, 3, 137-152. doi: 10.1122/1.548848

## ПОЛУЧЕНИЕ АЛЬГИНАТНЫХ МИКРОСФЕР РАЗЛИЧНОГО РАЗМЕРА ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИЯ

**С.В. Нарожный, И.Ф. Коваленко, Д.А. Мангасаров,  
М.И. Щетинский, О.А. Нардид**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,  
ул. Переяславская, 23, Харьков, 61016, Украина;*

*e-mail: stas.narozhnyi@gmail.com*

Поступила в редакцию 31 января 2018 г.

Принята 23 марта 2018 г.

**Актуальность.** Микросферы, полученные из полимеров, как природного, так и синтетического происхождения, нашли применение в химико-фармацевтической отрасли, пищевой промышленности и в сельском хозяйстве. Несмотря на это в настоящее время активно развиваются различные методы их получения. Основными требованиями, предъявляемыми к способу получения микросфер, является: низкая себестоимость, однородность получаемого продукта, мягкие условия получения. Одним из перспективных методов получения микросфер, который соответствует заявленным требованиям, является метод электрораспыления. В настоящее время проведено большое количество исследований, связанных с изучением влияния неоднородного электрического поля на размеры микросфер из полимерных материалов, в то же время практически отсутствуют работы, посвященные изучению влияния однородного электрического поля на их размеры.

**Цель работы.** Целью данного исследования являлось изучение влияния однородности электростатического поля, на размер микросфер из альгината натрия, полученных методом электрораспыления.

**Материалы и методы.** Микросферы альгината натрия получали методом электрораспыления, при условии однородности электростатического поля, образованного между контактами установки. В работе использовали альгинат натрия низкой вязкости ( $15 \cdot 10^{-3}$ – $25 \cdot 10^{-3}$  Па·с). В качестве источника двухвалентных катионов  $\text{Ca}^{2+}$  использовали водный 2% раствор  $\text{CaCl}_2$ . Размер микросфер оценивали на конфокальном микроскопе AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия).

**Результаты.** В ходе проведенного исследования были выявлены основные параметры экспериментальной установки, влияющие на размер получаемых микросфер. К ним относятся величина напряжения, приложенного к пластинам, задающим форму поля, расстояние между пластинами и скорость подачи полимера. К наиболее значимым параметрам можно отнести величину приложенного напряжения, так как именно изменение этой величины приводило к наибольшему изменению размера альгинатных микросфер.

**Выводы.** При использовании однородного электростатического поля можно получить микросферы альгината натрия диаметром от  $900 \pm 5$  мкм до  $2071 \pm 15$  мкм с сохранением сферической формы частиц.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** альгинат натрия; микросферы; метод электрораспыления; метод получения микросфер.

## PRODUCTION OF ALGINATE MICROSPHERES OF VARIOUS SIZES UNDER THE INFLUENCE OF AN ELECTROSTATIC FIELD WITH THE HELP OF ELECTROSPRAY METHOD

**S.V. Narozhnyi, I.F. Kovalenko, D.A. Mangasarov, M.I. Schetinsky, O.A. Nardid**

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine,  
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, 61016, Ukraine*

**Background:** Microspheres obtained from polymers, both natural and synthetic origin, have found application in chemical-pharmaceutical, food industries and in agriculture. Despite this, various methods of obtaining them are actively developing. The main requirements for the preparation of microspheres are low cost, homogeneity of the end product, mild conditions of their obtaining. One of the promising



methods to produce the microspheres, which meets the stated requirements, is the electrospray method. At the present time, a large number of studies have been carried out to study the effect of an inhomogeneous electric field on the dimensions of microspheres from polymeric materials, while at the same time there are practically no published reports devoted to the investigation of the influence of a homogeneous electric field on their dimensions.

**Objectives:** The purpose of this study was the investigation of the influence of the electrostatic field uniformity on the size of the sodium alginate microspheres obtained by means of electrospray.

**Materials and methods:** The sodium alginate microspheres were prepared by the electrospray method, on the condition of homogeneity of electrostatic field formed between the contacts of the device. Sodium alginate of low viscosity ( $15 \cdot 10^{-3}$ – $25 \cdot 10^{-3}$  Pa·s) was used in the work. As a gel solution, a 2% solution of  $\text{CaCl}_2$  was used. The sizes of the microspheres were evaluated with a confocal microscope AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Germany).

**Results:** During the study, there were revealed the main parameters of the experimental setup, which affected the sizes of the obtained microspheres. These include the magnitude of the voltage applied to the plates determining the shape of the field, the distance between the plates, and the rate of the polymer supplying. The most important parameters comprise the magnitude of the applied voltage since it was the change in this value that led to the largest change in the sizes of the alginate microspheres.

**Conclusions:** Upon using the uniform electrostatic field it is possible to obtain the sodium alginate microspheres with a diameter from  $900 \pm 5 \mu\text{m}$  to  $2071 \pm 15 \mu\text{m}$ , on the condition of maintaining the spherical shape of the particles.

**KEY WORDS:** sodium alginate; microspheres; electrospray method; method of obtaining microspheres.

#### ОТРИМАННЯ АЛЬГІНАТНИХ МІКРОСФЕР РІЗНОГО РОЗМІРУ ПІД ВПЛИВОМ ЕЛЕКТРОСТАТИЧНОГО ПОЛЯ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОРОЗПИЛЮВАННЯ

С.В. Нарожный, И.Ф. Коваленко, Д.А. Мангасаров, М.И. Щетинский, О.А. Нардид

*Институт проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,  
вул. Переяславська, 23, Харків, 61016, Україна*

**Актуальність.** Мікросфери, отримані з полімерів, як природного, так і синтетичного походження, знайшли застосування у хіміко-фармацевтичній галузі, харчовій промисловості та у сільському господарстві. Незважаючи на це в даний час активно розвиваються різні методи їх отримання. Основними вимогами, що пред'являються до способу отримання мікросфер, є: низька собівартість, гомогенність одержуваного продукту, м'які умови отримання. Одним з перспективних методів отримання мікросфер, який відповідає заявленим вимогам, є метод електророзпилювання. Нині проведено велику кількість досліджень, пов'язаних з вивченням впливу неоднорідного електричного поля на розмір мікросфер з полімерних матеріалів, в той же час практично відсутні роботи, присвячені вивченню впливу однорідного електричного поля на їх розміри.

**Мета роботи.** Метою даного дослідження було вивчення впливу однорідності електростатичного поля на розмір мікросфер альгінату натрію, отриманих методом електророзпилювання.

**Матеріали та методи.** Мікросфери альгінату натрію отримували методом електророзпилювання за умови однорідності електростатичного поля, утвореного між контактами експериментальної установки. У роботі використовували альгінат натрію низькою в'язкості ( $15 \cdot 10^{-3}$ – $25 \cdot 10^{-3}$  Па·с). Як гелюючий розчин був використаний розчин  $\text{CaCl}_2$  2% концентрації. Розмір мікросфер оцінювали на конфокальному мікроскопі AxioObserver Z1 (CarlZeiss, Німеччина).

**Результати.** В ході проведеного дослідження були виявлені основні параметри експериментальної установки, що впливають на розмір отримуваних мікросфер. До них відносяться: величина прикладеної напруги до пластин, що задають форму поля, відстань між пластинами і швидкість подачі полімеру. До найбільш значимих параметрів можна віднести величину прикладеної напруги, так як саме зміна цієї величини викликала найбільшу зміну розміру альгінатних мікросфер.

**Висновки.** При використанні однорідного електростатичного поля можливо отримати мікросфери альгінату натрію діаметром від  $900 \pm 5 \mu\text{m}$  до  $2071 \pm 15 \mu\text{m}$  за умови збереження сферичної форми частинок.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** альгінат натрію; мікросфери; метод електророзпилювання; метод отримання мікросфер.

На сьогоднішній день розроблено множество методов получения микро- и наночастиц на основе полимеров животного [1-7] и растительного [8-9] происхождения. Одним из таких методов является метод электрораспыления, или формирование микросфер под воздействием электростатического потенциала [10-11].

Основными достоинствами данного метода, по сравнению с остальными, является возможность получения однородных по размеру микросфер в широком диапазоне – от 50 мкм до 1 мм [8].

За счет варьирования таких параметров, как концентрация полимера, скорость его подачи, величина приложенного напряжения можно регулировать размеры получаемых микросфер. Помимо этого в данном методе не используются токсические растворители или вещества, способные повредить биологические объекты.

Благодаря перечисленным выше достоинствам данный метод получил широкое распространение в пищевой промышленности [12], биотехнологии [13], медицине [14] и фармакологии [15].

Одним из полимеров, которые применяют для создания микро- и наноносителей является альгинат натрия [8, 16]. Он представляет собой линейный отрицательно-заряженный полисахарид, состоящий из последовательных или чередующихся GG/GM/MM-блоков 1-4-связанных остатков  $\beta$ -D-маннуровой (M) и  $\alpha$ -L-гулуровой (G) кислот [17]. Альгинат натрия получают из бурых водорослей (*Phaeophyceae*), включая *Laminaria hyperborea*, *Laminari adigitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera* [18] и бактерий рода *Azotobacter* и *Pseudomonas* [19]. Альгинат натрия может образовывать связи с двухвалентными катионами  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Br}^{2+}$  или  $\text{Sr}^{2+}$ , формируя при этом пористый гидрогель за счет образования поперечных связей GG/GM-блоков (GG-GG; GM-GG; GM-GM) между собой [20]. Подобный тип сформированных структур в литературе получил название «egg-box model» [21].

Также альгинат натрия является биосовместимым, нетоксичным полимером природного происхождения с низкой стоимостью производства [22]. Благодаря чему микросферы, полученные из этого полимера, нашли свое применение в области биосепарации, клеточной и молекулярной биологии, иммунологии, энзимологии и диагностике. Они успешно применяются в качестве биореакторов [23], матриц для инкапсуляции различных типов клеток [24], для направленной доставки лекарств с контролируемым высвобождением [25].

Целью данного исследования являлось изучение влияния однородности электростатического поля на размер микросфер из альгината натрия, получаемых методом электрораспыления.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для экспериментального исследования влияния однородности электростатического поля на размер микросфер полимера, получаемых методом электрораспыления, была изготовлена описанная ниже установка. Экспериментальная установка состоит из следующих основных систем (рис. 1): системы дозирования полимера, системы приема микросфер, системы формирования высокого напряжения и системы распыления полимера.

Система дозирования полимера представляет собой шприцевой насос, состоящий из камеры нагнетания (в качестве которой используется одноразовые инъекционные шприцы различного объема: от 1 мл до 20 мл); шагового двигателя Mitsumi M49SP-1 (Япония) и узла винтовой передачи толкающего усилия к поршню шприца.

Система дозирования обеспечивает равномерную подачу полимера с фиксированной скоростью в диапазоне от 0,1 мл/ч до 150 мл/ч.

Система приема микросфер включает в себя емкость с гелирующим раствором и магнитную мешалку.

Система формирования высокого напряжения собрана из источника высокого напряжения, регулируемого блока питания Б5-44 (Украина) и вольтметра универсального В7-16А (Украина).

Источник высокого напряжения обеспечивает на выходе постоянное напряжение от 4 до 12 кВ и представляет собой блокинг-генератор, в схеме которого (рис. 2) использован специально изготовленный высоковольтный трансформатор на ферритовом сердечнике.

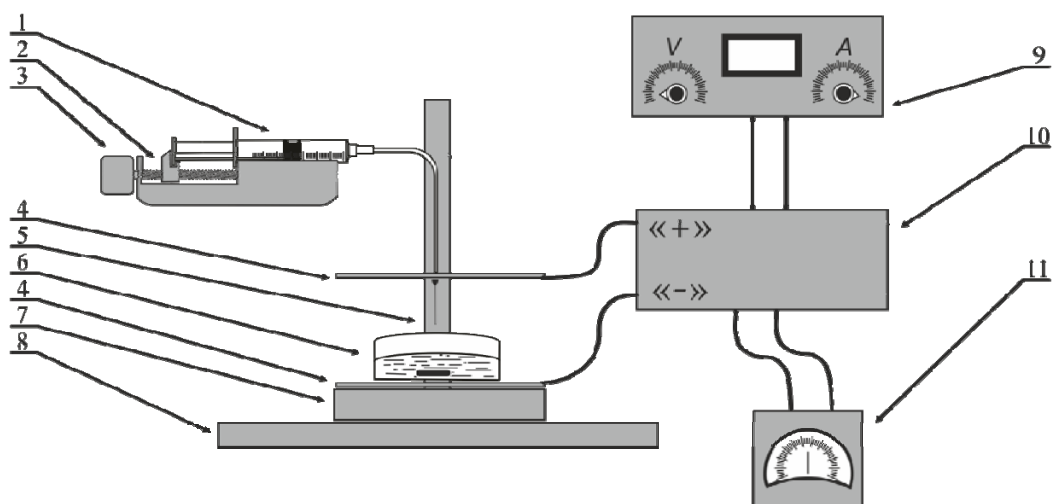


Рис. 1. Блок схема установки. 1 – камера нагнетания шприцевого насоса; 2 – винтовая передача; 3 – шаговый двигатель Mitsumi M49SP-1 (Япония); 4 – металлические пластины; 5 – капиллярная металлическая трубка ( $d_{\text{внутр.}}=260$  мкм); 6 – емкость с гелирующим раствором; 7 – магнитная мешалка; 8 – диэлектрическая стойка; 9 – регулируемый блок питания Б5-44 (Украина); 10 – источник высокого напряжения; 11 – вольтметр универсальный В7-16А (Украина).

Нужная величина высокого напряжения устанавливается путем изменения напряжения на выходе регулируемого блока питания Б5-44 (Украина), в пределах от 2 до 12 В. Максимальный выходной ток блока питания выставляется 1 А.

Для измерения выходного напряжения используется вольтметр универсальный В7-16А (Украина). Контроль выходного напряжения осуществляется путем измерения напряжения на дополнительной обмотке высоковольтного трансформатора, после чего измеренное значение напряжения умножается на поправочный коэффициент, зависящий от отношения количества витков высоковольтной обмотки к количеству витков дополнительной обмотки (400) для получения значения напряжения на выходе источника высокого напряжения.

Это позволяет контролировать выходное напряжение без использования киловольтметра.

Система распыления состоит из двух горизонтальных металлических пластин, на которые подается высокое напряжение; капиллярной металлической трубки ( $d_{\text{внутр.}}=260$  мкм), подающей поступающий из системы дозирования раствор в зону распыления, и специальной диэлектрической стойки (рис. 3, а), на которой закреплены обе пластины: нижняя — неподвижно, а верхняя укреплена на платформе, перемещаемой по вертикали подъемным механизмом, позволяющим регулировать расстояние между пластинами с высокой точностью.

Платформа для крепления одной из металлических пластин оснащена зажимом типа «луер-лок», что позволяет использовать стандартные иглы от одноразовых инъекционных шприцов.

Форма электростатического поля задается при помощи двух металлических пластин, расположенных параллельно друг относительно друга (рис. 3, б). Линейные размеры и форму пластин подбирали так, чтобы на практике можно было получить однородное электрическое поле в рабочей области.

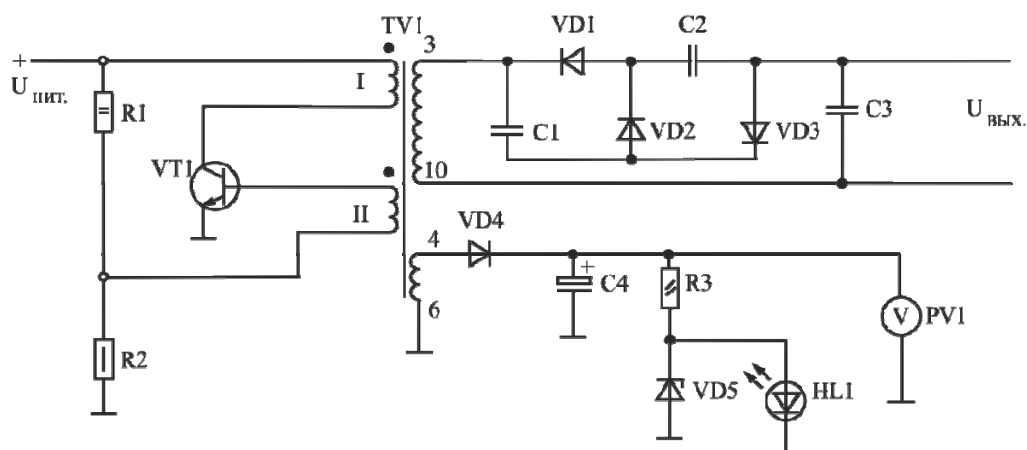


Рис. 2. Электрическая схема источника высокого напряжения.

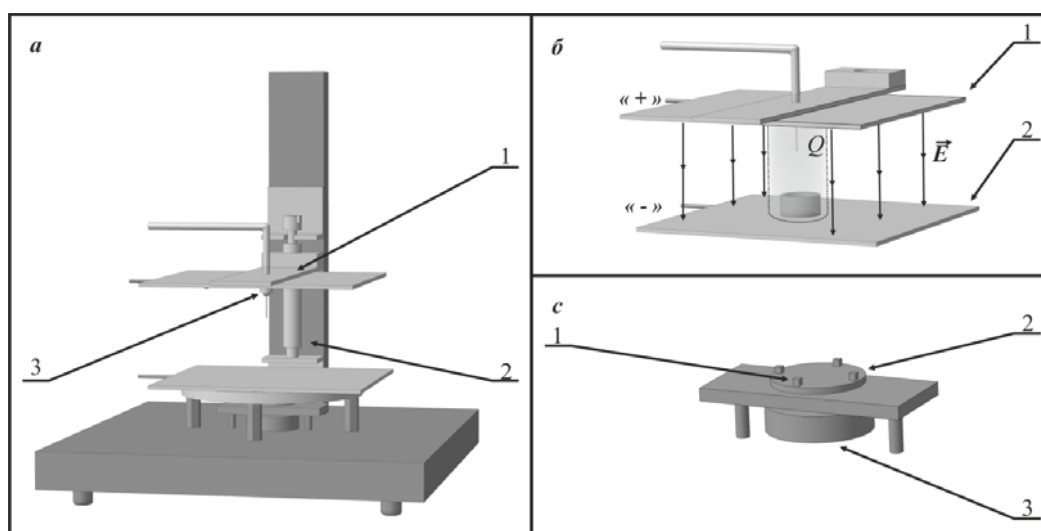


Рис. 3. Диэлектрическая стойка:

- а – 3D модель стойки: 1 – платформа для крепления металлической пластины и иглы; 2 – подъёмный механизм; 3 – зажим типа «луер-лок».
- б – силовые линии поля, образованного между двумя металлическими пластинами: 1,2 – верхняя и нижняя металлические пластины, задающие форму поля.
- с – магнитная мешалка: 1 – неодимовые магниты; 2 – насадка на вал шагового двигателя; 3 – шаговый двигатель Mitsumi M49SP-1 (Япония).

Исходя из наших расчетов, с достаточной степенью приближения мы можем считать электрическое поле, образованное в сегменте  $Q$ , однородным. Тем самым исключить влияние краевых эффектов поля, образованных на краях формозадающих пластин.

Все части установки служат для оптимизации процесса получения полимерных микросфер. Применение данной установки минимизирует влияние оператора на процесс получения микросфер и обеспечивает получение воспроизводимого и точного результата, а также позволяет получать микросферы различного диаметра. При этом процесс получения микросфер может быть реализован в стерильных условиях.

В качестве полимера в работе использовали альгинат натрия низкой вязкости ( $15 \cdot 10^{-3} - 25 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$ ) производства Sigma-Aldrich (Великобритания). Для сополимеризации блоков альгината натрия использовался водный раствор  $\text{CaCl}_2$  2%

концентрации [20]. Микрокапсулы находились в растворе  $\text{CaCl}_2$  в течение 1-го часа, после чего проводились микроскопические исследования.

Оценку формы и распределения микросфер из альгината натрия по размеру проводили при помощи конфокального микроскопа AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия). Обработку полученных изображений проводили в программе Zeiss LSM Image Examiner версии 4.2.0.121.

Результаты приведены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было установлено, что размер и форма получаемых альгинатных носителей зависят от нескольких параметров, таких как: расстояние между пластинами, задающими электростатическое поле –  $h$ ; диаметр капиллярной металлической трубки; величина напряжения  $U$  и как следствие, напряжённость электростатического поля  $E$ , создаваемого между контактами; скорость подачи полимера  $V$ , а также его концентрация. В данной работе была проведена серия экспериментов для определения влияния каждого из параметров на размер и форму получаемых микросфер. Для этого последовательно изменяли только один из исследуемых параметров, в то время как остальные оставались неизменными.

При свободном падении капля альгината в емкость с гелирующим раствором формируются крупные сферы, диаметр которых достигает  $2199 \pm 7$  мкм (рис. 4, 5.). Приложение незначительного напряжения приводит к облегчению отрыва каплей альгината от кончика иглы и позволяет уменьшить их размер до  $2015 \pm 18$  мкм. При этом не наблюдалось формирования конуса распыления, а только увеличивалась частота отрыва каплей от кончика иглы. Данный эффект вызван изменением величины коэффициента поверхностного натяжения альгината натрия под воздействием электрического напряжения [10].

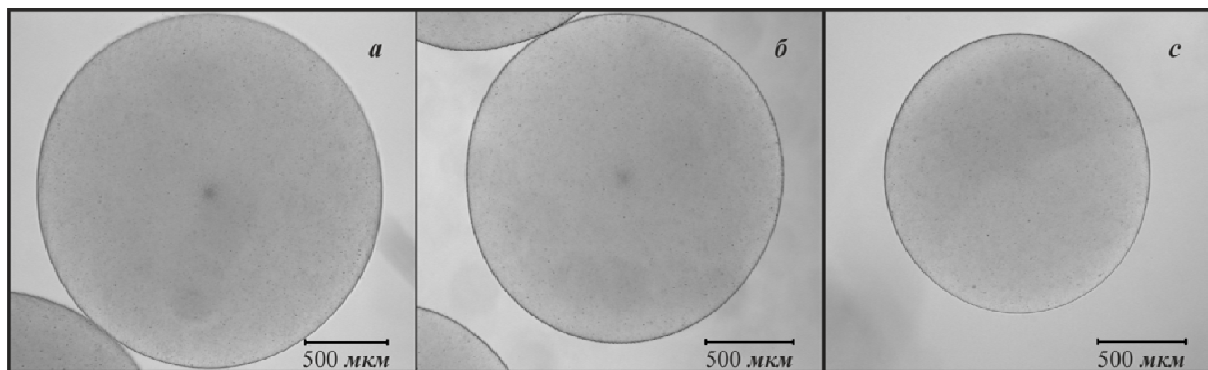


Рис. 4. Фотографии микросфер из альгината натрия.

Параметры установки:  $h=30$  мм;  $V=10$  мл/ч;  $C_{\text{алг.}}=2\%$ .  $a - U=2,25$  кВ;  $b - U=4,24$  кВ;  $c - U=6,33$  кВ.

Последующее увеличение напряжения, подаваемого на металлические пластины (рис. 3 б), не привело к формированию конуса распыления, а только вызвало уменьшение размера микросфер. Это косвенно подтверждает наше предположение об однородности поля в рабочей области  $Q$  (рис. 3 б).

В ходе эксперимента наблюдалась прямая корреляция между величиной приложенного напряжения и размером микросфер.

Как видно из приведённых графиков, снижение концентрации альгината натрия на 0,2% практически не влияет на размер получаемых микросфер. Что свидетельствует о том, что небольшие колебания концентрации практически не приводят к изменению размера получаемых микросфер.

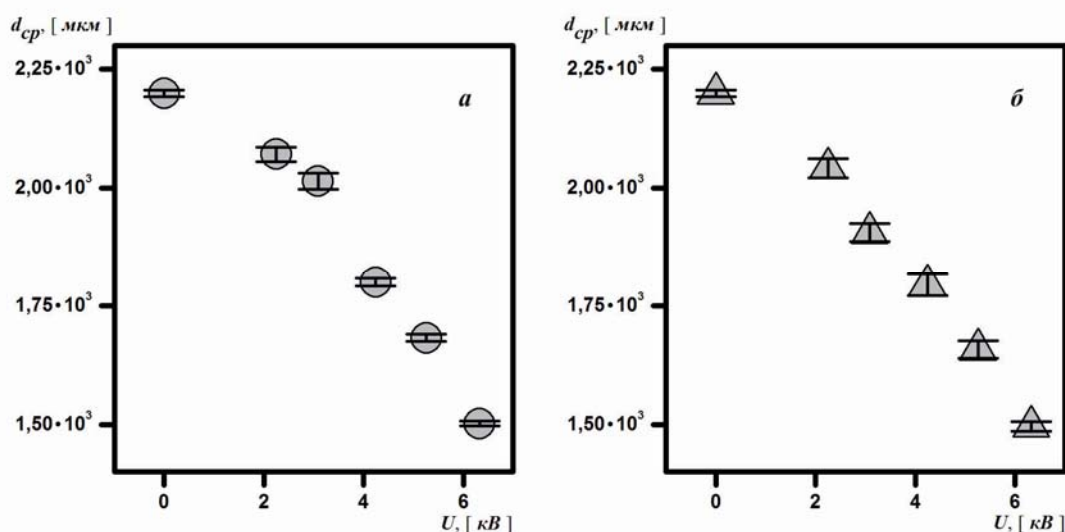


Рис. 5. Влияние приложенного напряжения на размер микросфер из альгината натрия. Параметры установки:  $h=30$  мм;  $V=10$  мл/ч. а – концентрация альгината натрия – 1,8%; б – концентрация альгината натрия – 2 %.

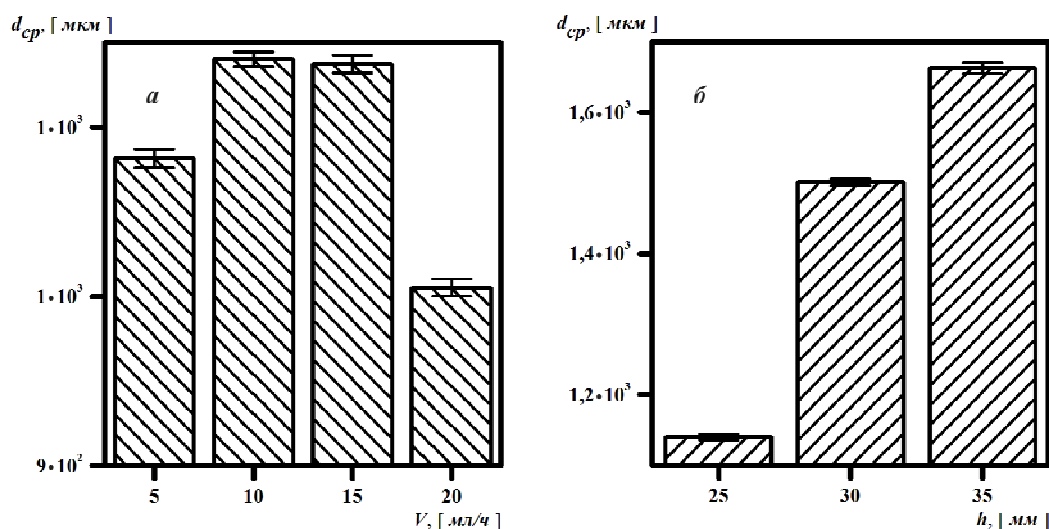


Рис. 6. Влияние параметров установки на размер микросфер. Параметры установки: а –  $U=6,33$  кВ,  $h=25$  мм; б –  $U=6,33$  кВ,  $V=10$  мл/ч.

Еще одним из важных параметров, влияющих на размер образованных микросфер, является расстояние между пластинами, задающими форму электростатического поля. Как видно из (рис. 6 б), при увеличении расстояния на 5 мм между пластинами наблюдается и увеличение диаметра микросфер из альгината натрия на 10%, в то же время уменьшение расстояния на 5 мм приводит к противоположному эффекту, уменьшая диаметр микросфер на 24%.

При этом как увеличение, так и уменьшение расстояния между пластинами не приводит к формированию конуса распыления, а только лишь к изменению частоты отрывания капли альгината натрия от кончика иглы.

Также одним из регулируемых параметров, влияющих на размер микросфер, является скорость подачи полимера (рис. 6 а). Как видно из приведенных результатов, уменьшение скорости подачи альгината натрия до 5 мл/ч приводило к уменьшению диаметра сфер на 5%, при этом увеличение скорости подачи до 20 мл/ч приводило к

более значительному снижению размера микросфер (на 11%), в то же время увеличение скорости подачи до 15 мл/ч практически не отразилось на их геометрии.

### ВЫВОДЫ

Была разработана, собрана и протестирована установка для получения полимерных микросфер методом электрораспыления.

Было исследовано влияние однородности электростатического поля на размер микросфер из альгината натрия, получаемых методом электрораспыления. К основным параметрам, влияющим на их размер, относятся величина приложенного напряжения к пластинам, задающим форму поля, расстояние между пластинами и скорость подачи полимера. Изменяя эти параметры, можно получить микросферы альгината натрия диаметром от  $900 \pm 5$  мкм до  $2071 \pm 15$  мкм.


### БЛАГОДАРНОСТЬ


Работа выполнена соответственно научному направлению работы отдела криобиофизики ИПКиК НАН Украины по теме: «Влияние криоконсервирования плаценты и ее водно-солевых экстрактов на антиоксидантное и противовоспалительное действие экстрактов» (№ государственной регистрации – 0116U003491).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ


Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.


#### Authors' ORCID ID

S.V. Narozhnyi  <https://orcid.org/0000-0001-9690-0203>

I.F. Kovalenko  <https://orcid.org/0000-0002-7063-6712>

D.A. Mangasarov  <https://orcid.org/0000-0001-7891-9023>

M.I. Schetinsky  <https://orcid.org/0000-0002-9279-2695>

O.A. Nardid  <https://orcid.org/0000-0002-9439-0606>

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chemtob C., Assimacopoulos T., Chaumeil J.C. Preparation and characteristics of gelatin microspheres // *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1988. Vol. 14(10). P. 1359–1374.
2. Jeyanthi R., Rao K. P. Preparation of gelatin microspheres of bleomycin // *Int. J. Pharm.* 1987. Vol. 35(1-2). P. 177–179.
3. Tran T. H., Ramasamy T., Poudel B. K., Marasini N. et al. Preparation and characterization of spray-dried gelatin microspheres encapsulating ganciclovir // *Macromol. res.* 2014. Vol. 22(2). P. 124–130.
4. Sun R., Shi J., Guo Y., Chen L. Studies on the particlesize control of gelatin microspheres // *Frontiers of Chemistry in China.* 2009. Vol. 4(2), P. 222–228.
5. Katti D., Krishnamurti N. Preparation of albumin microspheres by an improved process // *J. Microencapsul.* 1999. Vol. 16(2). P. 232–242.
6. Kramer P. A. Albumin microspheres as vehicles for achieving specificity in drug delivery // *J. Pharm. Sci.* 1974. Vol. 63. P. 1646–1647.
7. Stenekes R. J., Franssen O., van Bommel E. M., Crommelin D. J. et al. The preparation of dextran microspheres in an all-aqueous system: effect of the formulation parameters on particle characteristics // *Pharm. Res.* 1998. Vol. 15(4). P.557–561.
8. Paques J. P., van der Linden E., van Rijn C. J., Sagis L. M. Preparation methods of alginate nanoparticles // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2014. Vol. 209. P. 163–171.
9. Prusse U., Bilancetti L., Bučko M. et al. Comparison of different technologies for alginate beads production // *Chemical Papers.* 2008. Vol. 62(4). P. 364–374.
10. Poncelet D., Neufeld R. J., Goosen M. F. A., Burgarski B. et al. Formation of microgel beads by electric dispersion of polymer solutions // *AIChE J.* 1999. Vol. 45(9). P. 2018–2023.
11. Bugarski B., Li Q., Goosen M. F. A., Poncelet D. et al. Electrostatic droplet generation: mechanism of polymer droplet formation // *AIChE J.* 1994. Vol. (40). P. 1026–1032.
12. Manojlovic V., Rajic N., Djonlagic J., Obradovic B. et al. Application of electrostatic extrusion - flavour encapsulation and controlled release // *Sensors (Basel).* 2008. Vol. 8(3). P. 1488–1496.



13. Keshavarz T., Ramsden G., Phillips P., Mussenden P. et al. Application of electric field for production of immobilized biocatalysts // *Biotechnol. Tech.* 1992. Vol. 6. P. 445–450.
14. Manojlovic V., Djonlagic J., Obradovic B., Nedovic V. et al. Immobilization of cells by electrostatic droplet generation: a model system for potential application in medicine // *Int. J. Nanomedicine.* 2006. Vol. 1(2). P. 163–172.
15. Singh M. N., Hemant K. S., Ram M., Shivakumar H. G. Microencapsulation: a promising technique for controlled drug delivery // *Res. Pharm. Sci.* 2010. Vol. 5(2). P. 65–77.
16. Zhang J., Li X., Zhang D., Xiu D. Theoretical and experimental investigations on the size of alginate microspheres prepared by dropping and spraying // *J. Microencapsul.* 2007. Vol. 24(4). P. 303–322.
17. Lee K. Y., Mooney D. J. Alginate: properties and biomedical applications // *Prog. Polym. Sci.* 2012. Vol. 37(1) P. 106–126.
18. Smidsrod O., Skjak-Bræk G. Alginate as immobilization matrix for cells // *Trend Biotechnol.* 1990. Vol. 8(3). P. 71–78.
19. Remminghorst U., Rehm B. H. A. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications // *Biotechnol. Lett.* 2006. Vol. 28(21). P. 1701–1712.
20. Mørch Å. A., Donati I., Strand B. L., Skja G. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , and  $\text{Sr}^{2+}$  on alginate microbeads // *Biomacromolecules.* 2006. Vol. 7(5). P. 1471–1480.
21. Li L., Fang Y., Vreeker R., Appelqvist I., Mendes E. Reexamining the egg-box model in calcium - alginate gels with X-ray diffraction // *Biomacromolecules.* 2007. Vol. 8(2). P. 464–468.
22. Sachan K. N., Pushkar S., Jha A., Bhattcharya A. Sodium alginate: the wonder polymer for controlled drug delivery // *J. Pharm. Res.* 2009. Vol. 2(8). P. 1191–1199.
23. David B., Barbe L., Barthès-Biesel D., Legallais C. Mechanical properties of alginate beads hosting hepatocytes in a fluidized bed bioreactor // *Int. J. Artif. Organs.* 2006. Vol. 29(8). P. 756–763.
24. Strand B. L., Morsch Y. A., Skjak-Bræk G. Alginate as immobilization matrix for cells // *Minerva Biotechnologica.* 2000. Vol. 12(4). P. 223–233.
25. Arshady R. Biodegradable microcapsular drug delivery system // *J. Bioactive Compatible Polym.* 1990. Vol. 5. P. 316–342.

#### REFERENCES

1. Chemtob, C., Assimacopoulos, T., & Chaumeil, J. C. (1988). Preparation and characteristics of gelatin microspheres. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 14(10), 1359-1374.
2. Jeyanthi, R., & Rao, K. P. (1987). Preparation of gelatin microspheres of bleomycin. *International Journal of Pharmaceutics*, 35(1-2), 177-179.
3. Tran, T. H., Ramasamy, T., Poudel, B. K., Marasini, N., Moon, D. K., Choi, H. J., & ... Kim, J. O. (2014). Preparation and characterization of spray-dried gelatin microspheres encapsulating ganciclovir. *Macromolecular research*, 22(2), 124-130.
4. Sun, R., Shi, J., Guo, Y., & Chen, L. (2009). Studies on the particle size control of gelatin microspheres. *Frontiers of Chemistry in China*, 4(2), 222-228.
5. Katti, D., & Krishnamurti, N. (1999). Preparation of albumin microspheres by an improved process. *Journal of Microencapsul*, 16(2), 232-242.
6. Kramer, P. A. (1974). Albumin microspheres as vehicles for achieving specificity in drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63, 1646-1647.
7. Stenekes, R. J., Franssen, O., van Bommel, E. M., Crommelin, D. J., & Hennink, W. E. (1998). The preparation of dextran microspheres in an all-aqueous system: effect of the formulation parameters on particle characteristics. *Pharmaceutical Research*, 15(4), 557-561.
8. Paques, J. P., van der Linden, E., van Rijn, C. J., & Sagis, L. M. (2014). Preparation methods of alginate nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 209, 163-171.
9. Prusse, U., Bilancetti, L., Bučko, M., Bugarski, B., Bukowski, J., Gemeiner, P., & ... Vorlop, KD. (2008). Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chemical Papers*, 62(4), 364-374.
10. Poncellet, D., Neufeld, R. J., Goosen, M. F. A., Burgarski, B., & Babak, V. (1999). Formation of microgel beads by electric dispersion of polymer solutions. *AIChE Journal*, 45(9), 2018-2023.
11. Bugarski, B., Li, Q., Goosen, M. F. A., Poncellet, D., Neufeld, R. J., & Vunjak, G. (1994). Electrostatic droplet generation: mechanism of polymer droplet formation. *AIChE Journal*, (40), 1026–1032.
12. Manojlovic, V., Rajic, N., Djonlagic, J., Obradovic, B., Nedovic, V., & Bugarski, B. (2008). Application of electrostatic extrusion - flavour encapsulation and controlled release. *Sensors (Basel)*, 8(3), 1488-1496.
13. Keshavarz, T., Ramsden, G., Phillips, P., Mussenden, P., & Bucke, C. (1992). Application of electric field for production of immobilized biocatalysts. *Biotechnology Techniques*, 6, 445–450.



14. Manojlovic, V., Djonlagic, J., Obradovic, B., Nedovic, V., & Bugarski, B. (2006). Immobilization of cells by electrostatic droplet generation: a model system for potential application in medicine. *International Journal of nanomedicine*, 1(2), 163-172.
15. Singh, M. N., Hemant, K. S., Ram, M., & Shivakumar, H. G. (2010). Microencapsulation: a promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 65-77.
16. Zhang, J., Li, X., Zhang, D., & Xiu, D. (2007). Theoretical and experimental investigations on the size of alginate microspheres prepared by dropping and spraying. *Journal of Microencapsul*, 24(4), 303-322.
17. Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106-126.
18. Smidsrod, O., & Skjak-Bræk, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8(3), 71-78.
19. Remminghorst, U., & Rehm, B. H. A. (2006). Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnology Letters*, 28(21), 1701-1712.
20. Mørch, Å. A., Donati, I., Strand, B. L., & Skja, G. (2006). Effect of Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> and Sr<sup>2+</sup> on alginate microbeads. *Biomacromolecules*, 7(5), 1471-1480.
21. Li, L., Fang, Y., Vreeker, R., Appelqvist, I., & Mendes, E. (2007). Reexamining the egg-box model in calcium - alginate gels with X-ray diffraction. *Biomacromolecules*, 8(2), 464-468.
22. Sachan, K. N., Pushkar, S., Jha, A., & Bhattcharya, A. (2009). Sodium alginate: the wonder polymer for controlled drug delivery. *Journal of Pharmacy Research*, 2(8), 1191-1199.
23. David, B., Barbe, L., Barthès-Biesel, D., & Legallais, C. (2006). Mechanical properties of alginate beads hosting hepatocytes in a fluidized bed bioreactor. *The International journal of Artificial Organs*, 29(8), 756-763.
24. Strand, B. L., Morsch, Y. A., & Skjak-Braek, G. (2000). Alginate as immobilization matrix for cells. *Minerva Biotechnologica*, 12(4), 223-233.
25. Arshady R. (1990). Biodegradable microcapsular drug delivery system. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 5, 316-342.

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2018-39-07>

### ПАМ'ЯТІ ПРОФЕСОРА ЮРІЯ ПАВЛОВИЧА БЛАГОГО



24 квітня 2018 р. на 89 році пішов з життя Юрій Павлович Благою (д. н. 29.07.1929) – відомий фізик-експериментатор, доктор фізико-математичних наук, професор, який зробив великий внесок у розвиток молекулярної біофізики в Україні.

Юрій Павлович розпочав свою науково-педагогічну діяльність на фізичному факультеті Харківського державного університету після його закінчення у 1952 р., де він читав курс лекцій «Фізика рідкого стану», у 1960 р захистив кандидатську дисертацію та у 1975-1980 рр. займав посаду завідувача кафедри експериментальної фізики (за сумісництвом). Його подальша наукова доля була безперервно пов'язана з Фізико-технічним інститутом низьких температур НАН України з

перших днів заснування закладу в 1960 році. Почавши з посади головного інженера лабораторії, у 1962 р. він досяг рівня керівника фізичного відділу. У цей період Юрій Павлович займався вивченням фізичних властивостей криогенних рідин і в 1971 році захистив докторську дисертацію за темою «Дослідження термодинамічних властивостей скраплених газів та їх розчинів». У 1970 році Юрій Павлович перейшов до нової перспективної тематики – молекулярної біофізики нуклеїнових кислот, включаючи фізику біомолекул за умов низьких температур. В період з 1972 р. до початку 2000 р. він очолював відділ молекулярної біофізики, а з 2000 року працював головним науковим співробітником ФТІНТ ім. Б. І. Веркіна НАН України. У 1974 р. отримав наукове звання професора.

Підтримуючи зв'язок між фундаментальною наукою та вищою освітою, Юрій Павлович за сумісництвом працював завідувачем кафедри молекулярної та прикладної біофізики (1980-1985 рр.) і далі професором кафедри біологічної і медичної фізики Харківського національного університету. Він став одним із засновників потужної школи молекулярної біофізики у Харкові та вніс вагомий вклад у становлення декількох поколінь молодих науковців у цій галузі. Його курси лекцій з фізики біополімерів прослухали близько 600 студентів з більш ніж 20 країн світу. Серед його учнів – понад 20 кандидатів та 2 доктори наук, які активно працюють як в наукових організаціях України, так і в провідних світових лабораторіях.

Широке коло наукових інтересів Юрія Павловича включало різні аспекти молекулярної фізики та біофізики: структурні та спектральні характеристики нуклеїнових кислот та їх компонентів у розчинах та низькотемпературних матрицях, міжмолекулярні взаємодії біомолекул, кооперативні процеси, конформаційні й фазові переходи в біополімерах та їх комплексах з біологічно активними сполуками (барвниками, лікарськими речовинами, іонами металів), застосування криогенних методів криоподрібнення та сублимаційної сушки фармацевтичної сировини. Під керівництвом Юрія Павловича було створено комплекс апаратури для біофізичних досліджень, включаючи низькотемпературні, та виконувалися роботи за темами фундаментальних досліджень, прикладних проектів у рамках державних науково-технічних програм та господарчо-договірних тем, низки міжнародних грантів.

Результати цих досліджень опубліковано майже в 300 статтях у престижних наукових виданнях, оглядах [1] і монографіях «Металокомплекси нуклеїнових кислот у розчинах», 1991 р. [2], та «Фізичні принципи молекулярної організації і структурної динаміки біополімерів», 2012 р [3]. Міжнародне визнання наукових досягнень Юрія Павловича відбилося у присвоєнні йому звання Соросовського професора та участі в низці міжнародних наукових проєктів.

У 2008 році Юрій Павлович, у складі колективу колег, отримав Державну премію України в галузі науки і техніки за цикл робіт «Фундаментальні фізичні властивості біополімерів, що визначають їх функціонування».

Впродовж багатьох років Юрій Павлович був заступником голови спеціалізованої вченої ради Харківського університету з захисту докторських та кандидатських дисертацій за спеціальністю 03.00.02 – «Біофізика», де, завдяки опонуванню кваліфікаційних робіт, він дав путівку у велику науку багатьом українським біофізікам. Юрій Павлович входив до складу редакційної колегії наукового фахового видання «Біофізичний вісник» а також журналу «Проблеми кріобіології» (до 1991 – «Кріобіологія»), був організатором низки шкіл з фізики нуклеїнових кислот та співорганізатором конференцій по спектроскопії біополімерів і застосуванню мас-спектрометрії в біології та медицині. Він є одним з засновників Українського біофізичного товариства (УБФТ) та ініціаторів проведення з'їздів УБФТ.

Колеги та учні Юрія Павловича запам'ятають його як талановитого та ерудованого науковця, мудрого керівника та педагога, людину великої доброти і справжнього благородства.

[1] Благой Ю.П., Шеина Г.Г., Иванов А.Ю. и др. Низкотемпературные экспериментальные исследования в молекулярной биофизике (обзор) // Физика низких температур. 1999. Т. 25 (10). С. 1003-1020.

[2] Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах / [Ю. П. Благой, В. Л. Галкин, Г. О. Гладченко и др.]: отв. ред. Малеев В.Я. Киев : Наук. думка, 1991. 272 с. ISBN 5-12-002499-0

[3] Фізичні принципи молекулярної організації і структурної динаміки біополімерів : монографія / [Ю. П. Благой, О. Н. Веселков, С. Н. Волков, та ін.]: за ред. Малєєва В. Я. Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2012. 352 с. ISBN 978-966-623-906-1

*В.О. Карачевцев, М.В. Косевич, Н.М. Жигалова*

## 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, 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.) наводиться двічі. Перший раз розміщується за основним текстом статті, виділяється як розділ **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**, який оформлюється за вимогами ДСТУ ГОСТ 8302:2015. Другий раз список літератури наводиться англійською мовою, розміщується після першого, виділяється як розділ **REFERENCES** і оформлюється згідно з міжнародним стилем оформлення списку наукових публікацій APA. Приклади оформлення бібліографічних посилань можна подивитись на сайті журналу у розділі «Керівництва для авторів»: <http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/about/submissions#authorGuidelines>.

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

## 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 twice. The first one should be given at the end of the manuscript as a separate section **REFERENCES**, formatted according to the Ukrainian DSTU GOST 8302:2015 style. The second list of references is given in English. It should be placed after the first one, entitled as **REFERENCES**, and formatted according to the APA style for scientific publications.

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

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

Наукове видання

“Біофізичний вісник”

Вип. 39(1)

Збірник наукових праць

Укр., рос. та англ. мовами.

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

Підписано до друку 01.06.2018. Формат 60×84 1/8.  
Папір офсетний. Друк ризографічний.  
Ум. друк. арк. 6,91. Обл.-вид. арк. 8,04. Наклад 100 пр.

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

---

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