

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ФОРМИРОВАНИЯ ФОСФОЛИПИДНЫХ ВЕЗИКУЛЯРНЫХ НАНОСТРУКТУР

Л.Ю. Авдеева*, А.Ю. Чунихин**

*Институт технической теплофизики НАН Украины,
Украина, 03057, г. Киев, ул. Желябова, 2а
E-mail: avdeeva22@ukr.net

**Институт биохимии имени А.В. Палладина,
Украина, 01030, г. Киев, ул. Леонтовича 9
E-mail: alchun@ukr.net

Приведены результаты математического моделирования процесса формирования везикулярных структур из фосфолипидов под воздействием механизмов дискретно-импульсного введения энергии. Для моделирования была использована гибридная функциональная сеть Петри, позволяющая объединить в математической модели исходные условия проведения процесса (температуру, концентрацию материала и т. п.) и характеристики технологического оборудования (типа ДИВЭ-активатора, частоты обращения ротору и др.).

дискретно-импульсный ввод энергии, диспергирование, липидные везикулярные наноструктуры, математическое моделирование, гибридные функциональные сети Петри

Развитие науки все больше базируется на закономерностях, присущих объектам наноуровня. Создание энергосберегающих технологий производства материалов с применением наноструктур является одним из приоритетных направлений научных разработок и отвечает требованиям современного промышленного производства [1–3].

Везикулярные наноструктуры, которые в жидкокристаллическом состоянии образуют фосфолипиды, представляют значительный интерес для изучения и использования благодаря их уникальным свойствам, а именно возможности солюбелизации и транспортирования непосредственно в биологическую клетку веществ различной природы. Оболочка везикулы защищает активное действующее вещество от влияния отрицательных внешних факторов и способствует его транспортированию, что значительно увеличивает положительный эффект от ее применения [3–9].

В настоящее время для получения везикулярных структур из фосфолипидов используются такие методы, как ультразвуковая обработка, методы инъекции, экструзии и т. д. Несмотря на их эффективность, эти методы характеризуются значительными затратами энергии и невысокой производительностью. Вследствие этого, применение фосфолипидных наноструктур ограничивается их использованием в фундаментальных исследованиях, а также медицинской и фармацевтической промышленности. Повышенный интерес к потенциальным возможностям использования

фосфолипидных везикул и расширения спектра их применения требует разработки промышленного способа их получения [10, 11].

Решение проблемы снижения энергоемкости и повышения производительности процессов при создании промышленной технологии производства липидных наноструктур возможно за счет использования механизмов дискретно-импульсного введения энергии (ДИВЭ), которые обеспечивают высокий уровень интенсификации массообменных и гидромеханических процессов при минимальных непроизводительных затратах энергии и сохранении высокого качества материала. Принцип ДИВЭ определяет пути прямого преобразования непрерывно вводимой в аппарат энергии в кратковременные импульсы высокой мощности, дискретно распределенные в рабочем объеме. Практическая реализация идеологии ДИВЭ предусматривает инициирование в рабочем объеме аппарата при обработке дисперсной системы таких явлений, как взрывное вскипание, гидродинамическая, акустическая и паровая кавитации, а также целенаправленное использование сопутствующих этим явлениям мощных динамических эффектов: высокочастотных осцилляций, сферических ударных волн, кумулятивных микроструй и др. [12-15].

Нами была исследована и доказана возможность управления механизмом образования везикул из фосфолипидов в условиях диссипативного состояния гетерогенной системы за счет применения ДИВЭ. Использование этой научной концепции позволило значительно интенсифицировать процесс формирования липидных наноструктур, получить стабильные при хранении везикулы заданного размера с высоким процентом захвата биологически активных веществ и разработать промышленную технологию их получения [10, 11].

Определение количественных показателей липидных везикул (размера и внутреннего объема) в зависимости от условий их формирования во всем диапазоне вариативности параметров технологического процесса было проведено с помощью математического моделирования. Его использование позволяет учесть большое количество физических факторов и обеспечивает прогнозирование поведения дисперсной системы в широком интервале режимных параметров.

В качестве средства моделирования механизма формирования везикулярных фосфолипидных наноструктур была выбрана программная среда Cell Illustrator v.3 (Human Genome Center, University of Tokyo, Japan), в которой базовым аппаратом являются гибридные функциональные сети Петри [16, 17]. Преимуществами гибридных функциональных сетей Петри как средств моделирования являются:

- возможность структурного отображения состояний системы, которая моделируется, и процессов, которые происходят в системе;
- возможность количественного моделирования состояний и процессов трех видов одновременно: дискретного, непрерывного и ассоциативного (образующего);
- возможность учета активирующего, ингибирующего и каталитического эффектов с помощью связей специального типа.

Сети Петри – математическая абстракция для представления дискретных и непрерывных распределенных систем. Графически представляется в виде двухдольного ориентированного мультиграфа с маркерами (маркированный ориентированный граф), который имеет два типа вершин: позиции P и переходы

T. Позиции могут быть пустыми или маркированными и определяют состояние сети, тогда как переходы показывают действие.

Процесс функционирования сети Петри состоит в последовательном выполнении переходов и соответствующем перечислении количества "ресурса" в позициях (рис.1).

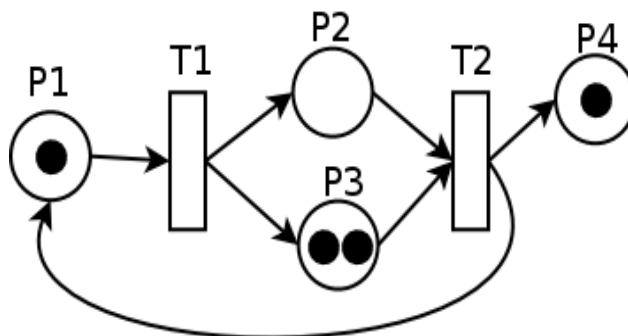


Рис. 1. Графическое изображение сетей Петри
Fig. 1. Graphic representation of Petri nets

Моделирование механизма формирования и самоорганизации везикулярных фосфолипидных наноструктур под воздействием явлений и эффектов ДИВЭ имеет целью системное объединение в математической модели как исходных технологических параметров материала (температуры, концентрации и т. п.), так и характеристик используемого оборудования (типа ДИВЭ-активатора, частоты вращения ротора и др.). На основе результатов экспериментальных исследований среднего диаметра липидных везикул от условий и режимов проведения технологического процесса их получения были получены частичные функциональные зависимости. В качестве аппроксимирующих функций были использованы полиномы от второй до пятой степеней.

Аппроксимирующие зависимости среднего диаметра (D_{cp}) от температуры (t) и концентрации (c) при разных угловых скоростях вращения ротора (ω) представлены в формулах (1)-(3):

при $\omega = 3\ 000$ об/мин = 314 рад/с:

$$D_{cp} = (67 \cdot 10^{-4} \cdot t^2 - 0,895t + 33,536) \cdot c^2 - (0,04t^2 - 5,865t + 241,59) \cdot c - 8,2877t + 1018 \quad (1)$$

при $\omega = 4\ 500$ об/мин = 472 рад/с:

$$D_{cp} = (4 \cdot 10^{-5} \cdot t^3 - 53 \cdot 10^{-4} t^2 - 0,2074t + 5,5137)c^2 - (5 \cdot 10^{-4} t^3 - 0,0729t^2 + 3,1084t + 49,963)c + (18 \cdot 10^{-4} t - 0,2547t^2 + 9,4619t + 392,96); \quad (2)$$

при $\omega = 6\ 000$ об/мин = 628 рад/с:

$$D_{cp} = (4 \cdot 10^{-5} \cdot t^3 - 84 \cdot 10^{-4} t^2 - 0,5627t - 6,8177)c^2 - (6 \cdot 10^{-4} t^3 - 0,1034t^2 + 6,7957t - 81,854)c + (3 \cdot 10^{-4} t - 0,057t^2 + 3,470t + 349,81). \quad (3)$$

Результаты исследований частичных функциональных зависимостей среднего диаметра липидных везикул от параметров технологического процесса позволили параметризовать сеть Петри. С ее помощью была построена графо-аналитическая модель, которая позволяет рассчитывать средний диаметр липидных наноструктур, полученных в результате обработки липидной суспензии в зависимости от заданных компоновки и характеристик рабочих органов, скорости вращения ротора ДИВЭ-активатора, концентрации и температуры исходного материала (рис. 2). Так, зависимостями (1)-(3) были параметризованы переходы p1-p3 соответственно, что позволило получить численное значение среднего диаметра липидных везикул «GDDave» в позиции m5.

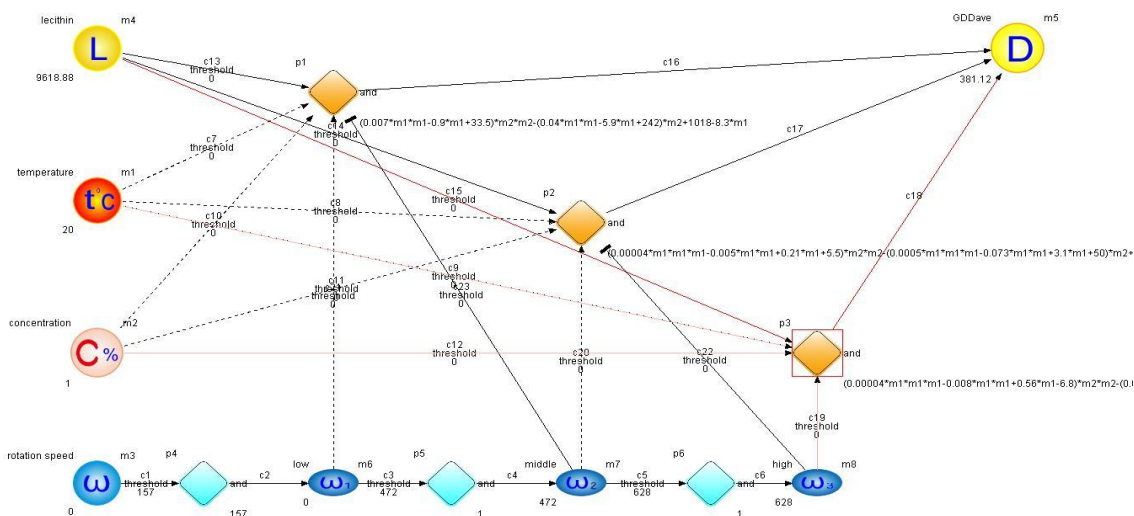


Рис. 2. Графоаналитическая модель расчета среднего диаметра липидных везикул с помощью сетей Петри при $C_M - 1\%$; $t - 20^\circ\text{C}$; $\omega - 628$ рад/с

Fig. 2. Graphanalytical model of calculation of the average diameter of lipid vesicles with Petri nets in $D - 1\%$; $t - 20^\circ\text{C}$; $\omega - 628$ rad / s

Так, при обработке методом ДИВЭ липидной суспензии с 1 %-ной концентрацией фосфолипидов при температуре 20°C и угловой скорости вращения ротора 628 рад/с по разработанному способу (без предыдущей подготовки) [10, 11], расчетное значение среднего диаметра составляет 381,12 нм (по экспериментальным данным ... 382 нм) (рис. 2).

В таблице приведены примеры расчета диаметра фосфолипидных везикул по результатам исследований, полученных экспериментальным (D_e) и аналитическим путем (D_m), с помощью сетей Петри, при температуре $t = 42 \pm 2^\circ\text{C}$, концентрации материала (C_m) от 0,5 до 10 % и угловых скоростях ротора (ω) 314, 472 или 628 рад/с. Абсолютная ошибка моделирования рассчитывалась по формуле: $\Delta = |D_m - D_e|$, нм, а относительная – по: $\delta = (\Delta/D_e) \cdot 100, \%$.

Таким образом, предложенная аналитическая модель на основе среды моделирования "Гибридные функциональные сети Петри" позволяет рассчитывать значение среднего диаметра липидных везикул в зависимости от широкого диапазона параметров технологического процесса обработки –

температуры (от 20 до 80 °С), концентрации материала (от 0,5 до 10 %), при значениях угловой скорости ротора 314, 472 или 628 рад/с.

Таблица. Значения диаметра фосфолипидных везикул, полученные экспериментальным и аналитическим путем, с помощью сетей Петри
Table. The diameter of the phospholipid vesicles obtained experimentally and analytically, by using Petri nets

| t °С | ω, рад/с | C _м , % | D _м , nm | D _е , nm | Δ, nm | δ, % |
|------|----------|--------------------|---------------------|---------------------|-------|------|
| 42 | 314 | 0,5 | 603 | 575 | 28 | 4,87 |
| | | 2,5 | 517 | 496 | 21 | 4,23 |
| | | 5 | 427 | 441 | 14 | 3,17 |
| | | 10 | 722 | 689 | 33 | 4,79 |
| | 472 | 0,5 | 456 | 441 | 15 | 3,40 |
| | | 2,5 | 301 | 302 | 1 | 0,33 |
| | | 5 | 226 | 225 | 1 | 0,44 |
| | | 10 | 369 | 350 | 19 | 5,43 |
| | 628 | 0,5 | 386 | 380 | 6 | 1,58 |
| | | 2,5 | 299 | 314 | 15 | 4,78 |
| | | 5 | 234 | 245 | 11 | 4,49 |
| | | 10 | 312 | 330 | 18 | 5,45 |

Средняя относительная погрешность моделирования по всем режимам и условиям составляет приблизительно 4,3 %.

Эффективность включения (X_{ls}) – один из важнейших показателей липидных везикулярных препаратов, который характеризует количество вещества, ассоциирующееся в середине везикулы. Этот показатель можно рассчитать по формуле [18]:

$$X_{ls} = \frac{C \cdot (D - h)^3 \cdot N_A \cdot S \cdot 10^{-27}}{(D^2 + (D - h)^2) \cdot Mr \cdot 6}, \quad (4)$$

где C – концентрация фосфолипидов, мг/мл; D – диаметр везикулы, А; h – толщина монослоя, А; N_A – число Авогадро; S – площадь молекулы фосфолипидов в монослое, А²; Mr – молярная масса фосфолипидов.

Задав стандартные для липидной везикулы исходные данные: h = 40, А = 4 нм, S = 60 А², Mr = 1000 г/моль и концентрацию липидов в процентах (после несложных превращений), получим выражение зависимости эффективности включения от диаметра везикулы в нанометрах (D_{nm}) и концентрации липидов (C_%):

$$X_{ls} = \frac{6 \cdot 10^{-4} \cdot (D_{nm} - 4)^3}{D_{nm}^2 + (D_{nm} - 4)^2}. \quad (5)$$

Вместе с тем существует теоретическая граница эффективности включения, которая обусловлена соотношением внутреннего объема везикулы и ее полного объема, при заданных диаметре и толщине липидного бислоя. Считая

липидную везикулу идеальным шаром с диаметром D и внутренней полостью диаметром $(D - 2h)$, несложно найти предельную эффективность включения X_t :

$$X_t = \left(1 - \frac{2h}{D}\right)^3. \quad (6)$$

Следует указать, что границы применения зависимостей (4) и (5) полностью определяются выражением (6), поэтому для везикул диаметром больше чем 200 нм при средних и высоких концентрациях фосфолипидов необходимо сравнивать расчетные значения эффективности включения с теоретической границей. Также при рассмотрении однослойных везикул целесообразно ограничить диаметр значением в 600 нм.

Разработанная математическая модель была дополнена зависимостями, которые позволяют рассчитать показатель эффективности включения. Для этого к существующей структуре были добавлены определенные позиции и переходы (рис. 3).

Так, зависимостями (5) и (6) были параметризованы переходы $p9$ и $p8$ соответственно, что позволяет получать расчетные значения эффективности включения в позиции $m10$ ("Lp") и предельную эффективность включения в позиции $m9$ ("Bnd"). Конечное значение эффективности включения веществ в везикулы в позиции $m11$ ("ELp") определяем как минимальное значение между рассчитанным и предельным значениями эффективности включения. Автоматический выбор минимального значения обеспечивается установленными соответствующими порогами между позициями $m9$, $m10$ и переходами $p10$, $p11$.

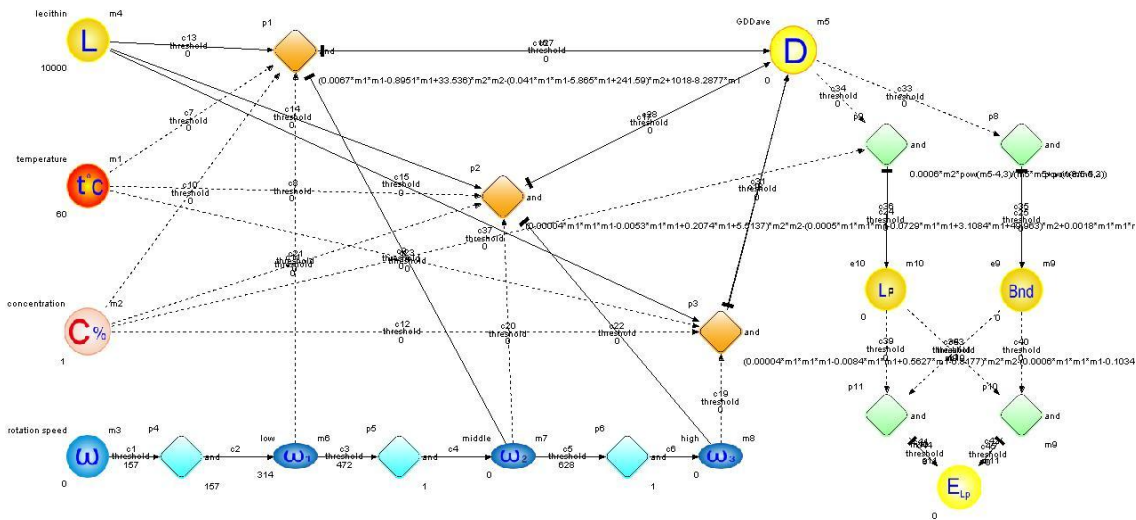


Рис. 3. Расчет среднего диаметра липидных везикул и эффективности включения полярных веществ при помощи сетей Петри при $C_M - 1\%$; $t - 60\text{ }^\circ\text{C}$; $\omega - 628\text{ рад/с}$
 Fig. 3. The calculation of the average diameter of the lipid vesicles and the effective integration of polar substances by using Petri nets in $D - 1\%$; $t - 60\text{ }^\circ\text{C}$; $\omega - 628\text{ рад / с}$

Работа сетей Петри теперь состоит из двух этапов. На первом вычисляются значения среднего диаметра везикул "GDDave" в зависимости от

угловой скорости вращения ротора ДИВЭ-активатора, температуры и концентрации исходного материала. На втором – на основе среднего диаметра везикул и концентрации липидов – значения эффективности включения веществ в везикулы ("ELp").

Полученные результаты хорошо коррелируют с результатами экспериментальных исследований.

ВЫВОДЫ

Математическая модель, созданная с помощью гибридных функциональных сетей Петри, позволяет определить особенности процесса формирования везикулярных фосфолипидных наноструктур под влиянием эффектов ДИВЭ и получить значение среднего диаметра везикул и эффективности включения в широком диапазоне параметров технологического процесса без дополнительных затрат на получение везикул и экспериментальное измерение их размера с помощью сложных технических средств. Преимуществом предложенного подхода является возможность получения значений среднего диаметра липидных везикул не только в "узлах" табличных значений, но во всем диапазоне вариативности параметров технологического процесса.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Кобаяси, Н. Введение в нанотехнологию / Н. Кобаяси: пер. с японск.–М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. –134 с.
2. Уайтсайдс, Дж. Нанотехнология в ближайшем десятилетии. Прогноз направления исследований / Дж. Уайтсайдс, Д. Эйглер, Р. Андерс и др. / под ред. М.К. Роко, Р.С. Уильямса и П. Аливисатоса.– М.: Мир, 2002. – 292 с.
3. Geckeler, Kurt E. Advanced Nanomaterials / Geckeler Kurt, E. Nishide Hiroyuki. – Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010. – 906 p.
4. Eliaz, N. Applications of Electrochemistry and Nanotechnology in Biology and Medicine I. – New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2011. – 425 p.
5. Елисеев, А.А. Функциональные наноматериалы / А.А. Елисеев, А.В. Лукашин. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2010. – 456 с.
6. Геннис, Р.Б. Биомембраны. Молекулярная структура и функции: пер. с англ. / Р.Б. Геннис. – М., 1997. – 624 с.
7. Gregoriadis, G. Liposome Technology. Entrapment of Drugs and Other Materials into Liposomes. – Informa Healthcare: New York, USA, 2007. – 399 p.
8. Woodle, M.C. Sterically stabilized liposome therapeutics // Advanced Drug Delivery Reviews. – № 16. – 1995. – P. 249 – 265.
9. Pereira-Lachataignerais, J., Pons, R., Panizza, P., Courbin, L., Rouch, J., L'opez, O. Study and formation of vesicle systems with low polydispersity index by ultrasound method // Chemistry and Physics of Lipids, 2006. – № 140. – P. 88 – 97.
10. Авдеева, Л.Ю. Применение гидродинамической кавитации в технологическом процессе получения фосфолипидных наноструктур / Л.Ю. Авдеева, Г.К. Иваницкий // Современная наука: исследования, идеи, результаты, технологии.– 2011.– № 2 (7). – С. 59 – 65.

11. Авдеева, Л.Ю. Энергоэффективная технология получения фосфолипидных наноструктур / Л.Ю. Авдеева // Промислова теплотехніка. – 2011. – Т. 33.– № 8. – С. 139–143.
12. Долинский, А.А. Тепломассообмен и гидродинамика в парожидкостных дисперсных средах / А.А. Долинский, Г.К. Иваницкий.- Київ: Наукова думка, 2008. – 382 с.
13. Дискретно-импульсный ввод энергии в теплотехнологиях / А.А. Долинский [и др.]. – Київ: Наукова думка, 1996. – 208 с.
14. Долинский, А.А. Наномасштабные эффекты при дискретно-импульсной трансформации энергии / А.А. Долинский, Б.И. Басок // Инженерно-физический журнал.– 2005. –Т. 78. – № 1. –С.15–22.
15. Промтов, М.А. Перспективы применения кавитационных технологий для интенсификации химико-технологических процессов / М.А. Промтов // Вестник ТГТУ. – 2008. – Т. 14. – № 4.– С. 861–869.
16. Nagasaki, M. et al. Foundations of Systems Biology. Using Cell Illustrator and Pathway Databases. – Springer, 2007. – 166 p.
17. Koch, I., Reisig, W., Schreiber, F. (eds.) Modeling in Systems Biology. The Petri Net Approach. – Springer, 2011. – 388 p.
18. Стефанов, А.В. Биохимические основы использования липосом в качестве переносчиков биологически активных веществ: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня док. биол. наук / А.В. Стефанов.– Київ, 1987. – 40 с.

MODELING OF PHOSPHOLIPID VESICULAR NANOSTRUCTURE FORMATION PROCESS

L.Yu. Avdieieva , A. Yu. Chunikhin

This paper presents the results of mathematical modeling of the formation of vesicular structures from phospholipids under influence of mechanisms of discrete pulsed introduction of energy. The hybrid functional Petri net was used in the modeling process. It allows to combine the original conditions of the process (temperature, concentration of material, etc.) and features of the processing equipment (such as DIVE-activator rotor revolution frequency, etc.) in the mathematical model.

discrete-input pulse energy, dispersion, lipid vesicle nanostructure, mathematical modeling, hybrid functional Petri net