

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Свотин Артём Александрович

**Разработка способов получения и анализ свойств композиций
дигидрокверцетина и L-лизина**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
кандидат фармацевтических наук
Терехов Роман Петрович

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ БИОДОСТУПНОСТИ ФЛАВОНОИДОВ (обзор литературы)	16
1.1. Описание литературного ландшафта и отбор публикаций	19
1.2. Биофармацевтические параметры	25
1.2.1. Растворимость	25
1.2.2. Проницаемость	32
1.2.3. Биодоступность <i>in vivo</i>	36
1.3. Выводы по главе 1	39
ГЛАВА 2. ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ МОДИФИКАЦИЙ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА И L-ЛИЗИНА	40
2.1. Продукт сухого гриндинга	40
2.2. Пленки	41
2.3. Лиофилизаты	43
2.4. Выводы по главе 2	44
ГЛАВА 3. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОДИФИКАЦИЙ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА И L-ЛИЗИНА	46
3.1. Макро- и микроскопическая структура	47
3.1.1. Органолептическое описание	47
3.1.2. Микроскопическая морфология	48
3.2. Строение твердой фазы	51
3.2.1. Фазовое состояние	51
3.2.2. Термические фазовые переходы	53
3.3. Спектральный анализ	56
3.3.1. Хромофорная система	56
3.3.2. Функциональный анализ	58
3.3.3. Молекулярная структура	61
3.4. Количественный анализ примеси тяжелых металлов	63

3.5. Выводы по главе 3	64
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК	
КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА	65
4.1. Экспресс-анализ дигидрохверцетина методом УФ-спектрофотометрии	65
4.2. Одновременный анализ компонентов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с предколоночной дериватизацией	67
4.2.1. Хроматографическое определение без дериватизации	68
4.2.2. Дериватизация нингидриновым реагентом	72
4.2.3. Дериватизация бензиловым спиртом	75
4.2.4. Дериватизация <i>o</i> -фталевым альдегидом	77
4.3. Анализ дигидрохверцетина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии	83
4.4. Выводы по главе 4	86
ГЛАВА 5. БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ	
ИССЛЕДОВАНИЯ МОДИФИКАЦИЙ ДИГИДРОХВЕРЦЕТИНА	87
5.1. <i>In vitro</i> тест «Растворение»	87
5.2. Диффузия <i>in vitro</i>	89
5.3. Цитотоксичность <i>ex vivo</i>	91
5.3.1. Восстанавливающая способность	92
5.3.2. Цитотоксичность	94
5.4. Ранозаживляющая активность <i>in vivo</i>	97
5.4.1. Общепфизиологические параметры животных	98
5.4.2. Динамика площади ожога	100
5.4.3. Гистологический анализ	102
5.4.4. Полуколичественная гистологическая оценка	105
5.4.5. Терапевтическая активность	106
5.5. Выводы по главе 5	108
ГЛАВА 6. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	110
6.1. Материалы	110
6.1.1. Объекты исследования	110

6.1.2. Реактивы, стандартные образцы, растворители.....	111
6.2. Оборудование.....	113
6.3. Методология теоретического исследования.....	116
6.4. Методы морфологического анализа.....	116
6.4.1. Органолептическое описание.....	116
6.4.2. Сканирующая электронная микроскопия.....	116
6.5. Методы физико-химического анализа.....	117
6.5.1. Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях.....	117
6.5.2. Спектроскопия в инфракрасной области.....	117
6.5.3. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса.....	118
6.5.4. Рентгеновская порошковая дифракция.....	118
6.5.5. Дифференциальная сканирующая калориметрия.....	118
6.5.6. Термогравиметрический анализ.....	119
6.5.7. Растворимость.....	119
6.5.8. Определение количественного содержания тяжелых металлов.....	120
6.6. Методы количественного анализа.....	121
6.6.1. Методика количественного экспресс-анализа.....	121
6.6.2. Методика одновременного количественного определения компонентов композиции.....	122
6.6.3. Методика количественного анализа дигидрокверцетина.....	124
6.7. Методы биофармацевтического и биологического анализа.....	125
6.7.1. Тест растворения <i>in vitro</i>	125
6.7.2. Диффузия.....	125
6.7.3. ССК-8 эксперимент.....	126
6.7.4. Ранозаживляющая активность.....	129
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	134
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	135
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	137
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	138
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	139

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	142
Приложение А. Патент Российской Федерации	162
Приложение Б. Акт внедрения (Сеченовский университет)	163
Приложение В. Акт внедрения (ООО «Робиос»)	164
Приложение Г. Проект спецификации на ДКВ/ЛИЗ _г	165
Приложение Д. Выписка из протокола заседания ЛЭК	167

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В соответствии с распоряжением Правительства Российской Федерации № 1495-р от 7 июня 2023 г. «Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года», требуется обеспечить решение задач по формированию устойчивого социально-экономического развития страны, одной из которых является: «разработка, внедрение и применение лекарственных средств для медицинского применения, в том числе новых». Возможный источник для создания инновационных препаратов может быть представлен соединениями природного происхождения, для которых ранее установлены выраженные биологические эффекты.

Дигидрокверцетин (ДКВ) – флавоноид, зарегистрированный в Российской Федерации в качестве фармацевтической субстанции (ФС-000388). За счет низкой растворимости в воде при комнатной температуре он характеризуется ограниченной биодоступностью. Однако это соединение представляет интерес как основа для новых фитопрепаратов противовоспалительного и ранозаживляющего действия.

Ранее на примере других флавоноидов было показано значительное увеличение растворимости и биодоступности путем получения кокристаллов или коаморфных систем, где в качестве коформеров использовали соединения различных классов органических соединений.

Таким образом, актуальность обусловлена возможностью повышения биодоступности ДКВ путем оптимизации его физико-химических характеристик за счет получения композиций с биологически активными веществами, что в дальнейшем позволит осуществить разработку лекарственных препаратов на их основе.

Степень разработанности темы исследования

Начало исследований по изучению ДКВ было положено в ИрИХ СО РАН под руководством Н.А. Тюкавкиной. В дальнейшем при тесном взаимодействии Сеченовского Университета (Н.А. Тюкавкина, Ю.А. Колесник, И.А. Селиванова), ФГБНУ «ВИЛАР» (В.А. Быков, В.К. Колхир, Т.А. Сокольская) и РНИМУ имени Н.И. Пирогова (Ю.О. Теселкин, И.В. Бабенкова) разработан антиоксидантный препарат «Диквертин». В настоящее время оцениваются перспективы использования ДКВ в составе комбинированных лекарственных препаратов (И.Р. Ильясов). В последние годы вопросы инженерии кристаллов и аспекты стереохимии данного флаванонола масштабно изучаются научной группой под руководством И.А. Селивановой.

Фундаментальные и прикладные моменты коаморфизации и кокристаллизации фармацевтических субстанций широко освещены в работах Н.А. Васильева из Института химии растворов РАН. Им были описаны кокристаллы и коаморфные структуры на основе флубендазола, интроконазола и ряда других соединений. Параллельно с его работами значимый вклад в изучение основополагающих аспектов в области кристаллов и кокристаллов внесла Е.В. Болдырева, занимающаяся изучением особенностей влияния физических параметров на структуру и свойства получаемых продуктов.

Зарубежные ученые уделяют большое внимание фундаментальным вопросам кокристаллизации и коаморфизации по изучению причин изменения физико-химических свойств в результате получения подобных структур. Так, в работах D.D. Bavishi и С.Н. Borkhataria изменение растворимости данных объектов объясняется через феномены потока и парашюта. Помимо этого, в работе Y. Wand продемонстрировано, что с ростом энергии сольватации кристаллической решетки полученных кокристаллов их растворимость снижается. В качестве важного прикладного аспекта в работах F. Zhou

рассматривается возможность применения кокристаллизации для разделения рацемических смесей.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – научно-обоснованная оптимизация растворимости дигидрокверцетина путем фазовой модификации в композициях с L-лизином и установление показателей качества для стандартизации полученных объектов.

Задачи исследования:

1. Проанализировать современные тенденции в области оптимизации физико-химических параметров флавоноидов для установления наиболее перспективных подходов для увеличения их растворимости и биодоступности.
2. Получить композиции ДКВ с L-лизином в виде коаморфных или кокристаллических фазовых модификаций.
3. Определить показатели контроля качества путем изучения композиций комплексом современных физико-химических методов фармацевтического анализа.
4. Разработать и экспериментально обосновать оптимальные условия количественного анализа ДКВ и L-лизина в составе композиций.
5. Оценить растворимость композиций в воде и диффузионную подвижность в агаровом геле для ДКВ в составе фазовых модификаций.
6. Изучить цитотоксические, ранозаживляющие и противовоспалительные свойства синтезированных композиций в экспериментах *ex vivo* и *in vivo*.

Научная новизна

В результате проведенных исследований автором впервые:

- синтезирована стеклообразная фазовая модификация ДКВ с L-лизином, характеризующаяся улучшенной растворимостью в воде при комнатной температуре и диффузионной подвижностью в эксперименте *in vitro*, остающаяся стабильной при хранении в комнатных условиях в течение 9 месяцев;
- описана микроскопическая морфология аморфных монофазных систем на основе ДКВ с L-лизином;
- разработана методика на базе ВЭЖХ с УФ-детектированием для одновременного анализа ДКВ и L-лизина;
- установлено ингибирующее цитотоксичность субаддитивное взаимодействие ДКВ и L-лизина по отношению к клеткам кишечника (клеточная линия Сасо-2) в эксперименте *ex vivo*.

Научная новизна исследования подтверждена патентом Российской Федерации № 2841264 от 01 августа 2024 г.

Теоретическая и практическая значимость работы

Предложенные в работе методологические подходы к получению и описанию коаморфных субстанций характеризуются высокой степенью универсальности и могут быть адаптированы для других твердых аморфных бикомпонентных систем. Полученные данные расширяют знания о природе химического взаимодействия между флаванолом ДКВ и основной протеиногенной аминокислотой L-лизином.

Теоретическая значимость диссертационного исследования заключается в изучении химических преобразований, протекающих на фоне дериватизации L-лизина *о*-фталевым альдегидом в присутствии ДКВ и 3-меркаптопропионовой кислоты. Описанный в работе подход к пробоподготовке

образцов, содержащих смесь флавоноида и аминокислоты, может служить теоретической основой для разработки методик предколоночной дериватизации и других композиций данных групп биологически активных веществ.

Результатом проведенного исследования, обуславливающим его практическую значимость, стали разработанные и валидированные методики количественного определения ДКВ и L-лизина, с помощью которых была продемонстрирована повышенная начальная скорость растворения для полученных модификаций по сравнению с исходным флавоноидом. Предложенные методики качественного и количественного анализа компонентов коаморфных модификаций и продукта сухого гриндинга ДКВ с аминокислотой L-лизином могут использоваться в работе контрольно-аналитических лабораторий. В эксперименте *in vivo* проведено исследование ранозаживляющей активности продукта сухого гриндинга, для которого разработан проект спецификации.

Методология и методы исследования

В основе данной работы лежит трансляционная модель исследования, характеризующаяся ориентацией на практическое применение, междисциплинарность (объединение химических, биологических и фармацевтических подходов) и двунаправленность потоков знаний от фундаментальной науки к фармацевтической практике, а также обратной связью для уточнения и совершенствования методов. Исследование выполнено с применением современных и высокотехнологичных подходов, химическая структура полученных продуктов подтверждена с использованием арбитражных методов анализа. Основные этапы исследования выполнены в соответствии с положениями действующей на территории Российской Федерации нормативной документации: Государственной Фармакопеей XV издания (ГФ РФ XV), Фармакопеей ЕАЭС, Европейской конвенции по защите позвоночных животных,

используемых в экспериментальных и других научных целях (ETS N 123), ГОСТ №33215-2014 от 09 ноября 2015 г. «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» и ГОСТ №33216-2014 от 09 ноября 2015 г. «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами».

Положения, выносимые на защиту

- Способ получения продукта сухого гриндинга ДКВ с L-лизином, характеризующейся увеличенной растворимостью в воде при комнатной температуре.
- Способы получения двух коаморфных модификаций с улучшенной растворимостью ДКВ в воде: пленок путем сушки на полиэтиленовой подложке и мезопористого лиофилизата водного раствора.
- Результаты комплексного исследования коаморфных модификаций ДКВ с L-лизином, включающие физико-химическую характеристику, изучение биофармацевтических параметров *in vitro*, и описание цитотоксических свойств *ex vivo* и биологической активности *in vivo*.
- Методики качественного и количественного анализа компонентов коаморфных модификаций для рутинного и экспресс-анализа.
- Валидационные характеристики разработанных методик на базе УФ/вид-СФМ и ВЭЖХ.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность экспериментальных данных и сформулированных выводов базируется на систематическом анализе литературных источников, посвященных методам повышения растворимости и биодоступности флавоноидов, комплексном

использовании высокопрецизионных методов анализа, таких как УФ/вид-спектрофотометрия, ИК-спектроскопия, спектроскопия ЯМР ^1H , ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС/МС, термических методов исследования, выполненных на сертифицированном оборудовании и использованных в эксперименте по получению композиций ДКВ и L-лизина, получении многократно повторенных экспериментальных данных, обработанных методами математической статистики.

Основные результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на XXII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Федеральная территория Сириус, 2024); Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург; 2023, 2024); IX Всероссийской с международным участием конференции «Актуальные вопросы студенческой медицинской науки и образования» (Рязань; 2023); Международном молодежном научном медицинском форуме «Белые цветы» (Казань; 2023); Международной научно-практической конференции «Фармация. Вызовы времени» (Витебск; 2021); Международной научно-практической конференции «Современные тенденции развития фармацевтической науки и образования» (Шымкент; 2021); II Международном постерном соревновании «Innovative Ideas of Young Researchers» (Шымкент; 2023); XIX конгрессе «Разработка и регистрация лекарственных средств» (Москва, 2026).

Апробация диссертационной работы состоялась «5» марта 2026 г. на совместном заседании кафедр химии; фармацевтического естествознания; аналитической, физической и коллоидной химии; фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева и фармацевтической технологии Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). Протокол № 9 от 5 марта 2026 года.

Личный вклад автора

Автору диссертационного исследования принадлежит ведущая роль в планировании и проведении экспериментальных работ. Он лично осуществлял оптимизацию синтеза композиций ДКВ с L-лизином, получил и проанализировал результаты УФ/вид-спектрофотометрии и ИК-спектроскопии, разделил компоненты продукта сухого гриндинга флавоноида и аминокислоты, разработал и валидировал методику на основе ВЭЖХ, выполнил анализ данных спектроскопии ЯМР ^1H , масс-спектрометрии, РПД и термических методов анализа, доказав стабильный аморфный характер полученных пленок и лиофилизата. Испытания на клеточных (линии Caco-2, HUVES, 3T3, HEK293) и животных моделях (крысы линии Wistar) выполнены им лично. Автору принадлежит ведущая роль в подготовке текста диссертационной работы и научных публикаций.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (акт №703 от 08.07.2025) и используются в продвижении продуктов и медицинской стратегии ООО «Робиос» (акт б/н от 20.10.2025).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения, изложенные в диссертационной работе, соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пунктам 1, 2, 3 области исследования.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа выполнена в рамках плана и в соответствии с тематикой научно-исследовательской работы на кафедре химии ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по теме «Разработка подходов к анализу, стандартизации, оценке качества, и сертификации биологически активных соединений синтетического и природного происхождения, лекарственных препаратов, медицинских изделий (технологические и экологические аспекты)», номер государственной регистрации 01.200.118796.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 19 работ, в том числе 2 научные статьи в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 3 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed, 1 иная публикация по результатам исследования, 1 патент, 12 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 1 зарубежной конференции).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 167 страницах машинописного текста, содержит 18 таблиц (из них 1 в приложениях) и иллюстрирована 54 рисунками (из них 5 в

приложениях). Текст диссертации состоит из введения, обзора литературы, четырех глав, посвященных обсуждению результатов исследования, экспериментальной части, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложения. Библиография включает 215 источников, в том числе 195 – на иностранном языке.

ГЛАВА 1. СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ БИОДОСТУПНОСТИ ФЛАВОНОИДОВ (обзор литературы)

Флавоноиды – группа органических соединений, представляющих собой производные дифенилпропана. Эти природные полифенолы широко распространены в различных растительных источниках, таких как фрукты [77], овощи [27], ягоды [87], чай [113] и множество лекарственных растений [88, 89, 209]. Для них характерны разнообразные биологические эффекты, включая антигепатотоксическое [28], противоязвенное [172], противовоспалительное [90, 130], а также ранозаживляющее действие [91, 114, 212]. В последнее время развиваются направления, связанные с применением флавоноидов в терапии ожирения [36, 179]. Ранее считалось, что реализация биологических эффектов соединений данной группы обеспечивается исключительно антиоксидантными свойствами флавоноидов, однако в последнее десятилетие появляется большое количество публикаций, опровергающих это утверждение. Так, некоторые исследователи утверждают, что противовоспалительное действие некоторых соединений данной группы обусловлено ингибированием интерлейкинов (IL-1 β , IL-6 и IL-8) и фактора некроза опухоли (TNF- α) [158]. Возможные механизмы ранозаживляющего эффекта флавоноидов включают участие в регуляции сигнальных путей митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) и транскрипционного фактора NF-kB [25, 176]. Для родственных флавоноидам изокумаринов, являющихся мощными антиоксидантами, была продемонстрирована противовоспалительная активность, путем ингибирования ферментов, участвующих в лейкотриеновых и простагландиновых путях [112], также они могут модулировать функции нейронов посредством взаимодействия с тропомиозиновым тирозинкинасным рецептором (TrkB) [71].

В связи с развитием данного направления исследований возникает ряд вопросов, связанных с оптической активностью различных изомеров у ряда

флавоноидов, у которых в бензопираноновом кольце присутствуют центры хиральности. Однако в настоящее время этому вопросу уделяется сравнительно мало внимания [115]. Тем не менее, этот фактор может приводить к различиям в физико-химических, фармакокинетических и фармакодинамических свойствах соединений.

Несмотря на наличие широкого спектра биологических эффектов у флавоноидов, разработка лекарственных препаратов на их основе затруднена ограниченной биодоступностью, что, по мнению широкого круга специалистов, работающих в этой области, объясняется ограниченной растворимостью в воде при комнатной температуре. Соединения данной группы часто относят к 2 (низкая растворимость, высокая проницаемость) или 4 классу (низкая растворимость, низкая проницаемость) в биофармацевтической классификационной системе [31, 140]. Таким образом, одним из основных направлений можно считать разработку модифицированных форм с улучшенной растворимостью, сопровождающейся сохранением или увеличением проницаемости.

В литературе описано влияние структуры флавоноидов на растворимость как в полярных, так и в неполярных реагентах. Было показано, что присутствие двойной связи в кольце С (Рисунок 1.1) влияет на данный показатель, который, также зависит от количества гидроксильных групп в кольце В. При наличии в кольце метоксигрупп наблюдается снижение растворимости флавоноидов независимо от используемого растворителя. Напротив, наличие одинарной связи между атомами С2 и С3 в кольце С способствует повышению данного параметра, в то время как введение ОН-группы в положение С3 снижает растворимость в воде [191]. Важно отметить, что изменения в химической структуре флавоноидных соединений, такие как замена гидроксильных групп на метоксигруппы, могут коррелировать с вариациями в биологической активности. В связи с этим, среди исследователей растёт интерес к поиску стратегий повышения растворимости без изменения исходного молекулярного строения флавоноидов.

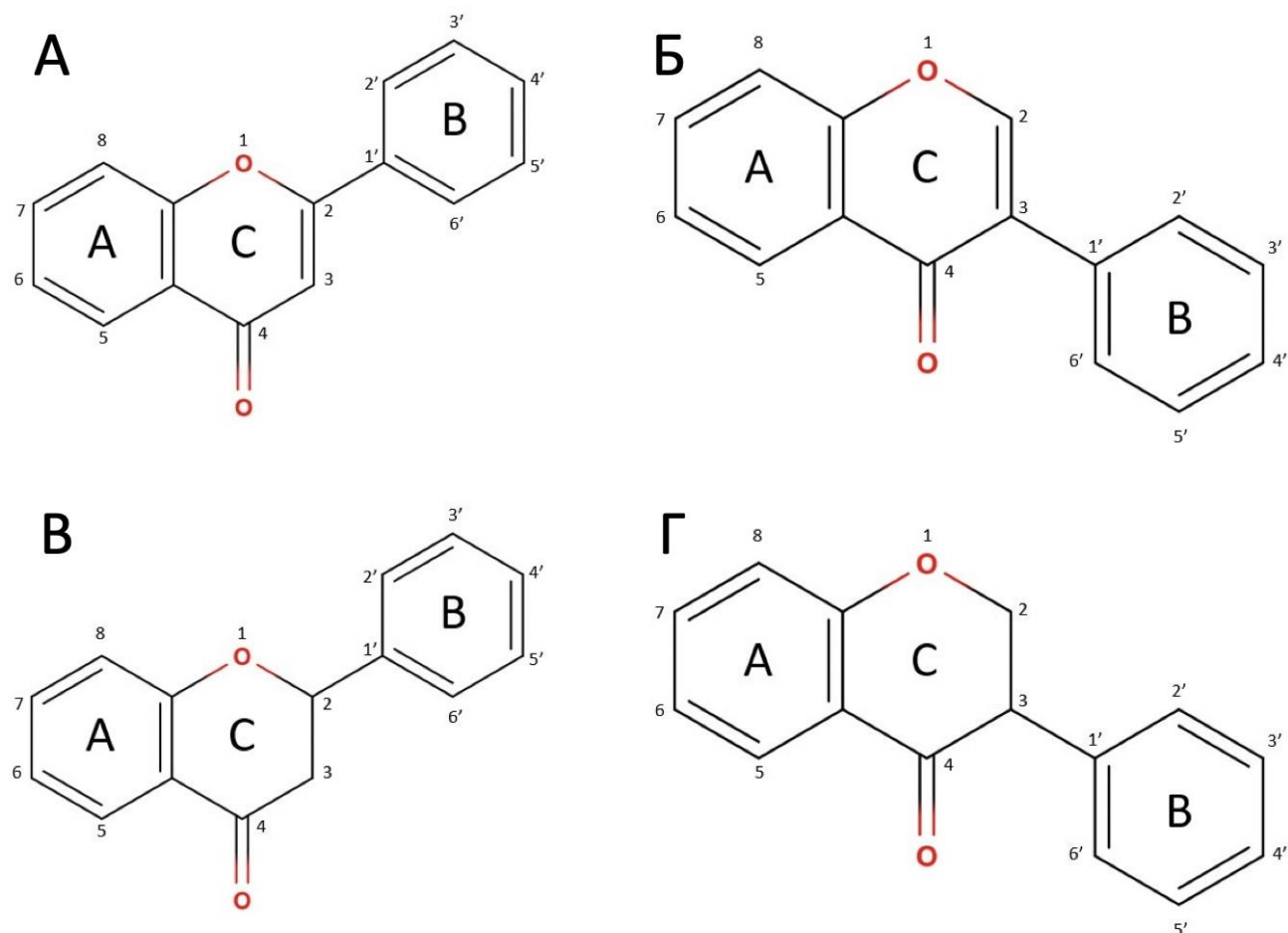


Рисунок 1.1 – Базовые структуры флавоноидов: А – флавон, Б – изофлавои; В – флаванон; Г - изофлаванон

Помимо физико-химических свойств флавоноидов, на их биодоступность могут оказывать воздействие и другие факторы, такие как лекарственная форма [195], ферменты [38], кишечная микрофлора [155] и физиологическое состояние организма [148]. Также влияние на концентрацию в плазме крови обеспечивает высокое сродство к альбуминам.

Несмотря на обширный объём информации о стратегиях повышения растворимости и биодоступности флавоноидов, эти знания остаются фрагментарными, что затрудняет выбор наиболее оптимального пути исследований в этой области. В связи с этим крайне важно систематизировать научные данные для выявления перспективных направлений дальнейшего развития.

Таким образом, в ходе данного обзора предметного поля (Scoping review) предстояло обобщить и систематизировать научные данные о методах повышения биодоступности флавоноидных соединений без изменения их исходной молекулярной структуры. Основным интерес представляет выявление наиболее часто встречающихся методов и оценка их эффективности в разрезе улучшения растворимости и проницаемости в сравнении с исходными соединениями.

1.1. Описание литературного ландшафта и отбор публикаций

Для обзора текущего научного ландшафта построена библиографическая сеть в программе VOSviewer. Для этого в базе данных PubMed был выполнен поисковый запрос «flavonoid AND (solubility OR permeability) AND -review» и его результаты визуализированы на Рисунке 1.2. На полученной диаграмме размер сфер соответствует относительной частоте упоминания термина, а цветовая шкала, варьирующаяся от синего до желтого, отражает степень новизны статей, опубликованных в период с 2010 по 2024 г. При этом, термин «флавоноиды» был исключен из построения сети. Наиболее встречающимися являются слова «животные», «антиоксиданты», «растворимость» и «растительные экстракты». Это отражает основные тенденции, связанные с флавоноидами в данный период: исследование экстрактов из лекарственного растительного сырья и их антиоксидантной активности с последующим изучением растворимости и тестированием в экспериментах *in vivo*. В последнее время наблюдается рост интереса к вопросам, связанным с экспрессией генов [73, 92], что позволяет предположить переход от восприятия флавоноидов исключительно в качестве антиоксидантов к изучению возможности регуляции внутриклеточных механизмов путем направленного связывания с мишенями.

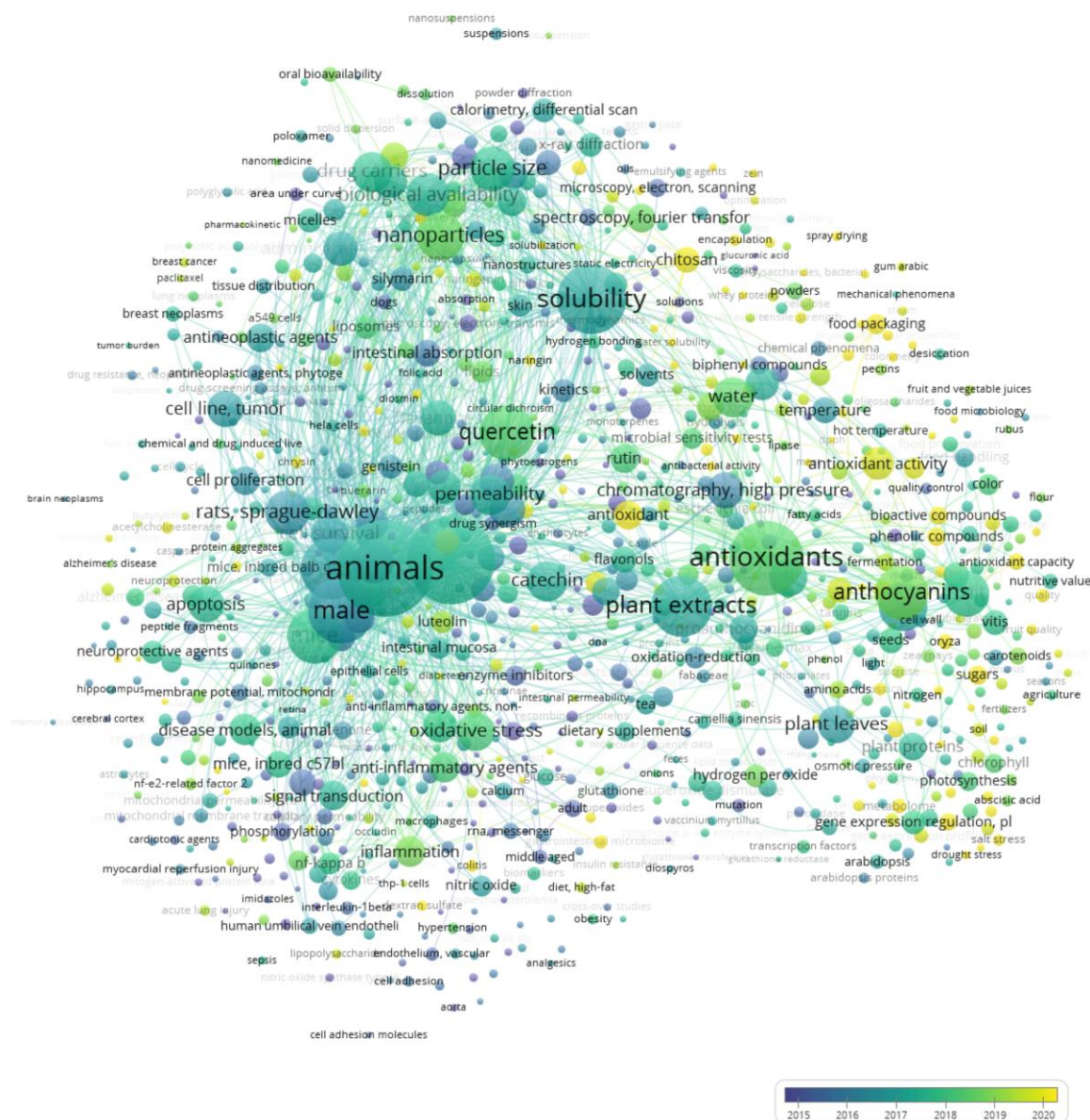


Рисунок 1.2 – Библиографическая сеть для запроса «flavonoid AND (solubility OR permeability) AND -review». Построено в программе VOSviewer

В процессе отбора публикаций с целью достижения максимально однородных исходных данных, поисковую выборку из 17 000 статей подвергли обработке путем анализа резюме, после чего исключено 16 283 статьи, ввиду косвенного упоминания в них терминов «флавоноид» и «растворимость», а также по причине обзорного характера ряда работ. Из оставшихся 717 поисковых записей при первичном анализе текста удалено 455 публикаций в связи с отсутствием изучения растворимости полученных объектов и применением химической модификации исходных соединений. Оставшиеся 262 статьи

подвергнуты глубокому рассмотрению, в результате чего удалено 218 из-за изучения только фазовой растворимости без конечной точки (т.е. четкого значения максимальной растворимости, достигнутой исследователями) или ее измерение в органических растворителях. Для публикаций, содержащих только данные по проницаемости, критерием исключения на данном этапе являлось отсутствие значения кажущейся проницаемости (P_{app}) в описанных авторами результатах. Таким образом, финальная выборка содержала 44 статьи в рецензируемых зарубежных изданиях. Пошаговый алгоритм отбора представлен на Рисунке 1.3.



Рисунок 1.3 – Диаграмма PRISMA, иллюстрирующая процесс отбора исследований

С 2010 года наблюдается устойчивый рост числа публикаций, посвященных изучению модификации растворимости и проницаемости флавоноидов: с 3 в период 2010-2012, до 13 в 2019-2021 и 2022-2024 годах. В 2010-2012 годах основное внимание исследователей было направлено на получение различных наноструктур на основе флавоноидов, однако к 2022-2024 их представленность в

общем количестве публикаций заметно снизилась (Рисунок 1.4). Аналогичные тенденции показаны для фосфолипидных комплексов на их основе. При этом наблюдается постоянное увеличение интереса к кокристаллам и коаморфам на основе флавоноидов: если в 2016-2018 годах их доля составляла 10,00% от проанализированных исследований, то к 2022-2024 она выросла до 30,75%. Также, в последнее время ученых привлекают комплексы включения с циклодекстринами, что подтверждается устойчивым ростом числа публикаций, посвященных этому методу модификации.

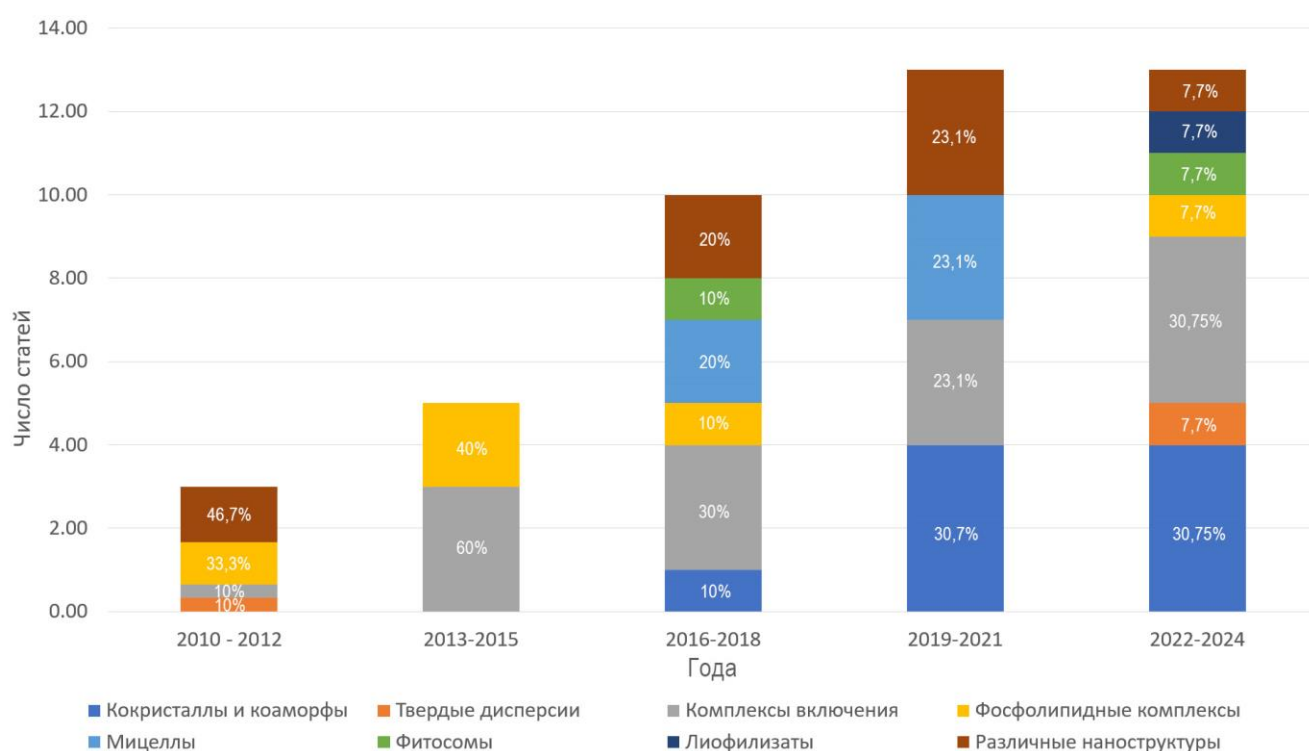


Рисунок 1.4 – Динамика частоты использования методов модификации

Среди основных групп флавоноидов наибольшее внимание ученых было уделено изофлавонам, доля которых в 2022-2024 годах составила 38,40% от всех полученных модификаций (Рисунок 1.5). В 2013-2021 годах наблюдался всплеск интереса к флавонам, однако в период с 2022 по 2024 год данных по их использованию не обнаружено.

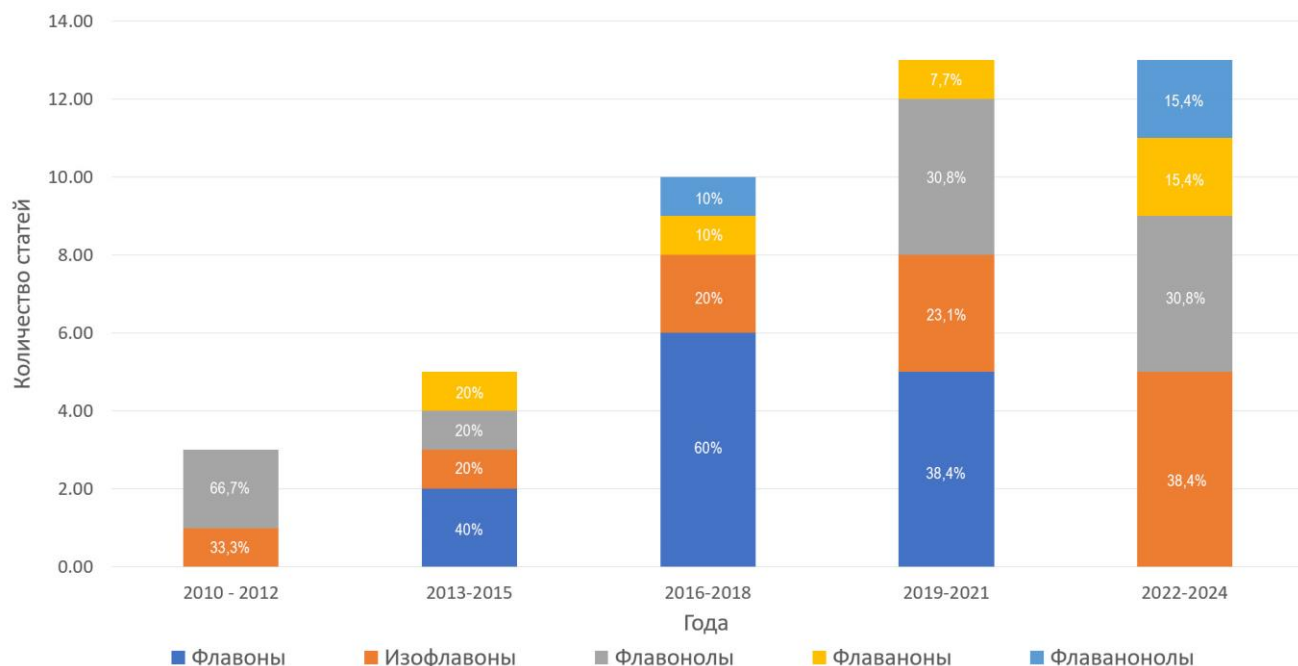
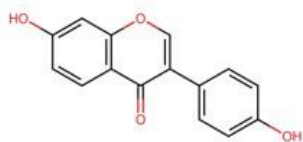


Рисунок 1.5 – Динамика частоты использования групп флавоноидов, подвергнутых модификации

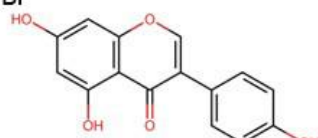
В целом, в последнее десятилетие наблюдается большее разнообразие в группах модифицируемых флавоноидов, чем ранее. Всего, в 44 статьях, включенных в обзор, идентифицировано 15 различных флавоноидов из 5 групп (Рисунок 1.6).

Всего описано 75 различных объектов с измененными биофармацевтическими параметрами. Их растворимости уделено внимание в 39 статьях, проницаемости – в 8 исследованиях: из них в 3 авторы контролировали оба параметра. При этом, для изучения проницаемости использовали 2 метода: в 7 случаях оценку проводили с использованием клеточной линии CaCo-2 (иммортилизованная клеточная линия колоректальной аденокарциномы человека) и в 1 – с помощью бесклеточной модели проницаемости. Также проанализированы фармакокинетические параметры.

Изофлавоны

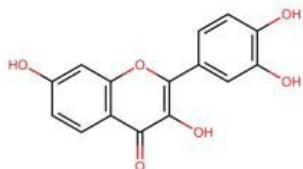


Дайдзеин

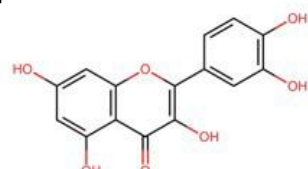


Генистеин

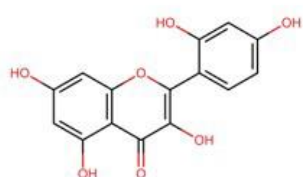
Флавонолы



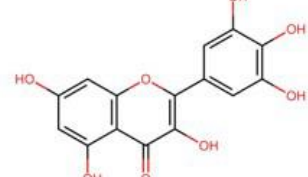
Физетин



Кверцетин



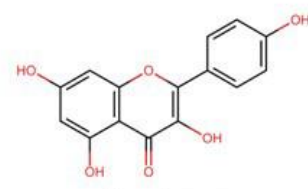
Морин



Мирицетин

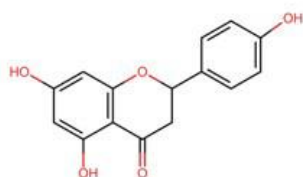


Изорамнетин

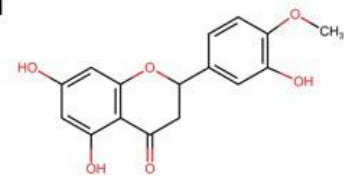


Кемпферол

Флаваноны

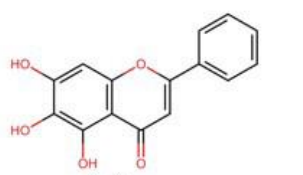


Нарингенин

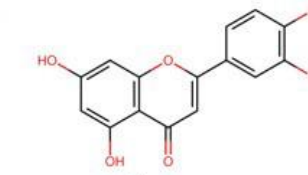


Гесперетин

Флавоны



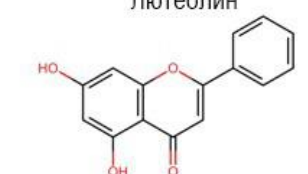
Байкалеин



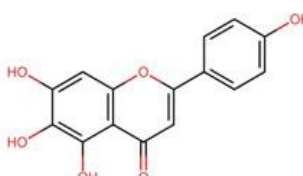
Лютеолин



Апигенин

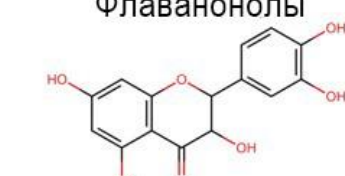


Хризин



Скутеллареин

Флаванолы



Дигидрокверцетин

Рисунок 1.6 – Структуры модифицируемых флавоноидов

В процессе изучения литературного ландшафта выявлено несколько основных препятствий для систематизации информации о подходах к повышению растворимости различных модификаций флавоноидов, среди которых выделялись значительные различия в методологиях, используемых в анализах. В частности, такие изменяемые параметры, как температура, значение pH, среда растворения, продолжительность анализа и способы количественного определения, значительно варьировались в различных исследованиях. Таким образом, неоднородность условий и методов анализа этого показателя могла повлиять на конечный результат для исходных веществ и полученных объектов. Эта вариабельность привела к невозможности прямого сравнения точных значений растворимости между отдельными исследованиями для одного и того же флавоноида и обусловила необходимость исключения публикаций, не содержащих информации о растворимости исходного соединения или кратности изменения растворимости. Следовательно, в будущем представляется необходимым стандартизировать метод определения растворимости.

Кроме того, исследования, посвященные изучению проницаемости модифицированных форм флавоноидов, немногочисленны, что формирует предпосылки к более детальному изучению этого параметра.

1.2. Биофармацевтические параметры

1.2.1. Растворимость

Наибольшее число объектов получено при использовании методов кокристаллизации и коаморфизации, формирования комплексов включения, фосфолипидных комплексов, твердых дисперсий и наноструктур. В среднем большинство модификаций характеризовалось повышенной растворимостью, не превышающей 10-кратного значения от исходного (Рисунок 1.7). Для удобства визуального представления данных использовали десятичный логарифм кратности

увеличения растворимости для конечных форм в сравнении с исходными флавоноидами.

Получение твердых дисперсий. Этот метод широко распространен в фармацевтической промышленности для улучшения растворимости и биодоступности действующих веществ [26, 58, 72, 149, 151]. В процессе получения конечного продукта происходит уменьшение размера частиц, улучшение смачиваемости и изменение фазового состояния субстанций, что приводит к изменению их биофармацевтических свойств [120]. Существует два основных подхода к получению твердых дисперсий: методы, основанные на испарении растворителя и на плавлении. К первым относятся такие способы, как распылительная сушка [81, 185, 210], электрораспыление [119], технологии псевдооживленного слоя [60] и сверхкритических флюидов [118], а также распылительно-сублимационная сушка [124]. Среди методов с плавлением встречается экструзия горячего расплава [8, 17, 150], трехмерная (3D) печать [21] и микроволновый нагрев [50]. Однако, несмотря на широкое распространение в промышленности для других групп химических веществ, для флавоноидов метод оказался непопулярным и был описан всего в 2 исследованиях. Так получены твердые дисперсии генистеина с поливинилпирролидоном для которых продемонстрировано увеличение растворимости флавоноида от 78,5 до 2211,9 раз в зависимости от соотношения компонентов [186]. Вторыми описанными объектами являются дисперсии кверцетина с поливинилпирролидоном и плуроником F127, однако для них увеличение растворимости было скромнее – не превышало 10,3 раз [122].

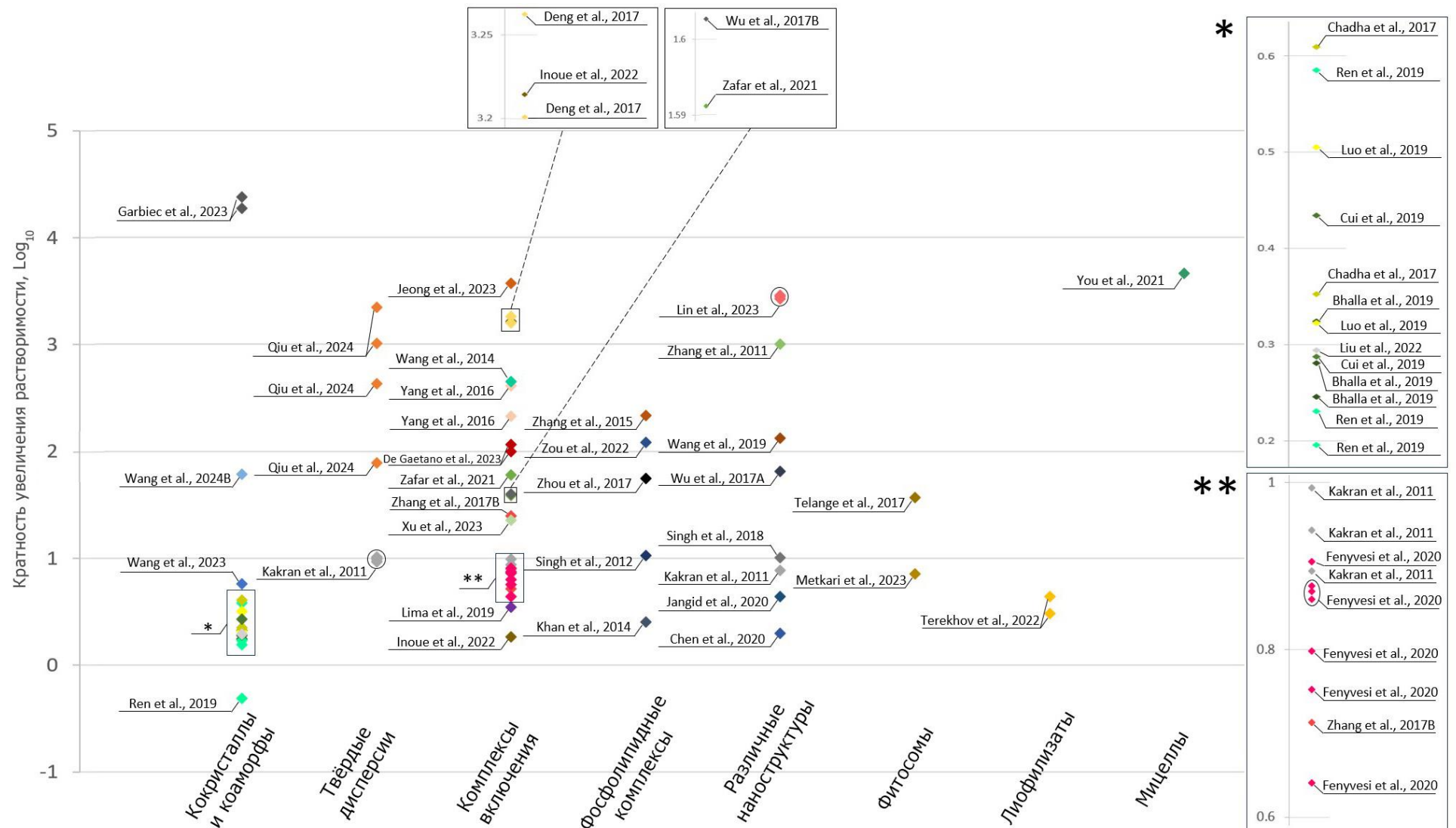


Рисунок 1.7 – Кратность изменения растворимости флавоноидов после модификации

Получение комплексов включения. Такие структуры формируются при взаимодействии гидрофобных молекул с циклическими олигосахаридами, такими как циклодекстрины, циклоамилоза и их модификации [205]. Основными путями получения комплексов включения являются соосаждение [49, 100], смешивание [100], микроволновое облучение [138] и распылительная сушка [83, 96]. Способность циклодекстринов повышать растворимость объясняется их двойственной структурой: внутренняя полость липофильна и способна инкапсулировать молекулы, плохо растворимые в полярных растворителях, посредством образования водородных связей. При этом внешняя поверхность гидрофильна, что и обеспечивает водорастворимость образующихся комплексов [202].

Интересно, что именно этот метод получил широкое распространение для улучшения растворимости и биодоступности флавоноидов. Всего представлено 27 модификаций в 13 статьях, что делает его самым популярным для данного семейства природных полифенолов. Для модификации флавоноидов применяли циклодекстрины и их производные: β -циклодекстрин (β -ЦД) [53, 102, 122, 164, 178], γ -циклодекстрин (γ -ЦД) [110], (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрин (ГП- β -ЦД) [40, 53, 62, 95, 101, 102, 187], аминомодифицированный β -циклодекстрин [166], сульфобутилэфир- β -циклодекстрин [40, 53] и произвольно метилированный β -циклодекстрин (ПМ- β -ЦД) [53]. Кроме того, некоторые модификации получены с использованием циклоамилозы [103] и лецитина [178]. Наиболее выраженное увеличение растворимости достигнуто для физетина в комплексе с циклоамилозой: возрастание более чем в 3700 раз по сравнению с исходным флавоноидом. При этом, большинство объектов характеризовались повышенной растворимостью, однако не превышающей 100-кратного значения от исходного.

Получение фосфолипидных комплексов. Существует несколько методов получения фосфолипидных комплексов [74] для улучшения биофармацевтических параметров различных действующих веществ и растительных экстрактов: испарение растворителя [126, 160], совместное измельчение [169], механическое диспергирование [154], сверхкритический

флюидный процесс, лиофилизация с сорастворителем и осаждение антирастворителем [182]. Для флавоноидов применение данного подхода было установлено в 5 статьях, где сообщали о получении новых комплексов с улучшенной растворимостью в воде [23, 128, 161, 167, 177]. Наиболее значимых результатов удалось добиться в случае кемпферола, растворимость которого увеличили в 216,7 раз [161]. Несколько меньшее увеличение достигнуто для изорамнетина и байкалеина – в 122,0 и 55,5 раз, соответственно [23, 167]. Подобное изменение растворимости является самым незначительным, среди пяти наиболее распространенных методов, что вместе со сложностью стандартизации полученных объектов делает его дальнейшее развитие целесообразным для ограниченного круга задач.

Получение наноструктурированных объектов. Наноструктуры на основе флавоноидов представлены 10 модификациями в 8 статьях. Самыми популярными для получения объектами оказались наночастицы, которые описаны для физетина [85], кверцетина [122], лютеолина [159] и апигенина [163]. Также созданы такие структуры, как комплекс дайдзеин-фосфолипид, загруженный в липидные наноносители [57], наносуспензии для морины [30] и нарингенина [86], нановолокна мирицетина с добавлением (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина и поливинилпирролидона в различных соотношениях [144]. Среди всех описанных наноструктур последние показали наиболее выраженное увеличение растворимости в воде, которое превышало исходное значение более чем в 2600 раз.

Получение фитосом. Несмотря на то, что фитосомы можно считать одним из типов фосфолипидных комплексов, они выделены в отдельную группу в связи с их уникальными характеристиками, включающими образование ковалентных или водородных связей между оболочкой и инкапсулированным фитокомпонентом [74, 156], а также для сохранения авторского наименования полученных объектов. К сожалению, количество исследований, посвященных применению этого метода для отдельных флавоноидов невелико, что накладывает некоторые ограничения на полноту оценки их влияния на значения растворимости

и биодоступности. Большое количество публикаций включает в себя получение и изучение фитосом на основе экстрактов лекарственных растений, а не индивидуальных соединений.

Повышению растворимости индивидуальных флавоноидов путем формирования фитосом было посвящено 2 исследования. Успешно увеличена в 7,2 раза растворимость нарингенина путем образования конечной структуры с применением фракции не содержащего ГМО соевого лецитина, обогащенного фосфатидилхолином (LS-75) [174]. Получены фитосомы с апигенином, продемонстрировавшие увеличение растворимости в 36,8 раза [94]. Ограниченное повышение растворимости, а также сложный процесс создания конечного продукта ограничивает перспективы данного метода в области повышения растворимости и биодоступности флавоноидов.

Лиофилизация. Этот метод без одновременного добавления вспомогательных веществ с целью получения объектов, относящихся к другим группам, оказался непопулярным для повышения растворимости и биодоступности флавоноидов несмотря на то, что он широко используется для модификации биофармацевтических характеристик различных активных фармацевтических субстанций [141]. Помимо этого, он нашел применение в производстве различных наноструктурированных материалов и липосомальных форм для доставки лекарственных веществ [93, 129].

Единственное упоминание о применении данного метода касалось лиофилизации растворов ДКВ в различных органических соединениях. Установлено, что его растворимость в воде увеличилась в 4,4 раза для водно-этанольного и в 3,1 раз для ацетонитрильного лиофилизатов, соответственно [188]. Наблюдаемые в результате лиофилизации изменения могут быть обусловлены другой морфологией субстанции и увеличением площади поверхности в процессе лиофилизации.

Мицеллообразование. Метод формирования мицелл для повышения растворимости флавоноидов описан всего в одном исследовании. Единственным полученным и охарактеризованным объектом были мицеллы байкалеина с

глицирризиновой кислотой [170], для которых продемонстрировано увеличение растворимости в 4606 раз, что можно объяснить различной полярностью мицеллярных структур, способствующей включению труднорастворимых молекул и тем самым усиливающей их солюбилизацию [137].

Кокристаллизация/коаморфизация. Этому методу уделено внимание в 9 статьях и всего было получено 18 новых объектов с изменённой растворимостью по сравнению с исходными флавоноидами. Широко применяется для модификации биофармацевтических свойств полифенольных соединений не только в фармацевтической [70, 142, 173], но и в пищевой промышленности [41, 65, 117]. При этом, в некоторых исследованиях процесс кокристаллизации использовался для последующего совместного разделения рацемической смеси соединений и для повышения стабильности гигроскопических лекарственных препаратов [184]. Кокристаллы или коаморфы представляют собой супрамолекулярные комплексы, образованные посредством нековалентных взаимодействий между компонентами [153].

В качестве основных коформеров применяли азотсодержащие гетероциклические соединения: пиперазин [22, 147], никотинамид [146, 197], изоникотинамид [56, 197], теобромин [56], цитозин [42, 56], кофеин [127, 146, 197], пиперин [52], изониазид [127] и тиамин [42]. Помимо этого, получен ряд модификаций с основными протеиногенными аминокислотами: лизином [97], аргинином [97] и пролином [197], однако их сравнительное количество в общем числе коформеров невелико. Однако, именно с их использованием синтезированы продукты с наибольшим увеличением растворимости: для коаморфов генистеина с лизином и аргинином показано увеличение в 23 000 и 18 000 раз, соответственно [97]. На основании этого можно считать аминокислоты перспективными объектами для дальнейшего развития кокристаллизации и коаморфизации для повышения растворимости и биодоступности природных полифенольных соединений. Предполагается, что возрастание растворимости в результате получения кокристаллов по сравнению с исходными веществами обусловлено эффектами «потока» и «парашюта» [35].

Фазовая модификация не всегда приводит к повышению концентрации в насыщенном растворе: продукт кокристаллизации мирицетина с кофеином показал двухкратное уменьшение растворимости в воде [197]. Авторы связывают этот эффект с повышенной стабильностью твердой монофазной системы, обусловленной низкой растворимостью коформера в воде. Аналогичное снижение растворимости наблюдалось и для соединений других химических классов, таких как противогрибковый препарат 5-фторцитозин. В случае использования феруловой кислоты в качестве коформера было отмечено снижение растворимости из-за образования жесткого S-образного модуля, обладающего гидрофобными свойствами и пониженной полярностью [46]. Также влияние на растворимость кокристаллов оказывает энергия кристаллической решетки и свободная энергия сольватации. Например, в случае модификаций алкалоида матрина с органическими кислотами показано, что с увеличением свободной энергии сольватации растворимость кокристаллов в воде уменьшается [106].

Сочетание простоты реализации с эффективностью в повышении растворимости в воде делает метод получения кокристаллов и коаморфов одним из наиболее перспективных направлений для дальнейших исследований [75].

1.2.2. Проницаемость

В целом исследования проницаемости для полученных объектов носили очень ограниченный характер и были описаны всего в 9 публикациях (Таблица 1.1). Для визуализации результатов исследований, при написании обзора посчитана кратность изменения проницаемости, поскольку изначально она была представлена только в 3 статьях.

Таблица 1.1 – Результаты оценки проницаемости модификаций, описанных в литературе

Группа флавоноидов	Соединение	Метод увеличения проницаемости	Модель проницаемости	Исходная кажущаяся проницаемость, $\times 10^{-6}$ см/с	Полученная кажущаяся проницаемость, $\times 10^{-6}$ см/с	Кратность изменения проницаемости	Ссылка
Изофлавоны	Генистеин (ГЕН)	Мицеллообразование	Caco-2 (AP-BL)	6,33 $\pm$ 0,49	7,82 $\pm$ 0,38	1,24*	[165]
			Caco-2 (BL-AP)	8,65 $\pm$ 0,51	8,29 $\pm$ 0,44	0,96*	
		Мицеллообразование (ГЕН – 1,2 мг/мл; ГЕН – 1,6 мг/мл)	Caco-2 (AP-BL)	5,28 $\pm$ 0,49	8,23 $\pm$ 0,35 (ГЕН-Л)	1,56	[189]
			Caco-2 (BL-AP)	7,97 $\pm$ 0,36	8,46 $\pm$ 0,43 (ГЕН– 1,2 мг/мл)	1,06	
					7,59 $\pm$ 0,56 (ГЕН– 1,6 мг/мл)	0,95	
		Кокристаллизация с лизином и аргинином	Бесклеточная модель	4,28 $\pm$ 0,95	0,90 $\pm$ 0,02 (Лизин)	0,21*	[97]
					1,13 $\pm$ 0,03 (Аргинин)	0,26*	
		Получение комплексов включения с ПМ- β -ЦД, ГП- β -ЦД, β -ЦД и γ -ЦД	Caco-2	1,70 $\pm$ 0,10	17,10 $\pm$ 3,70 (ГЕН – β -ЦД)	10,00*	[116]
					17,10 $\pm$ 3,50 (ГЕН – ГП- β -ЦД)	10,00*	
					6,50 $\pm$ 1,70 (ГЕН – ПМ- β -ЦД)	3,82*	
					28,50 $\pm$ 1,70 (ГЕН – γ -ЦД)	16,76*	

Продолжение таблицы 1.1

Флавоны	Дайдзеин (ДДЗ)	Получение комплексов включения с ПМ-β-ЦД, ГП-β-ЦД, β-ЦД и γ-ЦД	Caco-2	11,90±1,90	31,40±4,10 (ДДЗ – β-ЦД)	2,64*	[116]
					21,70±9,10 (ДДЗ – ГП-β-ЦД)	1,82*	
					24,30±7,30 (ДДЗ – ПМ-β-ЦД)	2,04*	
					16,20±1,30 (ДДЗ – γ-ЦД)	1,36*	
	Байкалеин	Мицеллообразование	Caco-2 (AP-BL)	1,05±0,08	1,93±0,19	1,84*	[82]
			Caco-2 (BL-AP)	0,97±,10	1,85±0,13	1,91*	
		Получение фосфолипидного комплекса и матричной дисперсии на его основе	Caco-2	10,1	11,60 (комплекс)	1,15*	[23]
					15,30 (дисперсия)	1,51*	
	Апигенин	Мицеллообразование	Caco-2	5,32±0,51	6,76±0,56	1,27	[104]
	Хризин	Получение комплексов включения с ПМ-β-ЦД	Caco-2	2,32	4,65 (1:1 с ПМ-β-ЦД)	2,00	[53]
11,00 (1:2 с ПМ-β-ЦД)					4,74		

Примечание: * Значения посчитаны при написании обзора; AP – апикальная сторона, BL – базолатеральная сторона

Получение комплексов включения. Оценку проницаемости полученных объектов проводили в 2 исследованиях с применением продуктов модификации флавоноидов генистеина, дайдзеина и хризина на модели клеточного монослоя

линии CaCo-2. Для дайдзеина максимальное увеличение было достигнуто в комплексе с β -ЦД, которое составило 260% от исходного значения [116]. В случае хризина в комплексе с ПМ- β -ЦД в соотношении 1:2 между компонентами авторам удалось показать увеличение проницаемости в 4,7 раз [53]. Наиболее значимые результаты были продемонстрированы для генистеина, комплекс включения которого с γ -ЦД показал 16,8-кратное увеличение проницаемости [116].

Получение фосфолипидных комплексов. Для фосфолипидного комплекса на основе байкалеина, продемонстрировавшего увеличение растворимости в 55,5 раз, авторы провели оценку трансмембранной проницаемости на модели CaCo-2. В результате установлено, что в случае самого комплекса проницаемость возрастает всего в 1,2 раз, в то время как для матричной дисперсии на его основе продемонстрировали результаты, превосходящие исходные свойства объектов в 1,5 раза [23].

Мицеллообразование. Наибольшее количество статей по проницаемости посвящено именно данному способу модификации. Было изучено влияние получения мицелл на проницаемость генистеина (2 исследования) [165, 189], байкалеина [82] и апигенина [104]. В результате установлено, что для всех объектов проницаемость не превышала двухкратного значения от исходного, а наилучшие результаты наблюдали для мицелл байкалеина. Эти данные, вместе с ограниченными исследованиями растворимости, ставят под вопрос целесообразность дальнейшего получения подобных объектов с целью изменения биофармацевтических свойств соединений флавоноидной природы.

Кокристаллизация/коаморфизация. Исследование было выполнено для коаморфов изофлавона генистеина с лизином и аргинином на бесклеточной модели оценки проницаемости [97]. Интересно отметить, что, несмотря на многократное повышение растворимости обоих объектов, их проницаемость упала в 4-5 раз.

Для таких способов модификации, как получение твердых дисперсий, фитосом и наноструктур, а также лиофилизации, исследований по оценке проницаемости, конечных продуктов, не выявлено.

1.2.3. Биодоступность *in vivo*

Получение твердых дисперсий. Влияние этого способа модификации на общую биодоступность флавоноидов было ограниченным. AUC увеличилась в среднем в 2 раза по сравнению с исходными соединениями, что является достаточно скромным результатом в сравнении с другими методами, что сопровождается небольшим снижением $T_{1/2}$ и отсутствием выраженного влияния на C_{max} и T_{max} (Рисунок 1.8). Полученные данные свидетельствуют о потенциале данного подхода в случаях, когда необходимо ускорить наступление терапевтического эффекта препарата с незначительным повышением его биодоступности.

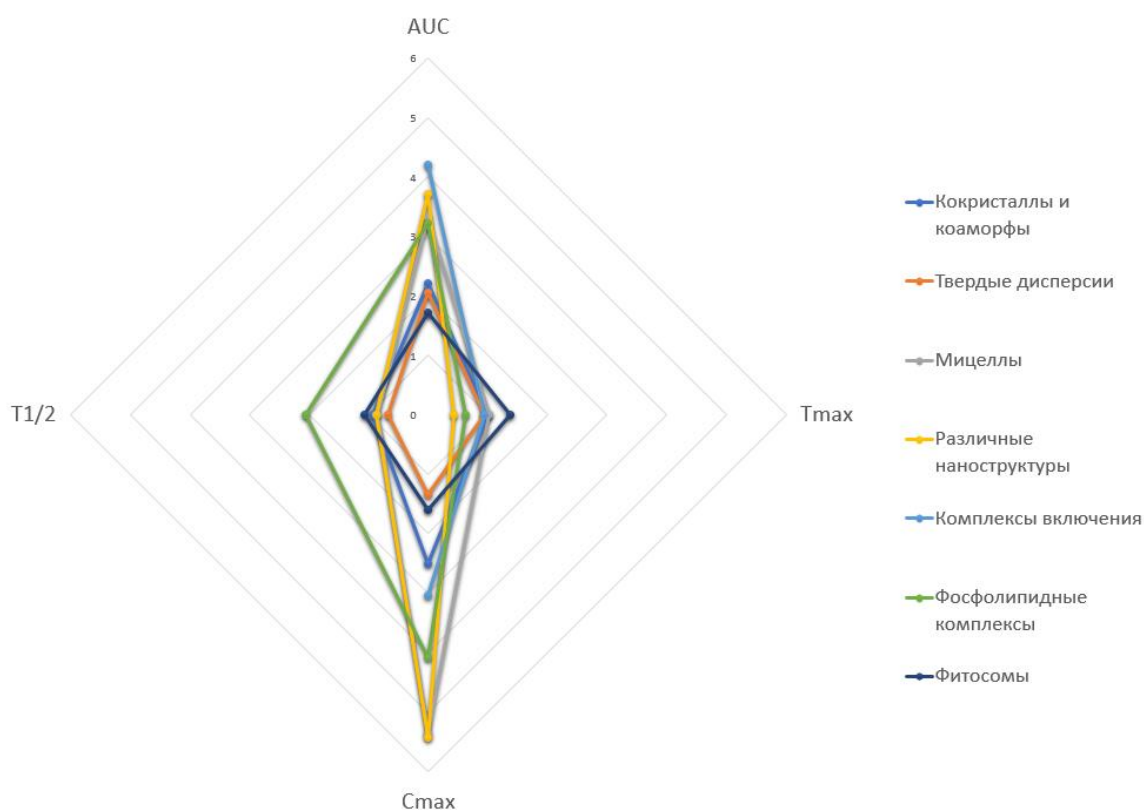


Рисунок 1.8 – Кратность изменения основных фармакокинетических параметров

Получение комплексов включения. При оценке на моделях *in vivo* показано, что AUC для комплексов включения флавоноидов увеличилась в среднем в 4,2 раза по сравнению с исходными веществами и это сопровождалось

увеличением C_{max} примерно в 3 раза и сохранением исходного значения T_{max} . Данные результаты можно считать наиболее значительными среди всех изученных методов, что указывает на перспективность комплексов включения для модификации биофармацевтических свойств полифенолов [19].

Получение наноструктурированных объектов. Результаты оценки биодоступности различных наноструктур показали ожидаемые результаты. Наблюдали выраженное увеличение AUC и C_{max} (в 3,7 и 5,4 раза, соответственно), что объясняется значительно большей удельной площадью поверхности наноструктурированных форм по сравнению с другими объектами. Подобное строение приводит к большей полноте и скорости всасывания действующих веществ: T_{max} сократилось более чем в 2 раза по сравнению с исходными флавоноидами. Таким образом, можно сделать вывод, что различные наноструктуры являются предпочтительным выбором для разработки быстродействующих препаратов с высокой биодоступностью. В литературе известен пример противопаразитарного средства – альбендазола, для твердых липидных наночастиц которого продемонстрирована увеличенная скорость высвобождения действующего вещества, а также значительное возрастание проницаемости в цисты эхинококка [145]. Эффекты повышения биодоступности при получении наноструктурированных материалов проявляются и на молекулярно-генетическом уровне. Например, для нановолоконных каркасов из поливинилового спирта, наполненных экстрактом льняного семени, описано значительное увеличение экспрессии генов, являющихся остеогенными маркерами, что объясняется уменьшением размера частиц действующего вещества в процессе их получения [63]. В сравнении с другими методами наноструктурирование объектов способствовало наиболее выраженному увеличению C_{max} и снижению T_{max} , в то время как среднее увеличение AUC заняло второе место после комплексов включения.

Получение фитосом. За счет формирования устойчивых химических связей между инкапсулированным веществом и оболочкой данные структуры не показали существенного изменения большинства фармакокинетических

параметров: AUC , C_{max} , $T_{1/2}$ возросли в 1,7, 1,6 и 1,1 раз, соответственно. Однако для фитосом продемонстрировано наибольшее увеличение T_{max} , что указывает на их потенциал в качестве модификаций для получения лекарственных форм с пролонгированным высвобождением действующего вещества. В том числе за счет этой особенности его рассматривают как возможный путь разработки препаратов против онкологических заболеваний [157, 162].

Мицеллообразование. Для мицелл описаны результаты, сходные с комплексами включения. При отсутствии выраженного влияния на $T_{1/2}$ и T_{max} , увеличение AUC и C_{max} было весьма выраженным и достигало 3,3 и 5,4 раз, соответственно. Однако, несмотря на явное влияние на фармакокинетические параметры, перспективы расширения применения данного метода в лабораторной и промышленной практике весьма ограничены из-за сложности технологического процесса получения конечного объекта и его стандартизации.

Получение фосфолипидных комплексов. Хотя повышение растворимости, достигнутое этим методом, было меньше, чем при использовании других подходов, его влияние на фармакокинетические параметры весьма выражено. Среднее увеличение AUC достигало 3,2 раза, что меньше, чем для наноструктур и комплексов включения. При этом, C_{max} возросла в 3,0 раза, что ставит фосфолипидные комплексы на 3 место по этому показателю сразу после мицелл и наноструктур. Кроме того, относительное увеличение $T_{1/2}$, достигнувшее 2,1 раза, было наибольшим среди всех описанных подходов к модификации. Также наблюдалось снижение T_{max} почти в 2 раза. Это позволяет позиционировать данный метод как перспективный для разработки лекарственных форм, требующих пролонгированного высвобождения действующих веществ на основе флавоноидов. По литературным данным, аналогичное влияние на фармакокинетические параметры установлено при разработке лекарственной формы сукцината дегидроandroграфолида с пролонгированным высвобождением, применяемой в лечении респираторных заболеваний [111].

Кокристаллизация/коаморфизация. При оценке фармакокинетических параметров на моделях *in vivo* было установлено, что кокристаллы способны

увеличивать AUC и C_{max} , оказывая при этом минимальное влияние на $T_{1/2}$ и T_{max} . Это делает полученные соединения особенно интересными в тех случаях, когда необходимо повысить биодоступность препарата, не влияя на скорость наступления терапевтического эффекта или его выведение из организма, что является довольно распространённой задачей в фармацевтической практике.

Для лиофилизатов исследований фармакокинетических параметров *in vivo* авторы не проводили.

1.3. Выводы по главе 1

1. Установлены наиболее часто использующиеся методы для повышения растворимости флавоноидов и их влияние на оцениваемые биофармацевтические параметры.
2. Обнаружено, что, несмотря на широкое распространение исследований по изменению растворимости полученных объектов на основе флавоноидов, изучение их проницаемости носит ограниченный характер и должно учитываться при будущих разработках.
3. Отмечены различия в изменении фармакокинетических параметров при использовании различных методов модификации и сформированы предложения по их применению в зависимости от требуемых свойств создаваемого терапевтического агента: для пролонгированных форм – комплексы включения, для быстродействующих препаратов – твердые дисперсии; без учета времени высвобождения – кокристаллы и коаморфы.
4. Зафиксирована высокая неоднородность методов анализа растворимости для полученных структур на основе флавоноидов, что привело к невозможности прямого сравнения результатов различных исследований.
5. Установлена необходимость унификации методов и условий проведения изучения точного значения растворимости для флавоноидов.

ГЛАВА 2. ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ МОДИФИКАЦИЙ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА И L-ЛИЗИНА

Важным этапом фармацевтической разработки является оптимизация условий получения конечных продуктов, что позволяет сократить расходы как на этапе лабораторных исследований, так и полупромышленного и промышленного внедрения технологий. Помимо очевидных затрат денежных ресурсов, это в перспективе будет способствовать снижению экологической нагрузки на окружающую среду за счет меньшего расхода реагентов, а, следовательно, сокращения образования отходов, что особенно актуально в последнее время в связи с ужесточением государственного регулирования в данной области. Также, возможно уменьшение временных и энергетических затрат, необходимых для производства одной единицы продукта. Это может положительно сказаться на стоимости конечных продуктов и будет способствовать более рациональному использованию имеющихся ресурсов.

Исходя из биофармацевтической классификации, ДКВ относится к 2 классу [36], который характеризуется высокой проницаемостью и низкой растворимостью в воде, что делает первостепенной задачей значительного повышения растворимости в воде, для чего хорошо подходит метод получения кокристаллов и коаморфов с использованием в качестве коформеров протеиногенных аминокислот. Также, важным аспектом является то, что этот подход уже внедрен в фармацевтическую и пищевую промышленность.

2.1. Продукт сухого гриндинга

Состав композиции ДКВ и L-лизина оптимизировали по параметру растворимости в воде при комнатной температуре, определенной в терминах ГФ РФ XV согласно ОФС.1.2.1.0005 «Растворимость» и ОФС 2.3.6.0. «Раздел «Свойства» в частных фармакопейных статьях» Фармакопеи ЕАЭС, с целью

достижения максимального увеличения растворимости с минимальными затратами коформера, в роли которого выступает протеиногенная аминокислота.

Для получения выбран метод сухого гриндинга, который широко применяется в исследовательской практике синтеза различных кокристаллических и коаморфных модификаций фармацевтических субстанций с прицелом на оптимизацию физических, химических и биофармацевтических свойств [80, 183, 214]. Подбор оптимального соотношения компонентов представлен в Таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Оптимизация мольного соотношения ДКВ – L-лизина моногидрат

Мольное соотношение (ДКВ : L-лизин)	Растворимость в воде
1:0	Очень мало растворим
1:0,5	Мало растворим
1:1	Легко растворим
1:2	Очень легко растворим
1:5	Очень легко растворим
1:10	Очень легко растворим

По результатам оценки полученных продуктов гриндинга в качестве основного объекта дальнейшего изучения выбран состав с мольным соотношением компонентов 1:2, которая обеспечивала наилучшую растворимость в воде при комнатной температуре при наименьшем расходе коформера [11]. При этом, для навесок суммарной массой в пределах 10,0 г, гриндинг проводили в течение 15 минут, что позволило добиться высокой однородности и степени измельчения компонентов [16].

Растворимость полученного продукта в хлороформе, ацетоне и 96% этаноле может быть выражена в терминах ГФ РФ XV, как «практически нерастворим»

2.2. Пленки

Оптимизацию получения пленчатой структуры проводили с учетом данных термического анализа предыдущих исследований субстанции ДКВ.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) показала, что первый температурный эффект имеет максимум при 86,3 °С и представляет собой эндотермический процесс [188]. Ряд модификаций ДКВ также демонстрирует первый термический эффект около 75 °С. С учетом этого, получение модифицированных форм, требующих нагрева в процессе супрамолекулярного синтеза, целесообразно проводить при значениях температуры, не превышающих обозначенные выше.

Дополнительно проведена оценка затрат энергии для получения одного образца, с учетом времени, необходимого на нагрев прибора до соответствующей температуры. За основу были взяты данные из технической документации на сушильный шкаф Binder FED 53. Полученные данные представлены в виде параболической зависимости на Рисунке 2.1. Минимальное значение этой функции с учетом погрешности прибора достигается при температуре $59,55 \pm 14,19$ °С.

Обобщая экспериментальные данные, температура 65 °С, позволяет осуществлять формирование пленчатой структуры за 10-15 мин, что является оптимальным соотношением временных и энергетических затрат [15].

Выбор двукратного объема воды очищенной обусловлен получением в этом случае вязкого раствора с высокой концентрацией обоих компонентов, не подверженного высокой текучести по подложке. Использование меньшего количества воды увеличивает время растворения, а большего приводит к высокой текучести раствора. В свою очередь, применение полиэтиленовой основы упрощало снятие конечного продукта с нее, в отличие от стеклянных и металлических материалов.

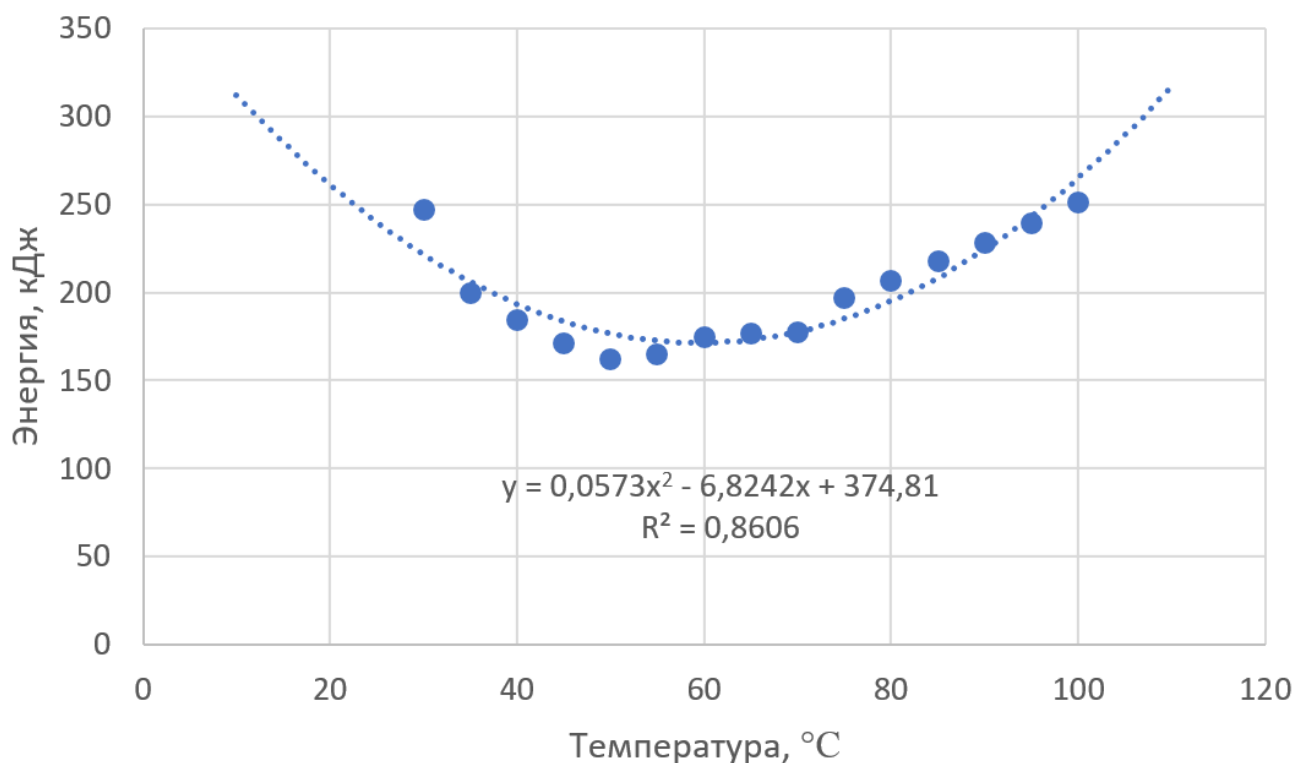


Рисунок 2.1 – Кривая зависимости затрат энергии на получение ДКВ/ЛИЗ_п от температуры

2.3. Лиофилизаты

Все мольные соотношения продуктов гриндинга, для которых продемонстрировано увеличение растворимости в воде до «очень легко растворим», были использованы для получения лиофилизатов. При этом разведение осуществляли в десятикратном объеме (от массы взятой навески продукта сухого гриндинга) воды дистиллированной, что позволяло достичь невысокой вязкости раствора. В результате установлено, что при использовании соотношений 1:5 и 1:10, получаемый продукт представляет из себя низкодисперсную твердую пену (Рисунок 2.2), что также было характерно для продукта сублимационной сушки чистого L-лизина. В то же время, лиофилизат продукта гриндинга с мольным соотношением 1:2 является легкой губчатой пористой структурой более высокой дисперсности насыщенного желтого цвета, что выгодно отличает его от лиофилизатов исходных веществ. В связи с этим для дальнейших исследований было выбрано данное соотношение компонентов.



Рисунок 2.2 – Продукт лиофилизации смеси ДКВ– L-лизин (1:5, моль)

2.4. Выводы по главе 2

1. Выявлено наиболее перспективное для дальнейших исследований с точки зрения растворимости в воде при комнатной температуре мольное соотношение 1:2 между ДКВ и L-лизином при проведении сухого гриндинга.
2. Установлена оптимальная по затратам времени и энергии температура получения пленок – 65 °С.
3. Обнаружено, что лиофилизаты продуктов сухого гриндинга с соотношением компонентов 1:5 и 1:10 по макроскопическим характеристикам сходны с продуктом лиофилизации чистого L-лизина.
4. Отмечено, что при лиофилизации водного раствора продукта сухого гриндинга с мольным соотношением компонентов 1:2 макроскопическая структура получаемых объектов резко отличается от продуктов сублимационной сушки индивидуальных компонентов, что делает ее наиболее интересной для дальнейшего изучения.

5. Получены композиции ДКВ с L-лизином методами сухого гриндинга, сушки на полимерной подложке и лиофилизации, представляющие интерес для дальнейшего изучения.
6. Запатентован способ повышения растворимости и биодоступности флавоноидов путем получения модификаций с L-лизином (Приложение А).

ГЛАВА 3. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОДИФИКАЦИЙ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА И L-ЛИЗИНА

Органолептический анализ позволяет осуществить визуальное описание исследуемых объектов, что соответствует рекомендациям ГФ РФ XV, изложенным в ОФС.1.1.0006 «Субстанции для фармацевтического применения» (эквивалентно ОФС 2.3.6.0. «Раздел «Свойства» в частных фармакопейных статьях» Фармакопеи ЕАЭС). В дополнение к нему, применение сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в соответствии с ОФС.1.2.1.0001 «Сканирующая электронная микроскопия» (ГФ РФ XV) способствует установлению морфологии поверхности, что достигается большей разрешающей способностью по сравнению с оптической микроскопией.

После этого требуется изучить природу наблюдаемой фазы, для чего необходимо применение метода рентгеновской порошковой дифракции (РПД) в соответствии с ГФ РФ XV ОФС.1.2.1.0032 «Рентгеновская порошковая дифрактометрия», являющегося «золотым стандартом» для данного вида исследований. В дополнение к нему идут методы термического анализа, включающими термогравиметрический анализ (ТГ) и дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК), в соответствии с ОФС.1.2.1.2.0010 «Термический анализ» (ГФ РФ XV) и ОФС 2.1.2.46. «Термический анализ» (Фармакопея ЕАЭС). Эти подходы позволяют за счет фазовых переходов дополнить данные РПД сведениями о превращениях, протекающих в исследуемых объектах при изменении температуры систем, а также оценить их стабильность при охлаждении и нагревании.

В то же время требуется установить химическую природу новых объектов, для чего применяются спектральные методы анализа в соответствии с ГФ РФ XV ОФС.1.2.1.1.0003 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» (ОФС 2.1.2.24. «Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» Фармакопеи ЕАЭС), ГФ РФ XV ОФС.1.2.1.1.0002

«Спектрометрия в средней инфракрасной области» (ОФС 2.1.2.23. «Абсорбционная спектрофотометрия в инфракрасной области» Фармакопеи ЕАЭС), ГФ РФ XV ОФС.1.2.1.1.0007 «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса» (ОФС 2.1.2.45. «Спектрометрия ядерного магнитного резонанса» Фармакопеи ЕАЭС), позволяющие подтвердить молекулярное строение синтезированных структур.

В результате формируется комплексное представление о новых объектах и их свойствах (термическая стабильность, морфология, строение фазы и ее химическая природа), опираясь на которые в дальнейшем будет возможно разработать и научно обосновать нормируемые показатели и методы контроля качества, а также выбрать оптимальную лекарственную форму и технологию ее получения, включая, но не ограничиваясь температурным режимом, использованием различных растворителей и вспомогательных веществ.

3.1. Макро- и микроскопическая структура

3.1.1. Органолептическое описание

ДКВ_{исх} представляет собой мелкокристаллическое вещество светлоскремового цвета с характерным древесным запахом. При растирании в ступке визуальных изменений не наблюдается.

ЛИЗ_{исх} является гранулярным порошком светлого оранжево-желтого цвета со специфическим аммиачным запахом. При растирании в ступке происходит разрушение гранул и формирование пластичной субстанции светло-желтого цвета.

Продукт сухого гриндинга ДКВ и L-лизина в соотношении 1:2 по молям (ДКВ/ЛИЗ_г) представляет собой порошок кремового цвета с желтоватым оттенком и слабым древесным запахом. При длительном растирании приобретает более яркий желтый окрас.

Лиофилизат ДКВ (ДКВ_л) представляет собой легкую пористую волокнистую структуру, формирующую частицы шаровидной формы светло-кремового цвета.

Лиофилизат L-лизина (ЛИЗ_л) характеризуется тонкой прозрачной хрупкой структурой пузырьковых кластеров светло-оранжевого цвета.

Лиофилизат продукта сухого гриндинга ДКВ и L-лизина (ДКВ/ЛИЗ_л) представляет собой губчатую пористую структуру насыщенного светло-желтого цвета (Рисунок 3.1А). При сдавливании или растирании легко диспергируется до мелкодисперсного порошка.

Пленки на основе продукта сухого гриндинга ДКВ и L-лизина (ДКВ/ЛИЗ_п) характеризуются хрупкой прозрачной пленчатой структурой от желтого до насыщенно-оранжевого цвета в зависимости от толщины пленки (Рисунок 3.1Б).

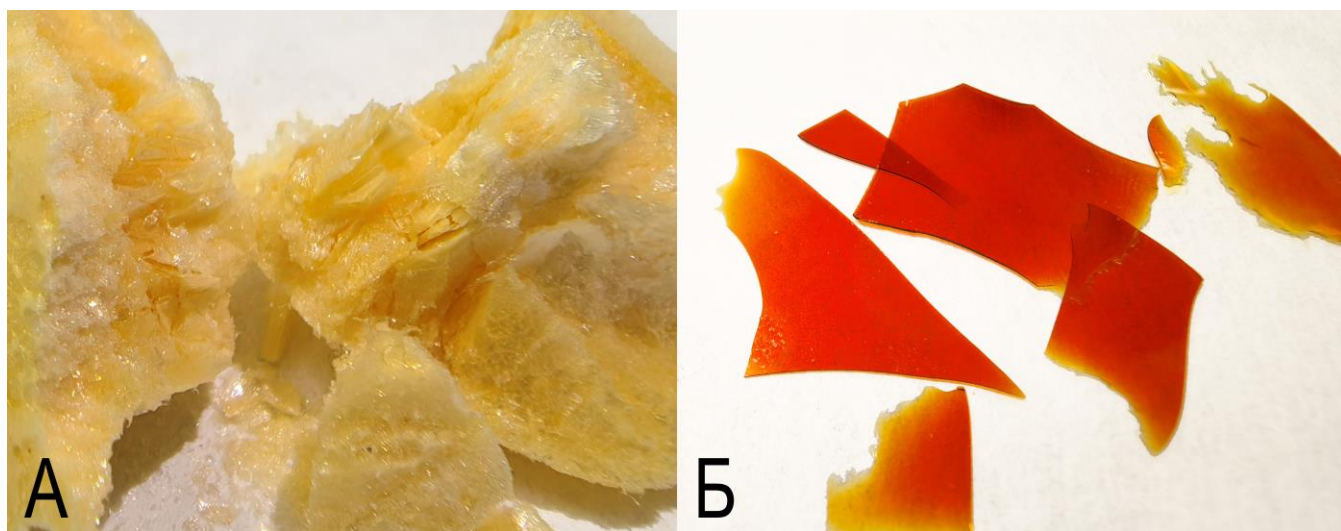


Рисунок 3.1 – Внешний вид полученных объектов: А – ДКВ/ЛИЗ_л, Б – ДКВ/ЛИЗ_п

3.1.2. Микроскопическая морфология

При микроскопическом рассмотрении на большом увеличении ДКВ_{исх} выглядит как отдельные четырехгранные остроконечные стержневидные частицы различного размера: примерно $21,0 \pm 6,7$ нм в длину и $5,2 \pm 2,7$ нм в ширину (Рисунок 3.2). При меньшем увеличении ($\times 30$) отчетливо видно, что данные частицы собраны в крупные агломераты размером $165,0 \pm 42,1$ на $125,0 \pm 33,5$ нм.

В ДКВ_л подобные стержневые структуры характеризуются большим размером, достигая $33,0 \pm 14,0$ и $6,5 \pm 2,5$ нм в длину и ширину, соответственно. На увеличении $\times 2000$ отчетливо визуализируются полые сферические элементы с гладкой поверхностью. Их диаметр составлял около $3,0 \pm 0,8$ нм, с перфорациями примерно в 1 нм. Помимо этого, заметно появление ворсистых структурных элементов длиной $16,1 \pm 4,4$ и шириной $7,7 \pm 2,9$ нм, а также тонких пластинок с гладкими контурами и отверстиями размером $1,6 \pm 0,4$ нм.

Частицы ЛИЗ_{исх} можно описать как сглаженные, сморщенные структуры различной формы размером от $131,25 \pm 78,4 \times 125,0 \pm 84,9$ до $808,3 \pm 351,0 \times 475,0 \pm 185,5$ нм, образованные агломерацией фрагментов размером $12,4 \pm 4,0 \times 11,3 \pm 3,6$ нм.

ЛИЗ_л представлял собой гладкие стеклообразные структуры с неровным шероховатым краем и плоской поверхностью размером от $470,0 \pm 80,0 \times 300,0 \pm 102,8$ до $1480,0 \pm 589,3 \times 650,0 \pm 212,5$ нм. Также на поверхности визуализируются редкие отверстия диаметром около 90,0 нм с неровным краем.

ДКВ/ЛИЗ_г выглядела как смесь исходных компонентов. В структуре четко визуализировались островки различной формы как у ЛИЗ_{исх} с размерами $197,5 \pm 72,5$ и $145,0 \pm 29,9$ нм в длину и ширину, соответственно, образованные агломератами частиц с множеством мелких фрагментов размером $22,5 \pm 3,9 \times 14,4 \pm 5,4$ нм, напоминающих ДКВ_{исх}. Однако, при рассмотрении на более мелком увеличении смесь в большей степени напоминала ДКВ_{исх}.

ДКВ/ЛИЗ_л представлял собой образования размером $565,0 \pm 273,7$ на $280,0 \pm 94,9$ нм с тонкими гладкими стенками и перфорированием по всей поверхности. Отверстия имели ровные края и характеризовались различным радиусом в зависимости от плоскости, на которой они расположены: полукруглые и мелкие перфорации, диаметром $3,5 \pm 1,0$ нм, располагались перпендикулярно по отношению к поверхности с крупными, диаметром $13,5 \pm 2,9$ нм, которые проходили насквозь через всю твердую фазу. По характеру пор и их размеру, данный объект можно охарактеризовать как мезопористый материал [134].

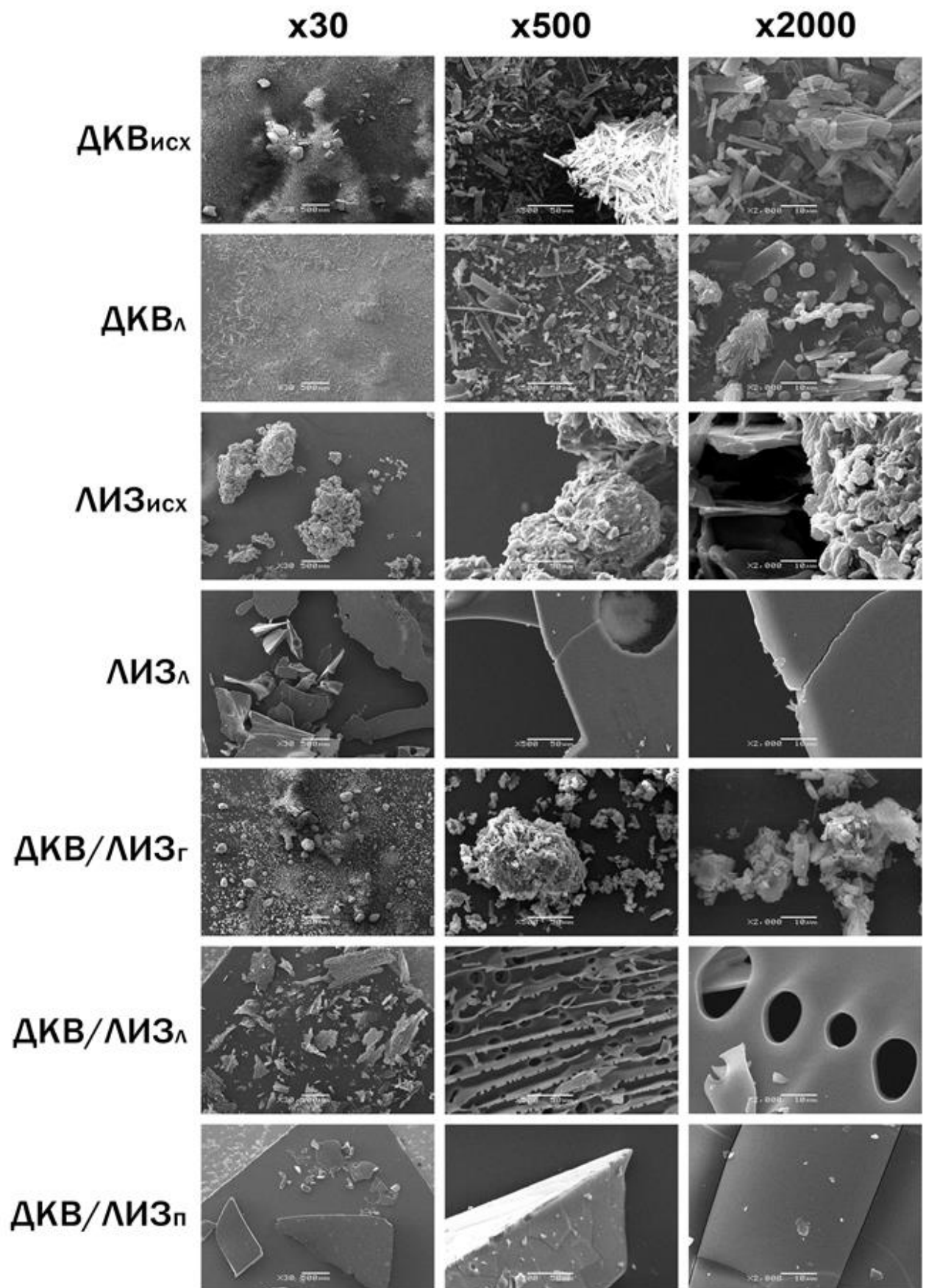


Рисунок 3.2 – Микрофотографии полученных объектов

ДКВ/ЛИЗ_п походили на небольшие частицы стекла размером $555,0 \pm 388,0$ на $409,0 \pm 257,4$ нм с рядом прямых трещин длиной $44,5 \pm 8,8$ нм и ровными срезами по краям. Вся поверхность структуры испещрена мелкими сколами размером $2,0 \pm 0,8$ нм.

Таким образом, каждый из полученных объектов характеризуется уникальной морфологией на макро- и микроуровне.

3.2. Строение твердой фазы

3.2.1. Фазовое состояние

Дифракционный профиль ДКВ_{исх} характеризуется набором пиков с следующими значениями 2θ : $7,2^\circ$; $7,7^\circ$; $12,8^\circ$; $14,3^\circ$; $15,0^\circ$; $15,5^\circ$; $16,7^\circ$; $17,6^\circ$; $18,0^\circ$; $18,3^\circ$; $19,2^\circ$; $20,1^\circ$; $21,0^\circ$; $22,7^\circ$; $23,5^\circ$; $24,4^\circ$; $24,9^\circ$; $25,6^\circ$; $26,3^\circ$; $26,7^\circ$; $27,4^\circ$; $28,4^\circ$; $28,9^\circ$ и $31,7^\circ$ (Рисунок 3.3А). Наличие большого количества четко оформленных индивидуальных пиков свидетельствует о кристаллическом фазовом строении исходной субстанции и соотносится с предыдущими исследованиями [33, 188]. В соответствии с классификацией, предложенной Meng et al., данную полиморфную модификацию можно отнести к форме III [213].

ЛИЗ_{исх} также представлял собой кристаллическую субстанцию и характеризовался набором пиков с следующими значениями 2θ : $8,6^\circ$; $13,4^\circ$; $15,4^\circ$; $17,2^\circ$; $19,6^\circ$; $20,0^\circ$; $21,4^\circ$; $23,5^\circ$; $25,9^\circ$; $28,7^\circ$; $30,0^\circ$; $31,0^\circ$; $32,7^\circ$; $33,7^\circ$; $34,7^\circ$; $37,1^\circ$; $40,2^\circ$; $41,5^\circ$ и $43,8^\circ$ (Рисунок 3.3Б), что коррелирует с более ранними работами, посвященными изучению данного соединения этим методом [211]. Полиморфизм для моногидратной формы L-лизина не описан, хотя существует псевдополиморфная модификация в виде гемигидрата [204].

Дифракционные паттерны полученных объектов резко отличаются от исходных соединений: на них исчезают индивидуальные резко очерченные пики и появляется «аморфное гало», которое свидетельствует об аморфной структуре. Для ДКВ/ЛИЗ_л его максимум достигается при 2θ равном $22,3^\circ$ (Рисунок 3.3В), а

для ДКВ/ЛИЗ_п при 22,2° (Рисунок 3.3Г). Разность между значениями $2\theta \leq 0,1$ свидетельствует о схожести строения аморфной фазы в изучаемых образцах.

Таким образом, в процессе совместной лиофилизации исходных компонентов и при сушке раствора ДКВ/ЛИЗ_г происходил переход от кристаллического исходного состояния в аморфное. Важно отметить, что подобное аморфное состояние остается стабильным при хранении при комнатной температуре, что подтверждается сохранением «аморфного гало» по истечении 9 месяцев хранения (Рисунок 3.3Д и Рисунок 3.3Е) и свидетельствует об отсутствии рекристаллизации, что характерно для ряда веществ аморфного строения.

Таким образом полученные объекты (ДКВ/ЛИЗ_л и ДКВ/ЛИЗ_п) можно охарактеризовать как коаморфные системы [9, 10]. Получение таких структур способствует модификации физико-химических свойств действующих веществ, в том числе их растворимости, а также стабильности при хранении. Ранее для антигипертензивного средства карведилола методом распылительной сушки получена подобная форма с аспарагиновой и глутаминовой кислотами [125]. J. Liu et al. продемонстрировали, что образование конечного продукта сопряжено с кислотно-основными взаимодействиями между исходными компонентами, что послужило базой для образования новой твердой фазы. Также, формирование коаморфных систем обнаружено при совместном измельчении в шаровой мельнице противогрибкового препарата гризеофульвина с различными аминокислотами [51], благодаря чему авторам удалось значительно повысить стабильность и растворимость полученных объектов, особенно при использовании триптофана в качестве коформера.

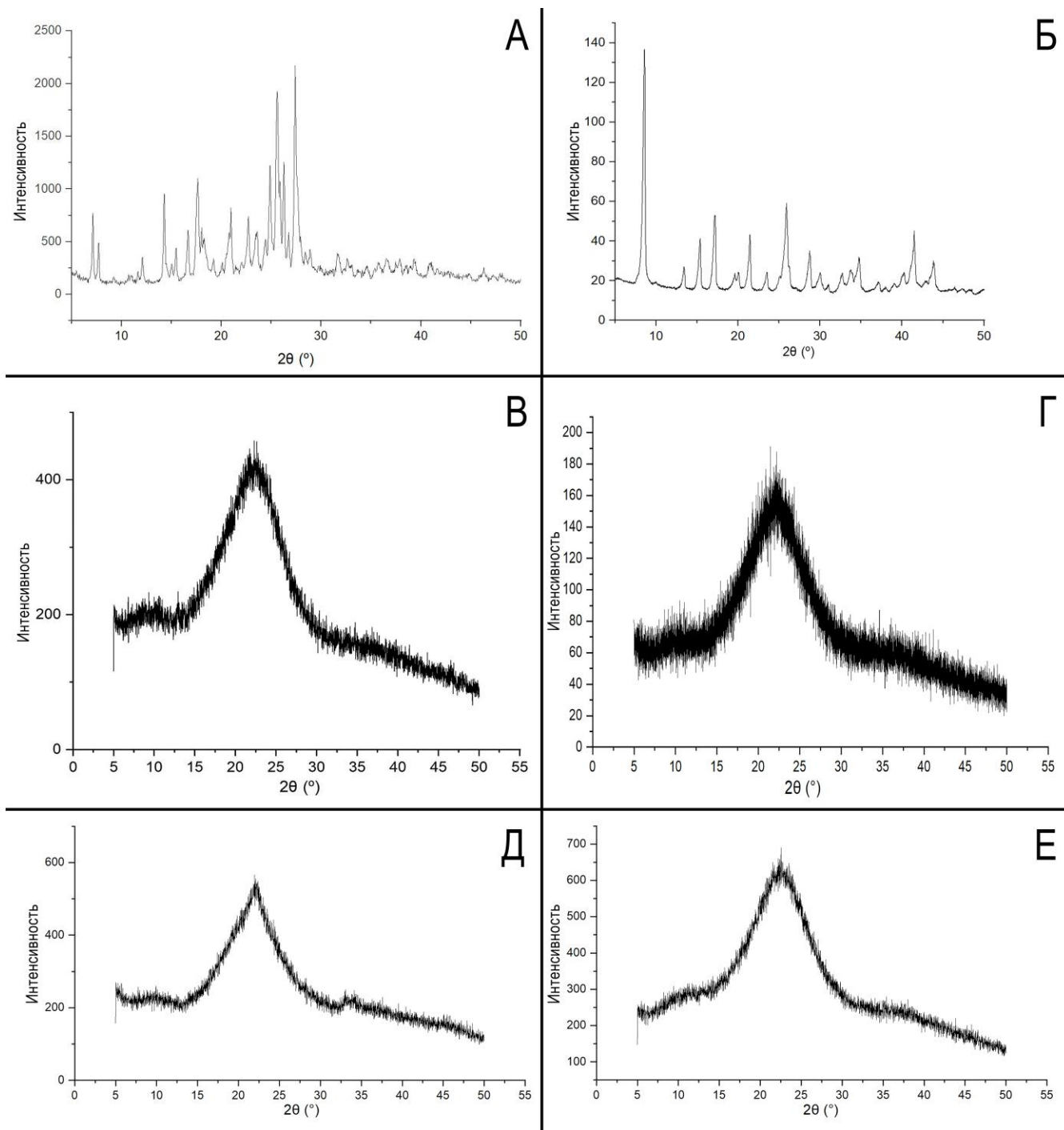


Рисунок 3.3 – Дифрактограммы: А – ДКВ_{исх}, Б – ЛИЗ_{исх}, В – ДКВ/ЛИЗ_л, Г – ДКВ/ЛИЗ_п, Д – ДКВ/ЛИЗ_л после 9 месяцев хранения, Е – ДКВ/ЛИЗ_п после 9 месяцев хранения

3.2.2. Термические фазовые переходы

Термический анализ осуществляли сочетанием методов ТГ и ДСК, что позволяло сформировать комплексное представление о фазовых переходах, протекающих при нагревании.

На ДСК-кривой ДКВ_{исх} (Рисунок 3.4А) присутствует широкий эндотермический эффект до 130 °С и максимумом при 89 °С, сопровождающийся медленной потерей массы на ТГ-кривой из-за удаления воды из образца [203]. Экзотермический эффект при 139 °С связан с переходом аморфной части ДКВ_{исх} в кристаллическую [105]. Дальнейшее нагревание приводило к плавлению при 233 °С с последующим разложением.

На ДСК-кривой ЛИЗ_{исх} (Рисунок 3.4Б) наблюдаются два выраженных эндотермических эффекта в диапазоне 40-100 °С, сопровождающихся потерей массы на ТГ-кривой. Это объясняется последовательным переходом моногидрата к гемигидрату, а затем к безводной форме лизина. При 214 °С образец плавился с дальнейшим разложением.

Экспериментальная ДСК-кривая для ДКВ/ЛИЗ_г (Рисунок 3.4В) практически идентична суперпозиции отдельных ДСК-кривых для индивидуальных веществ с учетом их мольного соотношения 1:2. Таким образом, подтверждено отсутствие взаимодействия между исходными компонентами при их смешении в ступке.

На ДСК-кривой ДКВ/ЛИЗ_п (Рисунок 3.4Г) исчезают тепловые эффекты, связанные с потерей кристаллизационной влаги, что объясняется способом получения данных образцов, включающим высушивание. Это дополнительно подтверждается меньшей потерей массы данных образцов (Рисунок 3.4Д) при нагреве в пределах 100 °С по сравнению с исходными индивидуальными веществами. В то же время появляется эндотермический эффект с максимумом при 62,9 °С, указывающий на фазовый переход второго рода, который может быть интерпретирован как процесс стеклования образца.

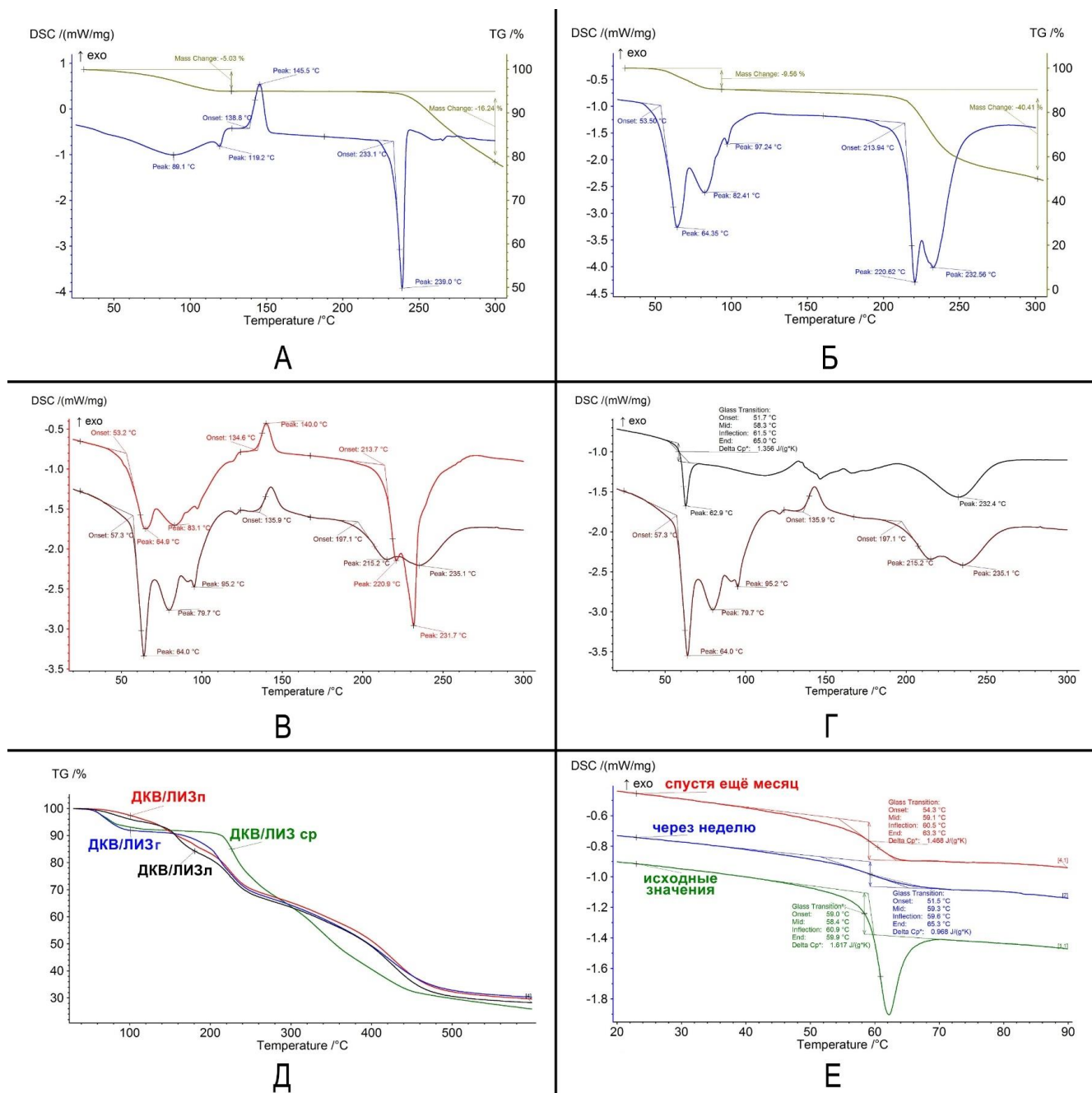


Рисунок 3.4 – Термограммы: А – ДКВ_{исх}; Б – ЛИЗ_{исх}; В – ДКВ/ЛИЗ_Г (коричневый), расчётная ДСК-кривая для смеси ДКВ_{исх} и ЛИЗ_{исх} 1:2 по молям (красный); Г – ДКВ/ЛИЗ_Г (коричневый), ДКВ/ЛИЗ_П (черный); Д – ДКВ/ЛИЗ_Г (синий), ДКВ/ЛИЗ_П (красный); ДКВ/ЛИЗ_Л (черный); расчётная ТГ-кривая для смеси ДКВ_{исх} и ЛИЗ_{исх} 1:2 по молям (зеленый); Е – термоциклирование ДКВ/ЛИЗ_П

Для дополнительного изучения природы эндотермического эффекта у ДКВ/ЛИЗ_П данный образец был подвергнут термическому циклированию с непрерывным старением при комнатных условиях. В ходе повторных нагревов через неделю и через месяц установлено, что значение T_{mid} (среднее значение температуры эффекта) остается практически постоянным, а изменение

теплоемкости приближается к исходному значению, что свидетельствует о кумулятивном эффекте и подтверждает наличие процесса стеклования (Рисунок 3.4Е) [39]. В целом, данное явление редко встречается у флавоноидов и по литературным данным оно было продемонстрировано для нарингенина после распылительной сушки, где температура данного фазового перехода составила около 93 °С [59].

Таким образом, было установлено, что полученные модификации ДКВ_{исх} с протеиногенной аминокислотой L-лизином в виде пленок и лиофилизатов представляют из себя новую аморфную фазу, и в дальнейшем представляет интерес изучить химические аспекты ее формирования с целью установления природы взаимодействия между исходными компонентами при образовании таких структур.

3.3. Спектральный анализ

Анализ выполняли с применением методов УФ-спектрофотометрии, спектроскопии ЯМР ¹Н и ИК-спектроскопии. Подобное комплексное изучение позволило осуществить всестороннее описание химической природы формирования новой фазы у исследуемых объектов.

3.3.1. Хромофорная система

УФ-спектры ДКВ_{исх}, снятые в 96% этиловом спирте (EtOH), характеризуются единственным максимумом поглощения при длине волны $\lambda=288$ нм и плечом в районе $\lambda=320-325$ нм, что соотносится с литературными данными [207]. Данный спектральный профиль обусловлен наличием в молекуле ДКВ двух изолированных хромофорных систем, а также фенольных гидроксильных групп, находящихся в положениях 5, 7, 3', 4', выполняющих роль ауксохромов и вступающих в р,π-сопряжение с ароматическими фрагментами.

Поскольку полученные объекты не растворяются в EtOH, то их спектры снимали в воде деионизированной. Для ДКВ/ЛИЗ_г, ДКВ/ЛИЗ_л, ДКВ/ЛИЗ_п спектры характеризовались максимум поглощения при $\lambda=288$ нм и выраженным плечом при $\lambda=324$ нм (Рисунок 3.5). Увеличение интенсивности плеча обусловлено сменой растворителя, что возможно приводит к ионизации, которую можно объяснить кислотно-основными взаимодействиями фенольных гидроксильных групп с основными центрами аминокислоты. При этом, раствор композиций ДКВ с L-лизином характеризовался желто-оранжевым цветом.

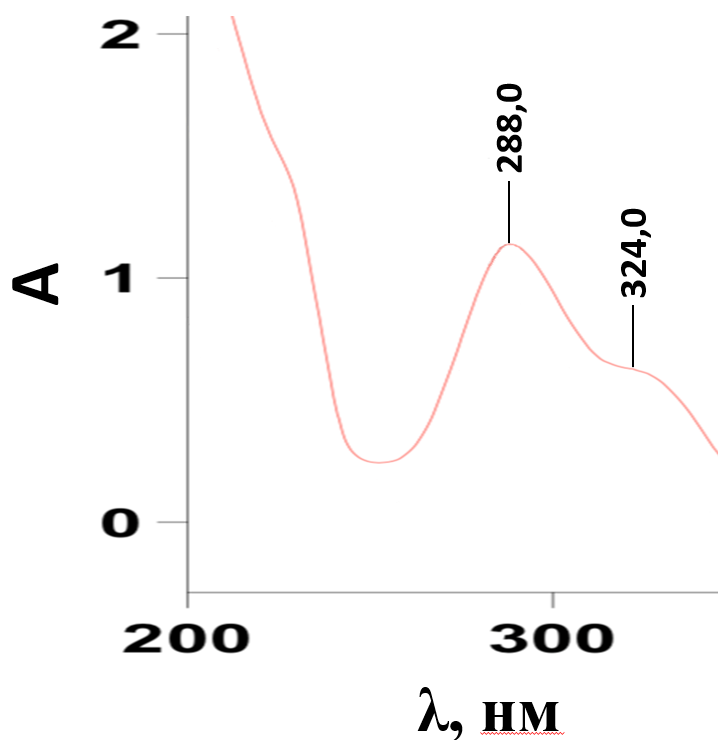


Рисунок 3.5 – УФ-спектр ДКВ/ЛИЗ_г в воде очищенной: концентрация в пересчете на ДКВ 0,024 мг/мл ($7,89 \times 10^{-5}$ моль/л)

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об ионизации молекул ДКВ в процессе получения коаморфных модификаций с L-лизином в виде пленок и лиофилизата.

3.3.2. Функциональный анализ

ИК-спектры снимали методом нарушенного полного внутреннего отражения, позволяющим осуществлять изучение с сохранением фазы анализируемых субстанций, а также изучать межмолекулярные взаимодействия без влияния растворителя. Дополнительными преимуществами этого подхода является отсутствие пробоподготовки, что сокращает время, затрачиваемое на проведение исследования.

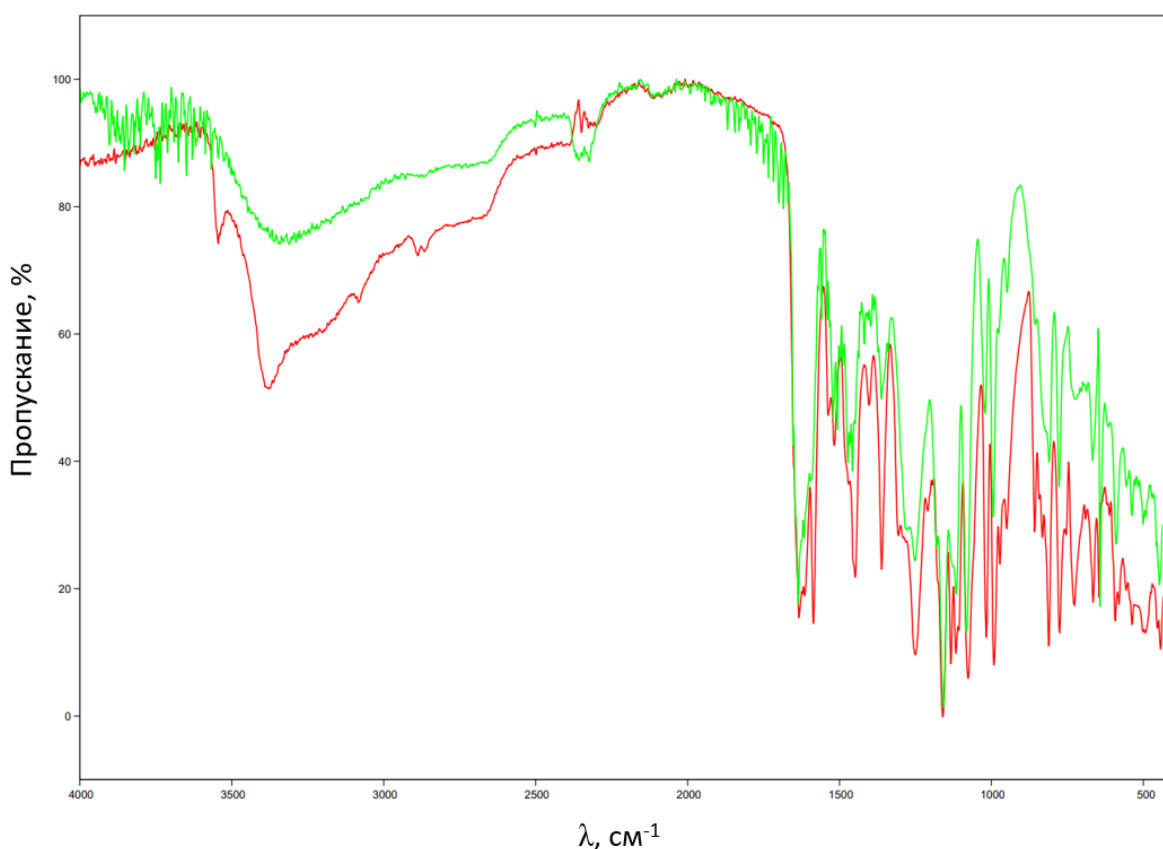


Рисунок 3.6 – ИК спектры ДКВ_{исх} (красный) и ДКВ_л (зеленый)

ИК-спектр ДКВ_{исх} (Рисунок 3.6) соответствовал литературным данным по характеристическим полосам поглощения [192]: $\nu_{\max}$, (cm^{-1}) 3380 (ν , O-H), 3083 (ν , C_{Ar}-H), 1633 (ν , C=O), 1517 (ν , C_{Ar}-C_{Ar}), 1446 (ν , C_{Ar}-C_{Ar}), 1402 (ν , C_{Ar}-C_{Ar}), 1250 (ν , C-O-C). При этом, в спектре ДКВ_л наблюдали сглаживание в «области водородных связей», интерпретируемое как уменьшение

количества свободных валентных колебаний О-Н ($3650\text{--}3580\text{ см}^{-1}$) и увеличение связанных колебаний О-Н ($3550\text{--}3200\text{ см}^{-1}$), что связано с образованием водородных связей при аморфизации исходного кристаллического вещества. В этом случае, возникающие взаимодействия могут быть двух типов: межмолекулярными и внутримолекулярными, в том числе между фенольной гидроксильной группой в положении 5 (ОН5) или вторичной спиртовой группой в положении 3 (ОН3) и карбонильной группой (C=O) бензопиранонового кольца [84]. В литературе описаны сходные спектральные изменения при аморфизации индометацина [34].

По характеристическим полосам поглощения ИК-спектр ЛИЗ_{исх} (Рисунок 3.7) совпадал с известными литературными данными [208]: $\nu_{\max}$, (см^{-1}) 2925 (ν , C-H), 2854 (ν , C-H), 2655 (ν , COO-H). Широкая полоса в области $3100\text{--}2600\text{ см}^{-1}$ соответствует валентным колебаниям протонированной аминогруппы. В процессе лиофилизации L-лизина происходили изменения в спектральном профиле, аналогичные ДКВ.

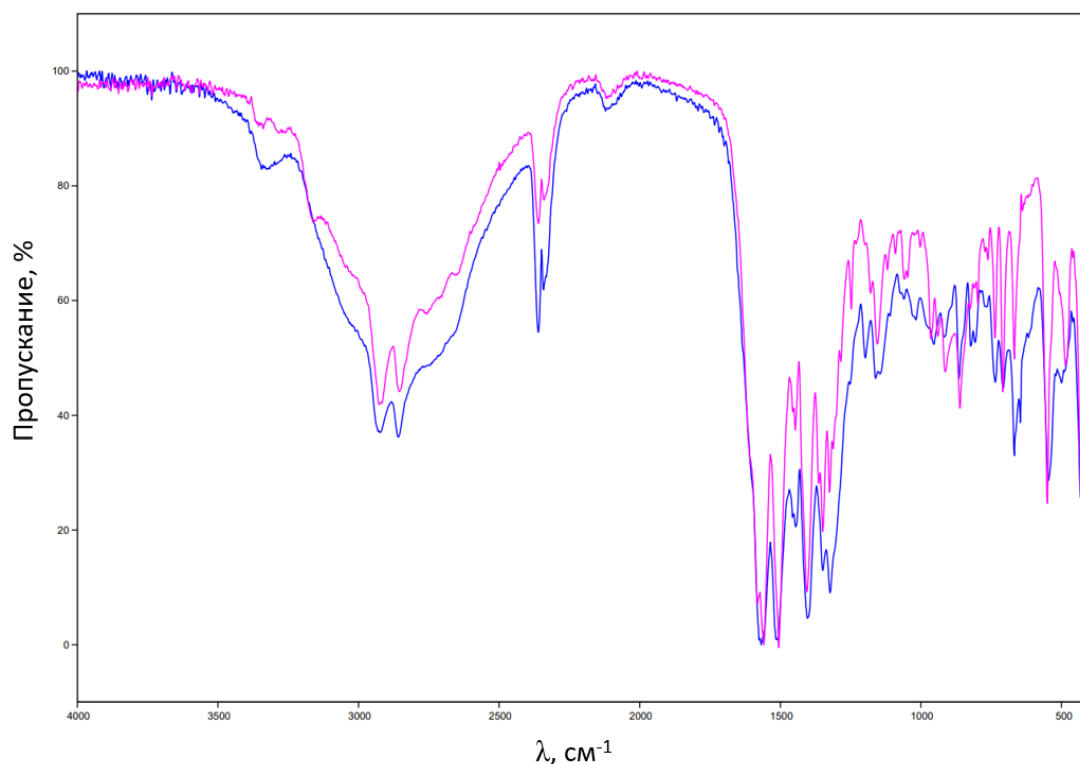


Рисунок 3.7 – ИК спектры ЛИЗ_{исх} (розовый) и ЛИЗ_л (синий)

ИК-спектр ДКВ/ЛИЗ_г (Рисунок 3.8) характеризовался полосами поглощения, совпадающими с профилем обоих исходных соединений, что позволяет предположить отсутствие формирования новых ковалентных связей и процессе совместного гридинга. Однако наблюдалось заметное уменьшение разрешения между полосами поглощения в «области водородных связей», вероятно, вызванное образованием водородных связей между аминогруппами аминокислоты и фенольными гидроксильными группами флавоноида. Данное предположение подтверждало визуальное наблюдение во время измельчения: смесь начала приобретать желтовато-оранжевый оттенок, что могло быть вызвано образованием водородных связей или ионизацией фенольных гидроксильных групп ДКВ.

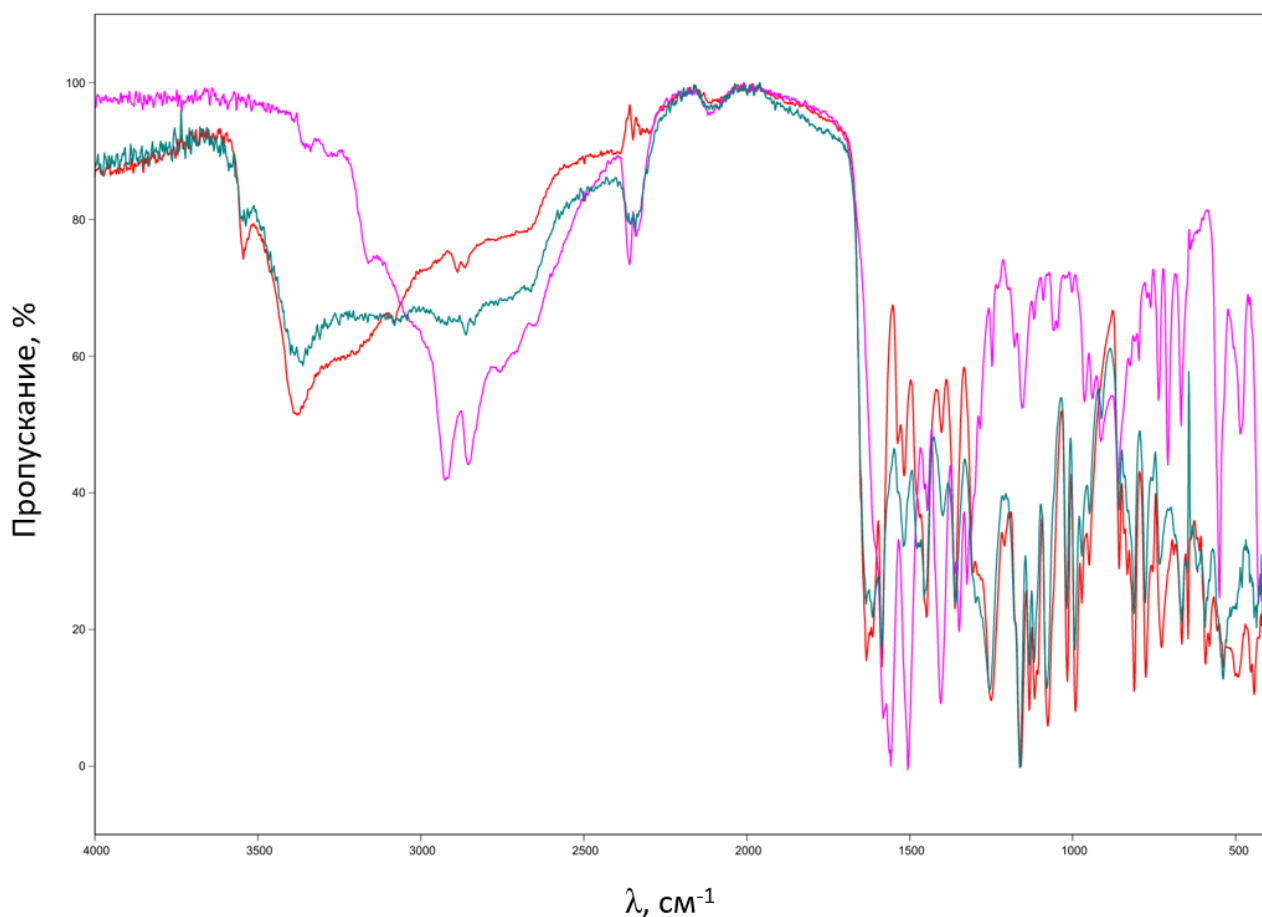


Рисунок 3.8 — ИК спектры ДКВ_{исх} (красный), ЛИЗ_{исх} (розовый) и ДКВ/ЛИЗ_г (бирюзовый)

В спектрах ДКВ/ЛИЗ_л и ДКВ/ЛИЗ_п (Рисунок 3.9) не наблюдалось заметных отличий по сравнению с ДКВ/ЛИЗ_г. Все спектральные изменения ограничивались «областью водородных связей», на что помимо их количества в различных модификациях также могло повлиять различное содержание влаги в анализируемых образцах [43]. Поэтому можно сделать вывод, что образование коаморфных продуктов происходило без формирования новых ковалентных связей между исходными веществами.

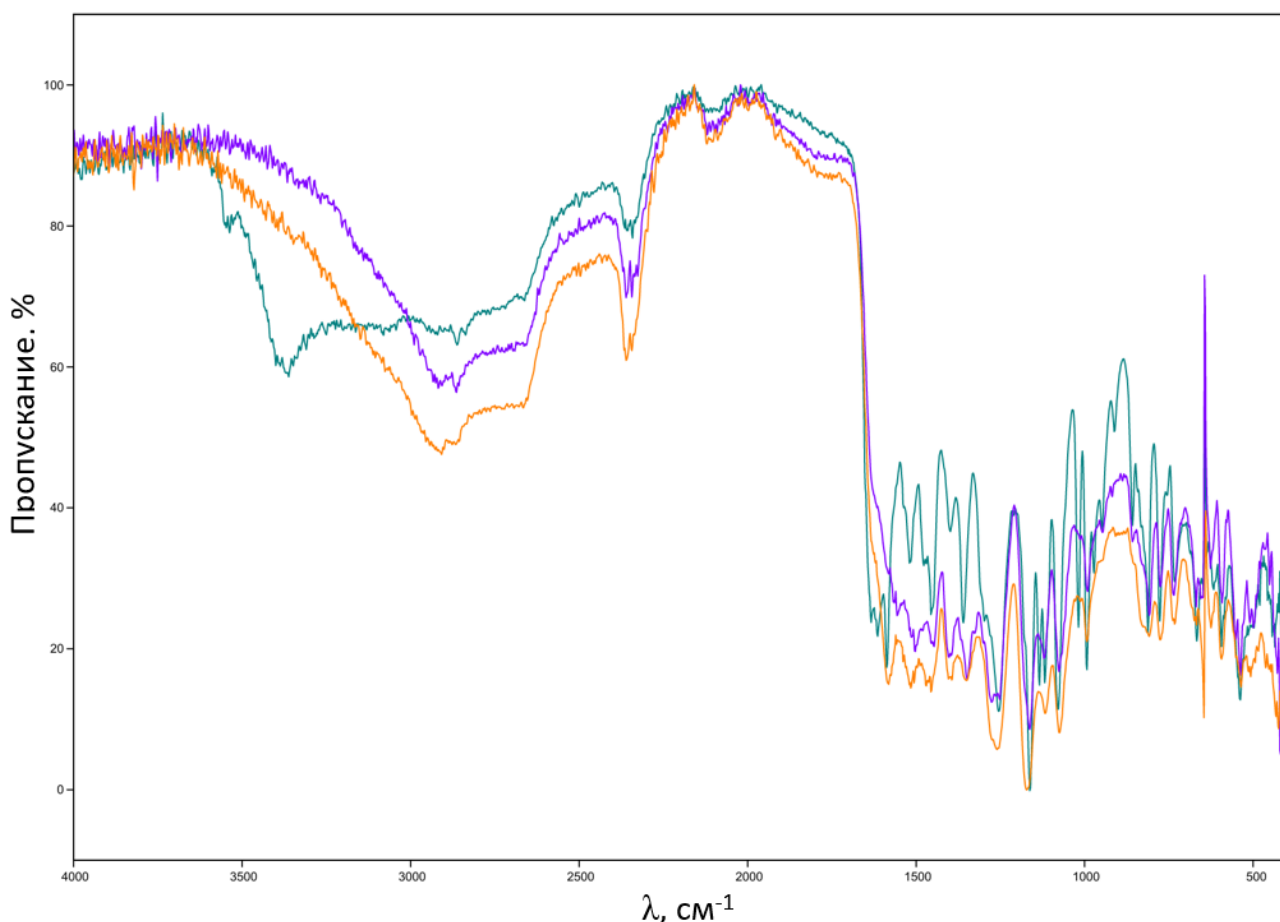


Рисунок 3.9 – ИК спектры ДКВ/ЛИЗ_г (бирюзовый), ДКВ/ЛИЗ_л (фиолетовый) и ДКВ/ЛИЗ_п (оранжевый)

3.3.3. Молекулярная структура

Для более надежного подтверждения молекулярного строения изучаемых композиций анализу арбитражным методом ЯМР ¹H был подвергнут ряд

образцов: ДКВ_{исх} (растворитель – DMSO-*d*₆), ЛИЗ_{исх} (растворитель – D₂O) и ДКВ/ЛИЗ_п (растворитель – D₂O).

В результате установлено отсутствие сигналов всех фенольных гидроксильных групп (ОН5, ОН7, ОН3', ОН4') в образце ДКВ/ЛИЗ_п (Таблица 3.1). Эти данные подтверждают предположения о возможности образования водородных связей между исходными компонентами. Все другие сигналы протонов ДКВ и L-лизина остались без изменений, а новых – не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии формирования новых ковалентных связей [12].

Таблица 3.1 – Соотнесение сигналов ЯМР ¹H

Источник сигнала		Значение химического сдвига		Мультиплетность
Молекула	Протон	Исходные соединения	ДКВ/ЛИЗ _п	
ДКВ	ОН5	11,8	н/д	Синглет
	ОН7	10,8	н/д	Синглет
	ОН4'	9,1	н/д	Синглет
	ОН3'	9,0	н/д	Синглет
	Н2'	7,0	7,1	Синглет
	Н5' Н6'	6,9	6,9	Синглет
	Н6	5,9	5,8	Дублет
	Н8	5,8	5,8	Дублет
	Н2	5,0	5,0	Дублет
	ОН3	4,6	4,3	Синглет
	Н3	4,5	4,8	Дублет
L-лизин	Н2	3,4	3,4	Мультиплет
	Н6	2,9	3,0	Триплет
	Н3 Н5	1,7	1,8 1,7	Мультиплет
	Н4	1,4	1,5	Мультиплет

Таким образом, процесс получения ДКВ/ЛИЗ_п и ДКВ/ЛИЗ_л можно охарактеризовать как супрамолекулярный синтез коаморфных фазовых модификаций исходного флавоноида.

3.4. Количественный анализ примеси тяжелых металлов

Результаты оценки количественного содержания примеси тяжелых металлов в ДКВ/ЛИЗ_л, представлены в Таблице 3.2. Выбор данного образца для анализа обусловлен наибольшим количеством технологических операций, во время которых могло произойти изменение их содержания в конечном продукте.

Таблица 3.2 – Содержание тяжелых металлов в образце ДКВ/ЛИЗ_л

Элемент	Метод определения	Содержание, мг/кг	Предельно-допустимое содержание, мг/кг
Pb	Атомно-эмиссионная спектрометрия	0,3996±0,0577	6,0
As	Атомно-эмиссионная спектрометрия	Менее 0,025	0,5
Cd	Атомно-эмиссионная спектрометрия	Менее 0,025	1,0
Ni	Атомно-эмиссионная спектрометрия	1,0605±0,1591	Не установлено
Hg	Атомно-абсорбционная спектрометрия	0,0470±0,0047	0,1

При сравнении полученных данных с требованиями, предъявляемыми ГФ РФ XV OFC.1.5.3.0009 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» и OFC 2.1.4.21. «Тяжелые металлы и мышьяк в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» в рамках Фармакопеи ЕАЭС

установлено, что содержание ртути, мышьяка, кадмия и свинца находится в допустимых пределах. При этом нормирование никеля в рамках данной ОФС не происходит.

3.5. Выводы по главе 3

1. Выявлена мезопористая структура у ДКВ/ЛИЗ_п и стеклообразное строение у ДКВ/ЛИЗ_л.
2. Определено, что ДКВ/ЛИЗ_п и ДКВ/ЛИЗ_л представляют собой бикомпонентные монофазные аморфные системы, которые можно охарактеризовать как коаморфы.
3. Установлено стабильное при хранении в комнатных условиях коаморфное фазовое строение полученных модификаций.
4. Обнаружен у ДКВ/ЛИЗ_п процесс стеклования при 62,9 °С, отсутствующий у исходных веществ и ранее описанных их модификаций.
5. Отмечено, что формирование новой фазы протекает без изменения хромофорной системы и возникновения новых ковалентных связей между исходными веществами, что позволяет отнести полученные объекты к продуктам супрамолекулярного синтеза.
6. Продемонстрировано, что формирование новых коаморфных модификаций происходит за счет образования межмолекулярных водородных связей между исходными веществами.
7. Установлено, что в полученных объектах содержание тяжелых металлов, нормируемых в рамках ГФ РФ XV ОФС.1.5.3.0009 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» и ОФС 2.1.4.21. «Тяжелые металлы и мышьяк в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» по Фармакопее ЕАЭС, находится в допустимых пределах.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА

Необходимым этапом фармацевтической разработки является оптимизация и валидация методик количественного анализа действующих веществ будущей субстанции. При этом, важно уделить внимание возможности экспресс-анализа, что позволит осуществлять контроль качества с минимальными затратами времени и ресурсов на относительно дешевом и простом в обращении оборудовании. Поскольку ДКВ характеризуется наличием выраженной хромофорной системы представляется возможным разработка методик с применением УФ-спектрофотометрии.

4.1. Экспресс-анализ дигидрокверцетина на базе УФ-спектрофотометрии

В качестве основного метода для экспресс-анализа ДКВ в составе ДКВ/ЛИЗ_г был выбран метод спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях спектра, рекомендованный ОФС.1.8.0009 «Экспресс-анализ лекарственных препаратов аптечного изготовления». Данный метод обеспечивает высокую точность и чувствительность, при этом не требуя трудоемкой пробоподготовки и специального обучения персонала.

Поскольку полученная композиция ДКВ/ЛИЗ_г характеризовалась высокой растворимостью в воде дистиллированной при комнатной температуре, то она была выбрана в качестве растворителя. На полученном спектре наблюдали основной максимум поглощения при $\lambda=288$ нм и плечо при $\lambda=324$ нм, соответствующие хромофорной структуре ДКВ. При этом поглощение второго компонента композиции (L-лизин) в данной области статистически незначимо (Рисунок 4.1), что делает методику специфичной по отношению к флавоноиду.

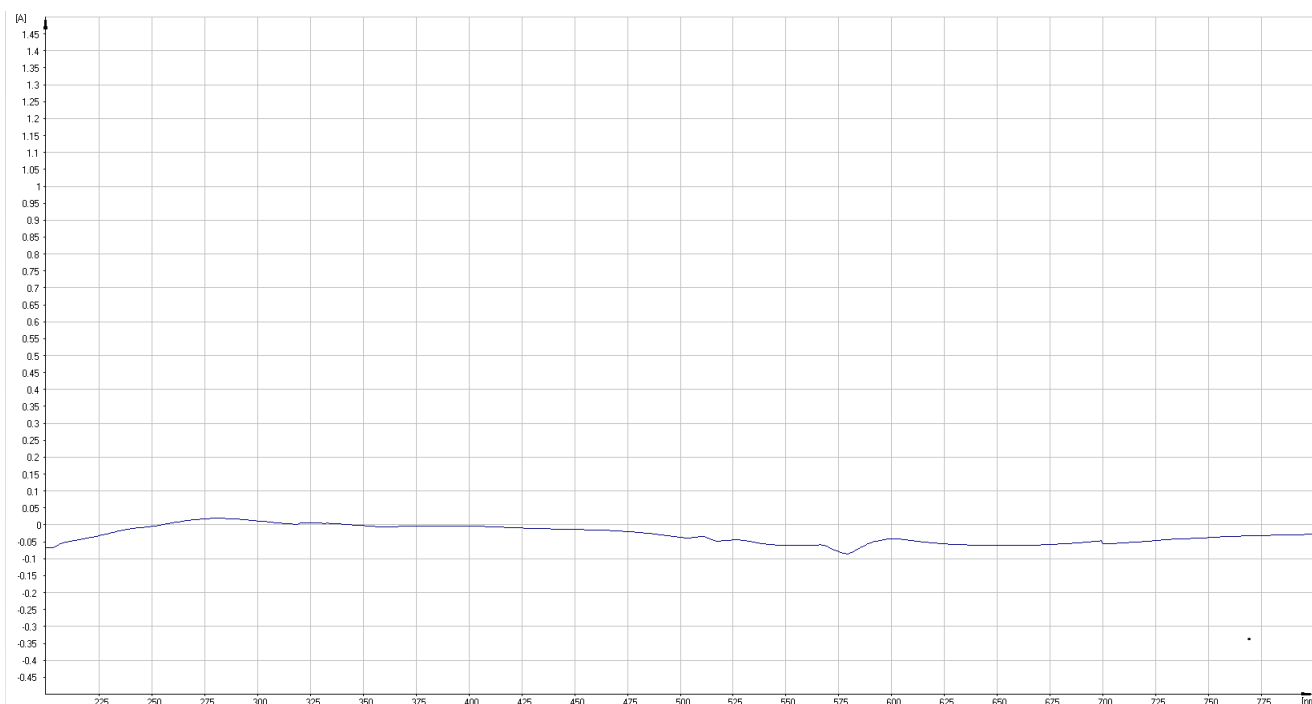


Рисунок 4.1 – УФ/вид спектр L-лизина в воде дистиллированной: концентрация 0,03 мг/мл ($1,83 \times 10^{-4}$ моль/л)

В диапазоне концентраций флавоноида от 0,0048 до 0,0240 мг/мл (от $1,58 \times 10^{-5}$ до $7,89 \times 10^{-5}$ моль/л) установлена линейная зависимость оптической плотности от концентрации с коэффициентом детерминации $r^2=0,9966$ (Рисунок 4.2) [13]. Коэффициент корреляции составил $r=0,9983$, что соответствует требованиям к характеристике аналитической методики «Линейность», предъявляемой ГФ РФ XV ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» и ОФС 2.3.14.0. «Валидация аналитических методик» Фармакопеи ЕАЭС.

Среднее значение повторяемости, определенное по параллельным растворам для всех основных точек калибровочной кривой, составило 2,90%. Установлена правильность методики, поскольку для уравнения линейной зависимости между экспериментально найденными и истинными величинами подтверждается гипотеза о равенстве единице тангенса угла наклона и о равенстве нулю свободного члена при степени надежности, равной 0,05 (Таблица 4.1).

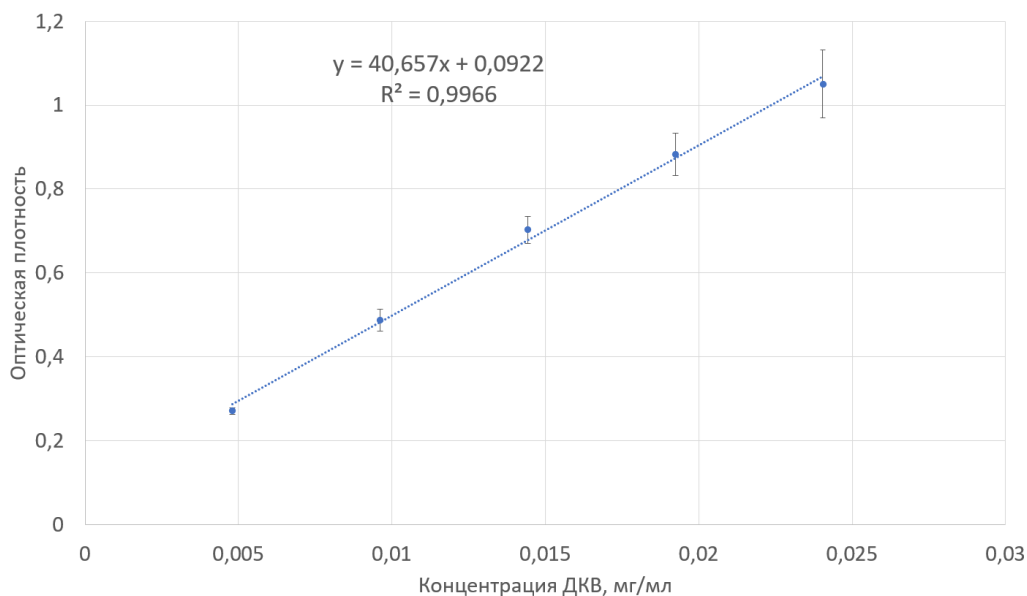


Рисунок 4.2 – Калибровочная кривая для определения ДКВ в ДКВ/ЛИЗ_г

Таблица 4.1 – Подтверждение правильности спектрофотометрической методики

	Y-пересечение	Переменная X1
Коэффициенты	$-5,75 \times 10^{-5}$	0,99692
Стандартная ошибка	0,00101	0,06177
t-статистика	-0,05670	16,14051
Нижние 95%	-0,01295	0,21212
Верхние 95%	0,01283	1,78172

4.2. Одновременный анализ компонентов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с предколоночной дериватизацией

Необходимость качественного и количественного контроля обоих компонентов разработанных модификаций обусловлена тем, что они являются биологически активными веществами, способными оказывать физиологическое действие при терапии.

Для ДКВ разработано большое количество методик хроматографического анализа в условиях обращенно-фазовой (ОФ) высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием в качестве подвижной фазы (ПФ) различных соотношений ацетонитрил (MeCN) : вода или метанол (MeOH) : вода или комбинацией всех 3 растворителей в изократическом или градиентном

режимах элюирования. При этом в состав ПФ часто вводят фосфорную (H_3PO_4), уксусную (CH_3COOH), муравьиную (HCOOH) или трифторуксусную кислоту (CF_3COOH) для подавления ионизации флавоноида, что позволяет достичь большей симметрии хроматографического пика и лучшего разрешения с побочными веществами. В роли неподвижной фазы (НФ), как правило, используют октадецилсилильный сорбент (C18), в редких случаях НФ на основе привитых циано-групп (CN), а в случае разделения диастереомеров ДКВ: бифинильную или фенильную НФ. Типичными детекторами в этих методиках служат УФ/вид-детектор и диодно-матричный детектор (ДМД) [64, 193] или масс-спектрометрический (МС) [66, 135, 200].

Однако хроматография L-лизина в условиях ОФ затруднена высокой полярностью, что снижает его удерживание, а также отсутствием хромофорной системы, что делает использование спектрофотометрических детекторов для анализа малоперспективным. Для решения этих проблем используется предколоночная дериватизация с целью его перевода в производные, способные удерживаться в условиях ОФ хроматографии и детектироваться УФ/вид- или флюоресцентными детекторами. Другим подходом, применяемым в анализе аминокислот, является постколоночная дериватизация, способствующая лучшему детектированию. Тем не менее, в литературе обнаружены методики, в которых описывался процесс хроматографического определения L-лизина в условиях ОФ хроматографии с изократическим или градиентным режимом элюирования на сорбентах C18 и C8 и детектированием на малых длинах волн (208-225 нм) [61, 79, 180].

4.2.1. Хроматографическое определение без дериватизации

В связи с обнаруженными литературными данными о возможности прямого определения L-лизина без дериватизации, применение которого позволяло значительно облегчить процесс хроматографического анализа, и нивелировать риск взаимодействия дериватизирующего агента с флавоноидом, был предпринят

ряд попыток воспроизведения опубликованных методик и их модификации для одновременного количественного анализа обоих компонентов исследуемых образцов.

Однако результаты адаптации методик на сорбенте C18 не позволили добиться эффективного протекания хроматографического процесса. В большинстве случаев отклик УФ/вид-детектора располагался непосредственно на «мертвом объеме», либо представлял из себя большое количество неразрешенных сигналов, что является неприемлемым для количественного анализа (Рисунок 4.3А). Замена MeCN на MeOH не способствовала существенному улучшению качества получаемых хроматограмм (Рисунок 4.3Б).

При этом изменения скорости потока и температуры термостата приводили к полному и непоследовательному изменению хроматографического профиля, что делало невозможным поиск закономерностей по влиянию этих параметров на процесс разделения компонентов.

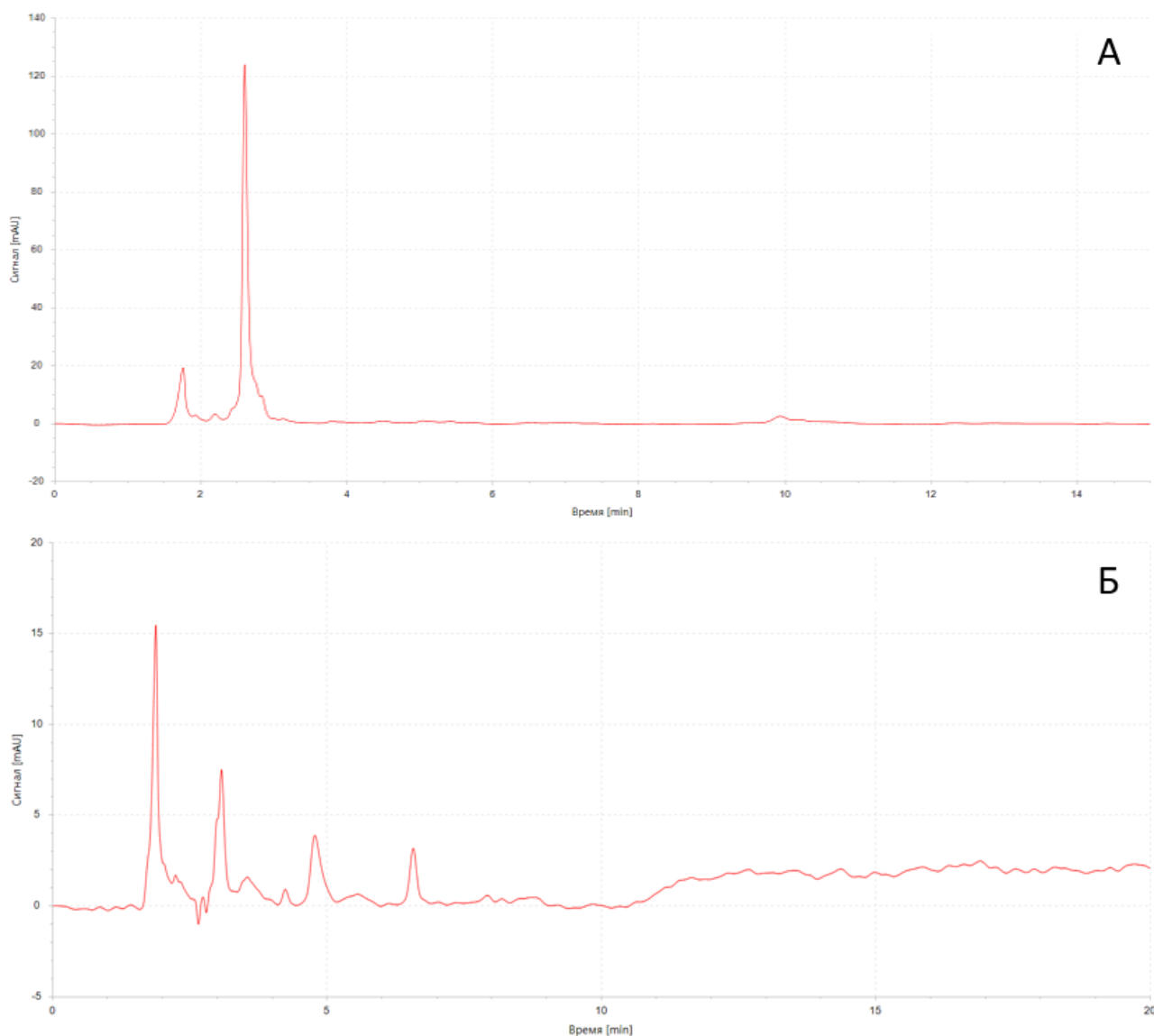


Рисунок 4.3 – Хроматограммы ЛИЗ_{исх}; колонка Phenomenex Luna C18(2), 5 μ m, 250 $\times$ 4,6 мм; скорость потока: 1 мл/мин; температура термостата: комнатная; длина волны: 210 нм; объем пробы: 20 мкл: А – ПФ: 30% H₂O (pH 2,7, HCOOH), 70% MeCN; Б – ПФ: 30% H₂O (pH 2,7, HCOOH), 70% MeOH

В дальнейшем была предпринята попытка увеличения полярности НФ для повышения сродства анализируемого компонента к ней, путем замены сорбента C18 на CN-фазу. Однако, изменение режимов элюирования и состава ПФ, а также варьирование различными параметрами хроматографического процесса тоже не привели к удовлетворительным результатам (Рисунок 4.4А и Рисунок 4.4Б).

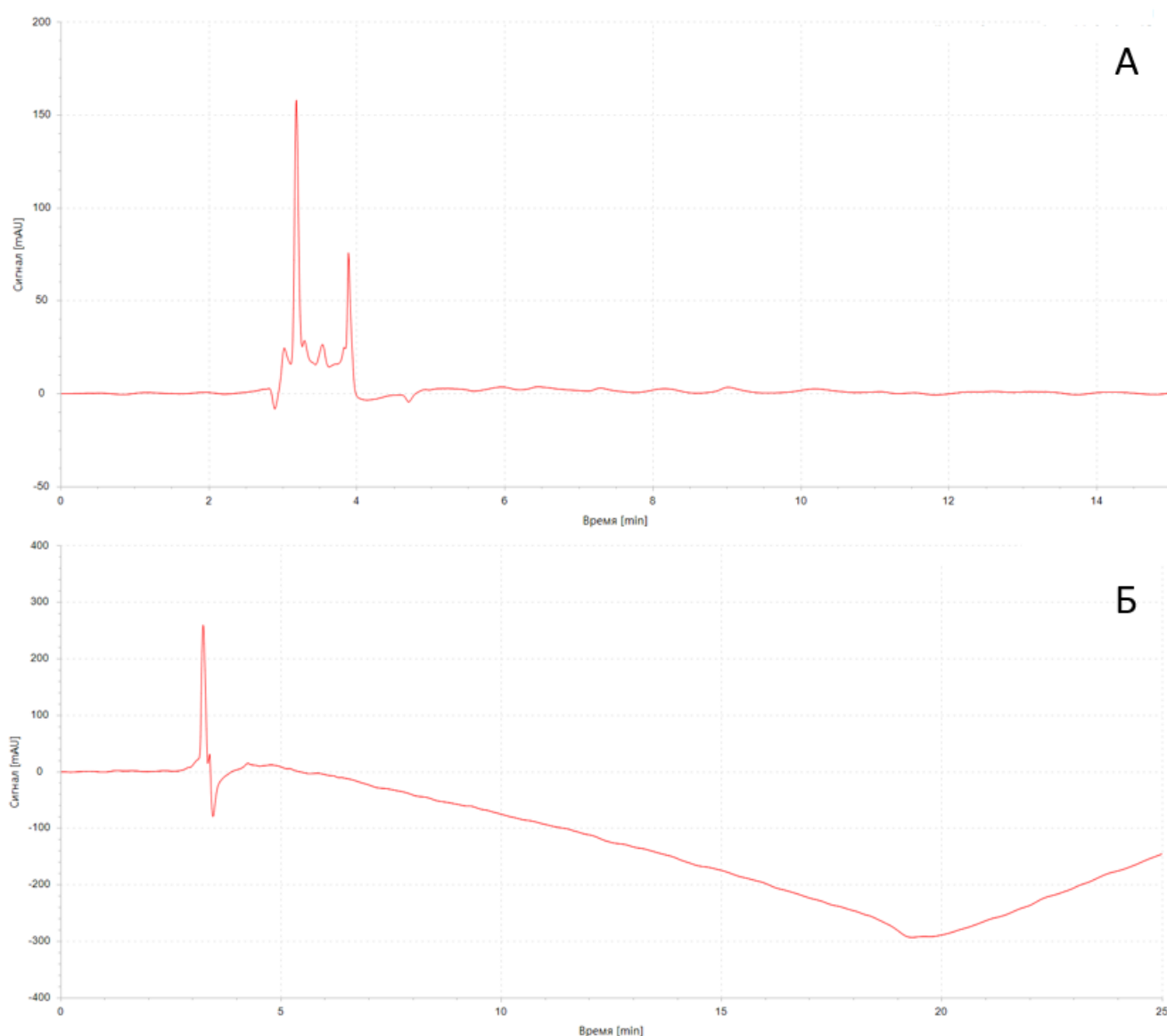


Рисунок 4.4 – Хроматограммы ЛИЗ_{исх}; колонка Phenomenex Luna CN, 5 μ m, 250×4,6 мм; скорость потока: 1 мл/мин; температура термостата: комнатная; длина волны: 214 нм; объем пробы: 20 мкл: А – изократическое элюирование ПФ: 50% H₂O (pH 2,7, HCOOH), 50% MeCN; Б – градиентное элюирование 0-15 мин: 65%→50% H₂O (pH 2,7, HCOOH), 35%→50% MeCN; 15-25 мин 50%→65% H₂O (pH 2,7, HCOOH), 50%→35% MeCN

Таким образом, добиться эффективного процесса разделения компонентов анализируемых образцов не удалось, и в дальнейшем было принято решение перейти к методикам с предколоночной дериватизацией.

4.2.2. Дериватизация нингидриновым реагентом

Первые попытки дериватизации были основаны на применении стандартного для аминокислот качественного реагента – нингидрина. В результате реакции ожидали получение окрашенного продукта, что сопровождалось бы изменением химической структуры и хромофорной системы (Рисунок 4.5).

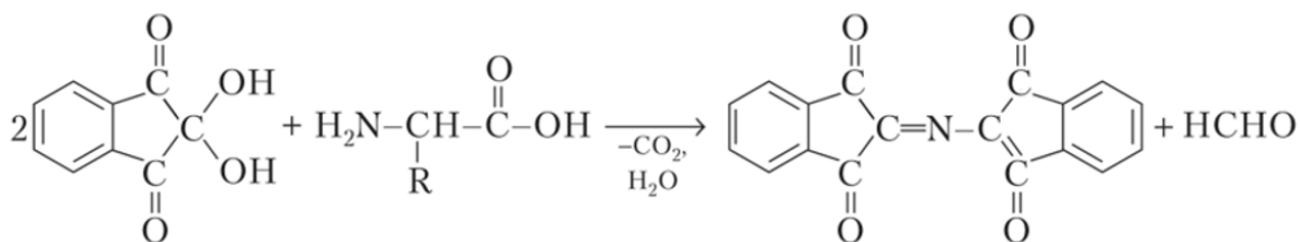


Рисунок 4.5 – Схема реакции предполагаемого взаимодействия

В качестве НФ для хроматографического разделения была выбрана C18, как наиболее часто используемая в аналитических методиках с дериватизацией нингидрином [136, 175]. Оптимизация параметров разделения позволила добиться устойчивого времени удерживания в районе 4 минут на колонке Inspire C18 (5μm, 150×4,6 мм) при изократическом элюировании с применением в качестве ПФ смеси MeCN (70%) : H₂O (30 %), доведенной до pH 2,4 при помощи CF₃COOH. Скорость потока составила 0,4 мл/мин, температура термостата 35 °С. Детектирование осуществляли при длине волны λ=230 нм, что соответствует максимуму поглощения продукта реакции по литературным данным. Типичная хроматограмма нингидрина при данных условиях приведена на Рисунке 4.6.

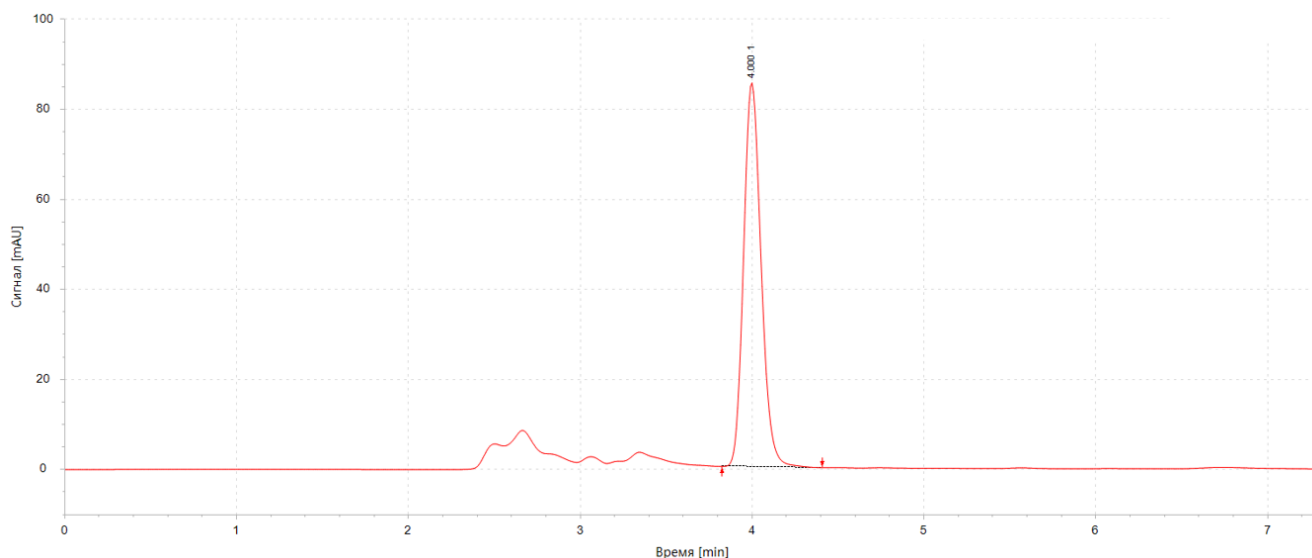


Рисунок 4.6 – Хроматограмма нингидрина; колонка Inspire C18 5 μ m, 150 $\times$ 4,6 мм; изократическое элюирование ПФ: 30% H₂O (pH 2,4, CF₃COOH), 70% MeCN; скорость потока: 0,4 мл/мин; температура термостата: 35 °C; длина волны: 230 нм; объем пробы: 20 мкл

При хроматографическом контроле за ходом реакции было зарегистрировано появление пика с временем удерживания 5,717 мин, площадь которого постепенно увеличивалась (Рисунок 4.7). Предположено, что данный сигнал соответствует продукту дериватизации аминокислоты, характеризующемуся меньшей полярностью, чем исходные реагенты. Поэтому появление данного пика согласуется с ожидаемым направлением реакции дериватизации.

Однако в дальнейшем было установлено, что хроматографическое определение ДКВ в этих условиях невозможно, поскольку время его удерживания составило около 3,4 минут (Рисунок 4.8), что совпадало с одним из пиков, присутствующих как на хроматограммах чистого нингидрина, так и продукта реакции дериватизации.

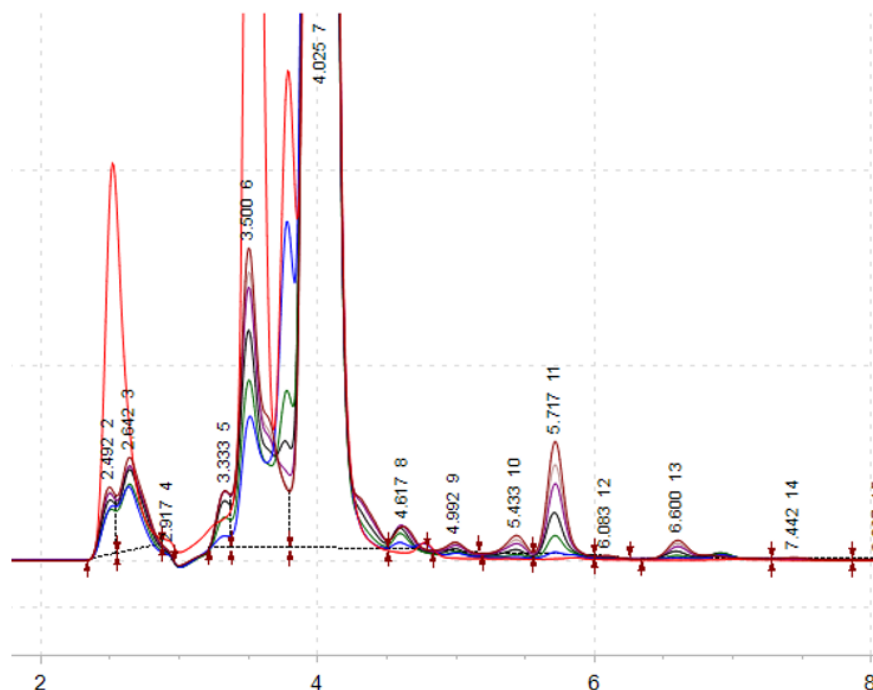


Рисунок 4.7 – Накопительный рост отклика детектора для хроматографического пика с временем удерживания 5,717 мин. Условия см. Рисунок 4.6

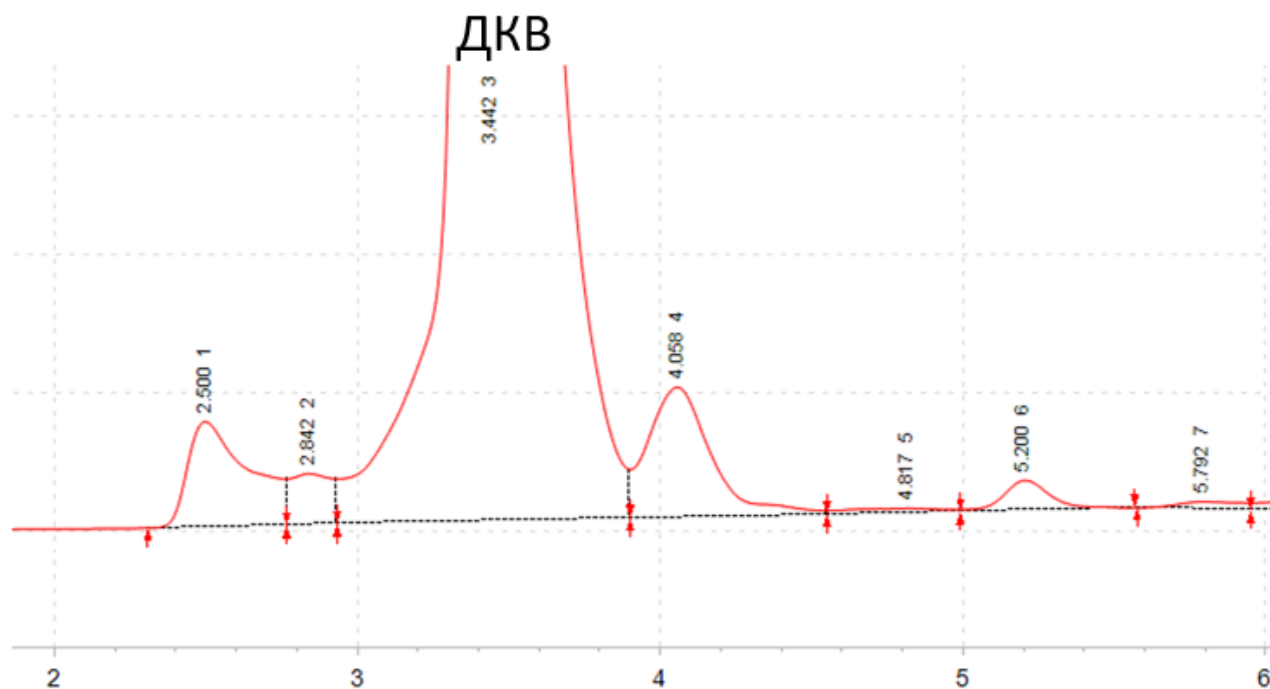


Рисунок 4.8 – Хроматограмма ДКВ_{исх}; колонка Inspire C18 5 μ m, 150 $\times$ 4,6 мм; изократическое элюирование ПФ: 30% H₂O (pH 2,4, CF₃COOH), 70% MeCN; скорость потока: 0,4 мл/мин; температура термостата: 35 °C; длина волны: 230 нм; объем пробы: 20 мкл

Дальнейшие изменения хроматографических условий, в том числе изменение НФ на фенильный сорбент, с целью оптимизации времени удерживания ДКВ по отношению к другим компонентам анализируемого раствора, не принесли положительных результатов, что послужило основой для отказа от применения нингидриновой реакции для предколоночной дериватизации L-лизина для исследуемых модификаций.

4.2.3. Дериватизация бензиловым спиртом

В дальнейшем была предпринята попытка использования бензилового спирта (ВпОН) для дериватизации аминокислоты путем этерификации по карбоксильной группе в присутствии кислотного катализатора. Схема ожидаемого превращения приведена на Рисунке 4.9.

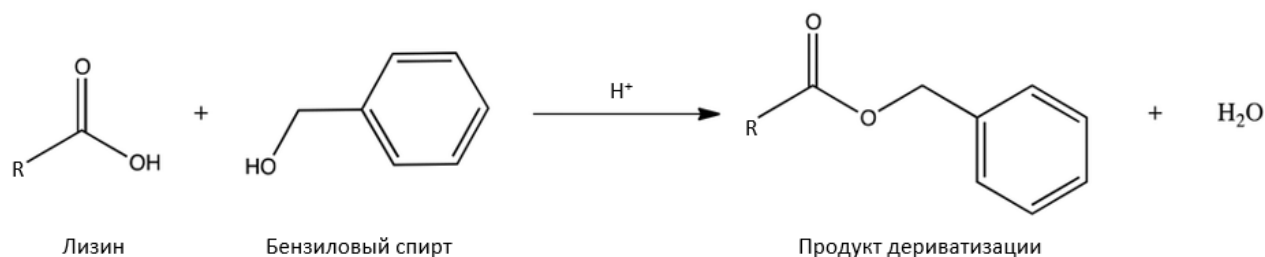


Рисунок 4.9 – Схема реакции предполагаемого взаимодействия L-лизина с ВпОН

При протекании этой реакции ожидалось, что образование сложноэфирной группы с остатком ВпОН поспособствует снижению полярности аналита, а, следовательно, повышению удерживания в условиях ОФ хроматографии, а также позволит сместить максимум поглощения в более длинноволновую область, что повысит селективность. За основу были взяты условия хроматографического разделения, описанные в разделе 4.2.2, за исключением длины волны детектирования, которая для текущего анализа составила $\lambda=260$ нм, что соответствует максимуму поглощения хромофорной системы ВпОН. Типичная хроматограмма приведена на Рисунке 4.10.

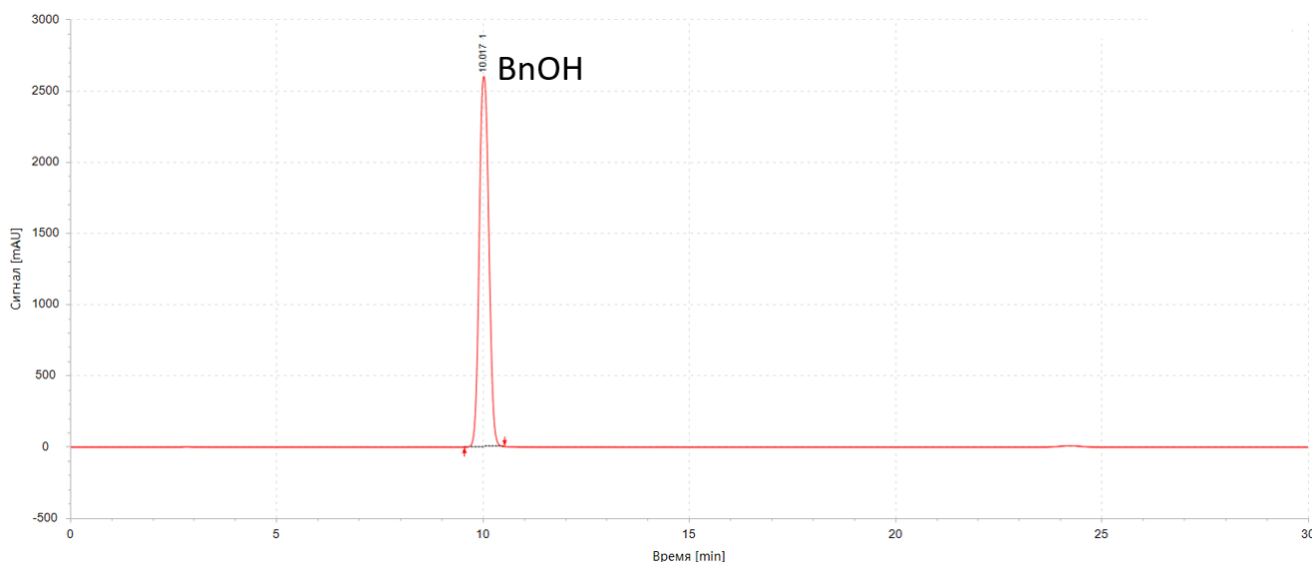


Рисунок 4.10 – Хроматограмма BnOH; колонка Inspire C18 5 μ m, 150 $\times$ 4,6 мм; изократическое элюирование ПФ: 30% H₂O (pH 2,4, CF₃COOH), 70% MeCN; скорость потока: 0,4 мл/мин; температура термостата: 35 °C; длина волны: 260 нм; объем пробы: 20 мкл

В ходе хроматографического разделения продуктов взаимодействия установлено, что при протекании реакции появляется один дополнительный пик с временем удерживания около 24 мин (Рисунок 4.11), не зависящий от концентрации аминокислоты в исходном растворе. На основании увеличения времени удерживания, а, следовательно, липофильности, было сделано предположение, что он соответствует дибензиловому эфиру – продукту межмолекулярной дегидратации BnOH.

Таким образом, ввиду отсутствия селективности взаимодействия BnOH с L-лизином и протекания побочных реакций, в дальнейшем было принято решение отказаться от попыток дериватизации путем этерификации карбоксильной группы аминокислоты.

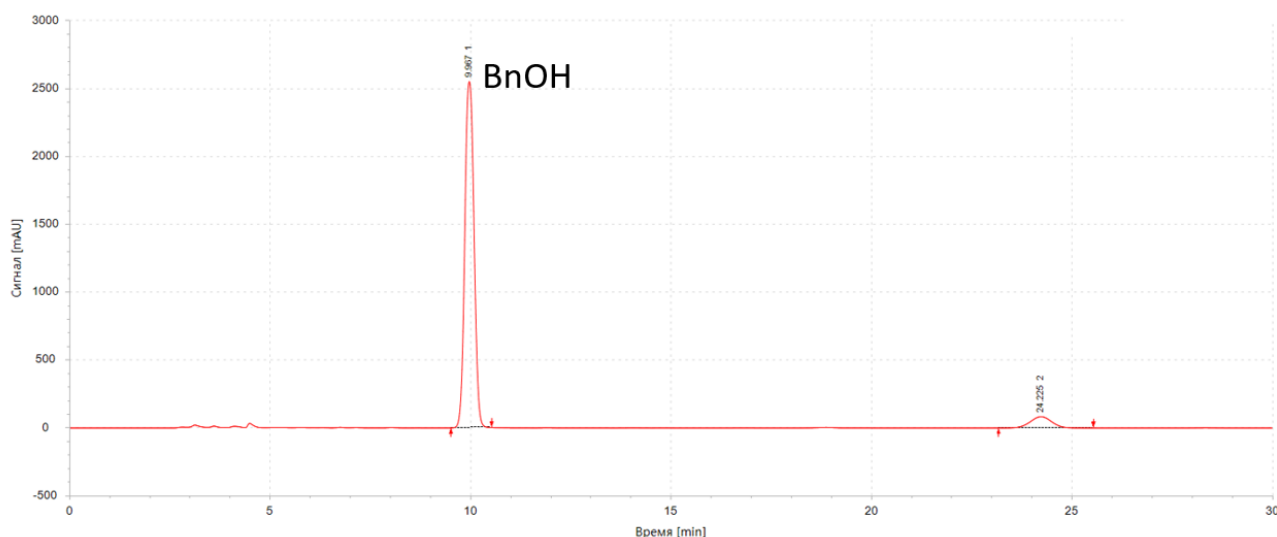


Рисунок 4.11 – Хроматограмма после кипячения ЛИЗ_{исх} в BnOH в присутствии серной кислоты концентрированной; колонка Inspire C18 5 μ m, 150 $\times$ 4,6 мм; изократическое элюирование ПФ: 30% H₂O (pH 2,4, CF₃COOH), 70% MeCN; скорость потока: 0,4 мл/мин; температура термостата: 35 °C; длина волны: 260 нм; объем пробы: 20 мкл

4.2.4. Дериватизация *o*-фталевым альдегидом

Среди классических для аминокислот дериватирующих агентов для дальнейшего анализа методом ВЭЖХ в литературе описаны дансилхлорид и *o*-фталевый альдегид (ОФА) [1, 206]. При этом, каждый из них характеризуется своими особенностями: дансильные производные считаются более стабильными, несмотря на более трудоемкий процесс дериватизации, а производные с ОФА, напротив, менее устойчивы, но их получение протекает проще и быстрее [206]. Именно второй вариант лег в основу фармакопейной методики качественного и количественного анализа компонентов раствора для инфузий в рамках ФС.3.1.0108.22 «Аланин + Аргинин + Валин + Гистидин + Глицин + Изолейцин + Лейцин + Лизин + Метионин + Пролин + Серин + Тирозин + Треонин + Триптофан + Фенилаланин + Ацетилцистеин + Ацетилтирозин, раствор для инфузий». Реакция дериватизации L-лизина ОФА-реагентом представляет собой нуклеофильное присоединение к карбонильному атому альдегидной группы в присутствии 2-сульфанилэтанола (2-меркаптоэтанола) или 3-сульфанилпропионовой (3-меркаптопропионовой) кислоты (Рисунок 4.12).

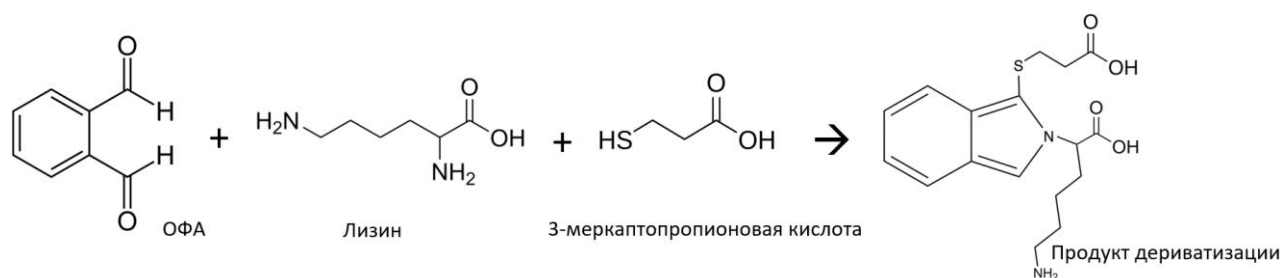


Рисунок 4.12 – Схема реакции предполагаемого взаимодействия L-лизина с ОФА в присутствии 3-меркаптопропионовой кислоты

В рамках фармакопейной методики аминокислоты анализируют в виде ОФА-производных на сорбенте C18 на градиентном режиме элюирования при длине волны УФ/вид-детектора $\lambda=338$ нм. Однако данная методика характеризуется сложным составом ПФ, состоящей из 2 элюентов: А – раствора 4,42 г ацетата натрия в 500 мл воды с добавлением 0,09 мл триэтиламина, с доведением значения рН до $7,2 \pm 0,1$ с помощью ледяной уксусной кислоты и прибавлением 1,5 мл тетрагидрофурана – и Б – раствора 1,36 г ацетата натрия в 100 мл воды с доведением ледяной уксусной кислотой значения рН до $7,2 \pm 0,1$ и последующим добавлением по 200 мл MeOH и MeCN. В литературе встречается модификация состава элюентов, однако различия между предлагаемыми подходами минимальны [1].

Для упрощения анализа была поставлена задача модификации состава ПФ, а также, по возможности, перевода режима элюирования с градиентного на изократический.

НФ представляла собой сорбент октадецилсилильный сорбент в колонке Inspire C18 (5 μm , 150×4,6 мм). В качестве ПФ использовали смесь MeCN (30%) : H_2O (70%), поскольку такое соотношение часто встречалось в методиках для анализа флавоноидов методом ВЭЖХ. Однако, ввиду нестабильности ОФА-производного, приняли решение отказаться от кислотного модификатора, применяемого для подавления ионизации ДКВ. Хроматограммы, полученные после дериватизации, характеризовались наличием пика с временем удерживания около 5,3 мин (Рисунок 4.13), площадь которого была пропорциональная количеству аминокислоты, введенному в реакцию.

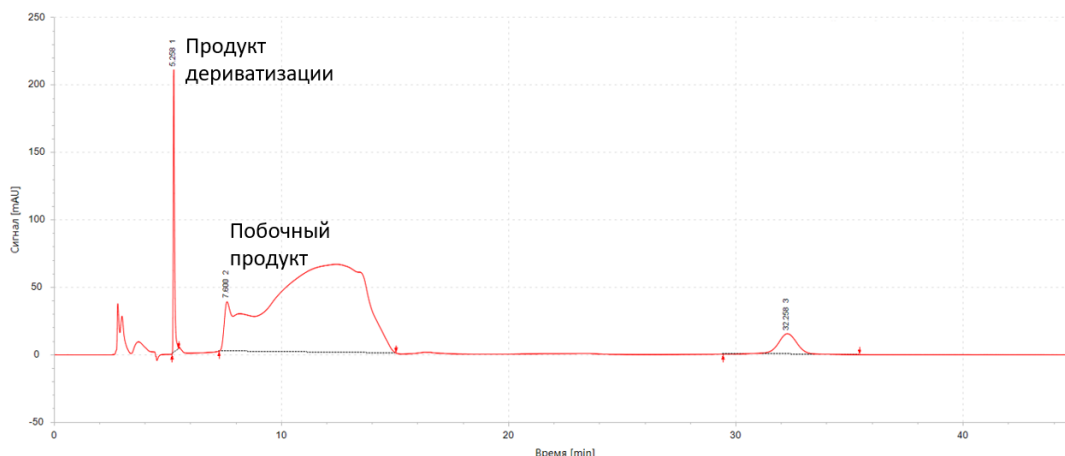


Рисунок 4.13 – Хроматограмма ЛИЗ_{исх} после дериватизации ОФА-регентом; колонка Inspire C18 5 μ m, 150 $\times$ 4,6 мм; изократическое элюирование ПФ: 70% H₂O, 30% MeCN; скорость потока: 0,4 мл/мин; температура термостата: 40 °С; длина волны: 338 нм; объем пробы: 20 мкл

В дальнейшем проведен анализ ДКВ, в условиях, аналогичных дериватизации аминокислоты. Установлено, что время удерживания флавоноида составило примерно 6,7 мин, что позволило считать пики двух анализируемых веществ не перекрывающимися в ходе анализа. При этом, обнаружено появление побочного продукта (пик с временем удерживания 7,5 мин и далее), образующегося как в присутствии L-лизина, так и в его отсутствие в реакционной смеси. В связи с этим, в дальнейшем предстояло оптимизировать хроматографические параметры с целью подбора наиболее оптимальных условий для разделения 3 компонентов анализируемой смеси: продукта взаимодействия L-лизина с ОФА, ДКВ и побочного продукта. При этом, важно было учитывать высокую нестабильность образующегося ОФА-производного и проводить начало анализа в течение 1 минуты после прекращения центрифугирования образца, следующего за добавлением стоп-растворов.

Поскольку при изменении состава ПФ на MeCN (35%) : H₂O (65%) наблюдалось значительное изменение профиля хроматограммы (Рисунок 4.14) в сторону уменьшения разрешения по сравнению с исходным, в дальнейшем попыток изменения состава ПФ от исходного соотношения не предпринимали, сконцентрировав внимание на варьировании скорости потока и температуры термостата.

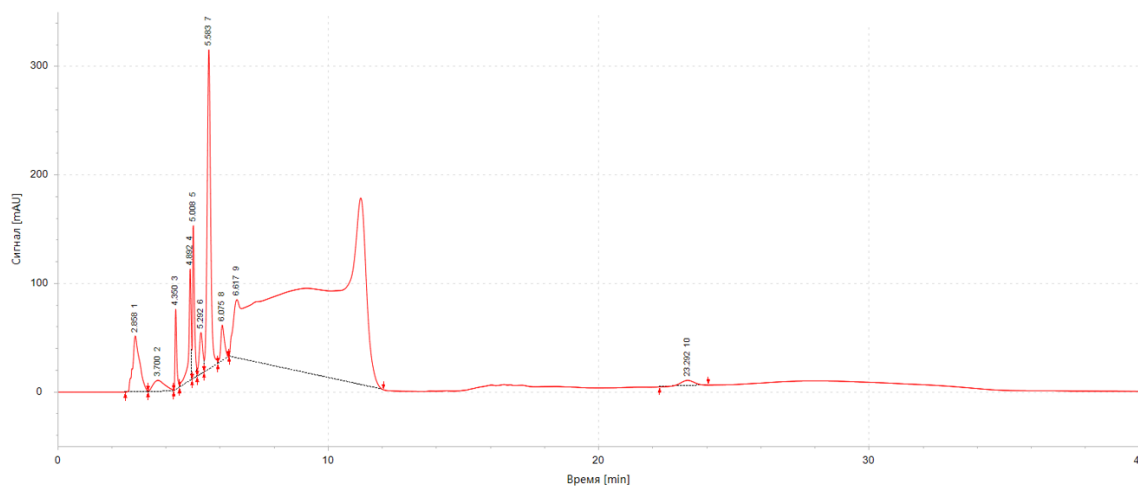


Рисунок 4.14 – Хроматограмма ЛИЗ_{исх} после дериватизации ОФА-регентом; колонка Inspire C18 5 μ m, 150 $\times$ 4,6 мм; изократическое элюирование ПФ: 65% H₂O, 35% MeCN; скорость потока: 0,4 мл/мин; температура термостата: 40 °С; длина волны: 338 нм; объем пробы: 20 мкл

В ходе дальнейшей оптимизации наилучшими были признаны условия хроматографического разделения при скорости потока 0,35 мл/мин и температуре термостата 45 °С [20]. Типичная хроматограмма смеси ДКВ_{исх} и ЛИЗ_{исх} в массовом соотношении 1:1 при данных условиях представлена на Рисунке 4.15.

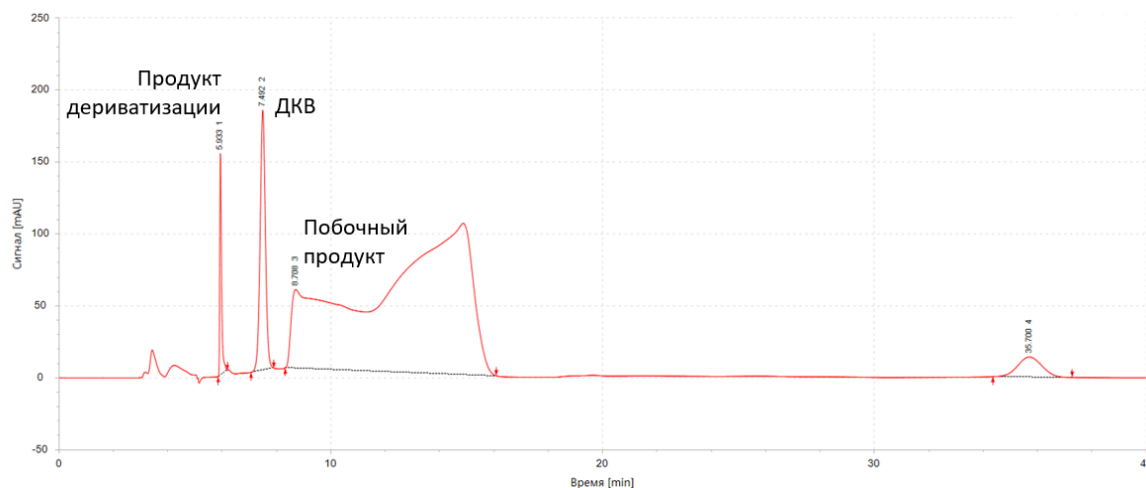


Рисунок 4.15 – Хроматограмма ДКВ_{исх} и ЛИЗ_{исх} в массовом соотношении 1:1 после дериватизации ОФА-регентом; колонка Inspire C18 5 μ m, 150 $\times$ 4,6 мм; изократическое элюирование ПФ: 70% H₂O, 30% MeCN; скорость потока: 0,35 мл/мин; температура термостата: 45 °С; длина волны: 338 нм; объем пробы: 20 мкл

Для подтверждения структур анализируемых компонентов и установления строения побочного продукта проведено исследование методом хромато-масс спектрометрии на трехкврупольном детекторе в сочетании с ДМД-детектором. Полученный масс-спектр продукта дериватизации в режиме отрицательной ионизации характеризовался пиком квазимолекулярного иона $[M-H]^-$ с m/z 349 (Рисунок 4.16А), а в режиме положительной ионизации $[M+H]^+$ m/z составил 351 (Рисунок 4.16Б), что соответствовало предполагаемой структуре. Для ДКВ в режиме отрицательной ионизации наблюдали пик $[M-H]^-$ с m/z 303 (Рисунок 4.16В), подтвердив отсутствие химического взаимодействия дериватизирующего агента с флавоноидом в ходе реакции.

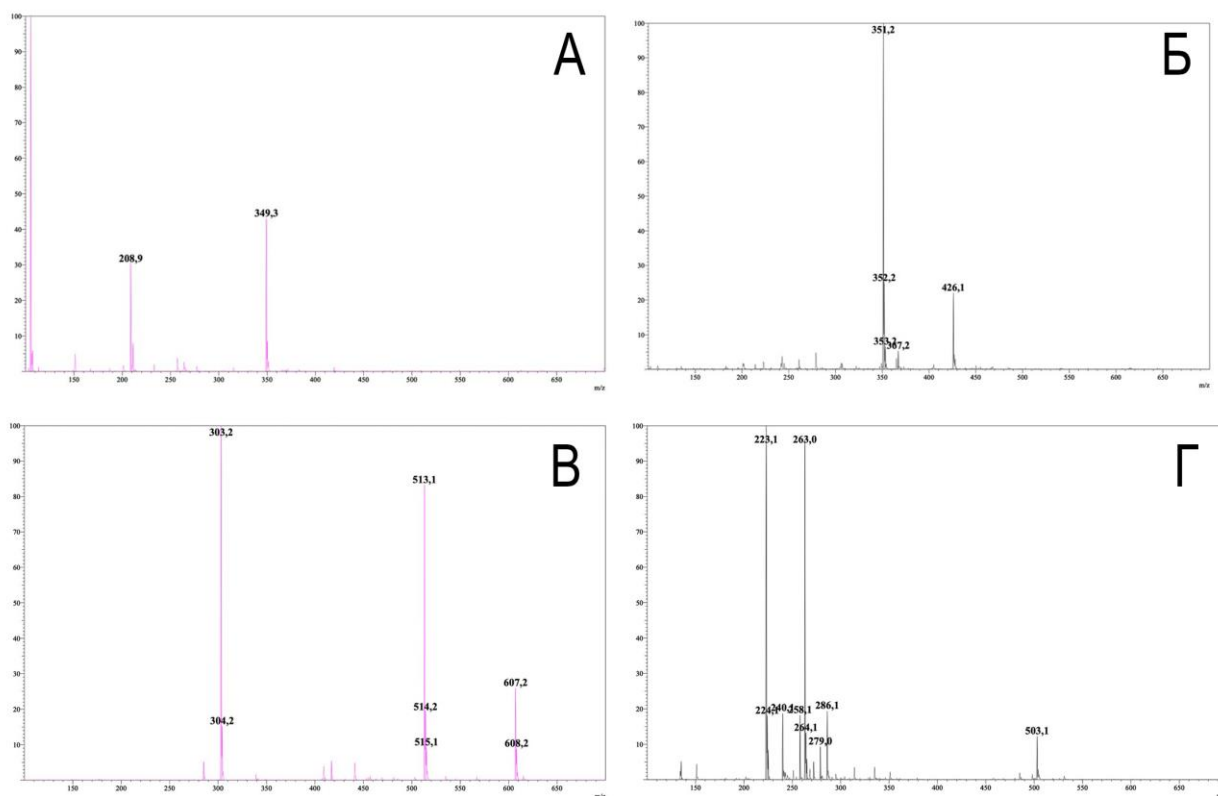


Рисунок 4.16 – ВЭЖХ МС/МС: А – продукт дериватизации L-лизина в режиме отрицательной ионизации; Б – продукт дериватизации L-лизина в режиме положительной ионизации; В – ДКВ в режиме отрицательной ионизации; Г – побочный продукт в режиме положительной ионизации

При расшифровке масс-спектра побочного продукта, записанного в режиме положительной ионизации, было установлено, что пику молекулярного иона соответствует сигнал с m/z 240 (Рисунок 4.16Г), что соответствует структуре полутиоацетата по одной из карбонильных групп ОФА (Рисунок 4.17). Пик с m/z 263 относится к квазимолекулярному иону $[M+Na]^+$ [5].

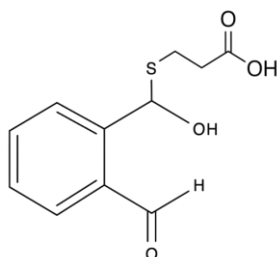


Рисунок 4.17 – Структура побочного продукта дериватизации

В ходе валидации полученной методики время удерживания продукта дериватизации составило $5,976 \pm 0,021$ мин, а флавоноида $7,426 \pm 0,027$ мин. Разрешение (R_s) составило 6,806, что свидетельствует о специфичности данной методики по отношению к ДКВ и продукту дериватизации L-лизина. Число теоретических тарелок для определяемых компонентов равно $42465,239 \pm 3908,644$ и $8308,416 \pm 314,834$. Коэффициенты детерминации линейной зависимости в пределах аналитической области (1-5 мг/мл каждого компонента в исходном растворе) составили 0,9936 и 0,9978 для продукта дериватизации и ДКВ, соответственно (Рисунок 4.18) [6].

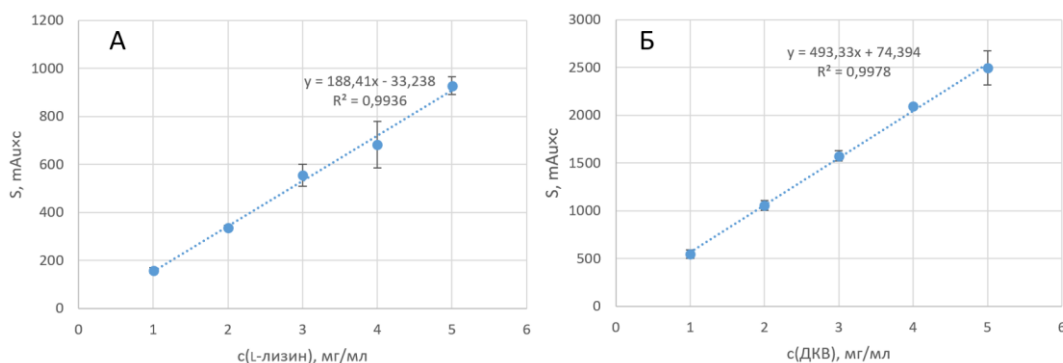


Рисунок 4.18 – Калибровочные кривые: А – продукт дериватизации L-лизина; Б – ДКВ

Коэффициенты корреляции при этом равны 0,9968 и 0,9989, что соответствует требованиям к линейности, предъявляемой ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик». Повторяемость по обоим компонентам для параллельных растворов составила 7,29% и 4,89%. Установлена правильность методики, поскольку для уравнения линейной зависимости между экспериментально найденными и истинными величинами для обоих анализируемых веществ подтверждается гипотеза о равенстве единице тангенса угла наклона и о равенстве нулю свободного члена при степени надежности, равной 0,05 (Таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Определение правильности для ВЭЖХ-методики с предколоночной дериватизацией

	Продукт дериватизации		ГСО ДКВ	
	У-пересечение	Переменная X1	У-пересечение	Переменная X1
Коэффициенты	0,00016	1,02026	0,00011	0,98658
Стандартная ошибка	0,00060	0,01738	0,00108	0,03152
t-статистика	0,26488	58,71085	0,10022	31,30122
Нижние 95%	– 0,00743	0,79945	– 0,01357	0,58609
Верхние 95%	0,00775	1,24106	0,01379	1,38706

Таким образом, полученная методика была валидирована в соответствии с требованиями ГФ РФ XV и может в дальнейшем использоваться для одновременного качественного и количественного анализа обоих компонентов композиций ДКВ–L-лизин.

4.3. Анализ дигидрокверцетина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Поскольку изначальной целью работы являлось повышение растворимости ДКВ, была разработана методика на базе ВЭЖХ для дальнейшего проведения теста «Растворение». В связи с этим была проведена адаптация методики,

разработанной ранее, для быстрого хроматографического определения ДКВ. Для этого в состав водного компонента ПФ была добавлена CF_3COOH до pH 2,4 с целью подавления ионизации флавоноида в процессе анализа. Рабочая длина волны детектора изменена на 288 нм, что соответствует максимуму поглощения ДКВ и способствует повышению специфичности и чувствительности методики, а также позволяет изменить аналитический диапазон. Кроме того, температура термостата понижена с 45 °С до 35 °С. В результате время удерживания флавоноида составило 8,3 мин, а фактор асимметрии 1,3. Типичная хроматограмма при данных условиях характеризуется наличием единственного пика, соответствующего ДКВ (Рисунок 4.19).

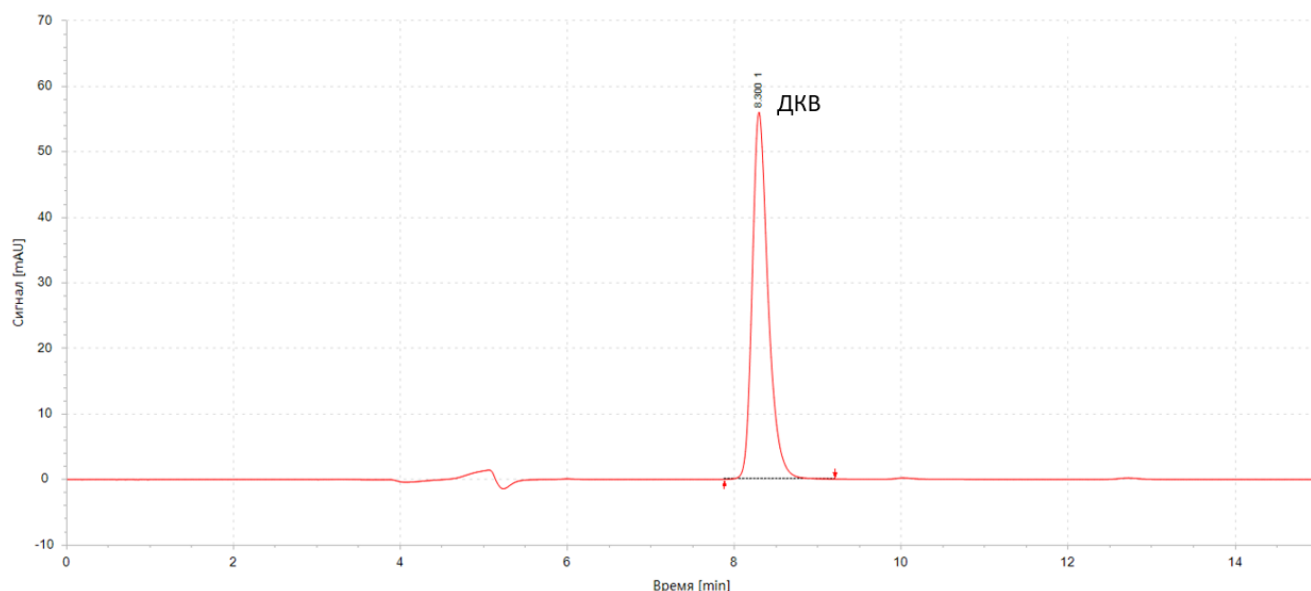


Рисунок 4.19 – Хроматограмма ГСО ДКВ; колонка Inspire C18 5 μm , 150 $\times$ 4,6 мм; изократическое элюирование ПФ: 70% H_2O (pH 2,4, CF_3COOH), 30% MeCN; скорость потока: 0,35 мл/мин; температура термостата: 35 °С; длина волны: 288 нм; объем пробы: 20 мкл

Коэффициент детерминации калибровочной кривой, полученной в ходе валидации методики (Рисунок 4.20) составил 0,99994, а коэффициент корреляции $r=0,99997$, что отвечает требованиям ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик». Аналитическая область, охватываемая уравнением линейной зависимости, лежит в пределах от 0,0001 мг/мл до 0,1250 мг/мл.

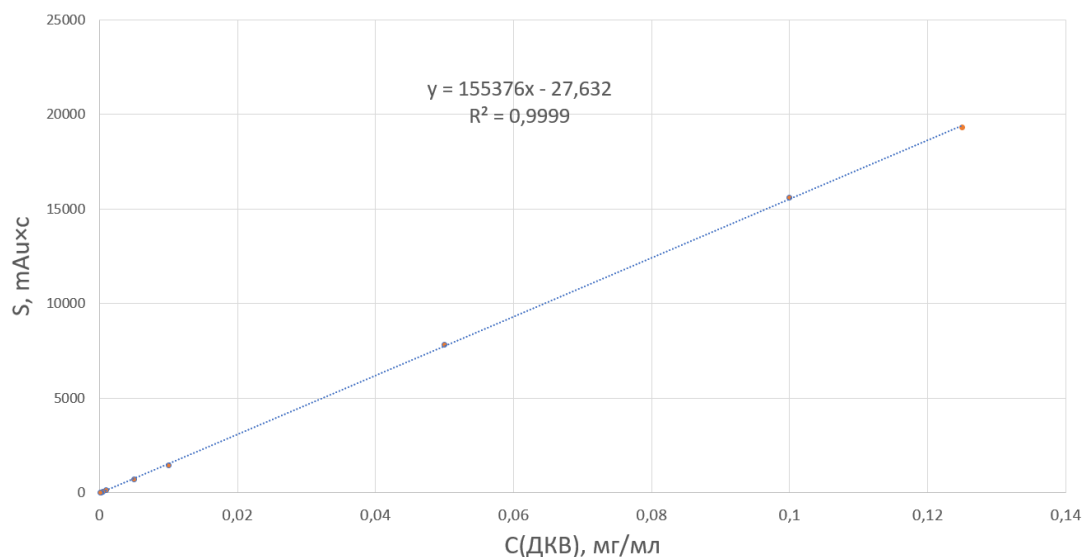


Рисунок 4.20 – Калибровочная кривая для ГСО ДКВ

Повторяемость, определенная для каждой точки калибровочной кривой по параллельным заколам одного раствора и выраженная как относительное стандартное отклонение (RSD) представлена в Таблице 4.3.

Таблица 4.3 – RSD по параллельным заколам для ГСО ДКВ на различных концентрациях

Концентрация ДКВ, мг/мл	Средняя площадь пика, мАу×с	Стандартное отклонение, мАу×с	RSD, %
0,12500	19304,0500	15,059490	0,078012
0,10000	15596,4200	55,755710	0,357491
0,05000	7811,6450	9,741954	0,124711
0,01000	1463,9390	2,859553	0,195333
0,00500	698,3798	0,749136	0,107268
0,00100	121,4150	1,920734	1,581957
0,00050	58,5554	1,055350	1,802310
0,00025	29,3423	0,479286	1,633433
0,00010	14,1327	0,163549	1,157241

Установлена правильность методики, поскольку для уравнения линейной зависимости между экспериментально найденными и истинными величинами подтверждается гипотеза о равенстве единице тангенса угла наклона и о

равенстве нулю свободного члена при степени надежности, равной 0,05 (Таблица 4.4).

Таблица 4.4 – Подтверждение правильности методики количественного анализа ДКВ

	Y-пересечение	Переменная X1
Коэффициенты	$-6,38 \times 10^{-5}$	0,99578
Стандартная ошибка	0,00024	0,00336
t-статистика	-0,26259	296,08713
Нижние 95%	-0,00315	0,95305
Верхние 95%	0,00302	1,03852

Таким образом, разработана и валидирована методика количественного индивидуального определения ДКВ в составе композиций с L-лизинном.

4.4. Выводы по главе 4

1. Разработана и валидирована методика экспресс-анализа ДКВ в присутствии L-лизина на базе УФ/вид-спектрофотометрии.
2. Разработана и валидирована методика количественного определения ДКВ в присутствии L-лизина на базе ВЭЖХ с УФ-детектированием.
3. Разработана и валидирована методика одновременного количественного определения компонентов композиций ДКВ–L-лизин с предколоночной дериватизацией ОФА-реагентом на базе ВЭЖХ с УФ-детектированием.
4. Установлена химическая структура побочного продукта реакции дериватизации ОФА-реагентом методом хромато-масс-спектрометрии.
5. Подтверждено отсутствие химического превращения ДКВ в ходе реакции дериватизации ОФА-реагентом.

На основе результатов, описанных в главах 3 и 4, разработан проект спецификации для ДКВ/ЛИЗ_г (Приложение Г).

ГЛАВА 5. БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МОДИФИКАЦИЙ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА

Сформировав комплексное представление о природе полученных композиций, представляло интерес изучить влияние осуществленного супрамолекулярного синтеза на биофармацевтические характеристики изучаемых объектов в сравнении с исходным флавоноидом. Для этого проведено 2 теста *in vitro*, способствующих оценке высвобождения ДКВ из объектов исследования: растворение и диффузия в агаровый гель.

Важно отметить, что оценка фармакологической активности на стадии фармацевтической разработки снижает затраты на разработку и обеспечивает успешный переход в клиническую практику, что ускоряет выход новых лекарственных препаратов на рынок [3]. Для трансляции результатов требовалось изучить биологические свойства фазовых модификаций ДКВ на моделях *ex vivo* и *in vivo*. Так, экспертиза по токсичности выполнена на клеточных культурах, родственных человеческим. Ранозаживляющую активность изучали на модели ожога III степени у крыс.

5.1. *In vitro* тест «Растворение»

Тест растворения в условиях *in vitro* часто используется для оценки профиля высвобождения действующего вещества [18], в том числе из различных модифицированных форм, таких как кокристаллы и коаморфы, комплексы включения, твердые дисперсии и т.д. [24, 32, 45, 107, 108, 121, 152, 171].

Подбор массы образца осуществляли с учетом ожидаемого содержания ДКВ в будущих лекарственных формах, основываясь на предыдущих данных по его исследованиям [37, 68, 69]. В связи с этим, выбраны навески, эквивалентные 100 мг чистого ДКВ_{исх.} В пересчете на ДКВ/ЛИЗ_г, ДКВ/ЛИЗ_п, ДКВ/ЛИЗ_л это составило по 208 мг каждого из анализируемых образцов. Оценку

количественного содержания флавоноида проводили с использованием валидированной методики, описанной в разделах 4.3 и 6.6.3.

В результате было установлено, что наибольшую начальную скорость растворения в $84,9 \text{ мг} \times \text{мл}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$ наблюдали для ДКВ/ЛИЗ_л, который достигал максимальной концентрации в течение первой минуты растворения и, таким образом, выходил на плато по содержанию флавоноида в единице объема (Рисунок 5.1). Это может быть обусловлено большой удельной поверхностью лиофилизированного образца, по сравнению с остальными, что и обеспечивает его ускоренное высвобождение [190]. При этом, колебания концентрации между точками на первой и последующих минутах для данного образца могут быть следствием неравномерного распределения образца по всему объему среды высвобождения в течение первой минуты, поскольку из-за невысокой плотности растворение происходило непосредственно с границы раздела жидкой и воздушной фаз.

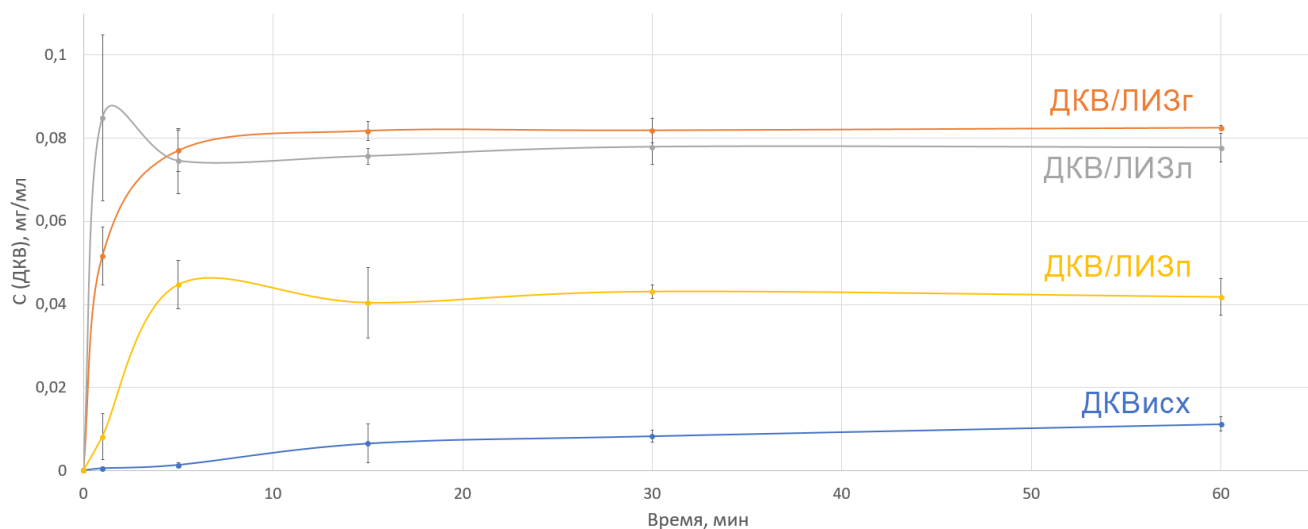


Рисунок 5.1 – Профили растворения ДКВ/ЛИЗ_г (оранжевый); ДКВ/ЛИЗ_л (серый); ДКВ/ЛИЗ_п (желтый); ДКВ_{исх} (синий)

Значение коэффициента различия между кривыми растворения ДКВ/ЛИЗ_л и ДКВ/ЛИЗ_г составил 13,485%, а коэффициент подобия 99,997%, что позволяет считать их эквивалентными между собой с точки зрения высвобождения флавоноида.

Для образца ДКВ/ЛИЗ_Г отмечена более низкая начальная скорость растворения ($51,6 \text{ мг} \times \text{мл}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$), с выходом на плато через 15 минут от начала эксперимента. При этом концентрация флавоноида была несколько выше, чем у ДКВ/ЛИЗ_Л, однако статистически достоверной разницы не достигнуто. Для ДКВ/ЛИЗ_П продемонстрировано наименьшее высвобождение ДКВ по сравнению с другими модификациями: через 60 минут эксперимента концентрация флаванолола в сравнении с ДКВ_{исх} была выше всего в 3,7 раза, в то время как у ДКВ/ЛИЗ_Г и ДКВ/ЛИЗ_Л этот параметр увеличился в 7,4 и 6,9 раз, соответственно. При этом скорость растворения в первую минуту для ДКВ/ЛИЗ_П составила $8,2 \text{ мг} \times \text{мл}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$, что значимо больше по сравнению с ДКВ_{исх} ($0,5 \text{ мг} \times \text{мл}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$).

Наблюдаемые различия между теоретической концентрацией ($0,11 \text{ мг/мл}$), которая должна была быть достигнута с учетом высокой растворимости модифицированных форм, и полученными практическими значениями может быть обусловлена целым рядом факторов, среди которых чистота ДКВ_{исх} в 95%, влажность образцов $8,1 \pm 0,2\%$ (ДКВ/ЛИЗ_Г), $5,7 \pm 0,3\%$ (ДКВ/ЛИЗ_Л) и $2,3 \pm 0,2\%$ (ДКВ/ЛИЗ_П), а также потери в порах ступки и при переносе образцов в среду растворения.

5.2. Диффузия *in vitro*

Метод диффузии в агар применяется для оценки высвобождения действующих веществ из наружных лекарственных форм местного действия. В соответствии с рекомендациями [7] были получены гели с содержанием действующего вещества 5% (в пересчете на ДКВ_{исх}), для которых измерен диаметр зоны горизонтальной диффузии через определенные промежутки времени (Таблица 5.1).

Таблица 5.1 – Оценка диаметра зоны горизонтальной диффузии на гелях

Образец	Начальный диаметр лунки	Диаметр зоны диффузии, мм			
		0,5 ч	1,0 ч	2,0 ч	3,0 ч
Гель на базе ДКВ/ЛИЗ _Г	25,00	2,00±0,06	4,00±0,12	6,00±0,06	8,00±0,12
Гель на базе ДКВ _{исх}		0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

На основе представленных данных можно констатировать, что ДКВ_{исх}, сформировавший суспензионный гель, абсолютно не высвобождается из него, что делает получение наружных лекарственных форм на его основе малоперспективным. Напротив, для ДКВ/ЛИЗ_Г установлена устойчивая диффузия в агаровый гель в течение всего времени эксперимента.

Затем опыт с гелем повторили в модификации с вертикальной ориентацией (Таблица 5.2).

Таблица 5.2 – Оценка зоны вертикальной диффузии на гелях

Образец	Высота зоны диффузии, мм			
	0,5 ч	1,0 ч	2,0 ч	3,0 ч
Гель на базе ДКВ/ЛИЗ _Г	2,00±0,00	4,00±0,06	7,00±0,12	8,00±0,12
Гель на базе ДКВ _{исх}	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Учитывая, что результаты, полученные этим и предыдущим способом, являются сопоставимыми ($r=0,9845$), то таким образом продемонстрирована возможность использования данной методики для оценки диффузии.

За счет такого изменения появилась возможность оценить подвижность в среде агарового геля флавоноида непосредственно из сухих образцов ДКВ_{исх}, ДКВ/ЛИЗ_Г и ДКВ/ЛИЗ_П. При этом для стандартизации условий на поверхность наносили навеску образца, эквивалентную 50 мг ДКВ_{исх}. Полученные в результате данные представлены в Таблице 5.3.

Таблица 5.3 – Оценка зоны вертикальной диффузии на сухих образцах

Образец	Высота зоны диффузии, мм			
	0,5 ч	1,0 ч	2,0 ч	3,0 ч
ДКВ _{исх}	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
ДКВ/ЛИЗ _г	10,00±0,12	12,00±0,15	14,00±0,15	16,00±0,17
ДКВ/ЛИЗ _п	4,00±0,06	6,00±0,12	12,00±0,12	14,00±0,17

Таким образом, установлено, что для ДКВ/ЛИЗ_г наблюдается несколько большая скорость диффузии по сравнению с ДКВ/ЛИЗ_п, что объясняется большей удельной поверхностью порошкообразной смеси по сравнению с пленчатой структурой. В то же время, образец ДКВ_{исх} в условиях данного эксперимента не высвобождается [2]. При этом результаты, полученные при использовании сухих образцов и гелей, характеризуются выраженной корреляцией $r > 0,999$.

5.3. Цитотоксичность *ex vivo*

Оценка цитотоксичности является важным этапом для фармакологического скрининга действующих веществ, поскольку позволяет изучить воздействие на различные клеточные системы вне живого организма, что не только сокращает в дальнейшем затраты на проведение доклинических исследований, но и соответствует принципам гуманного обращения с лабораторными животными, снижая их количество в дальнейшем.

Для оценки выживаемости клеток в этих экспериментах используют ряд окислительно-восстановительных индикаторов, изменяющих свою окраску под воздействием митохондриальных ферментов в живых клетках. Среди таких веществ наиболее распространены 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид, восстанавливающийся в формазан, окрашенный в пурпурный цвет (применяется в МТТ-тесте); 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2H-тетразолий-5-карбоксанид, восстанавливающийся в продукт оранжевого цвета (применяется в ХТТ-тесте) и WST-8: натрия 2-(2-метокси-4-нитропентил)-3-(4-нитропентил)-5-(2,4-дисульфофенил)-2H-тетразолий, восстанавливающийся в

формаза́н оранжевого цвета (входит в состав стандартного набора для определения жизнеспособности клеток ССК-8).

Наиболее старым из упомянутых ранее красителей, является МТТ, для которого характерна нерастворимость образующейся восстановленной формы в воде, что требует проведения дополнительной стадии анализа: растворение выделившихся в результате клеточного метаболизма кристаллов [199]. В связи с этим, был синтезирован ХТТ-реагент, восстановленная форма которого водорастворима и, следовательно, лишена недостатка, указанного выше. Помимо этого, он характеризуется большей чувствительностью, в сравнении с МТТ [98, 131]. Дальнейшее развитие восстанавливающих красителей привело к получению WST-8, основным преимуществом которого является то, что его восстановление протекает вне клеток за счет транспорта электронов через клеточную стенку [194]. Это снижает токсичность данного индикатора для клеточных культур. По этой причине для оценки клеточной выживаемости нами был выбран эксперимент с использованием ССК-8.

Поскольку принцип действия всех подобных индикаторов основан на редокс-процессах, то для анализа цитотоксичности у антиоксидантов, к которым относятся и флавоноиды, требуется дополнительная оценка восстановительных свойств испытуемого вещества в концентрациях, для которых в дальнейшем будет выполняться изучение клеточной гибели, в присутствии красителя.

5.3.1. Восстанавливающая способность

При оценке восстанавливающей способности для $ДКВ_{исх}$ наблюдали линейную зависимость между оптической плотностью раствора после инкубирования с WST-8 и концентрацией добавленного объекта исследования в диапазоне от 0,02 мг/мл до 1,25 мг/мл (Рисунок 5.2А). Коэффициент детерминации составил 0,9895, что позволяет считать данную модель регрессии применимой для оценки вклада восстанавливающей способности образца в

наблюдаемую оптическую плотность и указывает на выраженную восстанавливающую способность флавоноида.

Для L-лизина угол наклона кривой линейной зависимости практически равен 0 в диапазоне концентраций 0,020 мг/мл до 2,175 мг/мл, что свидетельствует о его слабой восстановительной способности (Рисунок 5.2Б). В то же время для ДКВ/ЛИЗ_Г и ДКВ/ЛИЗ_Л установлено выраженное восстановительное влияние, хотя и ниже, чем у ДКВ_{исх} (Рисунок 5.2В и Рисунок 5.2Г).

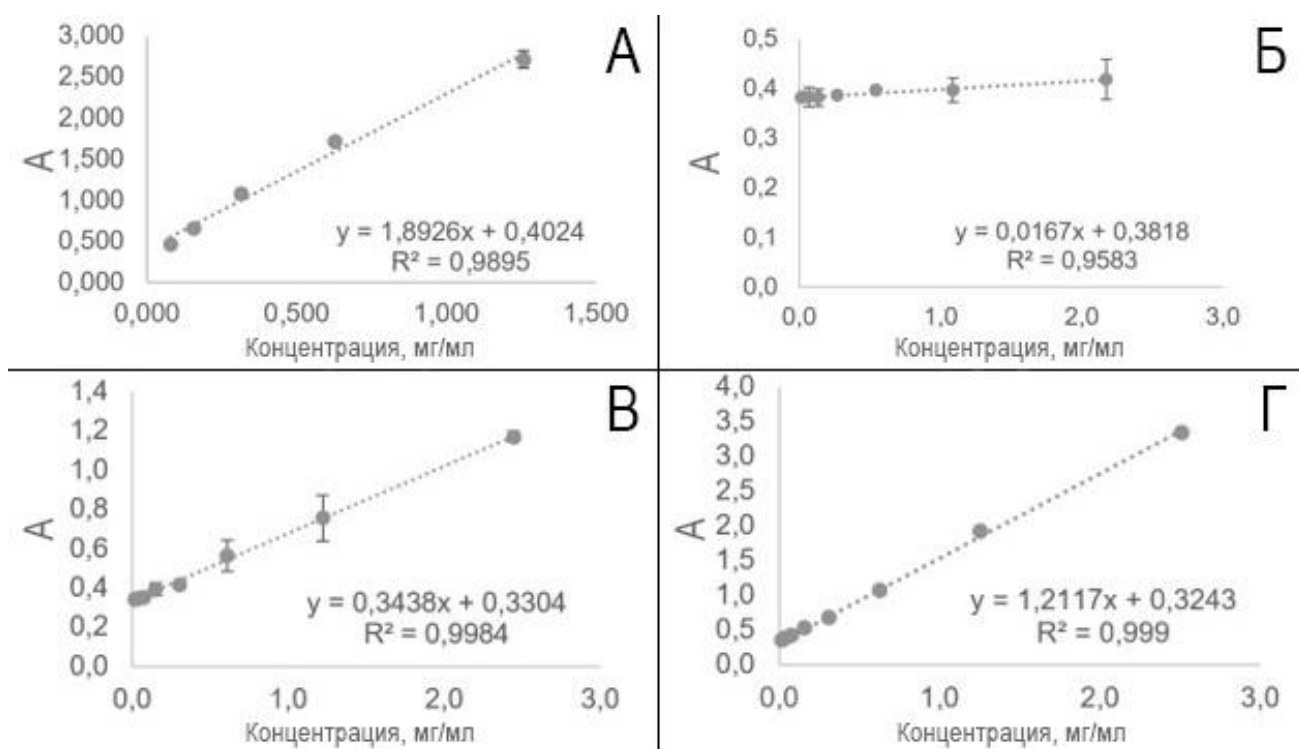


Рисунок 5.2 – Калибровочные кривые зависимости оптической плотности после добавления WST-8 от концентрации испытуемого образца: А – ДКВ_{исх}; Б – ЛИЗ_{исх}; В – ДКВ/ЛИЗ_Г; Г – ДКВ/ЛИЗ_Л

Для дополнительного сравнения использовали образец ДКВ с чистотой 90%, полученный от ООО «Робиос». Установлено, что восстанавливающая способность данного образца была ниже на 3,5% (Рисунок 5.3) по сравнению с ДКВ_{исх}, поставщиком которого являлся АО «Аметис». Подобное изменения можно объяснить меньшим содержанием ДКВ в образце ООО «Робиос».

Восстанавливающая способность, выраженная в %, при концентрации 0,15 мг/мл у образцов, полученных от различных производителей значимо не различалась и составила $30,8 \pm 5,1\%$ для продукта ООО «Робиос», а для ДКВ_{исх} – $35,6 \pm 4,2\%$ [48].

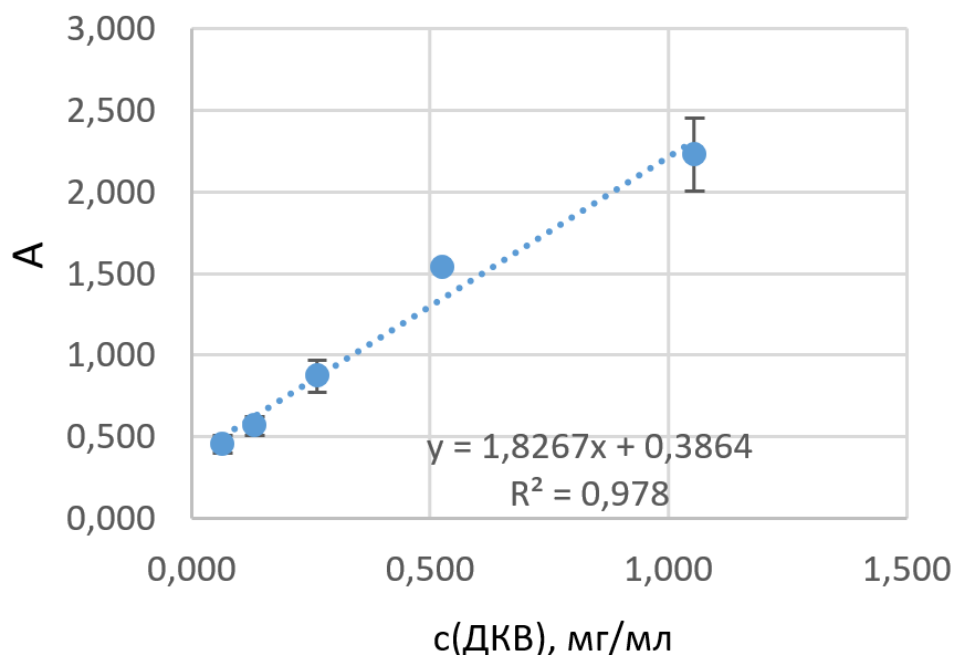


Рисунок 5.3 – Калибровочная кривая зависимости оптической плотности после добавления WST-8 от концентрации ДКВ от ООО «Робиос»

5.3.2. Цитотоксичность

При оценке цитотоксичности наблюдали обратную линейную зависимость между натуральным логарифмом выживаемости клеток и концентрацией анализируемого образца. Об этом свидетельствуют коэффициенты детерминации, составившие от 0,9171 для ДКВ/ЛИЗ_г на модели клеток НЕК293 до 0,9981 для образца ЛИЗ_л на линии HUVES. В большинстве случаев значение IC50 (концентрации анализируемого вещества, при которой достигается гибель 50% клеток) лежало в пределах заданного диапазона концентраций, что обеспечивало надежность его расчётов. Однако в случае образца ЛИЗ_л на клеточной линии 3ТЗ это значение превышало максимальную из взятых концентраций, что послужило причиной для исключения этих данных из дальнейшего анализа. Для ДКВ_{исх}

установленные значения IC_{50} составили 0,039, 0,065, 0,088 и 0,096 мг/мл для моделей клеток НЕК293, Сасо-2, HUVES и 3Т3, соответственно (Рисунок 5.4), что согласуется с литературными данными [54, 55].

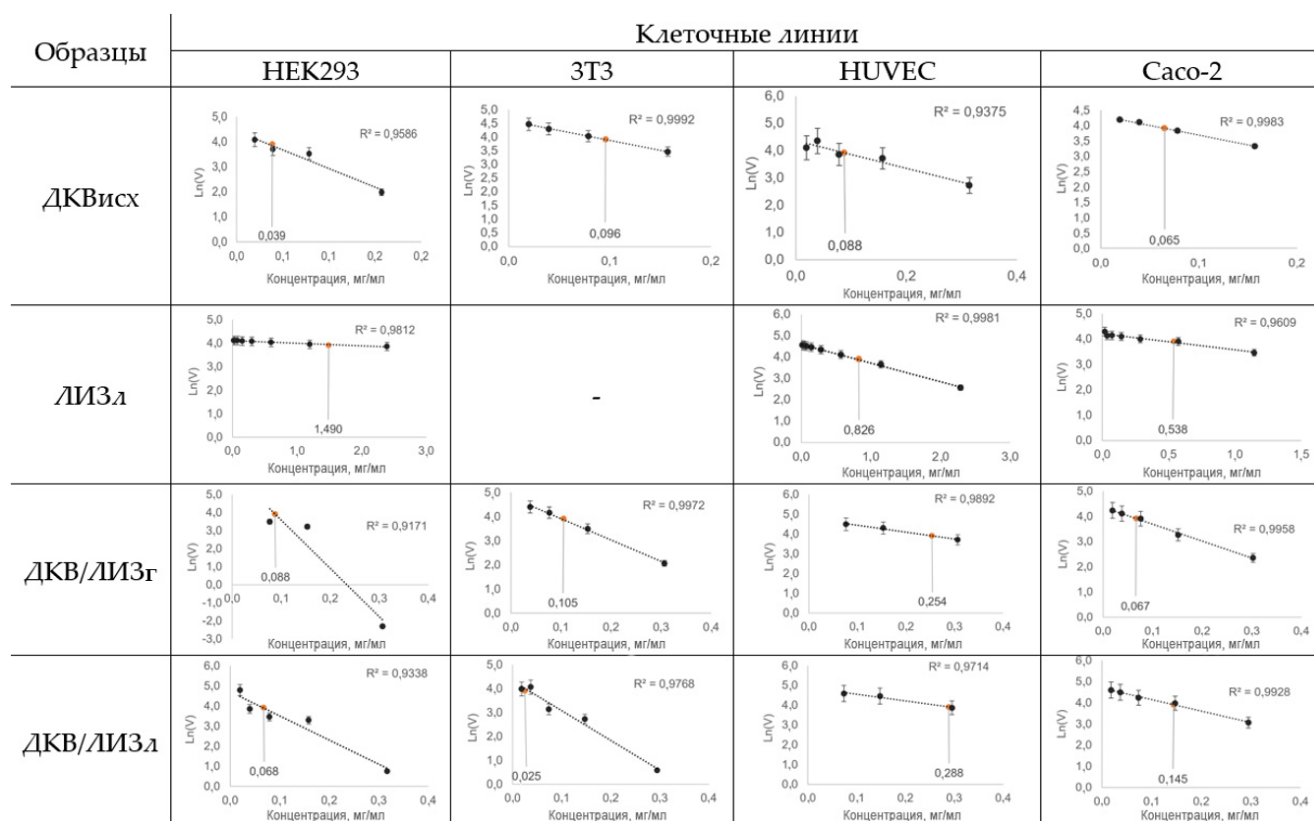


Рисунок 5.4 – Зависимость натурального логарифма выживаемости клеточных линий в зависимости от количества добавленного анализируемого образца

Для образца ДКВ, полученного от ООО «Робиос», значения IC_{50} составили 0,0721, 0,0573 и 0,0291 для клеточных линий HUVES, Сасо-2 и НЕК293, соответственно [4].

Для ЛИЗ_л значения IC_{50} были равны 0,538, 0,826 и 1,490 мг/мл для клеточных линий Сасо-2, HUVES и НЕК293, соответственно. В сравнении с ДКВ_{исх}, образец ДКВ/ЛИЗ_г характеризовался менее выраженной цитотоксичностью: значения IC_{50} составили 0,067, 0,088, 0,105 и 0,254 мг/мл для клеточных линий Сасо-2, НЕК293, 3Т3 и HUVES, соответственно. При этом, для образца ДКВ/ЛИЗ_л цитотоксичность была несколько выше: значения IC_{50} были

0,025, 0,068, 0,145 и 0,288 мг/мл для клеточных линий 3Т3, НЕК293, Сасо-2 и HUVES, соответственно.

Дальнейший дисперсионный анализ (ANOVA) позволил установить значительное влияние процесса лиофилизации на цитотоксичность образцов ДКВ_{исх} и ЛИЗ_{исх} в отношении клеток НЕК293 ($p = 0,02655$), 3Т3 ($p = 1,1 \times 10^{-7}$) и Сасо-2 ($p = 0,00089$). В случае первых двух клеточных линий наблюдали усиление цитотоксичности, а в третьем – ингибирование.

Ингибирующий эффект на цитотоксичность в случае ДКВ/ЛИЗ_л в отношении клеточной линии Сасо-2 демонстрируется непараллельными кривыми на графике скорректированных оптических плотностей в зависимости от присутствия обоих компонентов в концентрации 0,015 мг/мл (Рисунок 5.5А). Если бы взаимодействие отсутствовало, то приведенные кривые были бы параллельны друг другу. На Рисунке 5.5Б показано, что значение IC₅₀ для ДКВ/ЛИЗ_л находится выше изоболы его компонентов, которая получена путем соединения пары концентраций ДКВ_{исх} и ЛИЗ_{исх}. Данная кривая показывает концентрации, которые являются аддитивными, т.е. когда оба компонента демонстрируют постоянное соотношение цитотоксичности. Но, поскольку полученное значение IC₅₀ для данного образца лежит выше изоболограммы (т.е. требуется большая концентрация, чем теоретически ожидали), то это свидетельствует об субаддитивном эффекте во взаимодействии исходных компонентов.

Для дополнительного подтверждения субаддитивного эффекта проведен дисперсионный анализ, результаты которого представлены в Таблице 5.4. Поскольку фактическое значение коэффициента Фишера (F) превышает его критическое значение (F_{crit}) для взаимодействия компонентов ($p = 2,5 \times 10^{-11}$), нулевая гипотеза об отсутствии ингибирования цитотоксичности может быть отброшена, что подтверждает значимость наблюдаемого субаддитивного эффекта [44].

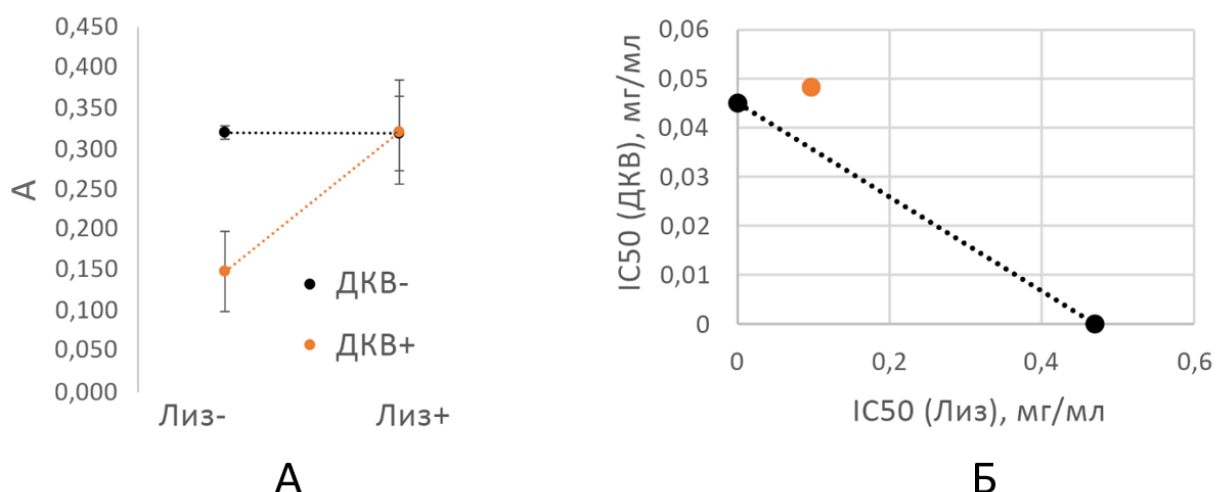


Рисунок 5.5 – Подтверждение ингибирования цитотоксичности компонентов композиций на клеточной линии Сасо-2 при лиофилизации: А – соотношение скорректированных оптических плотностей для ДКВ_{исх} и ЛИЗ_{исх} в концентрациях по 0,015 мг/мл в тестируемом образце; Б – изобола для компонентов в концентрации 0,015 мг/мл (черная линия) и экспериментальное значение IC50 (оранжевая точка)

Таблица 5.4 – Результаты дисперсионного анализа для подтверждения субаддитивного эффекта

Источник вариации	df	SS	MS	F	F_{crit}	p -значение
ЛИЗ _{исх}	1	0,236749	0,236749	139,425980	4,4939985	$2,60 \times 10^{-9}$
ДКВ _{исх}	1	0,439265	0,439265	258,691598	4,4939985	$2,67 \times 10^{-11}$
Взаимодействие	1	0,442234	0,442234	260,440100	4,4939985	$2,54 \times 10^{-11}$
Внутри	16	0,027168	0,001698			
Всего	19	1,145416				

Примечание: df – число степеней свободы, SS – сумма квадратов отклонений, MS – дисперсия, F – фактическое значение коэффициента Фишера, F_{crit} – критическое значение коэффициента Фишера

5.4. Ранозаживляющая активность *in vivo*

ДКВ давно рассматривается учеными, как перспективный терапевтический агент для лечения нарушений целостности кожных покровов, в том числе ожогов. При этом, если ранее в соответствии с научной парадигмой считалось, что его биологические эффекты обеспечиваются исключительно антиоксидантными свойствами, то в последнее время появляется ряд работ, связывающих

реализацию ранозаживляющего и противовоспалительного эффектов с направленным действием на ряд мишеней в живом организме. В частности, существуют данные о его способности регулировать экспрессию генов CD68, CD31 и VEGF [25]. Также показана возможность ДКВ активировать AMPK/Nrf2/HO-1 сигнальный путь в макрофагах, обеспечивающий снижение воспалительного процесса [67]. В то же время, для L-лизина продемонстрирована способность снижать уровень медиаторов воспаления в организме: фактора некроза опухоли альфа, интерлейкина 8 и фактора ингибирующий миграцию макрофагов [215].

Опираясь на литературные данные о наличии у обоих компонентов композиций ранозаживляющей и противовоспалительной активности, а также принимая во внимание способность водного раствора ДКВ/ЛИЗ_г формировать пленчатые структуры, предложено испытать данный образец в качестве препарата для лечения нарушений целостности кожных покровов. Модельным заболеванием выбран ожог III степени, создаваемый у крыс линии Wistar. Подобный подход часто встречается для оценки биологических эффектов флавоноидов в области ранозаживления.

Дизайн данного исследования был направлен на изучение активности ранозаживления композицией ДКВ/ЛИЗ_г в сравнении с отдельными компонентами, растительным лекарственным средством, одобренным для лечения ожогов, и плацебо. Протокол эксперимента был одобрен ЛЭК Сеченовского университета. В ходе эксперимента оценивали не только абсолютные значения площади ожогов, но и относительные значения внутри каждой из экспериментальных групп. Это позволило сформировать более полную картину динамики заживления ран.

5.4.1. Общефизиологические параметры животных

Средний вес экспериментальных животных составил $267,1 \pm 5,4$ г ($p < 0,05$), при этом статистической разницы между этим параметром в различных

исследовательских группах не обнаружено (Таблица 5.5). Описание групп представлено в разделе 6.7.4.

В то же время, в течение первой недели эксперимента наблюдалась тенденция к снижению массы тела у крыс во всех группах, однако значимых различий достигнуто не было. Масса тела возвратилась к исходному значению или превысила его на 28, 14 и 7 день в группах I, II и V соответственно.

Таблица 5.5 – Динамика изменения веса животных в ходе эксперимента

Группа	Средний вес $\pm$ полуширина доверительного интервала ($p < 0,05$), г						
	День 0	День 1	День 7	День 14	День 21	День 28	День 35
I	272,9 $\pm 12,9$	266,2 $\pm 12,3$	261,4 $\pm 14,0$	266,1 $\pm 14,1$	268,4 $\pm 14,9$	273,1 $\pm 16,8$	272,8 $\pm 13,9$
II	268,3 $\pm 14,7$	263,1 $\pm 15,4$	258,8 $\pm 15,0$	275,5 $\pm 19,5$	270,0 $\pm 13,9$	272,0 $\pm 11,0$	274,6 $\pm 10,5$
III	268,6 $\pm 11,7$	262,7 $\pm 15,1$	262,0 $\pm 13,9$	264,0 $\pm 12,9$	260,5 $\pm 12,8$	267,7 $\pm 12,8$	266,3 $\pm 13,7$
IV	258,0 $\pm 12,7$	253,0 $\pm 12,2$	250,4 $\pm 19,4$	250,2 $\pm 15,2$	252,1 $\pm 14,4$	255,3 $\pm 15,7$	256,9 $\pm 15,0$
V	268,5 $\pm 7,9$	261,9 $\pm 7,9$	278,1 $\pm 11,4$	262,3 $\pm 7,9$	263,6 $\pm 5,9$	273,0 $\pm 9,2$	268,5 $\pm 5,7$

Температура тела животных во всех группах в день ожога составляла $36,9 \pm 0,4$ °C ($p < 0,05$). В первый день она снизилась до $35,4 \pm 0,6$ °C ($p < 0,05$). Других существенных различий между измерениями не наблюдали.

На основании результатов анализа общего состояния можно предположить, что экспериментальные группы, сформированные в результате рандомизации, характеризуются высокой однородностью. Это, наряду со сходством морфологической структуры кожи экспериментальных животных с кожей человека [139], повышает значимость полученных данных. Колебания веса могут быть вызваны дискомфортом, обусловленным смоделированным термическим повреждением кожи.

Аналогичные изменения в моделях ожогов наблюдались Duan et al. [76] и Lakshmi et al. [78]. Резкое снижение температуры тела у экспериментальных животных после образования ожога можно объяснить частичным удалением шерсти и нарушением терморегуляции [29].

5.4.2. Динамика площади ожога

На первый день после формирования ожога на поврежденной коже наблюдали образование волдырей. Средняя площадь раны во всех группах составила $5,61 \pm 0,20 \text{ см}^2$ ($p < 0,05$). Статистически значимой разницы между данным параметром в исследуемых группах не обнаружено (Таблица 5.6).

Таблица 5.6 – Динамика абсолютной площади ожога у животных в ходе эксперимента

Группа	Средняя площадь ожога $\pm$ полуширина доверительного интервала ($p < 0,05$), см^2					
	День 1	День 7	День 14	День 21	День 28	День 35
I	$5,52 \pm 0,54$	$5,14 \pm 0,41$	$4,51 \pm 0,43$	$2,41 \pm 0,46$	$1,21 \pm 0,50$	$0,59 \pm 0,49$
II	$5,54 \pm 0,45$	$5,60 \pm 0,56$	$5,60 \pm 0,56$	$2,01 \pm 0,52$	$0,99 \pm 0,32$	$0,46 \pm 0,25$
III	$5,75 \pm 0,57$	$5,44 \pm 0,34$	$4,45 \pm 0,70$	$2,68 \pm 0,69$	$0,92 \pm 0,40$	$0,28 \pm 0,18$
IV	$5,73 \pm 0,57$	$5,41 \pm 0,33$	$4,68 \pm 0,47$	$2,85 \pm 0,59$	$1,19 \pm 0,24$	$0,33 \pm 0,14$
V	$5,51 \pm 0,42$	$5,34 \pm 0,38$	$3,90 \pm 0,50$	$1,67 \pm 0,47$	$0,55 \pm 0,26$	$0,11 \pm 0,05^*$
Примечание: * – показывает статистическую значимость по сравнению с группой II при $p < 0,05$						

На 7-й день во всех группах наблюдали образование корок. В группах I, III, IV и V отмечено снижение площади ожоговой поверхности на 7,0, 5,4, 5,5 и 3,1% в абсолютных значениях и на 6,0, 4,2, 4,1 и 2,8% в относительных значениях, соответственно (Рисунок 5.6). Однако существенной разницы между экспериментальными группами в течение первой недели лечения не выявлено.

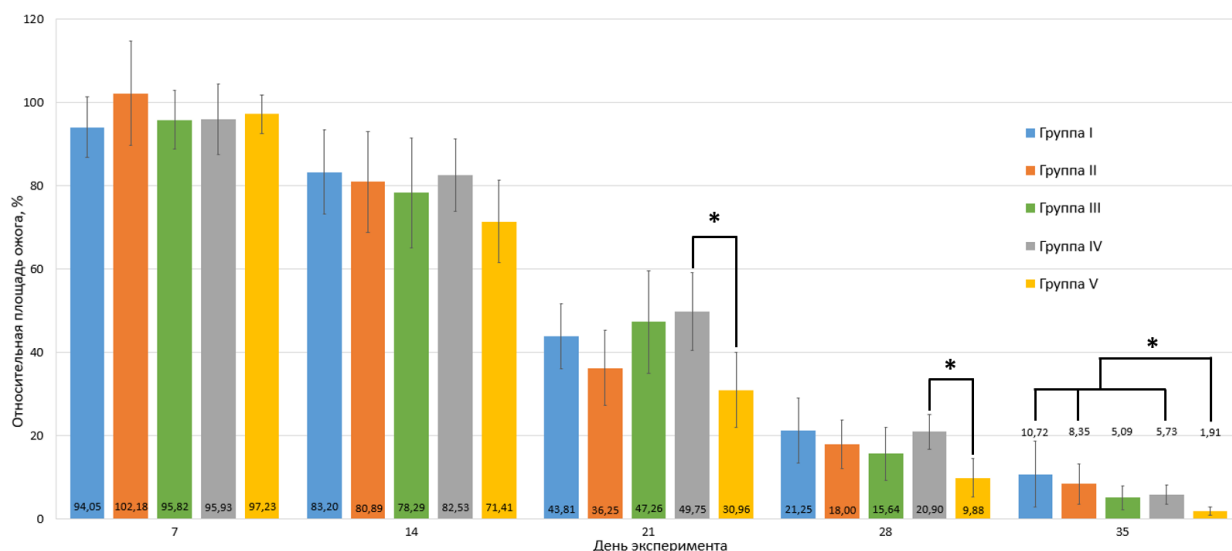


Рисунок 5.6 – Динамика относительной площади раны в ходе эксперимента

На 14-й день активное заживление раны наблюдали в группе V, которая опережала другие группы на $9,6 \pm 2,0\%$ ($p < 0,05$) по абсолютным значениям и на $9,8 \pm 2,1\%$ ($p < 0,05$) по относительной площади. Остальные группы показали аналогичные результаты без существенных различий по площади между собой. В конце третьей недели лечения активное заживление раны отмечено в группах II и V: в период с 14-го по 21-й день площадь ожога уменьшилась на 55,0 и 57,2% (абсолютные значения) и на 44,6 и 40,4% (относительные значения), соответственно, по сравнению с площадью на 14-й день. Эта тенденция сохранялась до конца эксперимента. В период с 21-го по 28-й день в группах III и IV наблюдали значительное снижение относительной площади до 31,7 и 28,9 % соответственно.

На 35-й день отмечена статистически значимая разница в относительной площади ожога в группе V. В других группах лечения относительные значения существенно не отличались к концу эксперимента. При этом, в группах III и IV наблюдали тенденцию к более активному заживлению ран, но доверительный интервал был меньше, чем в группе V. Макрофотографии площади ожоговой поверхности для каждого дня наблюдений представлены на Рисунке 5.7.

Для определения характера фармакологического взаимодействия между компонентами был проведен анализ ANOVA для относительной площади ожогов на 35-й день. Обнаружена статистически значимая разница в группе, получавшей лечение ДКВ, по сравнению с группой без лечения ($F = 5,69$, $p = 0,022$). Аналогичные результаты наблюдали для группы, получавшей лечение L-лизином ($F = 4,26$, $p = 0,045$). Для группы ДКВ/ЛИЗ_г отмечен аддитивный эффект комбинированного применения компонентов ($F = 0,21$, $p = 0,649$) [114].

Для изучения различий в молекулярных и клеточных механизмах заживления ран в экспериментальных группах был использован гистохимический анализ.



Рисунок 5.7 – Макрофотографии ожоговой поверхности по дням эксперимента

5.4.3. Гистологический анализ

В ходе гистологического исследования в группах I (Рисунок 5.8А), II и III (Рисунок 5.8Б) на 7-й день наблюдали участки обширной мононуклеарной

инфильтрации. Дермальная область не эпителизирована и заполнена большим количеством фибробластов и плазматических клеток. В группе IV было отмечено образование плохо дифференцированного эпидермального слоя. Также присутствуют фибробласты и тонкие коллагеновые волокна (Рисунок 5.8В). В группе V можно было наблюдать умеренное количество коллагеновых волокон и множество фибробластных клеток. Также можно было различить слои эпидермиса (Рисунок 5.8Г).

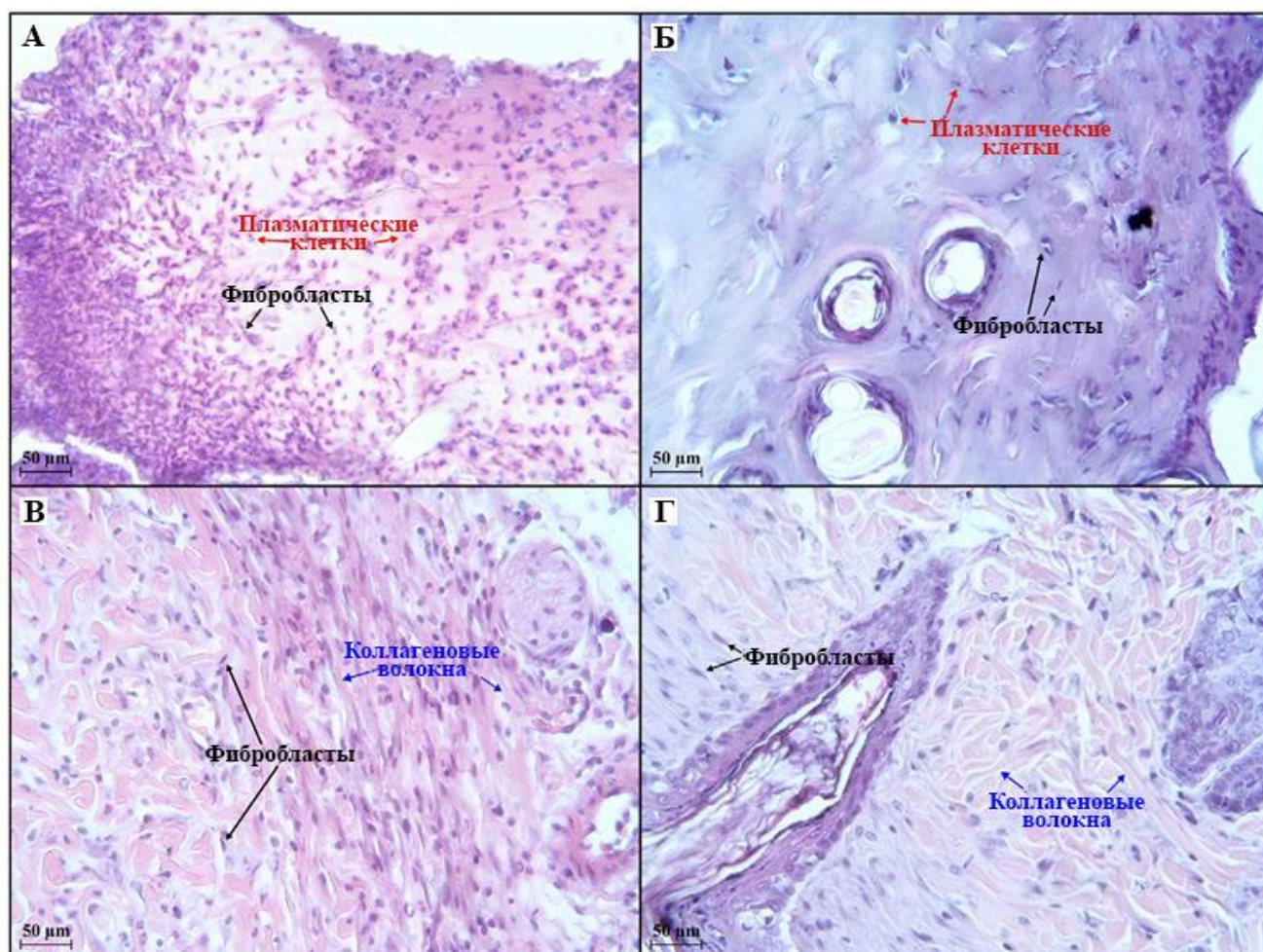


Рисунок 5.8 – Гистологические микрофотографии ($\times 400$) срезов на 7 день эксперимента: А – группа I; Б – группа III; В – группа IV; Г – группа V

На Рисунке 5.9А показано улучшение, которое наблюдали в группе II на 21-й день: поверхность кожи начала эпителизоваться, а граница между дермой и эпидермисом стала относительно гладкой. Отмечены дифференцированные слои, фибриллярные структуры и венозный застой.

После 1 месяца лечения в группе IV установлено увеличение количества коллагеновых волокон, клеток вокруг сосудов и венозного плектора. Идет активный процесс образования келоидных рубцов (Рисунок 5.9Б). Как показано на Рисунке 5.9В, эпидермальный и дермальный слои в группе V явно дифференцированы. Четко видно большое количество коллагеновых волокон, и отмечен активный процесс образования келоидных рубцов.

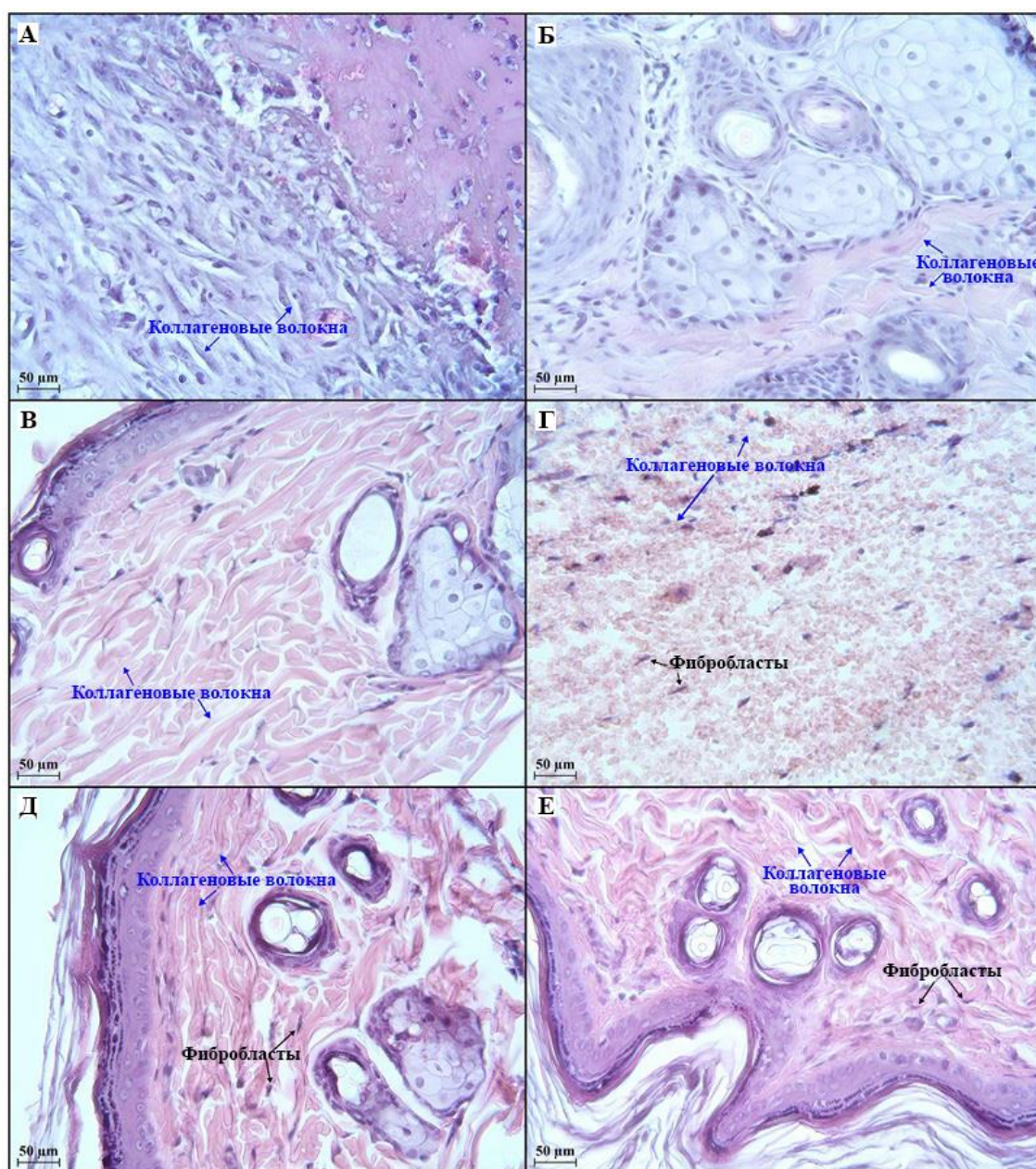


Рисунок 5.9 – Гистологические микрофотографии ($\times 400$) срезов во второй половине эксперимента: А – группа II на 21 день; Б – группа IV на 28 день; В – группа V на 28 день; Г – группа I на 35 день; Д – группа II на 35 день; Е – группа III на 35 день

В последний день эксперимента в группе I было отмечено слабое образование эпидермальной ткани. Дермальная область заполнена небольшим количеством фибробластов. Также наблюдали лимфоцитарную инфильтрацию, кровоизлияния и небольшое количество коллагеновых волокон (Рисунок 5.9Г). В группе II количество коллагеновых волокон увеличилось, а фибробластных клеток – уменьшилось, и начал формироваться рубец (Рисунок 5.9Д). Аналогичная картина наблюдалась в группе III (Рисунок 5.9Е), и та же гистологическая картина была отмечена в группах IV и V на 28-й день [14].

5.4.4. Полуколичественная гистологическая оценка

В группе I на 7-й день обнаружено большое количество плазматических клеток ($n = 273$). Это свидетельствует об интенсивной воспалительной реакции на ранней стадии, указывающей на активный иммунный ответ. В группе II на этот день обнаружено 59 плазматических клеток, что указывает на менее интенсивную воспалительную реакцию в течение первой недели эксперимента по сравнению с группой I. Таким образом, можно предположить более плавное продвижение в пролиферативную фазу.

Напротив, в группах IV и V на 7-й день плазматических клеток не обнаружено, что указывает на завершение воспалительного процесса и продолжающуюся регенерацию тканей. Количество фибробластов составило 291 в группе IV, а в группе V – 115. Кроме того, в этих группах на ранних стадиях заживления ран наблюдалось большое количество коллагеновых волокон: 122 и 88 в группах IV и группе V, соответственно. Эти данные указывают на начало пролиферативной фазы и предполагают первоначально сильный регенеративный ответ.

На 35-й день, по сравнению с 7-м днем, количество фибробластов в группах I и II изменилось со 185 до 44 и с 48 до 36, соответственно. Увеличение количества коллагеновых волокон в группе II с 33 (21-й день) до 119 (35-й день) свидетельствует об активном ремоделировании и укреплении ткани, что является

признаком фазы созревания заживления ран. Количество коллагеновых волокон в группе I достигло всего 11 на 35-й день, что вместе с уменьшением количества фибробластов указывает на слабое продвижение в пролиферативную и ремоделирующую фазы и подразумевает слабую регенерацию ткани.

На 35-й день в группе III наблюдали значительное присутствие фибробластов ($n = 64$) и коллагеновых волокон ($n = 136$), что указывает на сильную регенерацию и эффективное ремоделирование ткани. Данные свидетельствуют о том, что группа успешно достигла фазы созревания.

В группе IV отмечали уменьшение количества коллагеновых волокон до 47, что может указывать на недостаточное созревание ткани. В то же время в группе V на 28-й день выявили увеличение количества коллагеновых волокон (с 88 до 139). Это наблюдение указывает на переход ткани в фазу ремоделирования, где отложение коллагена имеет решающее значение для укрепления и созревания новообразованной ткани. Более высокое количество коллагена позволяет говорить о продолжающемся восстановлении ткани и успешной регенерации [132, 133].

5.4.5. Терапевтическая активность

Процесс заживления ран в группе I был самым сложным из всех экспериментальных групп. До последнего дня эксперимента у некоторых животных сохранялись остатки корочки на ожоговой поверхности. Также данная группа характеризовалась самым медленным уменьшением площади раневой поверхности среди всех групп исследования. На 7-й день гистологический анализ показал появление глубоких патологических процессов, вызванных ожогом, в частности воспаления, а признаки стадии пролиферации наблюдались позднее всех – 35-й день. Аналогичные результаты были отмечены в других исследованиях [198], где отрицательная контрольная группа получала лечение физиологическим раствором. Однако есть данные [196], согласно которым, такое лечение существенно не отличается от отсутствия лечения.

В группе II гистологические показатели существенно не отличались от показателей плацебо в первой половине эксперимента. В течение первой недели положительной динамики заживления ран не отмечено, что можно объяснить образованием масляной пленки на поврежденной поверхности кожи. Это снижает газообмен между раной и окружающей средой и затрудняет высвобождение продуктов воспаления. Как показал гистохимический анализ, стадия пролиферации наблюдалась только на 21-й день. При этом масло семян облепихи ранее изучалось на предмет его ранозаживляющего эффекта после термических ожогов на модели крыс Sprague-Dawley [181], где был продемонстрирован значительный эффект по сравнению с сульфадиазином серебра. Авторы предположили, что подобная биологическая активность связана с наличием в масле омега-3 и омега-6 жирных кислот, токоферола и каротиноидов. Кроме того, модель овец мериносовой породы [99] показала ускоренное заживление ран под воздействием облепихового масла. Это исследование подтвердило данные предыдущих наблюдений о благотворном влиянии местного применения облепихового масла на клинически значимую крупную модель животных.

В группе III заживление ран было активнее, чем в группе отрицательного контроля. В конце эксперимента у некоторых животных отмечено почти полное восстановление шерстяного покрова на поврежденной поверхности. Такие наблюдения хорошо согласуются с литературными источниками. Существуют данные [109] об изучении ранозаживляющей активности флавоноидов в условиях раневой инфекции, вызванной *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*. Была показана значительная активность ДКВ при лечении таких поражений кожи, что позволяет предположить, что антимикробный эффект флавоноидов может дополнительно способствовать заживлению ран после различных травм. Это свойство было дополнительно продемонстрировано в липосомальной форме ДКВ [168], характеризующейся выраженной антиоксидантной активностью и пролонгированным высвобождением. Кроме того, во время лечения ДКВ начало пролиферации наблюдалось на 21-й день. В

данной группе это произошло раньше, чем в группе отрицательного контроля, что подтверждает участие флавоноида в процессах регенерации тканей.

Визуально процесс заживления ран в группе IV аналогичен процессу в группе III. Однако, согласно данным гистологического анализа, в то время как большинство экспериментальных животных группы III к концу первой недели все еще находились в фазе экссудации, в группе IV наблюдали начало пролиферации. Возможной причиной такого раннего процесса регенерации может быть ремоделирующие эффекты лизина [123, 143].

Наиболее интересные результаты получены в группе V, где процесс заживления ран был наиболее выраженным. В конце эксперимента в этой группе наблюдали почти полное восстановление поврежденной поверхности с формированием нового волосяного покрова. Значительная разница в относительной площади ожога на 35-й день явно указывает на высокую биологическую активность ДКВ/ЛИЗ_г по сравнению с другими исследованными методами лечения. Более того, признаки пролиферации отмечены уже на 7-й день, как и в группе IV. На 28-й день установлено четкое разделение эпидермального и дермального слоев, что свидетельствует о высокоинтенсивном регенеративном процессе и потенциале композиции для регенерации тканей. Также, важным является наличие аддитивного эффекта в ранозаживляющем действии благодаря комбинированному присутствию флавоноида и аминокислоты. При этом предыдущие исследования противовоспалительной активности ДКВ показали, что скорость заживления ран коррелирует с улучшением биологической доступности псевдополимерных модификаций [47].

5.5. Выводы по главе 5

1. Выявлено, что концентрация флавоноида в образце ДКВ/ЛИЗ_л после 60 минут растворения в 900 мл воды очищенной при температуре $37 \pm 0,5$ °C в 6,9 раз больше, чем для ДКВ_{исх}, а начальная скорость растворения больше в 170 раз.

2. Установлено, что при температуре 37 °С диффузионная подвижность в агаровом геле у образца ДКВ_{исх} отсутствует, а для ДКВ/ЛИЗ_г и ДКВ/ЛИЗ_п составляет $16,00 \pm 0,17$ мм и $14,00 \pm 0,17$ мм, соответственно.
3. Продемонстрирована выраженная восстанавливающая способность для образцов ДКВ в концентрации 0,15 мг/мл, полученных от различных производителей: $30,8 \pm 5,1\%$ для ООО «Робиос», $35,6 \pm 4,2\%$ для АО «Аметис».
4. Доказано, что в сравнении с ДКВ_{исх} образец ДКВ/ЛИЗ_г характеризуется более высоким профилем безопасности: значения IC50 составили 0,067, 0,088, 0,105 и 0,254 мг/мл для клеточных линий Сасо-2, НЕК293, 3Т3 и HUVES, соответственно.
5. Обнаружен статистически значимый суббаддитивный эффект при лиофилизации ДКВ/ЛИЗ_г на клеточной линии Сасо-2 ($p = 2,5 \times 10^{-11}$).
6. Установлен аддитивный эффект комбинированного применения компонентов ($F = 0,21$, $p = 0,649$) ДКВ/ЛИЗ_г в эксперименте *in vivo* на крысах линии Wistar.
7. Выявлено, что регенеративный процесс в группе, получавшей лечение ДКВ/ЛИЗ_г, характеризовался более физиологичным течением, по сравнению с ДКВ_{исх} и облепиховым маслом: к 28 дню эксперимента наблюдали четкую дифференциацию дермального и эпидермального слоев кожи.

ГЛАВА 6. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

6.1. Материалы

6.1.1. Объекты исследования

Объектами исследования являлись фазовые модификации ДКВ, полученные из ДКВ – ФС 000388-270812 («Лавитол», АО «Аметис», Благовещенск, Россия).

Продукт сухого гриндинга ДКВ-L-лизин (ДКВ/ЛИЗ_с). ДКВ смешивали с L-лизина моногидратом в соотношении 1:2 (мол.) и перетирали в течение 15 минут в фарфоровой ступке.

Пленки ДКВ-L-лизин (ДКВ/ЛИЗ_п). Навеску ДКВ/ЛИЗ_г растворяли при комнатной температуре в двухкратном от взятой массы объеме воды очищенной, после чего наносили на твердую полиэтиленовую подложку и помещали в сушильную камеру на 10-15 минут при температуре 65 °С до полного высыхания. Полученные объекты отделяли от подложки и хранили при комнатной температуре.

Лиофилизат L-лизина (ЛИЗ_л). Навеску L-лизина моногидрата растворяли при комнатной температуре в воде очищенной в массовом соотношении 1:10. Полученный раствор замораживали в сосуде Дьюара с сухим льдом при температуре –78 °С в течение 24 часов, после чего подвергали сублимационной сушке при температуре –56 °С и давлении 1 кПа на протяжении 36 часов. Полученные объекты хранили при комнатной температуре.

Лиофилизат ДКВ (ДКВ_л). Навеску ДКВ растворяли при нагревании до 80 °С в воде очищенной в массовом соотношении 1:75. Полученный раствор замораживали в сосуде Дьюара с сухим льдом при температуре –78 °С в течение 24 часов, после чего подвергали сублимационной сушке при температуре –56 °С и давлении 1 кПа на протяжении 36 часов. Полученные объекты хранили при комнатной температуре.

Лиофилизат продукта сухого гриндинга (ДКВ/ЛИЗ_л). Навеску ДКВ/ЛИЗ_л растворяли при комнатной температуре в воде очищенной в массовом соотношении 1:10. Полученный раствор замораживали в сосуде Дьюара с сухим льдом при температуре $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 24 часов, после чего подвергали сублимационной сушке при температуре $-56\text{ }^{\circ}\text{C}$ и давлении 1 кПа на протяжении 36 часов. Полученные объекты хранили при комнатной температуре.

6.1.2. Реактивы, стандартные образцы, растворители

Агар – diaGene, Москва, Россия.

Азотная кислота – 65%, Сигма Тек, Химки, Россия.

Ацетон – х.ч., ООО «Русхим», Москва, Россия.

Ацетонитрил – 99,9% (HPLC Gradient Grade), Fisher Scientific, Лафборо, Англия.

Бензиловый спирт – $>99,5\%$ ч.д.а., АО «Экос-1», Москва, Россия.

Борная кислота – 99-100,5% (pharma grade), PanReac Applichem, Дармштадт, Германия.

Водорода пероксид – 3%, АО «Самарамедпром», Чапаевск, Россия.

Водорода пероксид – 30%, CDH, Нью-Дели, Индия.

Гематоксилин и эозин – БиоВитрум, Санкт-Петербург, Россия.

ГСО ДКВ – 99,99%, АО «Аметис», Благовещенск, Россия; ГСО 10766-2016.

ДКВ – 95%, АО «Аметис», Благовещенск, Россия.

ДКВ – 99,1%, АО «Аметис», Благовещенск, Россия.

ДКВ – 90%, ООО «Робиос», Москва, Россия.

ДМСО – 99,9%, Beyotime, Шанхай, Китай.

ДМСО- d_6 – для ЯМР спектроскопии, Acros Organics, Уолтем, США.

Золетил 100 – Virbac, Карро, Франция.

L-лизина моногидрат – 98,5-101,0% (pharma grade), NeoFroxx GmbH, Дармштадт, Германия.

L-лизина моногидрат – 98,5-101,0% (pharma grade), PanReac Applichem, Дармштадт, Германия.

3-меркаптопропионовая кислота – >98,0%, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (TCI), Токио, Япония.

Метанол – $\geq 99,9\%$ (для градиентной ВЭЖХ), ООО «Акваметрия», Москва, Россия.

Минимально необходимая среда заменимых аминокислот (MEM) – 1X, Gibco, Уолтем, США.

Муравьиная кислота – >99,0% (for HPLC), Shanghai Macklin Biochemical Co., Ltd., Шанхай, Китай.

Набор для подсчета клеток (ССК-8) – Selleck Chemicals, Хьюстон, США.

Натрия ацетат – $\geq 99\%$, NeoFroxx GmbH, Дармштадт, Германия.

Натрия боргидрид – 98%, CDH, Нью-Дели, Индия.

Натрия гидроксид – ч.д.а., ООО «Русхим», Москва, Россия.

Нингидрин – $\geq 99\%$ х.ч., АО «ЛенРеактив», Санкт-Петербург, Россия.

Облепиховое масло – ООО «Тульский фармацевтический завод», Тула, Россия.

Раствор пенициллин/стрептомицин (P/S) – 1X, Gibco, Уолтем, США.

Раствор трипсина с ЭДТА – 1X, Gibco, Уолтем, США.

Среда DMEM – 1X, Gibco, Уолтем, США.

Соляная кислота – х.ч., ООО «Русхим», Москва, Россия.

Трифторуксусная кислота – 98%, Pallav Chemicals & Solvents Pvt. Ltd., Мумбаи, Индия.

Фетальная бычья сыворотка – 1X, ExCell, Шанхай, Китай.

Формалина буферный раствор 10% – БиоВитрум, Санкт-Петербург, Россия.

Фосфатный буфер (PBS) – 0,01 М, Biosharp, Хэфей, Китай.

о-фталевый альдегид – $\geq 97\%$ (HPLC grade), Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США.

Этанол – 96%, NeoFroxx GmbH, Дармштадт, Германия.

Этанол медицинский – 90%, ООО «Контанта-фарм М», Москва, Россия.

Эфир диэтиловый – х.ч., ООО "КУЗБАССОРГХИМ", Кемерово, Россия.

D₂O – для ЯМР спектроскопии, CDH, Нью-Дели, Индия.

6.2. Оборудование

Аппарат для окрашивания Autostainer XL (Leica, Нуслох, Германия) – для окрашивания гистологических срезов.

Весы аналитические AND GR-300 (A&D Co. LTD, Токио, Япония) – для взятия точной навески.

Влагомер автоматический i-Thermo GA64M (BEL Engineering, Монца, Италия) – для измерения влажности образцов.

Дифрактометр AERIS (Malvern Panalytical, Альмело, Нидерланды) – для РПД.

Дифференциальный сканирующий калориметр DSC 204 F1 Phoenix (NETZSCH Group, Зельб, Германия) – для ДСК.

Лиофильная сушилка BK-FD12P (Biobase, Цзинань, Китай) – для получения лиофилизированных модификаций ДКВ.

ИК-Фурье спектрометр ФСМ-2202 (ООО «Инфраспек», Санкт-Петербург, Россия) с приставкой нарушенного полного внутреннего отражения НПВО-Алмаз – для ИК-спектроскопии.

Инкубатор CelMate CO₂ (Esco Lifesciences Group, Сингапур) – для культивирования клеточных линий.

Камера Горяева ХВ.К.25 (Qiujing, Шанхай, Китай) – для расчета концентрации клеточных линий в ходе эксперимента *ex vivo*.

Камера UV-cabinet 4 (Camag, Муттенц, Швейцария) – для контроля диффузии.

Микроволновая система разложения EthosEasy (Milestone Srl, Коризоле, Италия) – для пробоподготовки при анализе тяжелых металлов.

Микропланшетный спектрофотометр Eon (BioTek, Винуски, США) – для оценки выживаемости клеток.

Микроскоп оптический Leica DM2000 (Leica Microsystems, Ветцлар, Германия) с цифровой камерой UCMOS03100KPA (TourCam, Ханчжоу, Китай) – для проведения гистологического анализа.

Микротом Leica RM 2265 (Leica, Нуслох, Германия) – приготовление тонких срезов для гистологического анализа.

Нагревательный стол HI 1220 (Leica, Нуслох, Германия) – для расправления гистологических срезов.

Оптический микроскоп CKX41 (Olympus, Токио, Япония) – для визуального контроля клеточных культур.

Программируемая автоматизированная станция CV5030 (Leica, Нуслох, Германия) – для нанесения покровных стекол при гистологическом анализе.

Сканирующий электронный микроскоп JSM-6320LA (JEOL Technics LTD, Токио, Япония) – для морфологического анализа.

Спектрометр атомно-адсорбционный Spectr AA-240 FS (Agilent Technologies, Санта-Клара (Калифорния), США) с ртутно-гидридной приставкой VGA-77 (Agilent Technologies, Санта-Клара (Калифорния), США) – для количественного анализа тяжелых металлов.

Спектрометр эмиссионный с индуктивно-связанной плазмой iCAP 7400 DUO (Thermo Fisher Scientific, Уолтем (Массачусетс), США) – для количественного анализа тяжелых металлов.

Спектрометр ЯМР Bruker Avance III 800МГц (Bruker BioSpin, Райнштеттен, Германия) – для спектроскопии ЯМР ^1H .

Спектрофотометр Cary 100 (Varian, Пало Альто, США) – для УФ/вид-спектрофотометрии, в том числе, для разработки методики количественного экспресс-анализа.

Спектрофотометр Specord 250 (Analytik Jena GmbH+Co. KG, Йена, Германия) – для УФ/вид-спектрофотометрии.

Сушильный шкаф FED 53 (Binder GmbH, Тюттинген, Германия) – для получения пленчатой модификации ДКВ.

Термовесы TG 209 F1 Libra (NETZSCH Group, Зельб, Германия) – для ТГ-анализа.

Термошейкер TS-100 (Biosan, Рига, Латвия) – для пробоподготовки в ходе количественного анализа методом ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией.

Тестер растворимости типа лопастная мешалка DT Light Series Dissolution Tester DT 126 (Erweka GmbH, Хаан, Германия) – для проведения *in vitro* теста растворения.

Установка магнетронного распыления IB-3 (Eiko Engineering Co., Токио, Япония) – для напыления золотого покрытия при пробоподготовке к СЭМ.

Центрифуга MiniSpin (Eppendorf, Гамбург, Германия) – для пробоподготовки в ходе количественного анализа методом ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией.

Хроматограф LC-30AD (Shimadzu, Киото, Япония), оснащенный диодно-матричным детектором SPD-M20A (Shimadzu, Киото, Япония) и масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040 (Shimadzu, Киото, Япония) – для ВЭЖХ-МС/МС.

Хроматограф LicArt 62 (Labconcept LLC, Санкт-Петербург, Россия) состоящий из насоса QP-62d, термостата T-85C, спектрофотометрического детектора UV-62 и ручного инжектора 7725i – для количественного анализа методом ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией.

Хроматограф LicArt 62 (Labconcept LLC, Санкт-Петербург, Россия) состоящий из насоса QP-62d, термостата T-85C, спектрофотометрического детектора UV-62 и автосемплера S-103dc – для количественного анализа ДКВ.

Центрифуга Centrifuge 5810 R (Eppendorf, Гамбург, Германия) – для пробоподготовки в ходе экспериментов на клеточных линиях.

pH-метр/ионометр Mettler-Toledo SevenCompact (Mettler-Toledo, Грайфензе, Швейцария) – установление значения pH для ПФ в ВЭЖХ.

6.3. Методология теоретического исследования

Систематический обзор литературы выполнен в соответствии с рекомендациями Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses (PRISMA) [201].

Анализ выполнен на основе статей, написанных на английском языке и депонированных в базе данных Google Scholar. Литературный запрос включал термин «flavonoid» в сочетании с «solubility» или «permeability» путем комбинирования логических операторов «AND» и «OR». Обзоры литературы были исключены из выборки путем включения в поисковую строку «-review». Таким образом, финальный запрос принимал следующий вид: «flavonoid AND (solubility OR permeability) AND -review». Для включения в выборку актуальной современной литературы не учитывались источники старше 2010 года.

6.4. Методы морфологического анализа

6.4.1. Органолептическое описание

Анализируемый объект помещали на ровную матовую поверхность белого цвета и описывали в соответствии с ГФ РФ XV ОФС.1.1.0006 «Субстанции для фармацевтического применения» и ОФС 2.3.6.0. «Раздел «Свойства» в частных фармакопейных статьях» Фармакопеи ЕАЭС при равномерном дневном освещении.

6.4.2. Сканирующая электронная микроскопия

Анализируемые объекты закрепляли на держателях образцов диаметром 32 мм при помощи двухсторонней клейкой ленты и помещали в установку магнетронного распыления, работающую при 8 мА и 0,16 Торр, что обеспечивало толщину слоя золота в 15 нм при напылении в течении 3 минут.

СЭМ осуществляли при увеличении от $\times 30$ до $\times 2000$ раз на сканирующем микроскопе с источником электронов на основе вольфрама, работающим при давлении 5×10^{-7} атм в режиме визуализации вторичных электронов (SEI-mode).

6.5. Методы физико-химического анализа

6.5.1. Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях

ДКВ_{исх} растворяли в 96% EtOH. В качестве образца сравнения применяли чистый 96% EtOH.

ЛИЗ_{исх}, ДКВ/ЛИЗ_г, ДКВ/ЛИЗ_л, ДКВ/ЛИЗ_п растворяли в воде деионизованной, которую также использовали в качестве образца сравнения.

УФ/вид-спектроскопию осуществляли в кюветах с длиной оптического пути 10 мм, при скорости записи спектра 100 нм/мин в диапазоне длин волн от 200 до 800 нм в соответствии с ГФ РФ XV ОФС.1.2.1.1.0003 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» и ОФС 2.1.2.24. «Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» Фармакопеи ЕАЭС.

6.5.2. Спектроскопия в инфракрасной области

ИК-спектры записаны методом нарушенного полного внутреннего отражения на алмазном кристалле в диапазоне $400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$ с разрешением 4 см^{-1} . Спектр сравнения – воздух. Число сканирований при записи спектра – 10.

Предварительно образцы высушивали при $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 2 ч.

Анализ проводили в соответствии с ГФ РФ XV ОФС.1.2.1.1.0002.15 «Спектрометрия в инфракрасной области» и ОФС 2.1.2.23. «Абсорбционная спектрофотометрия в инфракрасной области» Фармакопеи ЕАЭС.

6.5.3. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Для ЯМР-анализа по 10 мг образца растворяли в 100% растворе D₂O (для ЛИЗ_{исх} и ДКВ/ЛИЗ_п) и ДМСО-*d*₆ (для ДКВ_{исх}). Растворы помещали в 5-миллиметровую ЯМР-пробирку и записывали спектры ЯМР ¹H при температуре 298 К и рабочей частотой прибора 800 МГц, оснащенном тройным резонансным датчиком ТХ1. Для оценки химического сдвига использовали внешний стандарт – тетраметилсилан. Анализ проводили в соответствии с ГФ РФ XV ОФС.1.2.1.1.0007 «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса» и ОФС 2.1.2.45. «Спектрометрия ядерного магнитного резонанса» Фармакопеи ЕАЭС.

6.5.4. Рентгеновская порошковая дифракция

Профили рентгеновской порошковой дифракции получены на дифрактометре, оснащенном вертикальным широкоугольным угломером и твердотельным детектором Пельтье. Перед анализом каждый образец был помещен в пластиковый держатель. Источником излучения служил Cu (медный) катод ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$), сила тока составляла 15 мА, а напряжение – 40 кВ. Данные собирались при температуре 295 К в диапазоне 2θ от 5° до 50° с шагом 0,012° и временем накопления заряда 7 с. Визуализацию профилей РПД осуществляли в программном обеспечении OriginPro 2018 (версия 9.5.1) Анализ проводили в соответствии с ОФС.1.2.1.0032 «Рентгеновская порошковая дифрактометрия».

6.5.5. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Для ДСК-анализа навеску образцов 2,00–5,00 мг помещали в алюминиевые тигли с проколотыми крышками, которые подвергали нагреву со скоростью 10 °С×мин⁻¹ в потоке сухого азота 70 мл×мин⁻¹. Прибор предварительно откалибровывали для определения температур и скоростей фазовых переходов на чистых (99,999%) стандартных веществах (циклогексан, Hg, Ga, бензойная кислота, In, Sn, Bi, Pb, Zn и CsCl) в соответствии с требованиями стандартов

ASTM E967, E968 и E2253. Средняя погрешность калибровки составила 5% по нагреву и 0,2 К по температуре. Экспериментальные данные обработаны с помощью программного обеспечения NETZSCH Proteus® (версия 8.0.3) в соответствии с ASTM E794 и ISO 11357-1. Результаты представлены в соответствии с ГФ РФ XV ОФС.1.2.1.0027.18 «Термический анализ» и ОФС 2.1.2.46. «Термический анализ» Фармакопеи ЕАЭС.

6.5.6. Термогравиметрический анализ

Для ТГ-анализа образцы массой 5,00 – 10,00 мг помещали в тигли из оксида алюминия и нагревали со скоростью $10\text{ }^{\circ}\text{C}\times\text{мин}^{-1}$ в потоке сухого азота в $20\text{ мл}\times\text{мин}^{-1}$. Прибор предварительно откалибровали для определения температур фазовых переходов на чистых (99,999%) стандартных веществах (In, Sn, Bi, Zn, Al, Ag и Au) в соответствии с требованиями стандарта ASTM E1582. Для проверки термобалансов использовался моногидрат оксалата кальция. Систематическая погрешность измерения потери массы не превышала 1%. Экспериментальные данные обработаны с помощью программного обеспечения NETZSCH Proteus® (версия 8.0.3) в соответствии со стандартом ASTM E2550. Результаты представлены в соответствии с ГФ РФ XV ОФС.1.2.1.0027.18 «Термический анализ» и ОФС 2.1.2.46. «Термический анализ» Фармакопеи ЕАЭС.

6.5.7. Растворимость

Анализ проводили в соответствии с ОФС.1.2.1.0005 «Растворимость» и ОФС 2.3.6.0. «Раздел «Свойства» в частных фармакопейных статьях» Фармакопеи ЕАЭС.

6.5.8. Определение количественного содержания тяжелых металлов

Пробоподготовка. На аналитических весах взвешивали по 100 мг гомогенизированного образца и переносили в лайнер для минерализации, куда добавляли смесь 3 мл перекиси водорода 30% и 7 мл азотной кислоты 65%, после чего подвергали разложению по стандартной программе (Таблица 6.1).

Таблица 6.1 – Условия минерализации

Шаг	Температура, °C	Время, мин	Номинальная мощность, Вт
1	150	5	1800
2	200	10	1800
3	200	15	1800

После окончания минерализации для снижения давления внутри сосуда его охлаждали до 40 °C в закрытом состоянии в системе микроволновой пробоподготовки.

Атомно-эмиссионная спектроскопия. Для анализа количественного содержания мышьяка, ртути, кадмия и никеля использовали спектральные линии в соответствии с Таблицей 6.2.

Таблица 6.2 – Аналитические спектральные линии для атомно-эмиссионной спектроскопии

Элемент	Спектральная линия, нм
As	189,042
Cd	228,802
Pb	220,353
Ni	231,604

Анализ проводили при аксиальном обзоре пламени с временем промывки 105 с и скоростью 100 об/мин. Время между промывкой и анализом 10 с. Время первой и второй щели 20 с. Скорость анализа 50 об/мин. Скорость распылителя 0,6 л/мин. Мощность – 1150 Вт. Исследование проводили в двухкратной повторности.

Анализ проводили в соответствии с ГФ РФ XV ОФС.1.2.1.1.0017 «Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой» и ОФС 2.1.2.41. «Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой» Фармакопеи ЕАЭС.

Атомно-адсорбционная спектрометрия. Для анализа количественного содержания ртути использовали спектральную линию 253,7 нм.

Для работы гидридной установки были приготовлены следующие растворы: 5,0 моль/л соляной кислоты (200 мл) и 0,3% раствора боргидрида натрия в 0,5% гидроксиде натрия (250 мл), использовавшемся в качестве редуктанта.

Скорости потоков составили: пробы – 6 мл/мин, кислоты – 1 мл/мин, редуктанта – 1 мл/мин. Исследование проводили в двухкратной повторности.

Анализ проводили в соответствии с ГФ РФ XV ОФС.1.2.1.1.0005 «Атомно-абсорбционная спектрометрия» и ОФС 2.1.2.22. «Атомно-абсорбционная спектрометрия» Фармакопеи ЕАЭС.

6.6. Методы количественного анализа

6.6.1. Методика количественного экспресс-анализа

Для получения сток-раствора навеску ДКВ/ЛИЗ_г, полученную из ГСО ДКВ, массой 25,0 мг растворяли в 25,0 мл воды дистиллированной. Для получения рабочих растворов отбирали от 0,25 до 1,25 мл с шагом 0,25 мл сток-раствора и доводили объем до 25,0 мл водой дистиллированной. Концентрация ДКВ/ЛИЗ_г составила от 0,01 до 0,05 мг/мл, что эквивалентно от 0,0048 до 0,0240 мг/мл чистого ДКВ. Полученные растворы подвергали УФ/вид-спектрофотометрии и определяли оптическую плотность раствора в максимуме поглощения ДКВ на 288 нм. Измерения проводили в трехкратной повторности. Полученные данные обрабатывали в программе Microsoft Excel 2016.

6.6.2. Методика одновременного количественного определения компонентов композиции

Дериватизация нингидрином. Для проведения реакции смешивали в прозрачных стеклянных флаконах (10 мл) равные объемы 0,178 мг/мл нингидрина в ацетоне и 0,492 мг/мл L-лизина в воде очищенной, после чего нагревали при 60 °С в течение 3ч.

Дериватизация бензиловым спиртом. Для проведения реакции 1,0 г ЛИЗ_{исх} помещали в круглодонную колбу на 250 мл, прибавляли 50,0 мл ВпОН. Полученную смесь нагревали до растворения и добавляли 5 капель серной кислоты концентрированной, после чего кипятили с обратным холодильником в течение 1 ч. Из остывшего раствора отбирали 100 мкл полученного продукта, доводили до объема 10,0 мл смесью 70% MeCN и 30% H₂O с pH 2,4 (CF₃COOH) и подвергали хроматографическому разделению.

Дериватизация ОФА-реагентом. К навеске образца, содержащей 15,0 мг L-лизина или 15,0 мг ДКВ или 30 мг ДКВ/ЛИЗ_г добавляли 3 мл растворителя (вода очищенная для L-лизина и ДКВ/ЛИЗ_г; MeOH для ДКВ). Из полученного раствора отбирали по 2, 4, 6, 8 и 10 мкл, переносили в микропробирки типа эппендорф объемом 1,5 мл (Eppendorf, Гамбург, Германия) и доводили объем водой очищенной до 10 мкл. К полученному раствору прибавляли 100 мкл 0,1 М боратного буферного раствора, 5 мкл 3-меркаптопропионовой кислоты, перемешивали и приливали 295 мкл 5% раствора ОФА-реагента и помещали в термошейкер, работающий с частотой 1000 об/мин при температуре 25 °С на 2 мин. Реакцию останавливали добавлением 90 мкл MeCN и 100 мкл 0,1 М раствора натрия ацетата. Полученную смесь центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 1 мин. Супернатант немедленно использовали для ВЭЖХ анализа. Ввиду нестабильности ОФА-производного был разработан посекундный протокол операций для проведения дериватизации (Таблица 6.3).

Таблица 6.3 – Протокол дериватизации

Время по секундомеру, с	Выполняемая операция
0	Довести объема анализируемого раствора до 10 мкл
15	Добавить 100 мкл 0,1 М боратного буфера
30	Добавить 5 мкл 3-меркаптопропионовой кислоты
45	Добавить 295 мкл 5% раствора ОФА-реагента
60	Поместить закупоренную пробирку на 120 с в термошейкер при 1000 об/мин и температуре 25 °С
180	Извлечь пробирку из термошейкера
190	Добавить 90 мкл MeCN
200	Добавить 100 мкл 0,1 М раствора натрия ацетата
210	Поместить закупоренную пробирку в центрифугу на 60 с при 12 000 об/мин
270	Извлечь пробирку из центрифуги
300	Ввести пробу в хроматограф

Хроматографические условия: колонка Inspire C18 5 μ m, 150×4,6 мм (Dikma Technologies Inc., Калифорния-Сити, США); ПФ – 70% H₂O и 30% MeCN; скорость потока 0,35 мл/мин; температура термостата – 45 °С, длина волны УФ/вид-детектора 338 нм; время анализа – 40 мин; объем пробы – 20 мкл.

0,1 М боратный буферный раствор: 2,464 г борной кислоты растворяли в 90,0 мл воды очищенной. С помощью 5 М раствора гидроксида натрия доводили значение pH до 10,4 под контролем потенциометра и разбавляли полученную смесь водой очищенной до 100 мл. Этот раствор хранили при температуре от +2 до +8 °С не более 1 мес.

5% раствор ОФА-реагента: к 65,0 мг ОФА прибавляли MeOH до общей массы 1,3 г и помещали на ультразвуковую баню (ООО «Сапфир+», Москва, Россия) на 15 мин. Данный раствор использовали в течение 1 суток.

0,1 М раствор натрия ацетата: 8,203 г натрия ацетата растворяли в 90 мл воды очищенной и доводили объем до 100 мл. Полученный раствор хранили при температуре от +2 до +8 °С не более 1 мес.

Для построения калибровочных кривых использовали ГСО ДКВ и очищенный перекристаллизацией L-лизина моногидрат. Испытания на каждой

концентрации проводили в трехкратной повторности. Полученные данные обрабатывали в программе Microsoft Excel 2019.

Приготовление стандарта L-лизина: к навеске ЛИЗ_{исх} массой 3,0 г добавляли 100 мл 90% EtOH и нагревали до кипения, продолжавшегося в течение 5 мин. Полученный раствор в горячем виде процеживали через бумажный фильтр и оставляли остывать до комнатной температуры, после чего процедуру повторяли. Фильтрат оставляли при комнатной температуре на 2 дня. Образовавшийся кристаллический L-лизин отделяли от супернатанта и сушили при комнатной температуре.

Хромато-масс-спектрометрия: хроматографическое разделение осуществляли в условиях, описанных выше. Ионизацию осуществляли электроспреем в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов.

6.6.3. Методика количественного анализа дигидрокверцетина

Хроматографические условия: колонка Inspire C18 5 μ m, 150 $\times$ 4,6 мм; ПФ – 70% H₂O с pH 2,4 (CF₃COOH) и 30% MeCN; скорость потока 0,35 мл/мин; температура термостата – 35 °C, длина волны УФ/вид-детектора 288 нм; время анализа – 15 мин; объем пробы – 20 мкл.

Построение калибровочной кривой осуществляли с использованием ГСО ДКВ. Для приготовления сток-раствора навеску массой 12,5 мг растворили в 25 мл MeOH. Для приготовления рабочих растворов осуществляли последовательное разведение водой очищенной для получения образцов, содержащих от 0,125 до 0,0001 мг/мл ДКВ. Полученные данные обрабатывали в программе Microsoft Excel 2019.

6.7. Методы биофармацевтического и биологического анализа

6.7.1. Тест растворения *in vitro*

Для проведения теста растворение использовали аппарат типа «лопастная мешалка», работающий со скоростью 50 об/мин при температуре $37,0 \pm 0,5$ °С. Объем среды растворения – 900 мл воды очищенной. В каждый сосуд добавляли 100,0 мг ДКВ_{исх} или 208,0 мг ДКВ/ЛИЗ_г, ДКВ/ЛИЗ_п и ДКВ/ЛИЗ_л (эквивалентно 100,0 мг ДКВ_{исх}). Через 1, 5, 15, 30 и 60 мин отбирали пробы объемом 1 мл, который затем восполняли чистой средой растворения. Полученные образцы фильтровали через нейлоновый шприцевой фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Labfil, Ханчжоу, Китай) и анализировали методом ВЭЖХ в соответствии с разделом 6.6.3. Для каждого образца испытания проводили в трехкратной повторности. Обработку результатов проводили в программе Microsoft Excel 2019. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение.

Сопоставительный анализ профилей высвобождения ДКВ осуществляли по коэффициентам различия (f_1) и подобия (f_2) по формулам:

$$f_1 = \frac{\sum_{j=1}^n |R_j - T_j|}{\sum_{j=1}^n R_j} \times 100, \quad (6.1)$$

где n – число точек отбора пробы, R_j и T_j – концентрация действующего вещества в референтном и испытуемом образцах, соответственно, в момент времени j .

$$f_2 = 50 \times \log_{10} \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{j=1}^n |R_j - T_j|^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}, \quad (6.2)$$

где n – число точек отбора пробы, R_j и T_j – концентрация действующего вещества в референтном и испытуемом образцах в момент времени j , соответственно.

6.7.2. Диффузия

Стандартный метод. Для приготовления 2% агарового геля к навеске смеси полисахаридов массой 2,0 г прибавляли 100 мл воды очищенной. Полученную смесь ставили на 1 мин в микроволновую печь, затем разливали по

10 мл в чашки Петри с диаметром 100 мм и высотой 20 мм, стоящим на ровной горизонтальной поверхности. После полного застывания, в центр сформировавшейся поверхности ставили стеклянный цилиндр диаметром 25,0 мм и заливали второй слой. После застывания агара цилиндр аккуратно извлекали и полученную лунку заполняли гелем, содержащим 5% действующего вещества в пересчете на ДКВ_{исх}, и ставили в термостат с температурой $37,0 \pm 0,5$ °С. Через 0,5, 1, 2 и 3 часа измеряли диаметр зоны горизонтальной диффузии под УФ-облучением с длиной волны 254 нм.

Модифицированный метод на гелях с ДКВ. Агаровый гель готовили аналогично стандартному методу, но заливали в пробирки диаметром 16 мм и высотой 150 мм. После полного застывания на поверхность наносили 1,5 г геля, содержащего 5% действующего вещества в пересчете на ДКВ_{исх}, и ставили в термостат с температурой $37,0 \pm 0,5$ °С. Через 0,5, 1, 2 и 3 часа измеряли высоту зоны вертикальной диффузии под УФ-облучением с длиной волны 254 нм.

Модифицированный метод на субстанциях. Агаровый гель готовили аналогично стандартному методу, но заливали в пробирки диаметром 16 мм и высотой 150 мм. После полного застывания на поверхность наносили навеску субстанции, содержащей в пересчете на ДКВ_{исх} 50 мг действующего вещества, и ставили в термостат с температурой $37,0 \pm 0,5$ °С. Через 0,5, 1, 2 и 3 часа измеряли высоту зоны вертикальной диффузии под УФ-облучением с длиной волны 254 нм.

6.7.3. ССК-8 эксперимент

Условия культивирования клеток. Клетки линии Сасо-2 культивировали в среде, содержащей DMEM:FBS:MEM:P/S в соотношении 88:10:1:1. Для линий HUVES, HEK293 и ЗТЗ питательная среда содержала DMEM:FBS:P/S в соотношении 89:10:1. Клеточные линии были предоставлены Гуандунским фармацевтическим университетом. Культивирование осуществляли в стерильных пластиковых чашках Петри диаметром 100 мм, которые перед использованием подвергались дополнительному облучению УФ-излучением. Инкубирование

осуществляли при температуре 37,0 °С, содержании углекислого газа 5% и относительной влажности 95%. Культуральную среду обновляли каждые 24 ч.

Определение концентрации клеток. На каждую чашку Петри, из которой предварительно сливали питательную среду, наносили по 1,0 мл, подогретого до 37 °С раствора трипсина в ЭДТА. Инкубировали в течение 5 мин и останавливали трипсинизацию добавлением 1,0 мл культуральной среды, после чего промывали внутреннюю поверхность чашки Петри получившейся суспензией. Контроль открепления клеток осуществляли под микроскопом. Полученную клеточную суспензию собирали в пробирки типа «Фалькон» и центрифугировали 3 мин при 1000 об/мин. Супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в 10,0 мл чистой питательной среды. Из полученного раствора отбирали 100 мкл, которые помещали в камеру Горяева и рассчитывали концентрацию клеток (кл/мл) по формуле:

$$C = \frac{N_{\text{кл}}}{N_{\text{квадратов}}} \times 10^3, \quad (6.3)$$

где $N_{\text{кл}}$ – число клеток, подсчитанных в поле камеры Горяева, $N_{\text{квадратов}}$ – число квадратов в камере Горяева, использующейся для подсчета.

Определение восстанавливающей способности. В каждую лунку 96-луночного планшета вносили по 100 мкл DMEM, после чего добавляли по 100 мкл анализируемых образцов с концентрацией 0,15 мг/мл, растворенных в этом же растворителе. В каждую лунку вносили по 10 мкл раствора WST-8 и выдерживали в течение 1 ч при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа при относительной влажности 95%. Полученные растворы анализировали на микропланшетном спектрофотометре в максимуме поглощения восстановленной формы WST-8 при 450 нм. Восстановительную способность рассчитывали по формуле:

$$R = (A_n - A_0)/A_n \times 100\%, \quad (6.4)$$

где A_n – оптическая плотность раствора после добавления анализируемого вещества, A_0 – оптическая плотность полученного раствора без добавления аналита (0,400).

Холостой опыт. В каждую лунку 96-луночного планшета вносили по 100 мкл DMEM. Добавляли по 100 мкл каждого из анализируемых веществ, растворенных в DMEM в концентрациях от 10,0000 мг/мл до 0,0188 мг/мл. Затем вносили по 10 мкл раствора WST-8 и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С в атмосфере с содержанием углекислого газа 5% и относительной влажности 95%. Полученные растворы анализировали на микропланшетном спектрофотометре в максимуме поглощения восстановленной формы WST-8 при 450 нм.

Оценка цитотоксичности. Клеточную суспензию разводили до концентрации клеток 40 000 кл/мл и разливали по 100 мкл в каждую лунку 96-луночного планшета. Добавляли по 100 мкл каждого анализируемого вещества, растворенного в DMEM в концентрациях от 10,0000 мг/мл до 0,0188 мг/мл. Положительный контроль – удвоенное количество клеточной суспензии без добавления анализируемых веществ. Планшеты инкубировали в течение 24 ч при температуре 37 °С в атмосфере с содержанием углекислого газа 5% и относительной влажности 95%. Затем вносили по 10 мкл раствора WST-8 и повторно инкубировали в течение 1 ч. Полученные растворы анализировали на микропланшетном спектрофотометре в максимуме поглощения восстановленной формы WST-8 при 450 нм. Значения оптической плотности использовали для расчета жизнеспособности клеток (V) по формуле:

$$V = \frac{A_n - A_0}{A_{100} - A_0} \times 100\%, \quad (6.5)$$

где A_n – оптическая плотность анализируемого раствора, A_0 – оптическая плотность холостого опыта, A_{100} – оптическая плотность положительного контроля.

Полученные значения подвергали регрессионному анализу для построения линейной модели зависимости выживаемости клеток от концентрации анализируемого образца. На основе этих линейных зависимостей рассчитывали полумаксимальную ингибирующую концентрацию (IC50) для каждого

анализируемого образца как концентрацию, при которой жизнеспособность клеток составляет 50%.

Статистическая обработка результатов. Оценку восстанавливающей способности проводили в трехкратной повторности для каждой концентрации исследуемых веществ. На основе полученных данных рассчитаны средние арифметические значения и доверительные интервалы при $\alpha = 0,05$. Затем были построены линейные регрессионные модели зависимости оптической плотности тестового раствора от концентрации анализируемого образца.

Цитотоксичность оценивали в восьми повторностях для каждой концентрации каждого анализируемого образца и для каждой клеточной линии. На основе полученных данных были рассчитаны средние арифметические значения и доверительный интервал при $\alpha = 0,05$. Затем были построены линейные регрессионные модели для описания зависимости между оптической плотностью тестового раствора и концентрацией анализируемого образца.

Для оценки статистической значимости различий в наблюдаемой цитотоксичности и подтверждения наличия синергического или ингибирующего эффекта между компонентами многокомпонентных исследуемых объектов проведен двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) на основе значений оптической плотности тестовых образцов при $\alpha = 0,05$.

Оценка эффекта взаимодействия между компонентами многокомпонентных модификаций проведена с помощью изобол, отражающих концентрацию каждого отдельного компонента многокомпонентного объекта, при которой ожидается достижение IC50, если между компонентами наблюдается аддитивный эффект.

6.7.4. Ранозаживляющая активность

Животные. Исследование проводили на 60 трехмесячных самцах крыс породы Wistar, предоставленных вивариумом Сеченовского Университета. Животных содержали группами по 6 особей в поликарбонатных клетках с металлической откидной крышкой при постоянной температуре 23 ± 2 °C и

относительной влажности 50-60% отдельно от других видов животных. У них был свободный доступ к воде и пище с ежедневным обновлением и пополнением. Подстилка в клетках состояла из древесной стружки, которую меняли каждые 2 дня. Поддерживали 12-часовой режим сменяемости дневного и ночного освещения. Подобные условия содержания соответствуют требованиям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (ETS N 123), а также положениям ГОСТ №33215-2014 от 09 ноября 2015 г. «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» и ГОСТ №33216-2014 от 09 ноября 2015 г. «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами».

Дизайн эксперимента. За неделю до формирования ожога животные были случайным образом рандомизированы по 5 группам, после чего проходили акклиматизацию в течение 7 дней. Для рандомизации использовался онлайн-генератор случайных чисел, которому присваивалась последовательность от 1 до 60. Выпавшее число присваивалось животному, при этом сами значения не повторялись. Крысы с номерами 1-12 образовали группу I, 13-24 – группу II и так далее.

Группа I – отрицательный контроль: специфического лечения не проводили. Поверхности ожогов ежедневно увлажняли 1 мл дистиллированной воды.

Группа II – положительный контроль: лечение маслом семян облепихи в объеме 1 мл ежедневно на раневую поверхность.

Группа III – ежедневное лечение суспензией ДКВ_{исх} в концентрации 50 мг/мл.

Группа IV – ежедневная обработка раневой поверхности раствором ЛИЗ_{исх} в концентрации 50 мг/мл.

Группа V – ежедневное лечение 1 мл раствора ДКВ/ЛИЗ_г, содержащего 50 мг/мл (в пересчете на ДКВ_{исх}).

На 1, 7, 14, 21, 28 и 35 дни после формирования ожога у крыс измеряли массу тела, температуру и проводили оценку площади раневой поверхности контактным методом Поповой. Для этого на ожог накладывали прозрачную пластиковую пленку, край раны обводили чернилами, а затем ее площадь рассчитывали с помощью миллиметровой бумаги. Визуально дизайн эксперимента представлен на Рисунке 6.1.

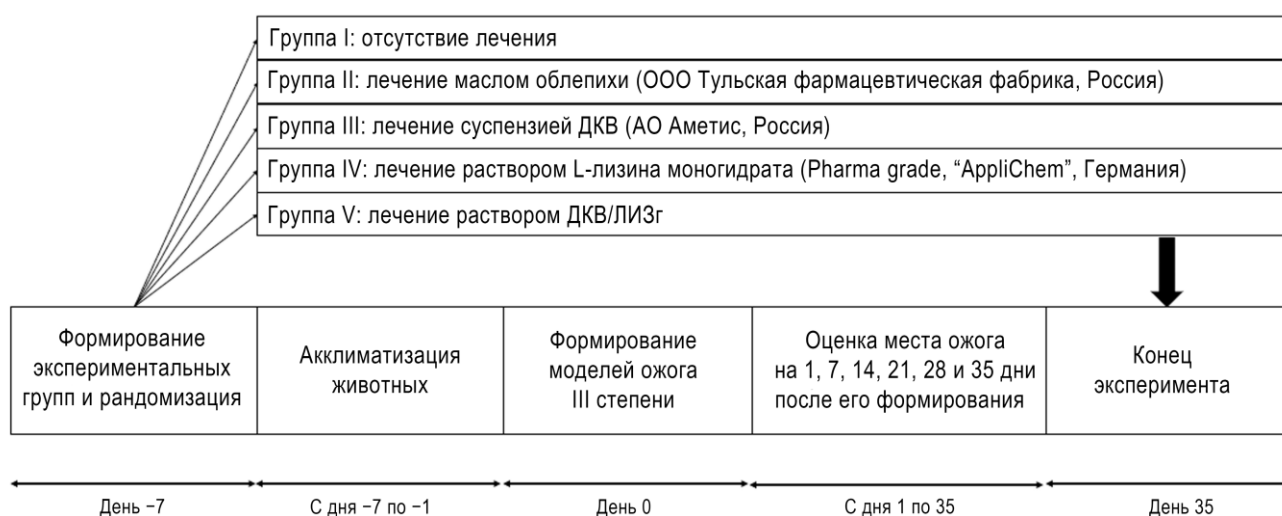


Рисунок 6.1 – Дизайн эксперимента по оценке противоожоговой активности

Протокол эксперимента был оформлен на научного руководителя и одобрен ЛЭК Сеченовского Университета: №19-20 от 2 июля 2020 г (Приложение Е).

Формирование ожога. Для создания модели ожога 3-ей степени на выбритую спины крысы, введенной в глубокий наркоз препаратом «Золетил» в дозировке 15 мг/кг, помещали на 20 с нагретую до 105 ± 5 °С металлическую пластину массой 200 г с площадью контакта 5 см².

Гистологический анализ. На 7, 14, 21, 28 и 35 дни у случайно выбранных животных в каждой группе срезали поверхность раны на границе со здоровыми тканями под ингаляционной анестезией этиловым эфиром. Гемостаз осуществляли 3% раствором перекиси водорода. Гистологический образец фиксировали в 10% буферном растворе формалина, а затем заливали парафином.

На микротоме готовили срезы толщиной 2 мкм, которые помещали на водяную баню для удаления парафина, после чего их переносили на предметное стекло нагревательного столика. Полученные образцы окрашивали гематоксилином и эозином по стандартному протоколу производителя с помощью соответствующего прибора, после чего помещали в среду для заключения препаратов для установки покровного стекла на автоматизированном устройстве. Полученные микропрепараты анализировали на микроскопе, оснащённом цифровой камерой с увеличением $\times 400$.

Полуколичественный гистологический анализ. На полученных микрофотографиях был выполнен подсчет количества видимых плазматических клеток, фибробластов и коллагеновых волокон. Данные анализировались независимо, без опоры на результаты гистологического анализа. Таким образом, были классифицированы типы воспалительных процессов и их фазы в разные дни.

Статистическая обработка результатов. Данные представлены как среднее значение $\pm$ полуширина доверительного интервала. Статистическую обработку проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа при уровне значимости $p < 0,05$ с использованием апостериорного теста множественных сравнений Тьюки. Сравнение проводили между исследуемыми группами в пределах одной временной точки. Дополнительно для оценки уменьшения площади ожога использовали относительные значения площади, рассчитанные по формуле:

$$RV = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{S_{i_n}}{S_{i_1}}}{n} \times 100\%, \quad (6.6)$$

где S_{i_n} – абсолютная площадь ожоговой поверхности для i -й отдельной крысы в группе на день n , S_{i_1} – абсолютная площадь ожоговой поверхности для i -й отдельной крысы в группе на день 1, n – число животных в группе.

Для установления характера фармакологического взаимодействия между ДКВ_{исх} и ЛИЗ_{исх} был проведен двухфакторный дисперсионный анализ в

программном обеспечении OriginPro 2018 (версия 9.5.1). Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования для повышения растворимости ДКВ были получены его фазовые модификации с L-лизином: пленки и лиофилизаты. В них методами ИК-спектроскопии и спектроскопии ЯМР ^1H подтверждено отсутствие образования новых ковалентных связей, что совместно с данными РПД позволяет считать их коаморфными структурами. Разработаны методики на основе УФ/вид-СФМ и ВЭЖХ, которые валидированы по показателям: специфичность, линейность, правильность и повторяемость. Цитотоксичность по отношению к клеткам линии HUVEC для ДКВ/ЛИЗ_г и ДКВ/ЛИЗ_л снизилась в 3 раза по сравнению с ДКВ_{исх}.

Оптимизирован состав ДКВ/ЛИЗ_г, продемонстрировавшей выраженную ранозаживляющую активность в эксперименте *in vivo*. Образование пленчатой структуры, способствовавшей процессу регенерации кожного покрова,

Результаты работы могут лечь в основу разработки линейки лекарственных средств с противовоспалительным и ранозаживляющим действием на основе разработанных композиций ДКВ с L-лизином.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. В ходе систематического литературного обзора выявлены наиболее перспективные методы для повышения растворимости, проницаемости и биодоступности флавоноидов, а также их влияние на фармакокинетические параметры, проведена критическая оценка результатов изучения конечной растворимости соединений флавоноидной природы.

2. На основе полученного продукта сухого гриндинга синтезированы новые коаморфные фазовые модификации ДКВ с L-лизином в виде пленок и мезопористых лиофилизатов, характеризующиеся улучшенной растворимостью в воде при комнатной температуре.

3. Определены основные показатели качества и методы их анализа для полученных композиций ДКВ с L-лизином: подлинность – в ИК-спектре должны содержаться полосы поглощения ~ 3380 , ~ 3083 , ~ 1633 см^{-1} (ДКВ) и ~ 2925 , ~ 2854 , ~ 2655 см^{-1} (L-лизин) и ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией: относительное время удерживания продукта дериватизации – 1 (около 6 мин); диgidрокверцетина – около 1,24; количественное определение – ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией *o*-фталевым альдегидом (45-50% ДКВ и 50-55 % L-лизина); для продукта сухого гриндинга данные показатели вошли в разработанный проект спецификации.

4. Разработаны методики количественного анализа компонентов композиций, позволяющие осуществлять экспресс-анализ содержания флавоноида в составе фазовых модификаций (на базе УФ/вид-СФМ), проводить количественный анализ ДКВ в присутствии L-лизина (ВЭЖХ-УФ) и выполнять единовременную оценку содержания флавоноида и аминокислоты (ВЭЖХ-УФ с предколоночной дериватизацией).

5. Установлено повышение растворимости флавоноида в составе композиций более чем на 3 порядка и увеличение диффузионной проницаемости в агаровом геле; средняя скорость растворения в первую минуту для ДКВ_{исх}, ДКВ/ЛИЗ_п,

ДКВ/ЛИЗ_г и ДКВ/ЛИЗ_л составила 0,5; 8,2; 51,6 и 84,9 мг×л⁻¹×мин⁻¹, соответственно.

6. Продемонстрировано снижение цитотоксичности для полученных лиофилизатов по сравнению с исходными компонентами на моделях клеточных линий CaCo-2 и HUVEC; на модели *in vivo* выявлено статистически значимое различие ($p < 0,05$) в ранозаживляющей и противовоспалительной активности по сравнению с группами положительного и отрицательного контроля.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Представленные результаты могут лечь в основу разработки противоожогового фитопрепарата на основе природного флаванолола ДКВ. Сформулирован проект спецификации на субстанцию ДКВ/ЛИЗ_г. Целесообразно применять результаты исследования при разработке и стандартизации новых субстанций на основе других представителей группы флавоноидов и аминокислот. Методики получения коаморфных композиций могут быть адаптированы для других соединений.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

На основе полученных результатов в дальнейшем целесообразно проведение фармацевтической разработки лекарственных форм на базе полученных модификаций с последующим проведением полномасштабных доклинических и клинических исследований.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЗТЗ	клеточная линия эмбриональных фибробластов мышцы
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ МС/МС	высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией
ГСО	государственный стандартный образец
ГФ РФ XV	Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания
ДКВ	дигидрокверцетин
ДКВ _{исх}	исходная субстанция дигидрокверцетина
ДКВ _л	лиофилизат дигидрокверцетина
ДКВ/ЛИЗ _л	лиофилизат продукта сухого гриндинга дигидрокверцетина с L-лизином
ДКВ/ЛИЗ _п	пленчатая форма на основе продукта сухого гриндинга дигидрокверцетина с L-лизином
ДКВ/ЛИЗ _г	продукт сухого гриндинга дигидрокверцетина с L-лизином в мольном соотношении 1:2
ДМД	диодно-матричный детектор
ДСК	дифференциальная сканирующая калориметрия
ЕАЭС	Евразийский экономический союз
ИК-спектроскопия	спектроскопия в инфракрасной области
ЛИЗ _{исх}	исходная субстанция L-лизина моногидрата
ЛИЗ _л	лиофилизат L-лизина
НФ	неподвижная фаза
ОФА	о-фталевый альдегид
ОФС	общая фармакопейная статья
ПФ	подвижная фаза
РПД	рентгеновская порошковая дифракция

СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
ТГ	термогравиметрия
УФ/вид- спектрофотометрия	спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях
УФ- спектрофотометрия	спектрофотометрия в ультрафиолетовой области
ФС	фармацевтическая субстанция
ЯМР ^1H	ядерный магнитный резонанс на ядрах ^1H
ANOVA	дисперсионный анализ
AUC	площадь под фармакокинетической кривой
BnOH	бензиловый спирт
C18	силикагель октадецилсилильный для хроматографии
Caco-2	эпителиальные иммортализованные клетки колоректальной аденокарциномы человека
CN	силикагель цианомодифицированный для хроматографии
C_{max}	максимальная концентрация исследуемого вещества в плазме крови
EtOH	этиловый спирт
F	фактическое значение коэффициента Фишера
F_{crit}	критическое значение коэффициента Фишера
HEK293	иммортализованные эмбриональные клетки почек человека
HUVEC	эндотелиальные клетки пуповинной вены человека
IC50	концентрации анализируемого вещества, при которой достигается гибель 50% клеток
MeCN	ацетонитрил
MeOH	метиловый спирт
$T_{1/2}$	время полувыведения
T_{max}	время достижения максимальной концентрации

	исследуемого вещества в плазме крови
R_s	разрешение между хроматографическими пиками
RSD	относительное стандартное отклонение
CCK-8	набор для подсчета клеток с красителем WST-8 в составе
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия бромид
XTT	2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2 <i>H</i> -тетразолий-5-карбоксанилид
WST-8	натрия 2-(2-метокси-4-нитропентил)-3-(4-нитропентил)-5-(2,4-дисульфофенил)-2 <i>H</i> -тетразолий

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аглоходжаева, Ш. М. Валидация ВЭЖХ-методики для количественного определения действующих веществ комбинированного инфузионного раствора / Ш. М. Аглоходжаева, А. Д. Ташпулатова // Фармация. – 2025. – Т. 74. – № 2. – С. 23-29.
2. Биодоступность и цитотоксичность композиций дигидрокверцетин - L-лизин / А. А. Свотин, М. Д. Корочкина, Д. Р. Колесникова [и др.] // Фармация. – 2025. – Т. 74. – № 8. – С. 31-39.
3. Взаимосвязь фармацевтической разработки и доклинических исследований (обзор) / И. Н. Ампилогова, М. В. Карлина, В. Г. Макаров, М. Н. Макарова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023. – Т. 12. – № 2. – С. 155-163.
4. Влияние стереоизомерного состава дигидрокверцетина на цитотоксичность / Р. П. Терехов, А. А. Свотин, М. Д. Корочкина [и др.] // ХИМБИОSEASONS 2025: сборник тезисов докладов XI Всероссийского форума молодых исследователей. – Калининград : Балтийский федеральный университет им. И. Канта, 2025. – С. 262.
5. Идентификация дериватов лизина с о-фталевым альдегидом методом хромато-масс-спектрометрии / А. А. Свотин, А. А. Ходячих, Е. С. Мельников [и др.] // Перспективы развития биологии, медицины и фармации: сборник статей по результатам XII международной научной конференции молодых ученых и студентов в 7 томах. – Шымкент : Южно-Казахстанская медицинская академия, 2025. – Т. 7. – С. 11-15.
6. Количественный анализ дигидрокверцетина и L-лизина в композициях / А. А. Свотин, А. А. Ходячих, Р. П. Терехов, И. А. Селиванова // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы докладов XII Всероссийского симпозиума с международным участием. – Москва : Перо, 2025. – С. 207.
7. Практикум по биофармации: Учеб. пособие для студентов вузов / А. И. Тихонов, Е. Е. Богущкая, Т. Г. Ярных, А. М. Котенко. – Харьков : НФаУ: Золотые станицы, 2003. – 96 с.
8. Разработка состава и технологии получения твердой дисперсной системы методом экструзии горячего расплава для повышения биодоступности действующего вещества / К. А. Гусев, Д. Н. Маймистов, В. И. Павловский [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – Т. 11. – № 4. – С. 108-115.
9. Разработка хиральных лекарственных средств на основе дигидрокверцетина / И. А. Селиванова, Р. П. Терехов, А. А. Свотин [и др.] // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых

лекарственных средств: сборник трудов 9-ой Международной научно-методической конференции. – Воронеж : Воронежский государственный университет, 2023. – С. 374-378.

10. Рентгенофазовый анализ пленок дигидрокверцетина с L-лизином / А. А. Свотин, Р. П. Терехов, А. Н. Утеньшев, И. А. Селиванова // Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы: сборник материалов. – Самара : Самарский государственный медицинский университет, 2021. – С. 458-462.

11. Свотин, А. А. Анализ продукта механоактивации дигидрокверцетина с L-лизином / А. А. Свотин // Актуальные вопросы студенческой медицинской науки и образования: материалы IX Всероссийской с международным участием студенческой научно-образовательной конференции. – Рязань : Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, 2023. – С. 165-166.

12. Свотин, А. А. Получение и исследование пленок на основе дигидрокверцетина и L-лизина / А. А. Свотин // Молодая фармация - потенциал будущего: сборник материалов конференции. – Санкт-Петербург : федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2023. – С. 305-310.

13. Свотин, А. А. Разработка методики количественного определения дигидрокверцетина в композиции с L-лизином / А. А. Свотин // X Международный молодёжный научный медицинский форум «Белые цветы», посвященный 150-летию С.С. Зимницкого: сборник тезисов. – Казань : Казанский государственный медицинский университет, 2023. – С. 810-811.

14. Свотин, А. А. Регенеративная активность композиции дигидрокверцетина с L-лизином *in vivo* / А. А. Свотин // «Молодая фармация – потенциал будущего»: сборник материалов XIV всероссийской научной конференции с международным участием Молодежного научного общества СПХФУ XIV. – Санкт-Петербург : Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, 2024. – С. 475-478.

15. Свотин, А. А. «Зеленая» фазовая модификация дигидрокверцетина с L-лизином / А. А. Свотин, Р. П. Терехов // Интеграционные связи фармацевтической экологии - 2023: сборник материалов. - 2023. – Москва : ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 2024. – С. 88-90.

16. Патент № 2841264C1 Российская Федерация, МПК А61К31/352 (2006.01). Способ повышения биодоступности флавоноидов : № 2024121971 : заявл. 01.08.2024 : опубл. 05.06.2025 / А. А. Свотин, Р. П. Терехов, А. К. Жевлакова, И. А. Селиванова. – 7 с.

17. Твердые дисперсные системы как способ создания лекарственных форм с замедленным высвобождением из расплывающихся субстанций / О. А. Терентьева, Ю. М. Кокур, И. А. Наркевич, Е. В. Флисюк // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2024. – Т. 13. – № 4. – С. 99-106.
18. Терехов, Р. П. Влияние фазового состояния на физико-химические, технологические и биофармацевтические параметры дигидрокверцетина : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация ... кандидата фармацевтических наук / Терехов Роман Петрович; ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). – Москва, 2021. – 173 с.
19. Фазовая модификация биофармацевтических свойств флавоноидов / Р. П. Терехов, А. А. Свотин, Д. И. Панков [и др.] // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы докладов XII Всероссийского симпозиума с международным участием. – Москва : Перо, 2025. – С. 79.
20. Физико-химическая характеристика коаморфных модификаций на основе дигидрокверцетина и L-лизина / А. А. Свотин, А. А. Ходячих, М. Д. Корочкина [и др.] // Фармация. – 2025. – Т. 74. – № 6. – С. 5-13.
21. 3D Printed Pellets (Miniprintlets): A Novel, Multi-Drug, Controlled Release Platform Technology / A. Awad, F. Fina, S. J. Trenfield [et al.] // Pharmaceutics. – 2019. – Vol. 11. – № 4. – P. 148.
22. A Novel Cocrystal of Daidzein with Piperazine to Optimize the Solubility, Permeability and Bioavailability of Daidzein / Z. Wang, S. Li, Q. Li [et al.] // Molecules. – 2024. – Vol. 29. – № 8. – P. 1710.
23. A novel matrix dispersion based on phospholipid complex for improving oral bioavailability of baicalein: preparation, *in vitro* and *in vivo* evaluations / Y. Zhou, W. Dong, J. Ye [et al.] // Drug Delivery. – 2017. – Vol. 24. – № 1. – P. 720-728.
24. A potential cocrystal strategy to tailor in-vitro dissolution and improve Caco-2 permeability and oral bioavailability of berberine / H. Chen, J. Ma, F. Zhou [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2024. – Vol. 666. – P. 124789.
25. A temperature-sensitive hydrogel loaded with taxifolin promotes skin repair by modulating MAPK-mediated autophagic pathway / C. Ding, Z. Liu, T. Zhao [et al.] // Journal of Materials Science. – 2023. – Vol. 58. – № 37. – P. 14831-14845.
26. Advancing Drug Delivery Paradigms: Polyvinyl Pyrrolidone (PVP)-Based Amorphous Solid Dispersion for Enhanced Physicochemical Properties and Therapeutic Efficacy / A. Rusdin, A. Mohd Gazzali, N. Ain Thomas [et al.] // Polymers. – 2024. – Vol. 16. – № 2. – P. 286.

27. Ahmed, M. Flavonoids in fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing: A review / M. Ahmed, J.-B. Eun // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2018. – Vol. 58. – № 18. – P. 3159-3188.
28. Alpinetin: a Dietary Flavonoid with Diverse Anticancer Effects / S. Gul, M. F. Maqbool, D. Zheng [et al.] // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2022. – Vol. 194. – № 9. – P. 4220-4243.
29. Alteration in Temperature Regulation Induced by Burn Injury in the Rat: / F. T. Caldwell, D. B. Graves, B. H. Wallace [et al.] // *Journal of Burn Care & Rehabilitation*. – 1989. – Vol. 10. – № 6. – P. 486-493.
30. Amorphous nano morin outperforms native molecule in anticancer activity and oral bioavailability / A. K. Jangid, H. Agraval, N. Gupta [et al.] // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. – 2020. – Vol. 46. – № 7. – P. 1123-1132.
31. An Overview on Dietary Polyphenols and Their Biopharmaceutical Classification System (BCS) / F. Truzzi, C. Tibaldi, Y. Zhang [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 11. – P. 5514.
32. Arya, P. In-vitro studies of Curcumin- β -cyclodextrin inclusion complex as sustained release system / P. Arya, N. Raghav // *Journal of Molecular Structure*. – 2021. – Vol. 1228. – P. 129774.
33. Assembling the Puzzle of Taxifolin Polymorphism / R. P. Terekhov, I. A. Selivanova, N. A. Tyukavkina [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 22. – P. 5437.
34. Bahl, D. Amorphization of Indomethacin by Co-Grinding with Neusilin US2: Amorphization Kinetics, Physical Stability and Mechanism / D. Bahl, R. H. Bogner // *Pharmaceutical Research*. – 2006. – Vol. 23. – № 10. – P. 2317-2325.
35. Bavishi, D. D. Spring and parachute: How cocrystals enhance solubility / D. D. Bavishi, C. H. Borkhataria // *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*. – 2016. – Vol. 62. – № 3. – P. 1-8.
36. Beneficial Flavonoid in Foods and Anti-obesity Effect / J. Liu, J. Cao, Y. Li, F. Guo // *Food Reviews International*. – 2023. – Vol. 39. – № 1. – P. 560-600.
37. Bioavailability and Safety of Dihydroquercetin (Review) / S. V. Orlova, V. V. Tatarinov, E. A. Nikitina [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2022. – Vol. 55. – № 11. – P. 1133-1137.
38. Bioavailability of nutraceuticals: Role of the food matrix, processing conditions, the gastrointestinal tract, and nanodelivery systems / C. Dima, E. Assadpour, S. Dima, S. M. Jafari // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2020. – Vol. 19. – № 3. – P. 954-994.

39. Bioflavonoids-based glass-like material / A. A. Svotin, A. V. Dzuban, I. A. Selivanova, R. P. Terekhov // XXII Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry: Book of abstracts in 7 volumes. – Federal Territory “Sirius” : Admiral Print, 2024. – Vol. 1. – P. 570.
40. Characterization and In Vivo Antiangiogenic Activity Evaluation of Morin-Based Cyclodextrin Inclusion Complexes / F. De Gaetano, F. Margani, V. Barbera [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15. – № 9. – P. 2209.
41. Chezanoglou, E. Co-crystallization in sucrose: A promising method for encapsulation of food bioactive components / E. Chezanoglou, A. M. Goula // *Trends in Food Science & Technology*. – 2021. – Vol. 114. – P. 262-274.
42. Chrysin cocrystals: Characterization and evaluation / R. Chadha, Y. Bhalla, A. Nandan [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2017. – Vol. 134. – P. 361-371.
43. Cichosz, S. IR Study on Cellulose with the Varied Moisture Contents: Insight into the Supramolecular Structure / S. Cichosz, A. Masek // *Materials*. – 2020. – Vol. 13. – № 20. – P. 4573.
44. Co-Amorphous Systems Based on Dihydroquercetin and l-Lysine: Synthesis and Evaluation / A. A. Svotin, M. D. Korochkina, A. A. Khodyachikh [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2025. – Vol. 17. – № 12. – P. 1528.
45. Co-amorphous systems using epigallocatechin-3-gallate as a co-former: Stability, in vitro dissolution, in vivo bioavailability and underlying molecular mechanisms / J. Chen, H. Li, X. Li [et al.] // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2022. – Vol. 178. – P. 82-93.
46. Cocrystallization with nutrient ferulic acid towards reducing the dissolubility behaviors of antifungal drug 5-fluorocytosine: An integrated theoretical and experimental case research / F.-Z. Bu, Y.-M. Yu, Y.-L. Shen [et al.] // *Journal of Molecular Structure*. – 2023. – Vol. 1275. – P. 134601.
47. Comparative Study of Wound-Healing Activity of Dihydroquercetin Pseudopolymorphic Modifications / R. P. Terekhov, I. A. Selivanova, M. N. Anurova [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2021. – Vol. 170. – № 4. – P. 444-447.
48. Comparison of antioxidant activity of dihydroquercetin samples with different diastereomeric composition / R. P. Terekhov, I. R. Ilyasov, B. Li [et al.] // *Drug development & registration*. – 2026. – Vol. 15. – № 1. – P. 43-52.
49. Comprehensive characterisation of the flurbiprofen/ β -cyclodextrin inclusion complex using X-ray techniques and NMR spectroscopy / K. Betlejewska-Kielak, E. Bednarek, A. Budzianowski [et al.] // *Journal of Molecular Structure*. – 2023. – Vol. 1285. – P. 135450.
50. Convection-Induced vs. Microwave Radiation-Induced in situ Drug Amorphization / N.-J. Hempel, M. M. Knopp, R. Berthelsen, K. Löbmann // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 5. – P. 1068.

51. Could the small molecules such as amino acids improve aqueous solubility and stabilize amorphous systems containing Griseofulvin? / M. T. França, T. M. Marcos, R. N. Pereira, H. K. Stulzer // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2020. – Vol. 143. – P. 105178.
52. Crystal Structure, Solubility, and Pharmacokinetic Study on a Hesperetin Cocrystal with Piperine as Coformer / Y. Liu, F. Yang, X. Zhao [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – № 1. – P. 94.
53. Cyclodextrin Complexation Improves the Solubility and Caco-2 Permeability of Chrysin / F. Fenyvesi, T. L. P. Nguyen, Á. Haimhoffer [et al.] // *Materials*. – 2020. – Vol. 13. – № 16. – P. 3618.
54. Cytotoxic effect of dihydroquercetin and its derivatives in liposomal form and in the form of fat nanoscale emulsions / R. S. Fadeev, V. V. Kaptsov, A. A. Uminsky, V. S. Akatov // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. – 2011. – Vol. 5. – № 1. – P. 45-50.
55. Cytotoxicity of Flavonoids toward Cultured Normal Human Cells / M. Matsuo, N. Sasaki, K. Saga, T. Kaneko // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2005. – Vol. 28. – № 2. – P. 253-259.
56. Daidzein cocrystals: An opportunity to improve its biopharmaceutical parameters / Y. Bhalla, K. Chadha, R. Chadha, M. Karan // *Heliyon*. – 2019. – Vol. 5. – № 11. – P. e02669.
57. Daidzein–phospholipid complex loaded lipid nanocarriers improved oral absorption: in vitro characteristics and in vivo behavior in rats / Z. Zhang, Y. Huang, F. Gao [et al.] // *Nanoscale*. – 2011. – Vol. 3. – № 4. – P. 1780.
58. Design and optimization of ganciclovir solid dispersion for improving its bioavailability / D. A. Gaber, M. A. Alnwiser, N. L. Alotaibi [et al.] // *Drug Delivery*. – 2022. – Vol. 29. – № 1. – P. 1836-1847.
59. Designing amorphous formulations of polyphenols with naringin by spray-drying for enhanced solubility and permeability / Y. Hatanaka, H. Uchiyama, K. Kadota, Y. Tozuka // *Advanced Powder Technology*. – 2022. – Vol. 33. – № 11. – P. 103627.
60. Development and Evaluation of Poorly Water-Soluble Celecoxib as Solid Dispersions Containing Nonionic Surfactants Using Fluidized-Bed Granulation / H. J. Kwon, E.-J. Heo, Y.-H. Kim [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2019. – Vol. 11. – № 3. – P. 136.
61. Development and validation of new hplc method for simultaneous estimation of l-lysine hydrochloride and l-carnitine-l-tartrate in pharmaceutical dosage form / M. Qadir, M. Ahmed, W. Hussain, M. Tahir // *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2015. – Vol. 77. – № 4. – P. 434.

62. Development of morin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: Enhancement of bioavailability, antihyperalgesic and anti-inflammatory effects / B. D. S. Lima, C. D. A. Campos, A. C. R. Da Silva Santos [et al.] // Food and Chemical Toxicology. – 2019. – Vol. 126. – P. 15-24.
63. Development of polyvinyl alcohol nanofiber scaffolds loaded with flaxseed extract for bone regeneration: phytochemicals, cell proliferation, adhesion, and osteogenic gene expression / A. G. Abdelaziz, H. Nageh, M. S. Abdalla [et al.] // Frontiers in Chemistry. – 2024. – Vol. 12. – P. 1417407.
64. Development, Optimization and Validation of an HPLC-PDA Method for Quantification of Taxifolin in the Bark Extract of *Pinus pinaster* / P. A. D. Almeida, C. A. P. Bhering, M. C. Alves [et al.] // Journal of the Brazilian Chemical Society. – 2016. – Vol. 27. – № 9. – P. 1648-1656.
65. Dias, J. L. Cocrystallization: A tool to modulate physicochemical and biological properties of food-relevant polyphenols / J. L. Dias, M. Lanza, S. R. S. Ferreira // Trends in Food Science & Technology. – 2021. – Vol. 110. – P. 13-27.
66. Diastereomers of Spheroidal Form and Commercially Available Taxifolin Samples / R. P. Terekhov, E. S. Melnikov, I. D. Nikitin [et al.] // Scientia Pharmaceutica. – 2024. – Vol. 92. – № 1. – P. 5.
67. Dihydroquercetin Activates AMPK/Nrf2/HO-1 Signaling in Macrophages and Attenuates Inflammation in LPS-Induced Endotoxemic Mice / L. Lei, Y. Chai, H. Lin [et al.] // Frontiers in Pharmacology. – 2020. – Vol. 11. – P. 662.
68. Dihydroquercetin alleviates dopamine neuron loss via regulating TREM2 activation / R. Yang, D. Li, X. Li [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2024. – Vol. 269. – P. 132179.
69. Dihydroquercetin Attenuates Silica-Induced Pulmonary Fibrosis by Inhibiting Ferroptosis Signaling Pathway / L. Yuan, Y. Sun, N. Zhou [et al.] // Frontiers in Pharmacology. – 2022. – Vol. 13. – P. 845600.
70. Directed Self-Assembly with Gallic Acid Provides First Phenolic Acid Cocrystals for the Antiviral Drug Acyclovir toward Increasing Pharmaceutical Features and Synergy: A Theoretical and Experimental Integration Research / F.-Z. Bu, Y.-M. Yu, M. Zhang [et al.] // Crystal Growth & Design. – 2023. – Vol. 23. – № 8. – P. 5868-5882.
71. Discovery of an isocoumarin analogue that modulates neuronal functions via neurotrophin receptor TrkB / K. Sudarshan, A. K. Boda, S. Dogra [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2019. – Vol. 29. – № 4. – P. 585-590.

72. Dosing of Rifaximin Soluble Solid Dispersion Tablets in Adults With Cirrhosis: 2 Randomized, Placebo-controlled Trials / J. S. Bajaj, T. I. Hassanein, N. T. Pyrsopoulos [et al.] // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2023. – Vol. 21. – № 3. – P. 723-731.e9.
73. Dramatic Suppression of Lipogenesis and No Increase in Beta-Oxidation Gene Expression Are among the Key Effects of Bergamot Flavonoids in Fatty Liver Disease / M. Parafati, D. La Russa, A. Lascala [et al.] // *Antioxidants*. – 2024. – Vol. 13. – № 7. – P. 766.
74. Drug-Phospholipid Complex—a Go Through Strategy for Enhanced Oral Bioavailability / K. Kuche, N. Bhargavi, C. P. Dora, S. Jain // *AAPS PharmSciTech*. – 2019. – Vol. 20. – № 2. – P. 43.
75. Dutt, B. Cocrystallization: An innovative route toward better medication / B. Dutt, M. Choudhary, V. Budhwar // *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*. – 2020. – Vol. 9. – № 2. – P. 256.
76. Effect of burn injury on apoptosis and expression of apoptosis-related genes/proteins in skeletal muscles of rats / H. Duan, J. Chai, Z. Sheng [et al.] // *Apoptosis*. – 2009. – Vol. 14. – № 1. – P. 52-65.
77. Effects of flavonoid-rich fruits on hypertension in adults: a systematic review / L. Ellwood, G. Torun, Z. Bahar, R. Fernandez // *JBIC Database of Systematic Reviews and Implementation Reports*. – 2019. – Vol. 17. – № 10. – P. 2075-2105.
78. Efficacy of desulfated heparin mitigating inflammation in rat burn wound model / T. S. R. Lakshmi, N. Shanmugasundaram, S. Shanmuganathan, M. Babu // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2011. – Vol. 97B. – № 2. – P. 215-223.
79. Eid, S. M. Underivatized Amino Acid Chromatographic Separation: Optimized Conditions for HPLC-UV Simultaneous Quantification of Isoleucine, Leucine, Lysine, Threonine, Histidine, Valine, Methionine, Phenylalanine, Tryptophan, and Tyrosine in Dietary Supplements / S. M. Eid, M. A. Farag, S. Bawazeer // *ACS Omega*. – 2022. – Vol. 7. – № 35. – P. 31106-31114.
80. Emerging trends in the stabilization of amorphous drugs / R. Laitinen, K. Löbmann, C. J. Strachan [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2013. – Vol. 453. – № 1. – P. 65-79.
81. Enhanced Oral Bioavailability of Resveratrol by Using Neutralized Eudragit E Solid Dispersion Prepared via Spray Drying / E.-S. Ha, D. H. Choi, I. Baek [et al.] // *Antioxidants*. – 2021. – Vol. 10. – № 1. – P. 90.
82. Enhancing the oral bioavailability of baicalein via Solutol® HS15 and Poloxamer 188 mixed micelles system / H. Shen, Y. Liu, H. Zhang [et al.] // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2019. – Vol. 71. – № 5. – P. 765-773.
83. Evaluation of β -lapachone-methyl- β -cyclodextrin inclusion complex prepared by spray drying and its application against different developmental stages of *Schistosoma mansoni* in murine

model / R. N. Soares, E. C. P. D. A. Ximenes, S. B. Araújo [et al.] // *Chemico-Biological Interactions*. – 2023. – Vol. 373. – P. 110374.

84. Exploring Taxifolin Polymorphs: Insights on Hydrate and Anhydrous Forms / F. C. Stenger Moura, N. Pinna, R. Vivani [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13. – № 9. – P. 1328.

85. Fabrication of Supercritical Antisolvent (SAS) Process-Assisted Fisetin-Encapsulated Poly (Vinyl Pyrrolidone) (PVP) Nanocomposites for Improved Anticancer Therapy / L.-F. Chen, P.-Y. Xu, C.-P. Fu [et al.] // *Nanomaterials*. – 2020. – Vol. 10. – № 2. – P. 322.

86. Fabrication of surfactant-stabilized nanosuspension of naringenin to surpass its poor physiochemical properties and low oral bioavailability / M. K. Singh, D. Pooja, H. G. Ravuri [et al.] // *Phytomedicine*. – 2018. – Vol. 40. – P. 48-54.

87. Flavonoid-Rich Mixed Berries Maintain and Improve Cognitive Function Over a 6 h Period in Young Healthy Adults / A. R. Whyte, N. Cheng, L. T. Butler [et al.] // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 11. – № 11. – P. 2685.

88. Flavonoids a Bioactive Compound from Medicinal Plants and Its Therapeutic Applications / A. Roy, A. Khan, I. Ahmad [et al.] // *BioMed Research International*. – 2022. – Vol. 2022. – № 1. – P. 5445291.

89. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview / D. Tungmunthum, A. Thongboonyou, A. Pholboon, A. Yangsabai // *Medicines*. – 2018. – Vol. 5. – № 3. – P. 93.

90. Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review / J. M. Al-Khayri, G. R. Sahana, P. Nagella [et al.] // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – № 9. – P. 2901.

91. Flavonoids as Potential Wound-Healing Molecules: Emphasis on Pathways Perspective / N. Zulkefli, C. N. M. Che Zahari, N. H. Sayuti [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 5. – P. 4607.

92. Flavonoids of *Euphorbia hirta* inhibit inflammatory mechanisms via Nrf2 and NF- κ B pathways / X. Bai, L. Li, Y. Wu, B. Jie // *Cell Biochemistry and Biophysics*. – 2024. – Vol. 83. – P. 1167-1183.

93. Fonte, P. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery / P. Fonte, S. Reis, B. Sarmiento // *Journal of Controlled Release*. – 2016. – Vol. 225. – P. 75-86.

94. Formulation and characterization of an apigenin-phospholipid phytosome (APLC) for improved solubility, in vivo bioavailability, and antioxidant potential / D. R. Telange, A. T. Patil, A. M. Pethe [et al.] // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2017. – Vol. 108. – P. 36-49.

95. Formulation of Genistein-HP β Cyclodextrin-Poloxamer 188 Ternary Inclusion Complex: Solubility to Cytotoxicity Assessment / A. Zafar, N. K. Alruwaili, S. S. Imam [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13. – № 12. – P. 1997.
96. Formulation of Multicomponent Chrysin-Hydroxy Propyl β Cyclodextrin-Poloxamer Inclusion Complex Using Spray Dry Method: Physicochemical Characterization to Cell Viability Assessment / S. S. Imam, S. Alshehri, W. A. Mahdi [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 15. – № 12. – P. 1525.
97. Genistein Co-Amorphous Systems with Amino Acids: An Investigation into Enhanced Solubility and Biological Activity / E. Garbiec, N. Rosiak, P. Zalewski [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15. – № 12. – P. 2653.
98. Guidelines for cell viability assays / S. Kamiloglu, G. Sari, T. Ozdal, E. Capanoglu // *Food Frontiers*. – 2020. – Vol. 1. – № 3. – P. 332-349.
99. Healing efficacy of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil in an ovine burn wound model / H. Ito, S. Asmussen, D. L. Traber [et al.] // *Burns*. – 2014. – Vol. 40. – № 3. – P. 511-519.
100. Hoque, M. J. Comparative study of inclusion complex formation between β -cyclodextrin (host) and aromatic diamines (guests) by mixing in hot water, co-precipitation, and solid-state grinding methods / M. J. Hoque, M. Toda, N. Mase // *Journal of Carbohydrate Chemistry*. – 2022. – Vol. 41. – № 4. – P. 249-272.
101. Host-guest inclusion system of scutellarein with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: preparation, characterization, and anticancer activity / F. Wang, B. Yang, Y. Zhao [et al.] // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 2014. – Vol. 25. – № 6. – P. 594-607.
102. Host-guest system of hesperetin and β -cyclodextrin or its derivatives: Preparation, characterization, inclusion mode, solubilization and stability / L.-J. Yang, S. Xia, S.-X. Ma [et al.] // *Materials Science and Engineering: C*. – 2016. – Vol. 59. – P. 1016-1024.
103. Improved low water solubility of fisetin by enzymatic encapsulation reaction using cycloamylose produced by cyclodextrin glucanotransferase / H.-M. Jeong, H.-N. Kang, Y.-R. Lee [et al.] // *Process Biochemistry*. – 2023. – Vol. 130. – P. 138-146.
104. Improved solubility and oral bioavailability of apigenin via Soluplus/Pluronic F127 binary mixed micelles system / Z. Zhang, C. Cui, F. Wei, H. Lv // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. – 2017. – Vol. 43. – № 8. – P. 1276-1282.
105. Improvement in the elution behavior of rutin via binary amorphous solid with flavonoid using a mechanochemical process / S. Fujioka, K. Kadota, M. Yoshida, Y. Shirakawa // *Food and Bioproducts Processing*. – 2020. – Vol. 123. – P. 274-283.

106. Improvement of the Thermal Stability and Aqueous Solubility of Three Matrine Salts Assembled by the Similar Structure Salt Formers / Y. Wang, B. Zhang, W. Wang [et al.] // *Pharmaceuticals*. – 2024. – Vol. 17. – № 1. – P. 94.
107. In vitro dissolution study on inclusion complex of piperine with ethylenediamine- β -cyclodextrin / K. Liu, H. Liu, Z. Li [et al.] // *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. – 2020. – Vol. 96. – № 3-4. – P. 233-243.
108. In Vitro–In Vivo Correlation in Cocrystal Dissolution: Consideration of Drug Release Profiles Based on Coformer Dissolution and Absorption Behavior / M. Kataoka, K. Minami, T. Takagi [et al.] // *Molecular Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 18. – № 11. – P. 4122-4130.
109. In Vivo Antimicrobial and Wound-Healing Activity of Resveratrol, Dihydroquercetin, and Dihydromyricetin against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans* / A. B. Shevelev, N. La Porta, E. P. Isakova [et al.] // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9. – № 4. – P. 296.
110. Inclusion Complexes of Daidzein with Cyclodextrin-Based Metal–Organic Framework-1 Enhance Its Solubility and Antioxidant Capacity / Y. Inoue, M. Yoshida, T. Ezawa [et al.] // *AAPS PharmSciTech*. – 2022. – Vol. 23. – № 1. – P. 2.
111. Inhalable spray-dried porous microparticles containing dehydroandrographolide succinate phospholipid complex capable of improving and prolonging pulmonary anti-inflammatory efficacy in mice / W.-Y. Chen, J.-X. Wei, C.-Y. Yu [et al.] // *Drug Delivery and Translational Research*. – 2025. – Vol. 15. – № 2. – P. 670-687.
112. Inhibition of the enzymes in the leukotriene and prostaglandin pathways in inflammation by 3-aryl isocoumarins / M. Ramanan, S. Sinha, K. Sudarshan [et al.] // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2016. – Vol. 124. – P. 428-434.
113. Insight into Tea Flavonoids: Composition and Chemistry / H.-F. He, K. Wei, J. Yin, Y. Ye // *Food Reviews International*. – 2021. – Vol. 37. – № 8. – P. 812-823.
114. Insights in wound healing properties of water-soluble composition of dihydroquercetin and L-lysine / A. A. Svotin, A. Taldaev, I. D. Nikitin [et al.] // *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. – 2025. – Vol. 28. – P. 13831.
115. Insights into the stereoisomerism of dihydroquercetin: analytical and pharmacological aspects / R. P. Terekhov, A. D. Savina, D. I. Pankov [et al.] // *Frontiers in Chemistry*. – 2024. – Vol. 12. – P. 1439167.
116. Investigation of transport of genistein, daidzein and their inclusion complexes prepared with different cyclodextrins on Caco-2 cell line / Á. E. Daruházi, T. Kiss, M. Vecsernyés [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2013. – Vol. 84. – P. 112-116.

117. Irigoiti, Y. Co-crystallized sucrose with propolis extract as a food ingredient: Powder characterization and antioxidant stability / Y. Irigoiti, D. K. Yamul, A. S. Navarro // *LWT*. – 2021. – Vol. 143. – P. 111164.
118. Itraconazole solid dispersion prepared by a supercritical fluid technique: preparation, in vitro characterization, and bioavailability in beagle dogs / J. Qi, B. Wang, S. Ding [et al.] // *Drug Design, Development and Therapy*. – 2015. – Vol. 9. – P. 2801.
119. J. Hogan, C. Narrow size distribution nanoparticle production by electrospray processing of ferritin / C. J. Hogan, P. Biswas // *Journal of Aerosol Science*. – 2008. – Vol. 39. – № 5. – P. 432-440.
120. Janssens, S. Review: physical chemistry of solid dispersions / S. Janssens, G. Van Den Mooter // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2009. – Vol. 61. – № 12. – P. 1571-1586.
121. Jara, M. O. Amorphous Solid Dispersions and the Contribution of Nanoparticles to In Vitro Dissolution and In Vivo Testing: Niclosamide as a Case Study / M. O. Jara, Z. N. Warnken, R. O. Williams // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13. – № 1. – P. 97.
122. Kakran, M. Dissolution enhancement of quercetin through nanofabrication, complexation, and solid dispersion / M. Kakran, N. G. Sahoo, L. Li // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2011. – Vol. 88. – № 1. – P. 121-130.
123. L-Arginine and L-Lysine stimulation on cultured human osteoblasts / P. Torricelli, M. Fini, G. Giavaresi [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2002. – Vol. 56. – № 10. – P. 492-497.
124. Leuenberger, H. Spray Freeze-drying – The Process of Choice for Low Water Soluble Drugs? / H. Leuenberger // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2002. – Vol. 4. – № 1/2. – P. 111-119.
125. Liu, J. Determination of the Optimal Molar Ratio in Amino Acid-Based Coamorphous Systems / J. Liu, T. Rades, H. Grohgan // *Molecular Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 17. – № 4. – P. 1335-1342.
126. Liu, L. Phospholipid Complexation for Bioavailability Improvement of Albendazole: Preparation, Characterization and In Vivo Evaluation / L. Liu, J. Nie, L. Li // *AAPS PharmSciTech*. – 2023. – Vol. 24. – № 1. – P. 36.
127. Luteolin cocrystals: Characterization, evaluation of solubility, oral bioavailability and theoretical calculation / Y. Luo, S. Chen, J. Zhou [et al.] // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2019. – Vol. 50. – P. 248-254.
128. Luteolin-phospholipid complex: preparation, characterization and biological evaluation: Luteolin-phospholipid complex / J. Khan, A. Alexander, Ajazuddin [et al.] // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2014. – Vol. 66. – № 10. – P. 1451-1462.
129. Lyophilization of Liposomal Formulations: Still Necessary, Still Challenging / S. Franzé, F. Selmin, E. Samaritani [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2018. – Vol. 10. – № 3. – P. 139.

130. Maleki, S. J. Anti-inflammatory effects of flavonoids / S. J. Maleki, J. F. Crespo, B. Cabanillas // *Food Chemistry*. – 2019. – Vol. 299. – P. 125124.
131. Mani, S. In Vitro Cytotoxicity Analysis: MTT/XTT, Trypan Blue Exclusion / S. Mani, G. Swargiary. – Text : electronic // *Animal Cell Culture: Principles and Practice : Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert*. – Cham : Springer International Publishing, 2023. – In Vitro Cytotoxicity Analysis. – P. 267-284. – URL: https://link.springer.com/10.1007/978-3-031-19485-6_18 (date accessed: 10.02.2026).
132. Mathew-Steiner, S. S. Collagen in Wound Healing / S. S. Mathew-Steiner, S. Roy, C. K. Sen // *Bioengineering*. – 2021. – Vol. 8. – № 5. – P. 63.
133. Matrix metalloproteinase 9 modulates collagen matrices and wound repair / D. C. LeBert, J. M. Squirrell, J. Rindy [et al.] // *Development*. – 2015. – Vol. 142. – № 12. – P. 2136-2146.
134. McCusker, L. B. Nomenclature of structural and compositional characteristics of ordered microporous and mesoporous materials with inorganic hosts(IUPAC Recommendations 2001) / L. B. McCusker, F. Liebau, G. Engelhardt // *Pure and Applied Chemistry*. – 2001. – Vol. 73. – № 2. – P. 381-394.
135. Metabolism, tissue distribution and excretion of taxifolin in rat / Y. Li, H. Su, Z.-P. Yin [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2022. – Vol. 150. – P. 112959.
136. Method comparison of HPLC-ninhydrin-photometry and UHPLC-PITC-tandem mass spectrometry for serum amino acid analyses in patients with complex congenital heart disease and controls / M. Michel, C. Salvador, V. Wiedemair [et al.] // *Metabolomics*. – 2020. – Vol. 16. – № 12. – P. 128.
137. Micellar solubilization of poorly water-soluble drugs: effect of surfactant and solubilize molecular structure / Z. Vinarov, V. Katev, D. Radeva [et al.] // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. – 2018. – Vol. 44. – № 4. – P. 677-686.
138. Microwave-Assisted Formation of Ternary Inclusion Complex of Pterostilbene / Y. A. Bin Jordan, A. Ahad, M. Raish [et al.] // *Pharmaceuticals*. – 2023. – Vol. 16. – № 12. – P. 1641.
139. Modeling trauma in rats: similarities to humans and potential pitfalls to consider / B. Weber, I. Lackner, M. Haffner-Luntzer [et al.] // *Journal of Translational Medicine*. – 2019. – Vol. 17. – № 1. – P. 305.
140. Modification of biopharmaceutical parameters of flavonoids: a review / A. Taldaev, A. A. Svotin, S. I. Obukhov [et al.] // *Frontiers in Chemistry*. – 2025. – Vol. 13. – P. 1602967.
141. Modification of the Physicochemical Properties of Active Pharmaceutical Ingredients via Lyophilization / A. Taldaev, D. I. Pankov, R. P. Terekhov [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15. – № 11. – P. 2607.

142. Molecular structures of flavonoid co-formers for cocrystallization with carbamazepine / C. Lee, J. Hee Lim, A. Young Cho [et al.] // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. – 2023. – Vol. 118. – P. 309-317.
143. mTORC1 Mediates the Processes of Lysine Regulating Satellite Cells Proliferation, Apoptosis, and Autophagy / M. Liu, Z. Yue, B. Zhang [et al.] // *Metabolites*. – 2022. – Vol. 12. – № 9. – P. 788.
144. Myricetin Nanofibers Enhanced Water Solubility and Skin Penetration for Increasing Antioxidant and Photoprotective Activities / T.-C. Lin, C.-Y. Yang, T.-H. Wu [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15. – № 3. – P. 906.
145. Nanoformulations of Albendazole As Effective Anticancer and Antiparasite Agents / F. Movahedi, L. Li, W. Gu, Z. P. Xu // *Nanomedicine*. – 2017. – Vol. 12. – № 20. – P. 2555-2574.
146. Naringenin Cocrystals Prepared by Solution Crystallization Method for Improving Bioavailability and Anti-hyperlipidemia Effects / W. Cui, Z. He, Y. Zhang [et al.] // *AAPS PharmSciTech*. – 2019. – Vol. 20. – № 3. – P. 115.
147. Optimized solubility and bioavailability of genistein based on cocrystal engineering / Z. Wang, Q. Li, Q. An [et al.] // *Natural Products and Bioprospecting*. – 2023. – Vol. 13. – № 1. – P. 30.
148. Oral bioavailability of bioactive compounds; modulating factors, *in vitro* analysis methods, and enhancing strategies / C. Dima, E. Assadpour, A. Nechifor [et al.] // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2024. – Vol. 64. – № 24. – P. 8501-8539.
149. Overview of the Manufacturing Methods of Solid Dispersion Technology for Improving the Solubility of Poorly Water-Soluble Drugs and Application to Anticancer Drugs / P. Tran, Y.-C. Pyo, D.-H. Kim [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2019. – Vol. 11. – № 3. – P. 132.
150. Patil, H. Hot-Melt Extrusion: from Theory to Application in Pharmaceutical Formulation / H. Patil, R. V. Tiwari, M. A. Repka // *AAPS PharmSciTech*. – 2016. – Vol. 17. – № 1. – P. 20-42.
151. Pharmaceutical amorphous solid dispersion: A review of manufacturing strategies / S. V. Bhujbal, B. Mitra, U. Jain [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2021. – Vol. 11. – № 8. – P. 2505-2536.
152. Pharmaceutical characterisation and evaluation of cocrystals: Importance of *in vitro* dissolution conditions and type of coformer / I. Tomaszewska, S. Karki, J. Shur [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2013. – Vol. 453. – № 2. – P. 380-388.
153. Pharmaceutical Co-Crystallization: Regulatory Aspects, Design, Characterization, and Applications / A. Raheem Thayyil, T. Juturu, S. Nayak, S. Kamath // *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. – 2020. – Vol. 10. – № 2. – P. 203-212.

154. Phospholipid Complex Formulation Technology for Improved Drug Delivery in Oncological Settings: a Comprehensive Review / J. Patil, D. M. Pawde, S. Bhattacharya, S. Srivastava // AAPS PharmSciTech. – 2024. – Vol. 25. – № 5. – P. 91.
155. Phytonutrients: Sources, bioavailability, interaction with gut microbiota, and their impacts on human health / J. Kan, F. Wu, F. Wang [et al.] // Frontiers in Nutrition. – 2022. – Vol. 9. – P. 960309.
156. Phyto-phospholipid complexes (phytosomes): A novel strategy to improve the bioavailability of active constituents / M. Lu, Q. Qiu, X. Luo [et al.] // Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2019. – Vol. 14. – № 3. – P. 265-274.
157. Phytosomes Loaded with Mastoparan-M Represent a Novel Strategy for Breast Cancer Treatment / H. Zhao, S. Bao, S. Chen [et al.] // International Journal of Nanomedicine. – 2025. – Vol. 20. – P. 109-124.
158. Potential Therapeutic Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Dihydroflavones, Flavones, and Flavonols / C. Zaragozá, L. Villaescusa, J. Monserrat [et al.] // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – № 4. – P. 1017.
159. Preparation and characterization of luteolin nanoparticles for enhance bioavailability and inhibit liver microsomal peroxidation in rats / L. Wang, C. Zhong, Y. Zu [et al.] // Journal of Functional Foods. – 2019. – Vol. 55. – P. 57-64.
160. Preparation and Evaluation of a Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System Loaded with Heparin Phospholipid Complex / X.-L. Qiu, Z.-R. Fan, Y.-Y. Liu [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – № 8. – P. 4077.
161. Preparation and evaluation of kaempferol–phospholipid complex for pharmacokinetics and bioavailability in SD rats / K. Zhang, L. Gu, J. Chen [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2015. – Vol. 114. – P. 168-175.
162. Preparation, characterisation, anticancer potential and safety evaluation of a soy lecithin phytosome delivery system loaded with constituents from *Barleria lupulina* / S. Banerjee, S. Mukhopadhyay, A. Das [et al.] // Journal of Microencapsulation. – 2025. – P. 1-21.
163. Preparation, characterization and antitumor activity evaluation of apigenin nanoparticles by the liquid antisolvent precipitation technique / W. Wu, Y. Zu, L. Wang [et al.] // Drug Delivery. – 2017. – Vol. 24. – № 1. – P. 1713-1720.
164. Preparation, characterization, and biological activity of the inclusion complex of dihydroquercetin and β -Cyclodextrin / Y. Xu, Y. Wang, C. Li [et al.] // AAPS Open. – 2023. – Vol. 9. – № 1. – P. 16.

165. Preparation, characterization, and pharmacokinetics study of a novel genistein-loaded mixed micelles system / H. Shen, D. He, S. Wang [et al.] // Drug Development and Industrial Pharmacy. – 2018. – Vol. 44. – № 9. – P. 1536-1542.
166. Preparation, Characterization and Water Solubility of Inclusion Complexes of Daidzein with Amino-Modified β -Cyclodextrins / Y.-H. Deng, L.-N. Su, Y.-H. Pang [et al.] // Chinese Journal of Analytical Chemistry. – 2017. – Vol. 45. – № 5. – P. 648-653.
167. Preparation of an isorhamnetin phospholipid complex for improving solubility and anti-hyperuricemia activity / F. Zou, H. Zhao, A. Ma [et al.] // Pharmaceutical Development and Technology. – 2022. – Vol. 27. – № 7. – P. 842-852.
168. Preparation of nanocomposite membranes loaded with taxifolin liposome and its mechanism of wound healing in diabetic mice / Q. Ding, C. Ding, X. Liu [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2023. – Vol. 241. – P. 124537.
169. Preparation of ursolic acid–phospholipid complex by solvent-assisted grinding method to improve dissolution and oral bioavailability / W. Wang, W. Zhang, Y. Jiang [et al.] // Pharmaceutical Development and Technology. – 2020. – Vol. 25. – № 1. – P. 68-75.
170. Preparation, optimization, characterization and in vitro release of baicalein-solubilizing glycyrrhizic acid nano-micelles / G. You, T. Feng, G. Zhang [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 2021. – Vol. 601. – P. 120546.
171. Preparation, Physicochemical Characterization and In - vitro Dissolution Studies of Diosmin-cyclodextrin Inclusion Complexes / F. Ai, Y. Ma, J. Wang, Y. Li // Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR. – 2014. – Vol. 13. – № 4. – P. 1115-1123.
172. Preventative and Therapeutic Potential of Flavonoids in Peptic Ulcers / W. Zhang, Y. Lian, Q. Li [et al.] // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – № 20. – P. 4626.
173. Production of curcumin-resveratrol cocrystal using cocrystallization with supercritical solvent / C. Dal Magro, A. E. Dos Santos, M. M. Ribas [et al.] // The Journal of Supercritical Fluids. – 2021. – Vol. 171. – P. 105190.
174. QBD Approach for the Design, Optimization, Development, and Characterization of Naringenin-Loaded Phytosomes to Enhance Solubility and Oral Bioavailability / V. Metkari, R. Shah, N. Salunkhe, S. Gurav // Journal of Pharmaceutical Innovation. – 2023. – Vol. 18. – № 4. – P. 2083-2097.
175. Quantitation of Pregabalin by HPLC-UV Method using Ninhydrin Derivatization: Development and Validation / F. Mutalabisin, A. B. M. Helaluddin, P. Sengupta [et al.] // Current Pharmaceutical Analysis. – 2021. – Vol. 17. – № 1. – P. 165-171.

176. Quercetin Nanoparticle Ameliorates Lipopolysaccharide-Triggered Renal Inflammatory Impairment by Regulation of Sirt1/NF-KB Pathway / S. Lu, S. Zhou, J. Chen [et al.] // *Journal of Biomedical Nanotechnology*. – 2021. – Vol. 17. – № 2. – P. 230-241.
177. Quercetin-Phospholipid Complex: An Amorphous Pharmaceutical System in Herbal Drug Delivery / D. Singh, M. S.M. Rawat, A. Semalty, M. Semalty // *Current Drug Discovery Technologies*. – 2012. – Vol. 9. – № 1. – P. 17-24.
178. Research on Characteristics, Antioxidant and Antitumor Activities of Dihydroquercetin and Its Complexes / Y. Zhang, J. Yu, X.-D. Dong, H.-Y. Ji // *Molecules*. – 2017. – Vol. 23. – № 1. – P. 20.
179. Role of flavonoids in controlling obesity: molecular targets and mechanisms / A. Mahboob, S. M. Samuel, A. Mohamed [et al.] // *Frontiers in Nutrition*. – 2023. – Vol. 10. – P. 1177897.
180. RP-HPLC-DAD method development and validation of L-lysine hydrochloride: application to bulk drug substance and multivitamin oral suspension / P. R. H. Vikram, N. M. Beeraka, H. B. Patel, P. Kumar // *Accreditation and Quality Assurance*. – 2023. – Vol. 28. – № 5. – P. 187-196.
181. Safety and healing efficacy of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil on burn wounds in rats / N. K. Upadhyay, R. Kumar, S. K. Mandotra [et al.] // *Food and Chemical Toxicology*. – 2009. – Vol. 47. – № 6. – P. 1146-1153.
182. Saini, V. Formulation and Characterization of Phytophospholipid Complex of *Andrographis Paniculata* Extract / V. Saini, R. Bala, S. Arora // *ECS Transactions*. – 2022. – Vol. 107. – № 1. – P. 9119-9126.
183. Screening for Pharmaceutical Cocrystal Hydrates via Neat and Liquid-Assisted Grinding / S. Karki, T. Friščić, W. Jones, W. D. S. Motherwell // *Molecular Pharmaceutics*. – 2007. – Vol. 4. – № 3. – P. 347-354.
184. Simultaneous Chiral Resolution of Two Racemic Compounds by Preferential Cocrystallization / F. Zhou, O. Shemchuk, M. D. Charpentier [et al.] // *Angewandte Chemie*. – 2021. – Vol. 133. – № 37. – P. 20426-20430.
185. Singh, A. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions / A. Singh, G. Van Den Mooter // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2016. – Vol. 100. – P. 27-50.
186. Solid Dispersions of Genistein via Solvent Rotary Evaporation for Improving Solubility, Bioavailability, and Amelioration Effect in HFD-Induced Obesity Mice / C. Qiu, Y. Zhang, Y. Fan [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2024. – Vol. 16. – № 3. – P. 306.
187. Solubility and dissolution rate improvement of the inclusion complex of apigenin with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin prepared using the liquid antisolvent precipitation and solvent

removal combination methods / W. Wu, Y. Zu, X. Zhao [et al.] // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. – 2017. – Vol. 43. – № 8. – P. 1366-1377.

188. Solubility Enhancement of Dihydroquercetin via “Green” Phase Modification / R. P. Terekhov, I. R. Ilyasov, V. L. Beloborodov [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 24. – P. 15965.

189. Solutol®HS15+pluronicF127 and Solutol®HS15+pluronicL61 mixed micelle systems for oral delivery of genistein / P. Ding, Y. Chen, G. Cao [et al.] // *Drug Design, Development and Therapy*. – 2019. – Vol. 13. – P. 1947-1956.

190. Specific surface area of mannitol rather than particle size dominant the dissolution rate of poorly water-soluble drug tablets: A study of binary mixture / K. Zhang, S. Qian, Z. Liu [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2024. – Vol. 660. – P. 124280.

191. Structure-solubility relationships and thermodynamic aspects of solubility of some flavonoids in the solvents modeling biological media / H. Zhang, M. Wang, L. Chen [et al.] // *Journal of Molecular Liquids*. – 2017. – Vol. 225. – P. 439-445.

192. Synthesis of Taxifolin-Loaded Polydopamine for Chemo-Photothermal-Synergistic Therapy of Ovarian Cancer / Y. Lu, X. Liu, T. Zhao [et al.] // *Molecules*. – 2024. – Vol. 29. – № 5. – P. 1042.

193. Taxifolin stability: In silico prediction and in vitro degradation with HPLC-UV/UPLC–ESI-MS monitoring / F. C. Stenger Moura, C. L. Dos Santos Machado, F. Reisdorfer Paula [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2021. – Vol. 11. – № 2. – P. 232-240.

194. Tetrazolium Salt WST-8 as a Novel and Reliable Chromogenic Indicator for the Assessment of Boar Semen Quality / Y.-H. Chen, C.-P. Wu, H.-L. Lin [et al.] // *Animals*. – 2020. – Vol. 10. – № 12. – P. 2293.

195. The Bioavailability of Drugs—The Current State of Knowledge / M. Stielow, A. Witczyńska, N. Kubryń [et al.] // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – № 24. – P. 8038.

196. The effects of epidermal growth factor on early burn-wound progression in rats / O. Kaya, E. Orhan, M. Sapmaz-Metin [et al.] // *Dermatologic Therapy*. – 2020. – Vol. 33. – № 1. – P. e13196.

197. The effects of pH, surfactant, ion concentration, coformer, and molecular arrangement on the solubility behavior of myricetin cocrystals / S. Ren, M. Liu, C. Hong [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 59-73.

198. The efficacy of a traditional medicine preparation on second-degree burn wounds in rats / N. Ebrahimpour, M. Mehrabani, M. Iranpour [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2020. – Vol. 252. – P. 112570.

199. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis / M. Ghasemi, T. Turnbull, S. Sebastian, I. Kempson // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 23. – P. 12827.
200. The Phototoxic Potential of the Flavonoids, Taxifolin and Quercetin / A. Rajnochová Svobodová, A. Ryšavá, M. Psotová [et al.] // *Photochemistry and Photobiology*. – 2017. – Vol. 93. – № 5. – P. 1240-1247.
201. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews / M. J. Page, J. E. McKenzie, P. M. Bossuyt [et al.] // *BMJ*. – 2021. – P. n71.
202. The use of cyclodextrin inclusion complexes to improve anticancer drug profiles: a systematic review / S. R. Gandhi, J. D. S. S. Quintans, G. R. Gandhi [et al.] // *Expert Opinion on Drug Delivery*. – 2020. – Vol. 17. – № 8. – P. 1069-1080.
203. Trofimova, N. N. Complex compounds of zinc and copper(ii) ions with dihydroquercetin and their antiviral activity / N. N. Trofimova, V. A. Babkin, O. I. Kiselev // *Russian Chemical Bulletin*. – 2015. – Vol. 64. – № 6. – P. 1430-1436.
204. Understanding the Solid-State Hydration Behavior of a Common Amino Acid: Identification, Structural Characterization, and Hydration/Dehydration Processes of New Hydrate Phases of L -Lysine / P. A. Williams, C. E. Hughes, J. Martin [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2016. – Vol. 120. – № 17. – P. 9385-9392.
205. Unlocking finasteride's potential via carboxymethyl- β -cyclodextrin inclusion complex for androgenic alopecia / R. Allahyari, B. Mahdavi, E. Rezaei-Seresht, M. Baghayeri // *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*. – 2025. – Vol. 10. – P. 100767.
206. Validation of a Simple HPLC-Based Method for Lysine Quantification for Ruminant Nutrition / J. Albuquerque, S. Casal, R. Cruz [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – № 14. – P. 4173.
207. Vekshin, N. L. Detection of polymeric forms of dihydroquercetin by optical absorption and light scattering / N. L. Vekshin // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2009. – Vol. 45. – № 4. – P. 459-462.
208. Vibrational modes optimization and terahertz time-domain spectroscopy of -Lysine and -Lysine hydrate / Y. Bian, X. Zhang, Z. Zhu, B. Yang // *Journal of Molecular Structure*. – 2021. – Vol. 1232. – P. 129952.
209. Wang, T. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate / T. Wang, Q. Li, K. Bi // *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2018. – Vol. 13. – № 1. – P. 12-23.

210. Weecharangsan, W. Surface Solid Dispersion of Ketoconazole on Trehalose Dihydrate using Spray Drying to Achieve Enhanced Dissolution Rate / W. Weecharangsan, R. J. Lee // *AAPS PharmSciTech.* – 2024. – Vol. 25. – № 7. – P. 220.
211. Williams, P. A. L -Lysine: Exploiting Powder X-ray Diffraction to Complete the Set of Crystal Structures of the 20 Directly Encoded Proteinogenic Amino Acids / P. A. Williams, C. E. Hughes, K. D. M. Harris // *Angewandte Chemie International Edition.* – 2015. – Vol. 54. – № 13. – P. 3973-3977.
212. Wound healing properties of flavonoids: A systematic review highlighting the mechanisms of action / M. T. B. Carvalho, H. G. Araújo-Filho, A. S. Barreto [et al.] // *Phytomedicine.* – 2021. – Vol. 90. – P. 153636.
213. X-Ray Structures, Intermolecular Interactions, and Structural Transformations of Dihydroquercetin Solvates and Polymorphs / X. Meng, Y. Zou, S. Yang [et al.] // *Pharmaceutics.* – 2025. – Vol. 17. – № 12. – P. 1512.
214. Yamamoto, K. Establishment of cocrystal cocktail grinding method for rational screening of pharmaceutical cocrystals / K. Yamamoto, S. Tsutsumi, Y. Ikeda // *International Journal of Pharmaceutics.* – 2012. – Vol. 437. – № 1-2. – P. 162-171.
215. Zhang, C. L-Lysine protects against sepsis-induced chronic lung injury in male albino rats / C. Zhang, Y. He, Y. Shen // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* – 2019. – Vol. 117. – P. 109043.

Приложение А. Патент Российской Федерации



Рисунок А.1 – Патент

Приложение Б. Акт внедрения (Сеченовский Университет)

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет)
к.фарм.н., доц. Литвинова Т.М.



2025 г.

08 ИЮЛ 2025

АКТ

703

внедрения в практику федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации результатов диссертационной работы Свотина Артёма Александровича

Предмет внедрения: основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Свотина А.А. «Разработка способов получения и анализ свойств композиций дигидрокверцетина и L-лизина».

Кем предложен: Свотин А.А., аспирант кафедры химии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет).

Кем и где выдано: ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119048, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

Цель внедрения: обеспечение надлежащего уровня знаний, умений и навыков в области фазовой модификации флавоноидов и повышения их биодоступности, обучающихся по направлениям подготовки 33.05.01 Фармация, 19.03.01 Биотехнология, 30.05.01 Медицинская биохимия.

Результаты внедрения: основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Свотина А.А. используются в образовательном процессе на кафедре химии при преподавании дисциплин «Органическая химия», «Химия биологически активных веществ», «Методы фармакопейного анализа».

Директор
Института фармации им. А.П. Нелюбина

(подпись)

д.фарм.н., проф. Раменская Г.В.

Заведующий кафедрой химии

(подпись)

д.фарм.н., проф. Нестерова О.В.

Начальник Учебного управления

(подпись)

к.м.н. Юдина Л.Ю.

Рисунок Б.1 – Акт внедрения (Сеченовский Университет)

Приложение В. Акт внедрения (ООО «Робиос»)

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор ООО «Робиос»



Петрова Е.Н.

2025 г.

АКТ

внедрения в работу отдела контроля качества общества с ограниченной ответственностью «Робиос» результатов диссертационной работы
Свотина Артема Александровича

Предмет внедрения: результаты оценки цитотоксичности субстанции дигидрокверцетина под брендом ВитаРост® на линии клеток НЕК-293, HUVEC, 3T3 и Сасо-2.

Кем предложен: Свотин А.А., аспирант кафедры химии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет).

Кем и где выдано: ООО «Робиос», 142204, Московская обл., г. Серпухов, Северное шоссе, д. 16.

Цель внедрения: скрининг фармакологической активности и безопасности.

Результаты внедрения: основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Свотина А.А. могут быть использованы в продвижении и медицинской стратегии продукции ООО «Робиос».

Коммерческий директор
ООО «Робиос»

 Шахмин Э.Р.
(подпись)

Рисунок В.1 – Акт внедрения (ООО «Робиос»)

Приложение Г. Проект спецификации на ДКВ/ЛИЗ_г

Проект спецификации субстанции дигидрокверцетин+L-лизина моногидрат

Химическое название: (2*R*,3*R*)-3,5,7-Тригидрокси-2-(3,4-дигидроксифенил)-2,3-дигидро-4*H*-1-бензопиран-4-он — (S)2,6-диаминогексановая кислота (1/2 мол.)

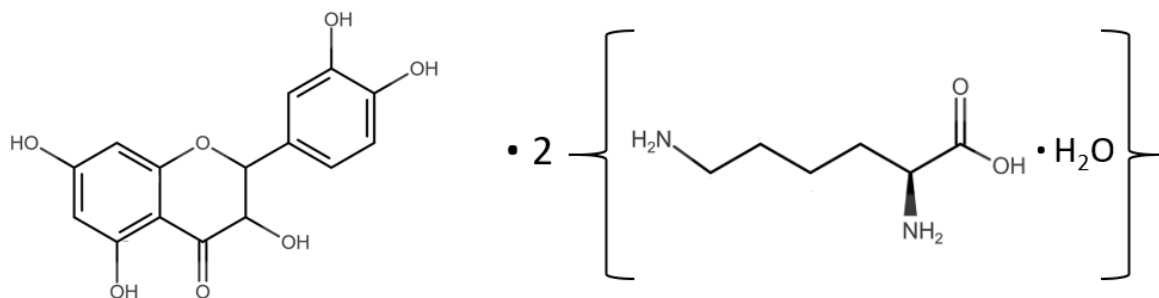


Рисунок Г.1 – Формула дигидрокверцетин+L-лизина моногидрат

Эмпирическая формула:



Молярная масса – 632,68 г/моль

Субстанция содержит не менее 45,0% и не более 50,0% дигидрокверцетина и не менее 50,0% и не более 55,0% L-лизина моногидрата в пересчете на сухое вещество.

Таблица Г.1 – Показатели качества субстанции дигидрокверцетин+L-лизина моногидрат

Показатель	Метод	Норма
Описание	ОФС.1.1.0006 «Субстанции для фармацевтического применения»	Мелкокристаллический порошок кремового цвета с желтоватым оттенком и легким древесным запахом
Растворимость	ОФС.1.1.0006 «Субстанции для фармацевтического применения»	Очень легко растворим в воде

Продолжение таблицы Г.1

Подлинность	ИК-спектроскопия	Содержит полосы поглощение дигидрокверцетина ~3380, ~3083, ~1633 см ⁻¹ и L-лизина ~2925, ~2854, ~2655 см ⁻¹
	ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией <i>о</i> -фталевым альдегидом	Относительное время удерживания продукта дериватизации – 1 (около 6 мин); дигидрокверцетина – около 1,24
Сульфатная зола	ОФС.1.2.2.2.0014 «Сульфатная зола»	Не более 0,3 %
Тяжелые металлы	ОФС.1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»	Свинец: не более 6,0 мг/кг Кадмий: не более 1,0 мг/кг Ртуть: не более 0,1 мг/кг Мышьяк: не более 0,5 мг/кг
Потеря в массе при высушивании	ОФС.1.2.1.0010 «Потеря в массе при высушивании», метод 1	Не более 15,0 %
Количественное определение	ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией <i>о</i> -фталевым альдегидом	Не менее 45,0 % и не более 50,0 % дигидрокверцетина. Не менее 50 % и не более 55% L-лизина моногидрата
Маркировка	«Содержимое гигроскопично»	
Хранение	В плотно закупоренной таре в холодном, сухом, защищенном от света месте	
Срок годности	1 год	

Приложение Д. Выписка из протокола заседания ЛЭК

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерство здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)



ЛОКАЛЬНЫЙ ЭТИЧЕСКИЙ КОМИТЕТ

119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8

тел.: 8(495)622-97-06, факс: 8(495)622-97-56,
iec@lmsmu.ru; iec@sechenov.ru

Выписка из протокола № 19-20 заседания Локального этического Комитета от 02.07.2020

Присутствовали:

Председатель Комитета - Николенко В.Н.
Заместитель председателя Комитета – Реброва Е.Л.
Члены Комитета: Ермолаева И.И., Бердникова Н.Г., Дубограй Е.В., Золкина И.В.,
Смолярчук Е.А., Субботина О.А.

Кворум есть, заседание считается правомочным.

Слушали: рассмотрение исследования в рамках диссертационной работы «Влияние фазового состояния на физико-химические, технологические и биофармацевтические параметры дигидрокверцетина» (исполнитель – Терехов Роман Петрович).

Постановили: одобрить исследование в рамках диссертационной работы «Влияние фазового состояния на физико-химические, технологические и биофармацевтические параметры дигидрокверцетина» (исполнитель – Терехов Роман Петрович).

Выписка верна.

Ответственный секретарь

И.И. Ермолаева

03.07.2020



Рисунок Д.1 – Выписка из протокола заседания ЛЭК