

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Здерко Назар Петрович**

УДК 615.1:615.322:615.074:615.014.22:577.1

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**РОЗРОБЛЕННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ  
ДІЇ НА ОСНОВІ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ CICHORIUM INTYBUS**

226 – Фармація, промислова фармація

16 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



Н.П. Здерко

Науковий керівник: Бессарабов В.І., доктор технічних наук, професор

Київ – 2023

## АНОТАЦІЯ

*Здерко Н.П.* Розроблення фармацевтичної композиції протизапальної дії на основі рослинної сировини *Cichorium intybus*. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 – Фармація, промислова фармація. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2023.

Запалення є важливою реакцією імунної системи, яка забезпечує виживання під час інфекції та пошкодження тканин. Запальні реакції необхідні для підтримки нормального тканинного гомеостазу. Однак регуляція інтенсивності запальної реакції з використанням фармакологічних засобів є важливим елементом лікування багатьох захворювань. В зв'язку з цим проблема розробки нових фармацевтичних композицій на основі пошуку плейотропних ефектів активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ), зареєстрованих у світових фармакопеях, є необхідною та своєчасною. Застосування для цієї мети флавоноїдів як моделей та перспективних кандидатів, а також багатих на них екстрактів з біотехнологічної рослинної сировини, дозволяє вирішувати цілий комплекс проблем та обмежень при лікуванні людей вікової категорії 60+ років.

Об'єкт дослідження – процеси формування протизапальних властивостей фармацевтичної композиції у виробництві лікарського засобу на основі біотехнологічної рослинної сировини (“волохатих” коренів) *Cichorium intybus*.

Предмет дослідження – технології комплексного використання флавоноїдів та водно-етанольних екстрактів з біотехнологічної рослинної сировини у виробництві протизапальних геріатричних лікарських засобів.

Метою дисертаційної роботи є створення технології фармацевтичної композиції протизапальної дії з керованими фізико-хімічними та фармакологічними властивостями на основі рослинної сировини *Cichorium intybus*.

Отримані в дослідженні наукові результати у сукупності дозволили розв'язати важливе науково-прикладне завдання: створення фармацевтичної композиції

протизапальної дії з керованими фізико-хімічними та фармакологічними властивостями на основі фармакопейного флавоноїду діосміну та водно-етанольного екстракту з біотехнологічної рослинної сировини *Cichorium intybus*.

В дисертаційній роботі визначені основні фактори регулювання фармако-технологічних та фармакологічних властивостей протизапального лікарського засобу на основі флавоноїдвмісних АФІ з метою забезпечення нормованих протизапальних властивостей лікарського засобу: природа та фармакологічні властивості флавоноїдів та екстрактів з біотехнологічної рослинної сировини *Cichorium intybus*, природа та технологічні властивості жирових основ, співвідношення основних компонентів фармацевтичної композиції, технологічні параметри процесу виробництва.

Визначено вплив процедури екстракції на вихід біоактивних сполук у «волохатих» коренях *Cichorium intybus* при використанні двох екстракційних розчинників – води та етанолу (70%). Антиоксидантна здатність, загальний вміст флавоноїдів і відновна здатність отриманих екстрактів були оцінені за допомогою аналізів поглинання радикалів DPPH, хелатування металів та аналізів з відновлення заліза відповідно. Найвищий загальний вміст флавоноїдів, а також найвища антиоксидантна активність і відновна здатність були виявлені в етанольному екстракті порівняно з водним.

Встановлено, що загальний вміст флавоноїдів у водному та етанольному екстрактах становив 121,3 мг (RE)/г та 60,3 мг (RE)/г, відповідно. Етанольний екстракт був більш багатим джерелом флавоноїдів, ніж водний. Таким чином, умови екстрагування істотно впливають на загальну кількість біологічно активних сполук в отриманих екстрактах.

Показано, що антиоксидантна та відновна активність водного екстракту ( $EC_{50}=0,350\pm 0,015$  мкг/мл та  $EC_{0,5}=0,42\pm 0,04$  мг/мл) нижча в 2 і 4 рази, відповідно (вищі значення  $EC_{50}$  та  $EC_{0,5}$ ), ніж ті самі активності етанольного екстракту ( $EC_{50}=0,165\pm 0,010$  мкг/мл та  $EC_{0,5}=0,10\pm 0,01$  мг/мл).

З використанням надвисокоєфективної рідинної хроматографії в поєднанні з мас-спектрометрією високої роздільної здатності (LC-HRMS) в етанольному екстракті з «волохатих» коренях *Cichorium intybus* ідентифіковано 33 сполуки, включаючи 9 фенольних кислот і 24 флавоноїди, що належать до різних фенольних підкласів. Ідентифіковано прості фенольні кислоти (галова, кавова, хлорогенова, кафтарова) та їх відповідні глікозильовані або складноєфірні форми. Апігенін, кверцетин, кемпферол, лютеолін та їх кон'югати (глікозиди, галактозиди, глюкуроніди та ін.) ідентифіковано як основні флавони цього екстракту. Флавоноїди та флавони були переважно у формі О-глікозиду.

Двадцять шість основних компонентів екстрактів з «волохатих» коренів *Cichorium intybus*, включаючи флавоноїди та фенольні кислоти, були кількісно визначені методом HPLC-DAD шляхом порівняння хроматограми екстракту з хроматограмою стандартів у водно-метаноловому розчині. Встановлено, що вміст поліфенолів був значно вищим в етанольному екстракті, ніж у водному, і залежав від властивостей екстрагованих сполук. Вміст кавової кислоти в етанольному екстракті становив  $7,001 \pm 0,068$  мг/г порівняно з  $1,013 \pm 0,007$  мг/г у водному. Концентрація рутину, лютеоліну та апігеніну становила в 38,8, 13,9 і 77,6 разів вище в етанольному, ніж у водному екстракті.

Здійснено порівняння впливу діосміну, гесперидину та водно-етанольного екстракту з біотехнологічної рослинної сировини *Cichorium intybus* на активність ензиму 15-ліпоксигенази як маркера запалення. Показано, що АФІ діосмін та 70%-етанольний екстракт з «волохатих» коренів *Cichorium intybus* інгібують 15-ліпоксигеназу, при цьому концентрації напівмаксимального інгібування  $IC_{50}$  становлять  $244,75 \pm 19,91$  мкМ та  $84,13 \pm 7,22$  мкМ відповідно.

При порівнянні суміші діосміну, гесперидину та 70% етанольного екстракту з «волохатих» коренів *Cichorium intybus* у співвідношенні 9:1:2 з сумішшю діосміну з 70% етанольним екстрактом з «волохатих» коренів *Cichorium intybus* (9:1)

встановлено, що їхні концентрації напівмаксимального інгібування 15-ліпоксигенази  $IC_{50}$  мають подібні значення ( $p \geq 0,05$ ):  $69,82 \pm 4,56$  мкМ та  $66,04 \pm 6,16$  мкМ відповідно.

Знайдено, що суміш діосміну з 70% етанольним екстрактом з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* у співвідношенні 9:1 може потенційно використовуватись в якості комплексу активних фармацевтичних інгредієнтів для лікарських засобів протизапальної дії, оскільки має високу ефективність як інгібітор 15-ліпоксигенази. Концентрація напівмаксимального інгібування 15-ліпоксигенази  $IC_{50}$  в даних умовах становить  $66,04 \pm 6,16$  мкМ.

Розроблено оригінальний лікарський засіб ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг з активними фармацевтичними інгредієнтами діосміном (450 мг) та 70% етанольним екстрактом з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* (50 мг). Показано, що кількісний склад і технологія виробництва лікарського засобу ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг є оптимальними, що підтверджується в процесі напрацювання лабораторних серій і контролю проміжних продуктів.

Розроблено лабораторний регламент приготування лікарського засобу ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг з урахуванням вимог належної виробничої практики GMP, який включає лабораторну рецептуру, опис технологічного процесу, технологічну схему із зазначенням критичних стадій та параметрів контролю в процесі виробництва.

Доведено відсутність хімічних взаємодій (хімічну сумісність) компонентів розробленого лікарського засобу та стабільність системи в умовах прискореного випробування протягом 6 місяців. Зроблено висновок, що при розробці складу фармацевтичної композиції на основі діосміну та етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* здійснено раціональний підбір допоміжних речовин та технології її виготовлення.

В дисертаційній роботі шляхом визначення впливу структури та властивостей АФІ флавоноїдної природи діосміну, гесперидину та етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* на інгібування 15-ліпоксигенази

концептуально обґрунтовані склад та технологія фармацевтичної композиції, яка забезпечує високий показник протизапальних властивостей на рівні концентрації напівмаксимального інгібування 15-ліпоксигенази  $IC_{50}=66,04\pm 6,16$  мкМ. При цьому вперше встановлено:

- що гесперидин є активатором 15-ліпоксигенази ( $K_a=933,77\pm 98,44$  мкМ) і, таким чином, потенційно володіє прозапальними властивостями;

- що 70%-етанольний екстракт з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* майже в 3 рази є більш ефективним інгібітором 15-ліпоксигенази, ніж діосмін;

- ефект підвищення протизапальної ефективності фармацевтичної композиції при застосуванні суміші діосміну з 70% етанольним екстрактом з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* у співвідношенні 9:1, в порівнянні з протизапальною ефективністю індивідуальних АФІ з дослідженої суміші у порівнянних концентраціях;

- молекулярний механізм інгібування 15-ліпоксигенази діосміном, 70% етанольним екстрактом з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* та їх сумішшю: модель Mixed (Partial), тобто змішаного (часткового) типу інгібування, коли інгібітор зв'язується як у активному центрі ензиму, так і зовні, а ензим-субстратний комплекс зберігає часткову активність у порівнянні з нативним ензимом;

- що суміш діосміну з 70% етанольним екстрактом з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* у співвідношенні 9:1 може використовуватись в якості комплексу активних фармацевтичних інгредієнтів для лікарських засобів протизапальної дії.

Практична значимість роботи полягає у розробленні та впровадженні в науково-дослідний процес фармацевтичної розробки лабораторної технології протизапальної фармацевтичної композиції на основі суміші діосміну з 70% етанольним екстрактом з “волохатих” коренів *Cichorium intybus*, що розширює можливості вітчизняної фармацевтичної промисловості у створенні нових лікарських засобів для лікування запальних захворювань. Лабораторна технологія одержання та дослідження властивостей екстрактів з біотехнологічної рослинної сировини *Cichorium intybus* впроваджена на підприємстві ТОВ «Ковлар Груп».

Результати дослідження біологічної активності екстрактів з біотехнологічної рослинної сировини *Cichorium intybus* впроваджено в освітній процес кафедри аптечної технології ліків Національного фармацевтичного університету для здобувачів вищої освіти за ОПП «Фармація» на другому (магістерському) рівні вищої освіти.

Ключові слова: *Cichorium intybus* L., флавоноїди, антиоксидантна активність, активний фармацевтичний інгредієнт, протизапальні властивості, 15-ліпоксигеназа, супозиторії, рутин, специфічна активність, фармакологічна дія, лікарський засіб, лікарські форми, кінетичні показники, біофармація, екстракт.

## ABSTRACT

*Zderko N.P.* Development of a pharmaceutical composition with anti-inflammatory properties based on plant raw material *Cichorium intybus*. – Qualification scientific paper, manuscript.

Doctor of philosophy dissertation, specialty 226 – Pharmacy, Industrial Pharmacy. – Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2023.

Inflammation is a crucial immune system response that ensures survival during infections and tissue damage. Inflammatory reactions are necessary to maintain normal tissue homeostasis. However, regulating the intensity of the inflammatory response using pharmacological agents is an important element in treating of many diseases. Therefore, the development of new pharmaceutical compositions based on the search for pleiotropic effects of active pharmaceutical ingredients (APIs) registered in global pharmacopeias is necessary and timely. The use of flavonoids for this purpose as models and promising candidates, as well as rich extracts from biotechnological plant raw materials containing them, allows addressing a whole range of problems and limitations in treating individuals aged 60 and above.

The object of the study is the processes of forming anti-inflammatory properties of a pharmaceutical composition in the production of a medicinal product based on biotechnological plant raw material ("hairy" roots) of *Cichorium intybus*.

The subject of the study includes technologies for the comprehensive use of flavonoids and aqueous-ethanol extracts from biotechnological plant raw material in the production of anti-inflammatory geriatric medicinal products.

The aim of the dissertation work is to create a technology for obtaining a pharmaceutical composition with controlled physicochemical and pharmacological properties, exhibiting anti-inflammatory effects, based on plant raw material *Cichorium intybus*.

The scientific results obtained in the research collectively allowed to solve an important scientific-applied task: creating a pharmaceutical composition with anti-inflammatory effects



and with controlled physicochemical and pharmacological properties based on the flavonoid included in the pharmacopoeia diosmin and an aqueous-ethanol extract from biotechnological plant raw material *Cichorium intybus*.

In the dissertation work, the main factors regulating the pharmaco-technological and pharmacological properties of the anti-inflammatory medicinal product based on flavonoid-containing APIs were identified with aimed of ensuring standardized anti-inflammatory properties of the medicinal product, considering the nature and pharmacological properties of flavonoids and extracts from biotechnological plant raw material *Cichorium intybus*, as well as the nature and technological properties of lipid bases, the ratio of the main components of the pharmaceutical composition, and the technological parameters of the production process.

The influence of the extraction procedure on the yield of bioactive compounds in the "hairy" roots of *Cichorium intybus* when using two extraction solvents - water and ethanol (70%) was determined. Antioxidant capacity, total flavonoid content, and reducing capacity of the obtained extracts were evaluated using DPPH radical scavenging, metal chelation, and iron reduction assays, respectively. The highest total flavonoid content, as well as the highest antioxidant activity and reducing capacity, were found in the ethanolic extract compared to the aqueous extract.

The total flavonoid content of the aqueous and ethanol extracts was found to be 121.3 mg (RE)/g and 60.3 mg (RE)/g, respectively. The ethanolic extract was a richer source of flavonoids than the aqueous extract. Thus, the extraction conditions significantly affect the total amount of biologically active compounds in the obtained extracts.

It was shown that the antioxidant and reducing activity of the aqueous extract ( $EC_{50}=0.350\pm 0.015$   $\mu\text{g/ml}$  and  $EC_{0.5}=0.42\pm 0.04$   $\text{mg/ml}$ ) is 2 and 4 times lower, respectively (higher values of  $EC_{50}$  and  $EC_{0.5}$ ) than the same activities of the ethanolic extract ( $EC_{50}=0.165\pm 0.010$   $\mu\text{g/ml}$  and  $EC_{0.5}=0.10\pm 0.01$   $\text{mg/ml}$ ).

Using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS), 33 compounds, including 9 phenolic acids and 24

flavonoids belonging to different phenolic subclasses, were identified in the ethanolic extract from the "hairy" roots of *Cichorium intybus*. Simple phenolic acids (gallic, caffeic, chlorogenic, kaftaric) and their corresponding glycosylated or ester forms were identified. Apigenin, quercetin, kaempferol, luteolin and their conjugates (glycosides, galactosides, glucuronides, etc.) were identified as the main flavones of this extract. Flavonoids and flavones were mainly in the O-glycoside form.

Twenty-six major components of *Cichorium intybus* "hairy" root extracts, including flavonoids and phenolic acids, were quantified by HPLC-DAD by comparing the chromatogram of the extract with the chromatogram of standards in aqueous-methanol solution. It was established that the content of polyphenols was significantly higher in the ethanol extract than in the water extract, and it depended on the properties of the extracted compounds. The content of caffeic acid in the ethanol extract was  $7.001 \pm 0.068$  mg/g compared to  $1.013 \pm 0.007$  mg/g in the aqueous extract. The concentration of rutin, luteolin, and apigenin was 38.8, 13.9, and 77.6 times higher in the ethanol than in the aqueous extract.

A comparison of the impact of diosmin, hesperidin, and aqueous-ethanol extract from biotechnological plant raw material *Cichorium intybus* on the activity of the enzyme 15-lipoxygenase as a marker of inflammation was conducted. It was demonstrated that the APIs diosmin and 70% ethanol extract from "hairy" roots of *Cichorium intybus* inhibit 15-lipoxygenase, with half-maximal inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) of  $244.75 \pm 19.91$   $\mu$ M and  $84.13 \pm 7.22$   $\mu$ M, respectively.

When comparing the mixture of diosmin, hesperidin, and 70% ethanol extract from "hairy" roots of *Cichorium intybus* in a ratio of 9:1:2 with the mixture of diosmin with 70% ethanol extract from "hairy" roots of *Cichorium intybus* (9:1), it was established that their half-maximal inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) for 15-lipoxygenase have similar values ( $p \geq 0.05$ ):  $69.82 \pm 4.56$   $\mu$ M and  $66.04 \pm 6.16$   $\mu$ M, respectively.

It was found that the mixture of diosmin with 70% ethanol extract from "hairy" roots of *Cichorium intybus* in a ratio of 9:1 can potentially be used as a complex of active pharmaceutical ingredients for anti-inflammatory medicinal products, as it exhibits high

effectiveness as an inhibitor of 15-lipoxygenase. The half-maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) for 15-lipoxygenase under these conditions is  $66.04 \pm 6.16 \mu\text{M}$ .

An original medicinal product, DC 500 mg suppositories, has been developed, containing 450 mg of diosmin and 50 mg of 70% ethanol extract from "hairy" roots of *Cichorium intybus* as active pharmaceutical ingredients. It has been demonstrated that the quantitative composition and manufacturing technology of the medicinal product DC 500 mg rectal suppositories, are optimal, as confirmed during the development of laboratory batches and intermediate product control.

A laboratory procedure for preparing the medicinal product DC 500 mg rectal suppositories, has been developed, considering the requirements of Good Manufacturing Practice (GMP). This procedure includes the laboratory formula, a description of the technological process, and a technological scheme specifying critical stages and control parameters during production.

The absence of chemical interactions (chemical compatibility) among the components of the developed medicinal product and the system's stability under accelerated testing conditions for 6 months have been proven. It is concluded that a rational selection of excipients and the manufacturing technology has been made in the development of the pharmaceutical composition based on diosmin and ethanol extract from "hairy" roots of *Cichorium intybus*.

In the dissertation work, by determining the influence of the structure and properties of active pharmaceutical ingredients (APIs) of flavonoid nature, namely diosmin, hesperidin, and ethanol extract from "hairy" roots of *Cichorium intybus*, the composition and technology of a pharmaceutical composition have been conceptually justified which ensures a high index of anti-inflammatory properties at the level of half-maximal inhibitory concentration ( $IC_{50} = 66.04 \pm 6.16 \mu\text{M}$ ) for the inhibition of 15-lipoxygenase.

Moreover, for the first time, it has been established that:

- hesperidin is an activator of 15-lipoxygenase ( $K_a = 933.77 \pm 98.44 \mu\text{M}$ ) and, therefore, potentially possesses pro-inflammatory properties;

- the 70% ethanol extract from "hairy" roots of *Cichorium intybus* is almost three times more effective as an inhibitor of 15-lipoxygenase than diosmin;

- there is an enhancement in the anti-inflammatory effectiveness of the pharmaceutical composition when a mixture of diosmin with 70% ethanol extract from "hairy" roots of *Cichorium intybus* in a ratio of 9:1 is used, compared to the anti-inflammatory effectiveness of individual APIs from the investigated mixture at comparable concentrations;

- the molecular mechanism of inhibition of 15-lipoxygenase by diosmin, 70% ethanol extract from "hairy" roots of *Cichorium intybus*, and their mixture follows a Mixed (Partial) model, indicating a mixed type of inhibition. In this model, the inhibitor binds both at the active site of the enzyme and externally, maintaining partial activity in the enzyme-substrate complex compared to the native enzyme;

- the mixture of diosmin with 70% ethanol extract from "hairy" roots of *Cichorium intybus* in a ratio of 9:1 can be utilized as a complex of active pharmaceutical ingredients for anti-inflammatory medicinal products.

The practical significance of the work lies in the development and implementation of pharmaceutical technology for the production of an anti-inflammatory pharmaceutical composition based on a mixture of diosmin with 70% ethanol extract from "hairy" roots of *Cichorium intybus*. This expands the possibilities of the domestic pharmaceutical industry in creating new medications for the treatment of inflammatory diseases. The laboratory technology for obtaining and studying the properties of extracts from biotechnological plant raw material *Cichorium intybus* has been implemented at the enterprise «Kovlar Group» LLC. The research results regarding the biological activity of extracts from biotechnological plant raw material *Cichorium intybus* have been incorporated into the educational process of the Department of Pharmaceutical Technology of Drugs at the National Pharmaceutical University for students pursuing higher education in the Pharmacy field at the second (master's) level of higher education.

Key words: *Cichorium intybus* L., flavonoids, antioxidant activity, active pharmaceutical ingredient, anti-inflammatory properties, 15-lipoxygenase, suppositories,

rutin, specific activity, pharmacological action, medicinal product, dosage forms, kinetic parameters, biopharmaceutics, extract.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

**Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації.**

### Публікації у фахових виданнях України та Європи

Особистий внесок здобувача: [1-4] – планування та проведення експериментальних досліджень, [2-4] – аналіз експериментальних результатів, [2-4] – узагальнення отриманих результатів та підготовка статті до публікації.

1. Matvieieva N., Bessarabov V., Khaynakova O., Duplij V., Bohdanovych T., Ratushnyak Ya., Kuzmina G., Lisovyi V., **Zderko N.**, Kobylinska N. Cichorium Intybus L.'Hairy' Roots as Rich-Source of Antioxidants and Anti-Inflammatory Compounds. *Heliyon*. 2023. Vol. 9, № 3. E14516. (наукометрична база даних Scopus).
2. Bessarabov, V. I., & **Zderko, N. P.** (2023). Механізм інгібування 15-ліпоксигенази діосміном. *Фармацевтичний часопис*, (2), 41–45.
3. Bessarabov V., Vasylenko V., Vakhitova L., Kuzmina G., **Zderko N.**, Plavan V., Zagoriy G. Development of a Decontamination System for Decomposing N-(phosphonomethyl)glycine. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2019. Vol. 3, №6. P. 6-13. (наукометрична база даних Scopus).
4. Бессарабов В.І., Вахітова Л.М., Кузьміна Г.І., Баула О.П., Лісовий В.М., **Здерко Н.П.** Розробка методу оцінки ефективності деконтамінації фосфорорганічних сполук. *Вісник КНУТД. Хімічні та біофармацевтичні технології*. 2018. №5 (126). С. 114-122.

### Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

Особистий внесок здобувача: [1-12] – інформаційний пошук, [3-22] – планування та проведення експериментальних досліджень, [1, 2, 4, 6, 10, 18, 21-25]

– узагальнення отриманих результатів та підготовка статті або тез доповіді до публікації.

1. Бессарабов В.І., **Здерко Н.П.**, Кузьміна Г.І., Баула О.П. Дослідження *in silico* можливої протигрипозної активності деяких рослинних екстрактів. *Загальноотерапевтична практика: нові технології та міждисциплінарні питання: Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, 7 листопада 2013 р., м. Харків / за ред. Г.Д. Фадєєнко та ін. – Х., 2013. – С. 28.*

2. Karyna Savchenko, Vadym Lisovyi, **Nazar Zderko**, Volodymyr Bessarabov, Galyna Kuzmina, Nadia Matvieieva, Hanna Kharytonenko. Research of anti-inflammatory properties Cichorium intybus extract. *Open Readings 2022 : 65th international conference for students of Physics and Natural sciences. Vilnius : Vilnius University, 2022. P. 297.*

3. Лижнюк В.В., Лісовий В.М., Бессарабов В.І., Кузьміна Г.І., **Здерко Н.П.**, Матвєєва Н.А. Визначення активності екстракту Cichorium intybus в redox системі аутоокиснення адреналіну. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології : Матеріали II міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції. Харків : НФаУ, 2022. С. 154.*

4. **Zderko N.P.**, Bessarabov V.I. Anticarcinogenic and radioprotective activity of diosmin and hesperidin. *Pharmacology, Pharmaceutical Technology and Pharmacotherapy in Active Longevity: book of abstracts of the II International Scientific Conference / edited by K. Prashchayeu and V. Bessarabov - Vilnius: OIHN, 2015. Pp. 22-23p. - ISBN 978-609-95788-0-4 (PDF).*

5. Савченко К.І., Лісовий В.М., Бессарабов В.І., Харитоненко Г.І., Гой А.М., **Здерко Н.П.** Дизайн лікарського засобу протизапальної дії. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології: матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції (м. Харків, 13 жовтня 2022 р.). Х.: Вид-во НФаУ, 2022. С. 182-183. <https://er.knutd.edu.ua/handle/123456789/23288>*

6. Volodymyr Bessarabov, Nadia Matvieieva, Galyna Kuzmina, Vadym Lisovyi, Iryna Pashchenko, Viktor Kostyuk, **Nazar Zderko**. Anti-inflammatory properties of Artemisia tilesii ledeb extract. *22nd World Congress of Gerontology and Geriatrics. IAGG World Congress*. 2022. P. 106.

7. **Здерко Н.П.**, Бессарабов В.І. Противірусна активність діосміну та гесперидину. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії*: матеріали II Міжнародної науково-практичної інтернет - конференції (м. Харків, 12-13 листопада 2015 р.) - Х. : Вид-во НФаУ, 2015. – С. 123-124.

8. **Здерко Н.П.**, Бессарабов В.І., Баула О.П. Потенціал діосміну та гесперидину як активних фармацевтичних інгредієнтів лікарських засобів для лікування хвороби Альцгеймера. *Хімічні проблеми сьогодення* : збірник тез доповідей Дев'ятої Української наукової конференції студентів, аспірантів і молодих учених з міжнародною участю / Донецький національний університет ; редколегія : О. М. Шендрик (відп. ред.) [та ін.]. – Вінниця : ТОВ «Нілан-ЛТД», 2016. С. 31.

9. Кузьміна Г.І., Бессарабов В.І., Харченко А.Ю., Лісовий В.М., Шахматова К.А., **Здерко Н.П.** Фармацевтична композиція для лікування запальних захворювань у людей літнього віку. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології* : збірник наукових праць. Випуск 9. Харків: НФаУ, 2021. С. 33.

10. **Здерко Н.П.**, Горюшин І.А. Флавоноїди як можливі інгібітори холінестераз. XVIII Наукова молодіжна конференція «Проблеми та досягнення сучасної хімії» збірник тез доповідей, Київ, ТОВ НВП «Інтерсервіс» 2016. – С. 57.

11. Bessarabov V. I., Kuzmina G. I., Shelihatska O. V., Vasilev V. I., Saliy O.O., Horiushun I. A., **Zderko N. P.** The hesperidin inhibits the butyrylcholinesterase from serum of human. IX-th International chemistry conference "Kyiv-Toulouse" dedicated to the 100-th anniversary of Fedir Babichev : materials of reports and performances (Kyiv, 4-9 june 2017). – Kyiv : TSNUK, 2017. – P. 127.



12. Бессарабов В.І., Кузьміна Г.І., Шелігацька О.В., Васильєв В.І., Баула О.П., Горюшин І.А., **Здерко Н.П.** Інгібування бутирилхолінестерази сироватки крові людини гесперидином. Матеріали Української науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю «*Нанотехнології у фармації та медицині*» Х.: 2017, С. 48.

13. Семенкова І.Л., Скрипка А.В., **Здерко Н.П.**, Бессарабов В.І., Кузьміна Г.І. Підвищення біодоступності активного фармацевтичного інгредієнту рослинного походження. *Наукові розробки молоді на сучасному етапі* : тези доповідей XVII Всеукраїнської наукової конференції молодих вчених та студентів (26-27 квітня 2018 р., Київ). - Київ : КНУТД, 2018. - Т. 1 : Сучасні матеріали і технології виробництва виробів широкого вжитку та спеціального призначення. - С. 561-562.

14. Яценко К.С., Шевчук А.І., Лісовий В.М., Бессарабов В.І., **Здерко Н.П.** Підвищення біодоступності флавоноїдів. *Наукові розробки молоді на сучасному етапі*: тези доповідей XVIII Всеукраїнської наукової конференції молодих учених та студентів, 18-19 квітня 2019 року. Київ: КНУТД, 2019. С. 594.

15. Vadym Lisovyi, Artem Kharchenko, **Nazar Zderko**, Olga Kovalevska, Volodymyr Bessarabov. Centrifugal formation of fibers of solid dispersed system of polymer with hesperidine. *Open Readings 2022* : 65th international conference for students of Physics and Natural sciences. Vilnius : Vilnius University, 2022. P. 302.

16. Харченко А.Ю., Лісовий В.М., Таран Д.С., **Здерко Н.П.**, Ковалевська О.І., Костюк В.Г., Бессарабов В.І. Формування волокон полімерної твердої дисперсної системи гесперидину. *Сучасні аспекти створення лікарських засобів* : матеріали II Міжнародної науково-практичної дистанційної конференції (1 лютого 2022 р., м. Харків). Харків : НФаУ, 2022. С. 225.

17. Кузьмич М.О., Мазура С.О., **Здерко Н.П.**, Кузьміна Г.І., Бессарабов В.І. Лікарські засоби для лікування нейродегенеративних захворювань. *Наукові розробки молоді на сучасному етапі* : тези доповідей XVII Всеукраїнської наукової

конференції молодих вчених та студентів (26-27 квітня 2018 р., Київ). - Київ : КНУТД, 2018. - Т. 1 : Сучасні матеріали і технології виробництва виробів широкого вжитку та спеціального призначення. - С. 585-586.

18. Шелігацька О.В., Бессарабов В.І., Куришко Г.Г., Вахітова Л.М., **Здерко Н.П.**, Максименко С.П. Механізми токсичної дії фосфорорганічних пестицидів. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології* : збірник наукових праць. – Х.: Вид-во НФаУ, 2016. – С. 691-693.

19. Пищик М.М., Прищепа С.М., **Здерко Н.П.**, Бессарабов В.І. Ферментні системи детоксикації фосфорорганічних сполук .Тези доповідей XV Всеукраїнської наукової конференції молодих учених та студентів "*Наукові розробки молоді на сучасному етапі*". Т. 1 : Секція "Нові наукомісткі технології виробництва матеріалів, виробів широкого вжитку та спеціального призначення" : 28-29 квітня 2016 р. — К. : КНУТД, 2016. — С. 407.

20. Бессарабов В.І., Вахітова Л.М., Кузьміна Г.І., **Здерко Н.П.**, Дерипапа В.С. Нові системи для деконтамінації фосфорорганічних активних фармацевтичних інгредієнтів. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії*: матеріали III Міжнародної науково-практичної інтернет -конференції -Х. : Вид-во НФаУ, 2017. – С. 36.

21. Ташак Д.С., **Здерко Н.П.**, Качалова О.А., Кузьміна Г.І., Бессарабов В.І. Косметичні композиції з лікувальними УФ-захисними властивостями. *Наукові розробки молоді на сучасному етапі* : тези доповідей XVII Всеукраїнської наукової конференції молодих вчених та студентів (26-27 квітня 2018 р., Київ). - Київ : КНУТД, 2018. - Т. 1 : Сучасні матеріали і технології виробництва виробів широкого вжитку та спеціального призначення. - С. 577-578.

22. Козачок Г.С., **Здерко Н.П.**, Кузьміна Г.І., Бессарабов В.І. Застосування УФ-фільтрів в anti-age косметичній продукції. *Наукові розробки молоді на сучасному етапі* : тези доповідей XVI Всеукраїнської наукової конференції молодих вчених та студентів (27-28 квітня 2017 р., Київ). - К. : КНУТД, 2017. - Т. 1

: Сучасні матеріали і технології виробництва виробів широкого вжитку та спеціального призначення. - С. 594-595.

23. Мідякова М.В., Здерко Н.П., Бессарабов В.І., Кузьміна Г.І. Порівняльний аналіз методів дослідження фотозахисних властивостей фармацевтичних композицій. *Наукові розробки молоді на сучасному етапі* : тези доповідей XVI Всеукраїнської наукової конференції молодих вчених та студентів (27-28 квітня 2017 р., Київ). - К. : КНУТД, 2017. - Т. 1 : Сучасні матеріали і технології виробництва виробів широкого вжитку та спеціального призначення. - С. 592-593.

24. Мислик К.О., Приймак В.І., Здерко Н.П., Кузьміна Г.І., Бессарабов В.І. Структура ринку лікарських засобів, що містить вітамін D. *Наукові розробки молоді на сучасному етапі* : тези доповідей XVI Всеукраїнської наукової конференції молодих вчених та студентів (27-28 квітня 2017 р., Київ). - К. : КНУТД, 2017. - Т. 1 : Сучасні матеріали і технології виробництва виробів широкого вжитку та спеціального призначення. С. 596-597.

25. Бессарабов В.І., Васильєв В.І., Баула О.П., Кузьміна Г.І., Здерко Н.П. Технологія віртуального експериментального дослідження у додипломній підготовці фахівців для фармацевтичної галузі. *Фармація XXI століття* : тенденції та перспективи: матеріали VIII Нац. з'їзду фармацевтів України: у 2 т. Т. 2 / М-во охорони здоров'я України. Нац. фармац. ун-т; ред. кол.: В.П. Черних (голова) та ін.; уклад.: С. Ю. Данильченко та ін. - Харків: НФаУ, 2016. – С. 326.

### **Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації**

Особистий внесок здобувача: [1-4] – інформаційний пошук, аналіз літературних даних, [2, 3] – планування та проведення експериментальних досліджень, [3] – узагальнення отриманих результатів та підготовка статті до публікації.

1. Кулик В.Б., Бессарабов В.І., **Здерко Н.П.**, Вакуленко О.С. Дослідження впливу терапії діосміном на ліпідний спектр крові і окисно-антиоксидантну систему щурів, які знаходились на дієті з високим вмістом холестерину. *Фізико-органічна хімія, фармакологія та фармацевтична технологія біологічно активних речовин* : збірник наукових праць / за заг. ред. А. Ф. Попова. - Київ : КНУТД, 2019. - Вип. 2, Т. 1. - С. 297-305.

2. Повshedна І.О., Бессарабов В.І., Кузьміна Г.І., Лісовий В.М., Закаблущкий Н.А., **Здерко Н.П.**, Пашенко І.О. Дослідження антиоксидантних властивостей цитрусового флавоноїду гесперидину. *Фізико-органічна хімія, фармакологія та фармацевтична технологія біологічно активних речовин*: збірник наукових праць, випуск 3 / за заг. ред. А. Ф. Попова. – Київ: КНУТД, 2021. С. 252-258.

3. **Здерко Н.П.**, Бессарабов В.І., Кузьміна Г.І., Плаван В.П. Огляд методів підвищення розчинності поганорозчинних активних фармацевтичних інгредієнтів. *Modern physical-organic chemistry and pharmacy: collective monograph*. Tallinn: Nordic Sci Publisher, 2021. P. 15-29.

4. Бессарабов В.І., Кузьміна Г.І., Вахітова Л.М., Горюшин І.А. Шинкарьова М.Ю., Баула О.П., **Здерко Н.П.**, Качалова Н.М. Антиоксидантні властивості флороглюцинолу в redox системі на основі аутоокиснення адреналіну. *KyivPharma-2017. Фармакологія та фармацевтична технологія в забезпеченні активного довголіття* : збірник наукових праць III Міжнародної науково-практичної конференції (8 грудня 2017 р., м. Київ) / під заг. ред. В. В. Страшного. – Київ : КНУТД, 2017. – С. 19-24.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ .....	26
ВСТУП.....	27
РОЗДІЛ 1 РОЛЬ АКТИВНИХ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ІНГРЕДІЄНТІВ ФЛАВОНОЇДНОЇ ПРИРОДИ У ФОРМУВАННІ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ .....	35
1.1 Сучасні погляди на молекулярні механізми розвитку запалення .....	35
1.1.1 Основні індуктори запалення.....	39
1.1.2 Основні медіатори та ефектори запалення.....	43
1.2 Роль ліпоксигеназ в розвитку запалення .....	46
1.3 Біологічна активність та застосування в якості активних фармацевтичних інгредієнтів флавоноїдних сполук.....	48
1.4 Фармакологічний потенціал флавоноїдвмісних екстрактів з рослинної сировини <i>Cichorium intybus</i> .....	51
1.5 Супозиторії, як оптимальна лікарська форма протизапального лікарського засобу на основі флавоноїдвмісних активних фармацевтичних інгредієнтів .....	53
Висновки до розділу 1 .....	56
РОЗДІЛ 2 ОБ’ЄКТ, ПРЕДМЕТ ДОСЛІДЖЕННЯ, ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРІАЛІВ І МЕТОДІВ, ЗАСТОСОВАНИХ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ .....	59
2.1 Матеріали та обладнання, використані при проведенні експериментальних досліджень.....	59
2.2 Біотехнологічна рослинна сировина .....	60
2.3 Процедура екстракції.....	62
2.4 Визначення загального вмісту флавоноїдів.....	62
2.5 DPPH тест.....	62
2.6 Визначення відновлювальної здатності.....	63
2.7 Хроматографічний аналіз .....	64

2.8 In Vitro вимірювання інгібування 15-sLOX.....	66
2.8.1 Методика визначення активності 15-ліпоксигенази in vitro .....	66
2.8.2 Визначення активності 15-ліпоксигенази без інгібіторів.....	68
2.8.3 Визначення активності 15-ліпоксигенази в присутності досліджуваних розчинів.....	69
2.8.4 Експериментальне дослідження впливу активних фармацевтичних інгредієнтів лікарського засобу на активність 15-ліпоксигенази в реакції ферментативного окислення лінолевої кислоти.....	70
2.9 Дослідження in silico біологічної активності флавоноїдів .....	71
2.10 Дослідження хімічної сумісності та стабільності .....	72
2.11 Інфрачервона спектроскопія з Фур'є перетворенням .....	72
2.12 Визначення кількісного вмісту АФІ в готовому лікарському засобі.....	73
2.13 Статистичний аналіз даних .....	74
Висновки до розділу 2 .....	74
РОЗДІЛ 3 ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КАНДИДАТІВ У КОМПОНЕНТИ ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ.....	76
3.1 Вплив природи екстракційного розчинника на вміст флавоноїдів та RedOx властивості екстрактів з “волохатих” коренів <i>Cichorium intybus</i> .....	76
3.2 Скринінг поліфенольних сполук в етанольному екстракті з “волохатих” коренів <i>Cichorium intybus</i> .....	77
3.3 Кількісне визначення поліфенольних сполук в етанольному екстракті з “волохатих” коренів <i>Cichorium intybus</i> .....	82
3.4 Дослідження in silico фармакологічних властивостей основних флавоноїдів, які містяться в етанольному екстракті з “волохатих” коренів <i>Cichorium intybus</i> .....	85

3.5 Дослідження протизапальної активності флавоноїдів та етанольного екстракту з “волохатих” коренів <i>Cichorium intybus</i> як потенційних активних фармацевтичних інгредієнтів фармацевтичної композиції.....	86
3.5.1 Дослідження запальних властивостей гесперидину .....	86
3.5.2 Дослідження протизапальних властивостей діосміну .....	88
3.5.3 Дослідження протизапальних властивостей 70% етанольного екстракту з “волохатих” коренів <i>Cichorium intybus</i> .....	91
3.5.4 Дослідження протизапальних властивостей суміші активних фармацевтичних інгредієнтів діосміну, гесперидину та екстракту цикорію ....	94
3.5.5 Дослідження протизапальних властивостей суміші активних фармацевтичних інгредієнтів діосміну та 70% етанольного екстракту з “волохатих” коренів <i>Cichorium intybus</i> .....	96
Висновки до розділу 3 .....	99
<b>РОЗДІЛ 4 РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ ДІОСМІНУ ТА ЕТАНОЛЬНОГО ЕКСТРАКТУ З <i>CICHORIUM INTYBUS</i></b> .....	101
4.1 Опис, склад та фармацевтична розробка лікарського засобу.....	101
4.1.1 Опис і склад лікарського засобу .....	101
4.1.2 Фармацевтична розробка .....	102
4.1.2.1. Компоненти лікарського засобу .....	103
4.1.2.2 Лікарський засіб.....	114
4.2 Розробка лабораторного регламенту приготування лікарського засобу на основі діосміну та етанольного екстракту з <i>Cichorium intybus</i> .....	126
4.2.1 Розробка технологічного процесу .....	126
4.2.2. Технологічна схема та опис технологічного процесу .....	130
4.3 Результати випробування на хімічну сумісність та стабільність компонентів лікарського засобу на основі діосміну та етанольного екстракту з <i>Cichorium intybus</i> .....	133

4.3.1	Матеріали та методи.....	134
4.3.2	Результати контролю фізичної стабільності за органолептичними показниками.....	135
4.3.3	Результати досліджень хімічної сумісності та стабільності за допомогою методу інфрачервоної спектроскопії з Фур'є перетворенням .....	137
4.3.4	Результати визначення кількісного вмісту АФІ в готовому лікарському засобі .....	150
	Висновки до розділу 4 .....	153
	<b>РОЗДІЛ 5 РОЗРОБЛЕННЯ ДЕКОНТАМІНАЦІЙНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ ОЧИСТКИ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ ПРИ ВИРОБНИЦТВІ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ СУПОЗИТОРІЇ РЕКТАЛЬНІ ДЦ ПО 500 МГ .....</b>	<b>154</b>
5.1	Системи деконтамінації N-фосфонометилгліцину .....	155
5.2	Методика дослідження кінетики деградації N-фосфонометил-гліцину .....	156
5.3	Результати дослідження нуклеофільного розкладання N-фосфонометилгліцину .....	157
5.3.1	Лужний гідроліз N-фосфонометилгліцину .....	157
5.3.2	Пергідроліз N-фосфонометилгліцину за участі гідроксиду калію та пероксиду водню у якості $\alpha$ -нуклеофілу .....	158
5.3.3	Вплив борної кислоти на швидкість розкладання N-фосфонометилгліцину.....	162
5.3.4	Розроблення складу деконтамінаційної системи для розкладання N-фосфонометилгліцину.....	164
5.4	Випробування розробленої деконтамінаційної системи для розкладання N-фосфонометилгліцину для очистки технологічного обладнання після циклу виробництва лікарського засобу ДЦ, супозиторії ректальні 500 мг .....	164
	Висновки до розділу 5 .....	165
	<b>ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ .....</b>	<b>167</b>
	<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>	<b>170</b>



ДОДАТОК А Список публікацій здобувача.....	195
ДОДАТОК Б Висновок комісії з питань етики та біоетики наукових досліджень .....	202
ДОДАТОК В Акт впровадження результатів дисертаційного дослідження в діяльність ТОВ «Ковлар Груп» .....	203
ДОДАТОК Г Акт впровадження результатів дисертаційного дослідження в діяльність ТОВ «Ковлар Груп» .....	204
ДОДАТОК Д Акт впровадження результатів дисертаційного дослідження в діяльність Національного фармацевтичного університету МОЗУ.....	205

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

TLR	Toll-подібні рецептори
NLR	NOD-подібні рецептори
АФО	Активні форми оксигену
PAMP	Патоген-асоційовані молекулярні патерни
IL-1	Інтерлейкін 1
TNF- $\alpha$	Фактор некрозу пухлини- $\alpha$
LOX	Ліпоксигенази
ЛЗ	Лікарські засоби
GSH	Глутатіон
MMP	Матріксні металопротеїнази
АФІ	Активні фармацевтичні інгредієнти
MDA	Малоновий диальдегід
GPx	Глутатіонпероксидази
CAT	Каталаза
COX-2	Циклооксигеназа-2
ПАР	Поверхнево-активні речовини
ЦПХ	Цетилпіридиній хлорид

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Запалення є важливою реакцією організму під час інфекції, пошкодження тканин та носить захисний характер. Запальні реакції необхідні для підтримки нормального тканинного гомеостазу [1]. Однак регуляція інтенсивності запальної реакції з використанням фармакологічних засобів є важливим елементом лікування багатьох захворювань [2, 3]. В зв'язку з цим проблема розробки нових фармацевтичних композицій на основі пошуку плейотропних ефектів активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ), зареєстрованих у світових фармакопеях, є необхідною та своєчасною. Застосування для цієї мети флавоноїдів як моделей та перспективних кандидатів, а також багатих на них екстрактів з біотехнологічної рослинної сировини, дозволяє вирішувати цілий комплекс проблем та обмежень при лікуванні людей вікової категорії 60+ років [4-7]. Тому особливу актуальність набувають наукові дослідження з розроблення нових та безпечних лікарських засобів для боротьби з запаленням.

В багатьох дослідженнях була продемонстрована потенційна протизапальна [8, 9] ефективність флавоноїду діосміну *in vivo*. В інших дослідженнях показано, що одними з найбільш перспективних є протизапальні властивості екстрактів та окремих виділених речовин з *Cichorium intybus* L. [10].

Важливою перевагою терапевтичного застосування лікарських рослин та екстрактів з них є їх відносна безпека, ефективність, економічна доцільність і доступність [11]. Останнім часом глобальний попит на лікарські рослинні продукти зріс з 19,6 млрд доларів США в 1996 році до 24,2 млрд доларів США в 2002 році і за прогнозами досягне 5 трлн доларів США до 2050 року [12]. Крім того є можливість ціленаправлено підвищити фармакологічну активність екстракту шляхом підбору потрібного екстрагенту щоб виділяти з рослини більшу кількість бажаних речовин [13]. Іншим способом підвищення кількості фармакологічно активних речовин в екстракті є отримання культур «волохатих» коренів потрібних

лікарських рослин, що можуть продукувати значно більше бажаних речовин. Для отримання трансгенної культури «волохатих» коренів, бажану рослину піддають впливу бактерій *Agrobacterium rhizogenes*. Отримана культура тканини швидко росте та легко піддається культивуванню на промисловій основі, крім того в отриманій культурі іноді значно підвищується продукція деяких речовин [14].

Таким чином, необхідність та актуальність досліджень у позначеному напрямку обумовлена попередніми дослідженнями та науковим прогнозуванням ефективності застосування комбінації фармакопейних флавоноїдів діосміну та гесперидину з одним із сухих екстрактів з «волохатих» коренів *Cichorium intybus* в лікарській формі супозиторіїв, що дозволить створити вискоєфективну протизапальну фармацевтичну композицію та доступний лікарський засіб на її основі в першу чергу для однієї з найбільших груп населення Європи – людей літнього та старечого віку.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** Робота виконана у відповідності до наукового напрямку КНУТД № 21/19 «Фундаментальні технології активного довголіття», перспективного плану розвитку наукового напрямку «Біологія та охорона здоров'я» Київського національного університету технологій та дизайну у 2021-2025 роках (№ державної реєстрації 0122U000139), планів науково-дослідних робіт КНУТД: НДР за державним замовленням «Розроблення геріатричної фармацевтичної композиції для лікування нейродегенеративних захворювань» (№ державної реєстрації НДР 0117U007411 (2017–2018 рр.)), фундаментальної НДР «Моделювання наноструктурних екологічних систем деконтамінації фосфорорганічних токсичних речовин» (№ державної реєстрації НДР 0116U004574 (2016–2018 рр.)), госпрозрахункової НДР «Послуги з тестового розрахунку кінетичних параметрів ферментативних реакцій інгібування 15-LOX із застосування спеціального програмного забезпечення» (№ 1139 від 08.12.2021 р.), госпрозрахункової НДР «Дослідження протизапальної активності та розробка лабораторної технологічної

схеми виробництва лікарського засобу» (№1077 від 04.03.2021 р.), ініціативної НДР «Фундаментальні технології розробки та виробництва лікарських засобів» (№ державної реєстрації НДР О121U114647 (2021-2025 рр.)), ініціативної НДР «Розробка інноваційних лікарських засобів на базі плейотропних ефектів активних фармацевтичних інгредієнтів» (№ державної реєстрації НДР О121U114646 (2021-2025 рр.)).

#### **Мета та завдання дослідження.**

Метою дисертаційної роботи є створення технології фармацевтичної композиції протизапальної дії з керованими фізико-хімічними та фармакологічними властивостями на основі рослинної сировини *Cichorium intybus*. Для досягнення поставленої мети вирішувались наступні завдання:

- дослідження фізико-хімічних, біохімічних характеристик та питомої біологічної активності гесперидину, діосміну, екстрактів з “волохатих” коренів *Cichorium intybus*;
- дослідження складу та антиоксидантних властивостей екстрактів з “волохатих” коренів *Cichorium intybus*;
- дослідження *in silico* біологічної активності основних компонентів екстрактів з “волохатих” коренів *Cichorium intybus*;
- розроблення лабораторного регламенту приготування лікарського засобу ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг, який включає лабораторну рецептуру, опис технологічного процесу, технологічну схему із зазначенням критичних стадій та параметрів контролю в процесі виробництва;
- дослідження хімічної сумісності компонентів та стабільності АФІ з жирowymi основами в бінарних та розроблених сумішах;
- розроблення складу деконтамінаційного засобу для ефективного очищення технологічного обладнання після виробництва лікарського засобу ДЦ, супозиторії ректальні 500 мг.

Об'єкт дослідження – процеси формування протизапальних властивостей фармацевтичної композиції у виробництві лікарського засобу на основі біотехнологічної рослинної сировини (“волохатих” коренів) *Cichorium intybus*.

Предмет дослідження – технології комплексного використання флавоноїдів та водно-етанольних екстрактів з біотехнологічної рослинної сировини у виробництві протизапальних геріатричних лікарських засобів.

Методи дослідження. Для ідентифікації складу екстрактів з біотехнологічної рослинної сировини *Cichorium intybus* використовували методи HPLC, масспектрометрії, UV та FTIR-спектроскопії. Дослідження фармакологічних властивостей флавоноїдів та основних компонентів екстрактів проводили методом QSAR аналізу. Кількісну оцінку протизапальних властивостей АФІ, екстрактів та фармацевтичних композицій проводили з використанням *in vitro* кінетичних досліджень інгібування 15-ліпоксигенази з сої (15-sLOX) як маркера запалення.

**Наукова новизна одержаних результатів.** В дисертаційній роботі шляхом визначення впливу структури та властивостей АФІ флавоноїдної природи діосміну, гесперидину та етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* на інгібування 15-ліпоксигенази концептуально обґрунтовані склад та технологія фармацевтичної композиції, яка забезпечує високий показник протизапальних властивостей на рівні концентрації напівмаксимального інгібування 15-ліпоксигенази  $IC_{50} = 66,04 \pm 6,16$  мкМ.

При цьому вперше встановлено:

- що гесперидин є активатором 15-ліпоксигенази ( $K_a = 933,77 \pm 98,44$  мкМ) і, таким чином, потенційно володіє прозапальними властивостями;
- що 70%-етанольний екстракт з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* майже в 3 рази є більш ефективним інгібітором 15-ліпоксигенази, ніж діосмін;
- ефект підвищення протизапальної ефективності фармацевтичної композиції при застосуванні суміші діосміну з 70% етанольним екстрактом з “волохатих” коренів

*Cichorium intybus* у співвідношенні 9:1, в порівнянні з протизапальною ефективністю індивідуальних АФІ з дослідженої суміші у порівнянних концентраціях;

- молекулярний механізм інгібування 15-ліпоксигенази діосміном, 70% етанольним екстрактом з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* та їх сумішню: модель Mixed (Partial), тобто змішаного (часткового) типу інгібування, коли інгібітор зв’язується як у активному центрі ензиму, так і зовні, а ензим-субстратний комплекс зберігає часткову активність у порівнянні з нативним ензимом;

- що суміш діосміну з 70% етанольним екстрактом з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* у співвідношенні 9:1 може використовуватись в якості комплексу активних фармацевтичних інгредієнтів для лікарських засобів протизапальної дії.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблена та впроваджена у науково-дослідний процес фармацевтичної розробки лабораторна технологія отримання протизапальної фармацевтичної композиції на основі суміші діосміну з 70% етанольним екстрактом з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* розширює можливості вітчизняної фармацевтичної промисловості у створенні нових лікарських засобів для лікування запальних захворювань. Лабораторна технологія одержання та дослідження властивостей екстрактів з біотехнологічної рослинної сировини *Cichorium intybus* впроваджена на підприємстві ТОВ «Ковлар Груп». Результати дослідження біологічної активності екстрактів з біотехнологічної рослинної сировини *Cichorium intybus* впроваджено в освітній процес кафедри аптечної технології ліків Національного фармацевтичного університету для здобувачів вищої освіти за ОПП «Фармація» на другому (магістерському) рівні вищої освіти.

**Особистий внесок здобувача** полягає у загальній постановці проблеми та обґрунтуванні мети, в здійсненні інформаційного пошуку та аналізі літературних даних за темою дисертації, опрацюванні методик та проведенні експериментальних досліджень, розробці складу та технології фармацевтичної композиції та лікарського засобу на її основі, проведенні організаційних заходів з впровадження

наукових результатів у науково-дослідний процес та освітній процес підготовки здобувачів вищої освіти. Положення і результати, що виносяться на захист дисертаційної роботи, отримані здобувачем особисто. Здобувач брав безпосередню участь в здійсненні фізико-хімічних досліджень та випробувань зразків в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України під керівництвом д-ра біол. наук, професора Матвєєвої Н.А., біохімічних та фармако-технологічних досліджень в Навчально-науковій лабораторії молекулярної фармакології, хемогеноміки та біогеронтології КНУТД під керівництвом д-ра техн. наук, професора Бессарабова В.І. в межах виконання відповідних науково-технічних тем, а також особисто здійснив обробку та теоретичне обґрунтування одержаних результатів. Внесок здобувача в обґрунтування положень, що виносяться на захист, є вирішальним.

Постановку наукових завдань та обговорення результатів, формулювання основних положень та висновків дисертаційної роботи проведено разом з науковим керівником.

Особистий внесок здобувача у працях, які опубліковані у співавторстві, наведено у розділі «Список публікацій здобувача». Співавторами наукових праць є науковий керівник та науковці, з якими проведені експериментальні дослідження, та які зазначені у спільних публікаціях.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня: науково-практичній конференції з міжнародною участю «Загальнотерапевтична практика: нові технології та міждисциплінарні питання» (Харків, 2013); II international scientific conference «Pharmacology, Pharmaceutical Technology and Pharmacotherapy in Active Longevity» (Vilnius, 2015); II міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (Харків, 2015); V Науково-практичній інтернет-конференції з міжнародною участю «Сучасні досягнення фармацевтичної



технології та біотехнології» (Харків, 2016); VIII національному з'їзді фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (Харків, 2016); XVIII науковій молодіжній конференції «Проблеми та досягнення сучасної хімії» (Київ, 2016); XV всеукраїнській науковій конференції молодих учених та студентів «Наукові розробки молоді на сучасному етапі» (Київ, 2016); дев'ятій Українській науковій конференції студентів, аспірантів і молодих вчених з міжнародною участю «Хімічні проблеми сьогодення» (Вінниця, 2016); IX international chemistry conference «Kyiv-Toulouse» dedicated to the 100th anniversary of Fedir Babichev (Kyiv, 2017); українській науково-практичній інтернет-конференції з міжнародною участю «Нанотехнології у фармації та медицині» (Харків, 2017); III міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (Харків, 2017); XVI всеукраїнській науковій конференції молодих вчених та студентів «Наукові розробки молоді на сучасному етапі» (Київ, 2017); III Міжнародній науково-практичній конференції «KyivPharma-2017. Фармакологія та фармацевтична технологія в забезпеченні активного довголіття» (Київ, 2017); XVII всеукраїнській науковій конференції молодих вчених та студентів «Наукові розробки молоді на сучасному етапі» (Київ, 2018); IV Міжнародній науково-практичній конференції «KyivPharma-2019. Фармакологія та фармацевтична технологія в забезпеченні активного довголіття» (Київ, 2019); XVIII всеукраїнській науковій конференції молодих вчених та студентів «Наукові розробки молоді на сучасному етапі» (Київ, 2019); IX Міжнародній науково-практичній internet-конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології» (Харків, 2021); V Міжнародній науково-практичній конференції «KyivPharma-2021. Фармакологія та фармацевтична технологія в забезпеченні активного довголіття» (Київ, 2021); II Міжнародній науково-практичній дистанційній конференції «Сучасні аспекти створення лікарських засобів» (Харків, 2022); II міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (Харків, 2022); II

Міжнародній науково-практичній конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології» (Харків, 2022); 65th international conference for students of Physics and Natural sciences «Open Readings 2022» (Vilnius, 2022); 22nd World Congress of Gerontology and Geriatrics «IAGG World Congress» (Buenos Aires, 2022).

**Публікації.** Результати дослідження опубліковано в 33 наукових працях, з яких: 2 – статті у наукових фахових виданнях України, 2 – у виданнях, що входять до науково-метричної бази Scopus; 4 – статті в інших виданнях, які додатково висвітлюють результати дослідження; тези 25 доповідей на наукових конференціях, з них 13 – доповіді на міжнародних конференціях.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається із вступу, 5 розділів, висновків, списку використаних джерел (183 найменування на 25 сторінках), 5 додатків (на 11 сторінках), містить 40 таблиць та 30 рисунків. Основний текст роботи викладено на 148 сторінках. Загальний обсяг роботи становить 205 сторінок.

## РОЗДІЛ 1

# РОЛЬ АКТИВНИХ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ІНГРЕДІЄНТІВ ФЛАВОНОЇДНОЇ ПРИРОДИ У ФОРМУВАННІ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

### 1.1 Сучасні погляди на молекулярні механізми розвитку запалення

Запалення є важливою реакцією імунної системи, яка забезпечує виживання під час інфекції та пошкодження тканин. Запальні реакції необхідні для підтримки нормального тканинного гомеостазу. Молекулярний механізм запалення є досить складним процесом, який ініціюється розпізнаванням специфічних молекулярних структур, пов'язаних з інфекцією або пошкодженням тканин. Весь процес запальної відповіді опосередковується кількома ключовими регуляторами, залученими до селективної експресії прозапальних молекул [1].

Запалення – це захисна стратегія, розроблена вищими організмами у відповідь на шкідливі впливи, такі як інфекції спричинені мікроорганізмами, пошкодження тканин та інші шкідливі умови. Це необхідна імунна відповідь господаря, що дозволяє усувати шкідливі подразники, а також загоювати пошкоджені тканини. Тому гостре запалення розглядається як а частина вродженого імунітету, перша лінія захисту господаря від чужорідних та небезпечних молекул. Людство знало класичні симптоми запалення протягом сотень років, які включають почервоніння, біль, набряк і жар [2, 3].

Останнім часом було досягнуто значного прогресу в розумінні клітинних та молекулярних подій, які беруть участь у гострій запальній реакції на інфекцію, та меншою мірою на пошкодження тканин. Крім того, події, які призводять до локалізованих хронічних запалень, особливо при хронічних інфекціях та автоімунних захворюваннях, зрозумілі частково. Значно менше відомо про причини та механізми системного хронічного запалення, яке зустрічається при різноманітних захворюваннях, включаючи 2 тип цукрового діабету і серцево-

судинних захворюваннях. Ці хронічні стани не спричинені класичними збудниками запалення: інфекціями чи травмами. Натомість вони, здається, пов'язані з порушенням функціонування тканин: тобто гомеостатичним дисбалансом однієї з кількох фізіологічних систем, які безпосередньо функціонально не пов'язані з захистом організму, або відновленням тканин [15].

На базовому рівні гостра запальна реакція, викликана інфекцією або пошкодженням тканин, передбачає скоординовану доставку компонентів крові (плазма та лейкоцити) до місця інфекції або травми [2, 3]. Ця реакція найдетальніше описана для мікробних інфекцій (зокрема бактеріальних інфекцій), при яких він запускається рецепторами вродженої імунної системи, такими як Toll-подібні рецептори (TLR) і NOD-подібні рецептори (NLR) [16]. Це первинне розпізнавання інфекції відбувається за допомогою клітин-резидентів, а саме макрофагів та тучних клітин, що продукують різноманітні медіатори запалення, включаючи хемокіни, цитокіни, вазоактивні аміни, ейкозаноїди та продукти протеолітичних каскадів. Основний і найшвидший ефект цих медіаторів полягає в тому, що вони викликають місцевий запальний ексудат: білки плазми і лейкоцити (переважно нейтрофіли), місцезнаходження яких, зазвичай, обмежується кровоносними судинами. При розвитку запалення вони отримують доступ через посткапілярні венули до позасудинних тканин в місці інфікування або травми. Активованій ендотелій кровоносних судин дозволяє селективну екстравазацію нейтрофілів, одночасно запобігаючи виходу еритроцитів [17]. Коли нейтрофіли досягають ураженої ділянки тканини, вони активуються шляхом прямого контакту з патогенами або через дію цитокінів, що продукуються клітинами-резидентами. Нейтрофіли намагаються зруйнувати чужорідні агенти шляхом виділення токсичного вмісту їх гранул, які включають активні форми кисню (АФО) і активні форми нітрогену, протеїназу 3, катепсин G і еластазу [18]. Ці, дуже потужні ефектори, не розрізняють мікроорганізми від тканин хазяїна, тому супутні пошкодження тканин хазяїна неминучі [19].

Успішна гостра запальна відповідь призводить до елімінації інфекційних агентів з подальшою фазою розсмоктування та відновлення, яка опосередкована, головним чином, резидентними та рекрутованими макрофагами [20]. Перемикання ліпідних медіаторів з прозапальних простагландинів на ліпоксини, які є протизапальними, має вирішальне значення для переходу від запалення до розсмоктування. Ліпоксини пригнічують виділення нейтрофілів і, натомість, сприяють виділенню моноцитів, які видаляють мертві клітини та ініціюють відновлення тканин [20]. Резолвіни і протектини, які належать до іншого класу ліпідних медіаторів, як і трансформуючий фактор росту- $\beta$  та фактори росту, що продукуються макрофагами також відіграють вирішальну роль у закінченні запалення, включаючи початок відновлення тканин [20, 21].

Якщо гостра запальна реакція не дозволяє усунення збудника, запальний процес зберігається і набуває нових ознак. Нейтрофільний інфільтрат заміщується макрофагами, а в разі інфікування також Т-клітинами. Якщо комбінованої дії цих клітин все ще недостатньо, настає хронічний запальний стан з утворенням гранульом і третинної лімфоїдної тканини [3, 22].

Характеристики цього запального стану можуть відрізнитись в залежності від ефекторного класу наявних Т-клітин. Крім стійких патогенів, хронічне запалення може бути спричинене пошкодженням тканин внаслідок автоімунної реакції (внаслідок персистенції власних антигенів), або сторонніми тілами, що не розкладаються. Невдалі спроби макрофагів поглинути та знищити патогени або сторонні тіла можуть призвести до утворення гранульом, в яких вони відгороджені шарами макрофагів, в останній спробі захистити господаря [2, 3].

Слід зазначити, що механізми інфекційно-індукованого запалення досліджені набагато краще, ніж інші запальні процеси. Незрозуміло, наскільки можливо застосовувати знання про запалення, індуковане інфекцією, до інших типів запалення. Хоча розуміння запалення, викликаного інфекцією, життєво важливе, воно може бути окремим випадком запалення. Механізми системних хронічних

запальних станів у цілому недостатньо вивчені, але вже, здається, очевидно, що для них не підходить класична картина переходу гострого запалення в хронічне [15].

Запальна реакція координується великою кількістю медіаторів які утворюють складні регулюючі мережі. Щоб розібрати ці мережі, корисно розділити всі компоненти за функціональними категоріями а також розрізнити індуктори та медіатори запалення. Індуктори – це сигнали, які ініціюють запальну реакцію. Вони активують спеціалізовані сенсори, які запускають продукцію специфічних наборів медіаторів. Медіатори, у свою чергу, змінюють функціональний стан тканин та органів (які є ефекторами запалення) таким чином, щоб це дозволяло адаптуватися до умов викликаних особливостями індуктора запалення. Таким чином загальний запальний «шлях» складається з індукторів, сенсорів, медіаторів та ефекторів [15, 23].

Також слід згадати що індуктори запалення можуть бути екзогенними та ендогенними.

Екзогенні індуктори можна поділити на дві групи: мікробні та немікробні. В свою чергу мікробні індуктори поділяються на патоген-асоційовані молекулярні патерни (РАМР) і фактори вірулентності. Перший клас мікробних індукторів, РАМР, є обмеженим і визначеним набором молекулярних моделей, які переносяться всіма мікроорганізмами певного класу (неважливо чи це патогенні чи коменсальні мікроорганізми) [24]. Визначення РАМР полягає в тому, що хазяїн виробив відповідний набір рецепторів (відомі як рецептори розпізнавання патерну), які виявляють їх присутність.

Наступний клас мікробних індукторів включає різноманітні фактори вірулентності, а отже обмежується патогенами. На відміну від РАМР, вони не відчуються безпосередньо спеціальними рецепторами. Натомість запальну реакцію запускають наслідки їх діяльності, а саме несприятливий вплив на господаря. Типову активність факторів вірулентності виявляють спеціалізовані рецептори. Наприклад, пороутворюючі екзотоксини вироблені грампозитивними

бактеріями виявляються інфламасомою NALP3 (кріопірин), яка чутлива до витоку іонів  $K^+$ , що є результатом утворення пор [25]. Примітно, що цей механізм виявлення може бути ненавмисно активованим функціональними імітаторами, тому алергени які є протеазами, можуть запускати шлях, який зазвичай індукується гельмінтами [26]. Альтернативний спосіб визначення вірулентної активності є неспецифічним і опосередкованим та полягає в виявленні загиблих клітин та пошкоджених тканин. У цьому випадку власне індукторами запальної реакції є ендогенні продукти пошкодження клітин та тканин. Важливо, що запальна реакція викликана цими двома механізмами виявлення вірулентної активності буде різною, оскільки перший механізм специфічний та характерний для патогенів (та в деяких випадках для класів патогенів), а інший – ні.

Слід підкреслити, що мікробні індуктори запалення не обов'язково належать до патогенних. Коменсальні бактерії є джерелом індукторів запалення, які виявляються TLR [27]. Активація TLR-цими бактеріями активно пригнічується множинними механізмами. Прикладом цього є TLR-залежне запалення яке розвивається в мишей, у яких відсутній ген A20, – один із найважливіших негативних регуляторів сигналізації TLR [28].

### **1.1.1 Основні індуктори запалення**

Екзогенні індуктори запалення немікробного походження включають алергени, подразники, сторонні тіла та токсичні сполуки [1]. Певні алергени виявляються, оскільки вони імітують вірулентну активність паразитів, інші можуть подразнювати епітелій слизової оболонки. Запальна реакція, індукована обома типами багато в чому схожа через те, що захист від паразитів і подразників навколишнього середовища залежить від очищення епітелієм слизової оболонки. Сенсори алергенів здебільшого невідомі [15].

Сторонні тіла – це неперетравлені частинки, які занадто великі для фагоцитуювання, або викликають пошкодження фагосомної мембрани макрофагів. Частинки кремнію діоксиду та азбесту є прикладами сторонніх тіл, які викликають запальну реакцію. Їхній великий розмір і стійкість до видалення, а також відсутність власних маркерів (таких як CD47), які зазвичай присутні в аутологічних клітинах і перешкоджають їх фагоцитозу (залучаючи гальмівні рецептори), вказують на аномальне явище в тканинах. Розпізнавання сигнали «не Я», ймовірно запускає фагоцитоз у макрофагів, але великий розмір або форма сторонніх частинок призводить до порушення фагоцитозу, тобто утворюється фагоцитарна чашка, але не може закритися з утворенням фагосоми. Якщо стороннє тіло занадто велике для утворення фагоцитарної чашки, макрофаг замість неї утворює навколо цього тіла гранульому. Сенсор, який запускає цю реакцію в макрофагах невідомий. У деяких випадках макрофаги можуть зливатися один з одним утворюючи «гігантські клітини», які інкапсулюють чужорідне тіло. Інкапсуляція сторонніх об'єктів є давньою стратегією захисту, яка, наприклад, також зустрічається в *Drosophila melanogaster* (Дрозофіла чорночерева), у яких ламелоцити (макрофагоподібні клітини) інкапсулюють яйця паразитоїдної оси для захисту хазяїна [29]. Не дивлячись на те, чи є чужорідне занадто великим для фагоцитозу чи порушує фагосомну мембрану, коли макрофаг стикається з чужорідними тілами, активується інфламасома NALP3 (сенсор) [30].

Ендогенні індуктори запалення – це сигнали, що виробляються напруженими, пошкодженими або іншим чином неправильно функціонуючими тканинами. Ідентичність і характеристики цих сигналів недостатньо вивчені, але вони, ймовірно, належать до різних функціональних класів за природою і ступенем тканинних аномалій про які вони повідомляють.

Під час некротичної загибелі клітин, наприклад, порушується цілісність плазматичної мембрани, що призводить до вивільнення певних клітинних компонентів, включаючи АТФ, іони  $K^+$ , сечову кислоту, HMGB1 (high-mobility



group box 1 protein), і деяких представників кальцій зв'язуючих білків сімейства S100 (S100A8, S100A9 і S100A12) [31]. АТФ зв'язується з пуриновими рецепторами (включаючи P2X7) на поверхні макрофагів, спричиняючи витік іонів  $K^+$  для активації інфламасоми NALP3 [25]. АТФ також активує ноцицептори (які є сенсорними рецепторами), тим самим повідомляючи нервовій системі про пошкодження тканин [32]. HMGB1 і S100A12 залучають рецептор RAGE (розширений специфічний рецептор кінцевих продуктів глікації; також відомий як AGER), який (принаймні у випадку HMGB1) співпрацює з TLR, щоб індукувати запальну реакцію [33, 34]. А S100A8 і S100A9 сигналізують через TLR4 [35].

В інтактних тканинах епітеліальні клітини і мезенхімальні клітини в нормі відокремлені одні від одного базальною мембраною, і розрив цього бар'єру призводить до «незапланованої» епітеліально-мезенхімальної взаємодії. Ці взаємодії вказують на наявність пошкодження тканини і, отже, ініціюють реакції відновлення, але як ці аномальні взаємодії відчуються погано вивчено. Поверхня епітелію відокремлює внутрішні компартменти від зовнішнього середовища. В органах, таких як кишечник, які заселені коменсалом мікроорганізмів, порушення епітеліального бар'єру дає доступ цим мікроорганізмам до TLR на макрофагах, які знаходяться в густому шарі сполучної тканини lamina propria (власна пластинка), що призводить до TLR-опосередкованої індукції відновлення тканини в кишечнику [27, 36]. Ще одним прикладом такою взаємодії може слугувати фактор росту герегулін (також відомий як нейрегулін 1) який в нормальних умовах відокремлений від його рецепторів (ERBB2, ERBB3 і ERBB4) в епітелії дихальних шляхів. При пошкодженні епітелію герегулін отримує доступ до його рецепторів і ініціює реакцію відновлення тканин [37].

Нарешті, пошкодження ендотелію судин дозволяють білкам плазми та тромбоцитам отримати доступ до позасудинних просторів [17]. Ключовий плазматичний регулятор запалення, фактор Хагемана (також відомий як фактор згортання крові XII), активується при контакті з колагеном та іншими

компонентами позаклітинного матриксу (ЕСМ). Активований фактор Хагемана діє як датчик пошкодження судин і ініціює чотири протеолітичні каскади, які генерують медіатори запалення: калікреїн-кініновий каскад, каскад згортання крові, фібринолітичний каскад і каскад комплементу. Тромбоцити також активуються при контакті з колагеном і виробляють різні медіатори запалення, включаючи тромбокساني та серотонін [2].

Всі вищезгадані ендogenous індуктори відносяться до гострих запальних реакцій на пошкодження тканин. Ще один клас ендogenous індукторів більше стосується хронічних запальних станів. До цього класу індукторів відносяться кристали мононатрію урату і кальцію пірофосфату дигідрату, AGE (кінцеві продукти глікації) та окислені ліпопротеїни (такі як ліпопротеїни високої щільності та ліпопротеїни низької щільності). Утворення таких кристалів полегшене в деяких сполучних тканинах, які забезпечують відповідну поверхню для зародження кристалів [31]. Утворення кристалів мононатрію урату і кальцію пірофосфату дигідрату в суглобах і навколосуглобних тканинах, наприклад, відповідає запальні стани, відомі як подагра та псевдоподагра відповідно [31]. Коли ці кристали досягають певного розміру, вони виявляються макрофагами і лікуються по суті так само, як сторонні тіла. Фагоцитоз цих частинок запускає активацію інфламасоми NALP3 і згодом виробництво субстратів каспази-1, включаючи представників сімейства інтерлейкіну 1 (IL-1) [30, 38].

AGE є продуктами неферментативної глікації довгоіснуючих білків, таких як колаген [39]. Ці продукти можуть призвести до зшивання білків, до яких вони приєднані, що призводить до поступового погіршення функціонування цих білків. Крім того, AGE розпізнаються їх рецептором RAGE, який має запальну активність окремо [34] або в поєднанні з TLR [40]. AGE можуть накопичуватись під час гіперглікемії і при прооксидантних станах, включаючи діабет 1 і 2 типу і старіння [39]. АФО, що виробляються фагоцитами, також відіграють роль у

перетворенні ліпопротеїнів високої щільності та ліпопротеїнів низької щільності в запальні сигнали шляхом окислення їх ліпідних і білкових компонентів [41].

Іншу групу ендogenous індукторів запалення складають продукти розпаду позаклітинного матриксу, які утворюються під час порушення функціонування тканин або їх пошкодження. Найкраще вивченим компонентом позаклітинного матриксу у цьому контексті є глікозаміноглікан гіалуронат. У нормальних умовах гіалуронат представлений у вигляді інертного високомолекулярного полімеру. Пошкодження тканини призводить до його розпаду на низькомолекулярні фрагменти, які є запальними, активуючи TLR4 і сприяють активності по відновленні тканин [42]. Це перетворення також вважається залежним від АФО [43]. Таким чином, кілька ендogenous шляхів, які ініціюють запальну відповідь залежать від АФО.

На додачу до індукторів, пов'язаних з інфекцією та пошкодженням тканин, ймовірно, існує інший, наразі неідентифікований клас індукторів що викликають запальну реакцію в тканинах, які функціонують неправильно або перебувають у стані стресу. Ці сигнали повідомляють про гомеостатичний статус і індують адаптивні зміни, які включають деякі ознаки класичної запальної реакції [15].

### **1.1.2 Основні медіатори та ефектори запалення**

Індуктори запалення викликають утворення багатьох медіаторів запалення, які у свою чергу, змінюють функціональність багатьох тканин і органів – ефекторів запалення (тканин мішеней). Багато з цих медіаторів запалення мають вплив одночасно на кровоносну систему та на залучення лейкоцитів. Ці медіатори можуть бути отримані з білків плазми або виділятися клітинами [2, 3]. Клітинні медіатори можуть вироблятися спеціалізованими лейкоцитами (зокрема тканинні макрофаги та тучні клітини). Деякі медіатори (такі як гістамін та серотонін) утворюються заздалегідь та зберігаються в гранулах тучних клітин, базофілів і тромбоцитів. Інші

медіатори, що утворюються заздалегідь, циркулюють у плазмі як неактивні попередники. Інші медіатори виробляються безпосередньо у відповідь на відповідну стимуляцію індукторами запалення.

Медіатори запалення можна розділити на сім груп згідно їх біохімічних властивостей: вазоактивні аміни, вазоактивні пептиди, фрагменти компонентів комплементу, ліпідні медіатори, цитокіни, хемокіни та протеолітичні ферменти [2, 3].

Перша група – це вазоактивні аміни (гістамін та серотонін) виділяються коли тучні клітини та тромбоцити дегранулюються. Вони комплексно впливають на кровоносну систему, збільшуючи проникність та викликаючи розширення судин, або їх звуження в залежності від контексту. Негайні наслідки їх виділення тучними клітинами можуть бути дуже шкідливими для сенсibiliзованих організмів, що може призвести до судинного та респіраторного колапсу при анафілактичному шоці.

Друга група – це вазоактивні пептиди, що можуть зберігатись в активній формі в секреторних везикулах (наприклад речовина Р (substance P)), або генеруватись протеолітичним процесингом неактивних попередників у позаклітинній рідині (наприклад кініни, фібринопептид А, фібринопептид В і продукти розпаду фібрину). Речовина Р виділяється сенсорними нейронами і може викликати дегрануляцію тучних клітин. Інші вазоактивні пептиди, такі як тромбін та плазмін, утворюються через протеоліз фактором Хагемана, викликають розширення судин та підвищують їх проникність (безпосередньо, або шляхом індукції вивільнення гістаміну з тучних клітин). Як згадувалось раніше, фактор Хагемана відіграє ключову роль у координації цих реакцій і функціонує одночасно як сенсор пошкодження судин і як індуктор запалення. Фактор Хагемана активує калікреїн-кініновий каскад і головний продукт цього каскаду, брадикінін, впливає на кровоносну систему, а також стимулює больові відчуття. Відчуття болю відіграє

важливу фізіологічну роль у запаленні, попереджаючи організм про ненормальний стан чи пошкодження тканин.

Третя група – це фрагменти компонентів комплементу C3a, C4a і C5a (також відомі як анафілатоксини), які виробляються кількома шляхами після активації комплементу. C5a (і меншою мірою C3a і C4a) стимулюють рекрутинг гранулоцитів та моноцитів і, таким чином, індукують дегрануляцію тучних клітин впливаючи на кровоносну систему.

Четверта група – це ліпідні медіатори (ейкозаноїди та фактори активації тромбоцитів) отримуються з фосфоліпідів, таких як фосфатидилхолін, які присутні в клітинних мембранах. Після активації цитозольної фосфоліпази A2 внутрішньоклітинними іонами  $Ca^{2+}$ , вона генерує арахідонову кислоту та лізофосфатидну кислоту з фосфатидилхоліну. Арахідонова кислота метаболізується з утворенням ейкозаноїдів або циклооксигеназами (COX I і COX II) з утворенням простагландинів та тромбоксанів або ліпоксигеназами з утворенням лейкотрієнів та ліпоксинів. Простагландини PGE2 і PGI2, у свою чергу, викликають вазодилатацію, а PGE2 крім того викликає біль та лихоманку [44, 45]. Ліпоксини (і резолвіни та протектини, що одержуються з омега-3 ненасичених жирних кислот) пригнічують запалення та сприяють зникненню запалення та відновленню тканин [21]. Другий клас ліпідних медіаторів, фактори активації тромбоцитів, утворюються ацилюванням лізофосфатної кислоти і активують кілька процесів, що відбуваються під час запальної реакції, включаючи рекрутування лейкоцитів, вазодилатацію або вазоконстрикцію, підвищення проникності судин і активацію тромбоцитів [2, 3].

П'ята група – це запальні цитокіни (фактор некрозу пухлини- $\alpha$ , (TNF- $\alpha$ ), інтерлейкіни IL-1, IL-6 та багато інших) виробляються багатьма типами клітин, основна кількість макрофагами та тучними клітинами. У них є кілька ролей в запальній реакції, включаючи активацію ендотелію та лейкоцитів і індукцію гострофазної відповіді.

Шоста група – це хемокіни, що виробляються багатьма типами клітин у відповідь на індуктори запалення. Вони контролюють екстравазацію лейкоцитів і їх хемотаксис до уражених тканин.

Сьома група – це деякі протеолітичні ферменти (включаючи еластин, катепсин і матриксну металопротеїназу) відіграють важливу роль у багатьох процесах, включаючи захист господаря, ремоделювання тканин і міграцію лейкоцитів.

Слід зазначити, що незрозуміло, якою мірою природа подразника запального процесу визначає тип індукowanego медіатора. На додачу багато (але не всі) медіатори не тільки безпосередньо впливають на тканини-мішені, але також самі індують вироблення додаткових медіаторів.

Ефекторами запальної реакції є тканини і клітини на функціональні стани яких впливають індуктори запалення. Хоча найочевидніше, що дія медіаторів запалення полягає в індукції утворення ексудату (через їх вплив на судинну систему та на міграцію лейкоцитів), багато медіаторів запалення мають інші, не менш важливі, ефекти на нейроендокринні і метаболітичні функції та на підтримку тканинного гомеостазу в цілому [46]. Ці функції медіаторів запалення відображають більш загальну роль запалення в контролі тканинного гомеостазу і в адаптації до шкідливих умов.

## **1.2 Роль ліпоксигеназ в розвитку запалення**

Поліненасичені жирні кислоти та їх метаболіти відіграють важливу роль у нормальному клітинному рості та розвитку [47]. Арахідонова кислота та незамінні поліненасичені жирні кислоти, є основними попередниками ейкозаноїдів, які, крім своєї ролі в різних фізіологічних функціях, беруть участь у багатьох захворюваннях, включаючи атеросклероз, діабет і неврологічні розлади [48-50]. Фосфоліпази, зокрема фосфоліпаза А2, відіграють головну роль в вивільненні

арахідонової кислоти з клітинної мембрани у відповідь на активність цитокінів, факторів росту та гормонів [51, 52]. Арахідонова кислота метаболізується трьома групами ферментів, а саме: циклооксигеназами, ліпоксигеназами та монооксигеназами або епоксигеназами цитохрому P450, які утворюють простагландини, гідропероксиейкозатетраєнові кислоти та епоксиейкозатрієнові кислоти відповідно [52, 53].

Ліпоксигенази (LOX) – це діоксигенази, що не містять гемового заліза, та утворюють гетерогенний клас ферментів перекисного окислення ліпідів, які залучені не тільки в проліферації та диференціації, а й у патогенезі різних захворювань. Як і інші діоксигенази жирних кислот, ліпоксигенази окислюють поліненасичені жирні кислоти до відповідних гідропероксиформ, які далі трансформуються на біоактивні ліпідні медіатори (ейкозаноїди та спорідненні речовини). З іншого боку, ліпоксигенази є одними з основних елементів регуляції клітинного окисно-відновного гомеостазу, який є важливим елементом регуляції експресії генів [53].

Геном людини містить шість функціональних генів LOX (ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX12B, ALOXE3, ALOX5), які кодують шість різних LOX-ізоформ (Таблиця 1.1) [54].

Таблиця 1.1 – Людські LOX-ізоформи, їх субстрати і продукти та розподіл по тканинах [54]

LOX-ізоформи	Головний субстрат	Головний продукт	Розподіл в тканинах	Список літератури
ALOX5	Арахідонова кислота	5(S)-HPETE	Лейкоцити, тучні клітини, дендритні клітини та В-лімфоцити	[55]
ALOX12	Арахідонова кислота	12(S)-HPETE	Тромбоцити і лейкоцити	[56, 57]
ALOX15	Арахідонова кислота	15(S)-HPETE 12CS1-HPETE	Еозинофіли, ретикулоцити та епітеліальні клітини	[58-60]
	Лінолева кислота	13(S)-HPODE		

ALOX15B	Арахідонова кислота	15(S)-HPETE	Волосяні фолікули, епідерміс і простата	[61]
	Лінолева кислота	13(S)-HPODE		
ALOX12B	Арахідонова кислота	12(R)-HPETE	Епідерміс	[62]
	Лінолева кислота	9(R)-HPODE		
ALOXE3	Арахідонова кислота	12(R)-HPETE	Епідерміс	[63]
	Лінолева кислота	9(R)-HPODE		

Початково ізоформи LOX людини були класифіковані щодо їх специфічності до окиснення арахідонової кислоти, але на даний час класифікація ізоформ LOX будується на номенклатурі генів [53]. Наприклад ортологи 12/15-LOX від різних видів повинні називатись ALOX15 [64].

На даний час встановлений взаємозв'язок ліпоксигеназ, а особливо найкраще вивченого їх представника – ALOX15, з багатьма патологічними станами та хворобами. Саме тому зараз ліпоксигенази розглядаються як потенційні фармакологічні мішені нових лікарських засобів від багатьох захворювань та станів, маркери запалення і активно досліджуються.

Було показано, що у дітей та дорослих, хворих на астму, підвищений концентрація ALOX15 та їх метаболітів в конденсаті, що видихається [65], бронхоальвеолярній промивній рідині [66] та в індукованому мокротинні [67].

### **1.3 Біологічна активність та застосування в якості активних фармацевтичних інгредієнтів флавоноїдних сполук**

Флавоноїди – це група біологічно активних речовин поліфенольного характеру, які в рослинах містяться у вигляді глікозидів, або у чистому вигляді. Флавоноїди володіють широким спектром біологічної дії [4-7].



Повідомляється, що деякі флавоноїди проявляють протизапальну активність *in vitro* та *in vivo*, але механізм протизапальної активності флавоноїдів ще не достатньо вивчено. На даний час пропонується декілька механізмів їх протизапальної дії. Одним з них є інгібування ферментів, що утворюють ейкозаноїди, включаючи фосфоліпазу А<sub>2</sub>, циклооксигенази та ліпоксигенази, тим самим знижуючи концентрації простаноїдів та лейкотрієнів [68, 69]. Інші можливі механізмами включають інгібування вивільнення гістаміну [70], інгібування фосфодіестерази [71], протеїнкінази [72] та транскриптази [73].

Одним з найперспективніших флавоноїдів для дослідження є діосмін, який використовується як активний фармацевтичний інгредієнт (АФІ) в комбінації з геспередином (Детралекс<sup>®</sup>, Діофлан<sup>®</sup>, Венарус<sup>®</sup>, Нормовен<sup>®</sup>), або індивідуально (Флебодія 600 мг<sup>®</sup>, Вазокет 600<sup>®</sup>) у лікарських засобах, що мають венотонічну та ангіопротекторну дію, зменшують розтяжність вен та веностаз, покращують мікроциркуляцію, знижують проникність капілярів та підвищують їхню резистентність, а також поліпшують лімфатичний дренаж, збільшуючи лімфатичний відтік. Для діосміну добре досліджений метаболізм, фармакокінетичні показники та токсичність, що значно спрощує розробку фармацевтичних композицій та нових лікарських засобів (ЛЗ), на його основі. Теж саме, дещо в меншій мірі, характерно і для гесперидину, який, як правило, застосовують разом з діосміном у співвідношенні 5 до 95 % відповідно.

Крім того, в багатьох дослідженнях була продемонстрована потенційна протизапальна [8, 9] та антимуутагенна [74, 75] ефективність діосміну. Також досліджено можливе застосування ЛЗ на основі діосміну при артеріальній гіпертензії [76], атеросклерозі [77], ішемії [78], раку [79], діабеті [80] та при інших захворюваннях [81-83].

Після перорального прийому діосмін швидко гідролізується до його аглікону діосметину ферментами кишечника і у вигляді аглікону всмоктується через кишкову стінку і потрапляє в кровотік. В кровотоці знаходять як чистий діосметин

так і його метаболіти [84, 85]. Хоча є дослідження, в яких діосмін проникає через моношар клітин Caco-2, що може вказувати на хорошу біодоступність при травленні [86].

Діосмін демонструє протизапальну активність при дослідженнях *in vivo*. Наприклад Shalkami, A. S. et al. показали протизапальну активність діосміну на щурах, у яких викликали виразковий коліт введенням розчину оцтової кислоти. Введення щурам діосміну призвело до дозозалежного зниження індексу активності захворювання та індексу пошкодження товстої кишки. Крім того, введення діосміну призвело до значного зниження рівнів маркерів запального процесу (TNF- $\alpha$ , COX II, мієлопероксидази (MPO)) та MDA, підвищення рівня глутатіону (GSH), а також до зниження експресії каспази-3 в порівнянні з контрольною групою [87]. У іншому дослідженні на щурах коліт викликали введенням тринітробензолсульфонової кислоти. Отримані дані показали, що введення діосміну знизило пошкодження товстої кишки, знизило рівень MPO, MDA та підвищило рівень GSH. Крім того діосмін інгібував лейкотрієн B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) [8].

Anwer, M. K. et al. показали протизапальну ефективність діосміну при зовнішньому застосуванні у формі гелю з наноемульсією діосміну при набряку лапок щурів, викликаного введенням каррагінану. Гель з наноемульсією діосміну продемонстрував ефективність вищу ніж гель фузидової кислоти (відсоток інгібування набряку 50,69 % та 42,51 % відповідно) [88].

В іншому дослідженні діосмін захищав печінку щурів від ураження спричиненого введенням етанолу, зокрема через зниження рівнів TNF- $\alpha$ , iNOS, COX-2 та транскрипційного фактору NF- $\kappa$ B. [89]

Shaaban, H. H. et al. досліджували протиревматичні ефекти діосміну та тролоксу (водорозчинного аналогу вітаміну E) у щурів, в яких викликали артрит введенням повного ад'юванту Фрейнда. Дослідження показало, що протиаартритна терапія фармацевтичною композицією, яка містить діосмін та/або тролокс захищає від оксидативного стресу та запалення, одночасно покращуючи гістологію суглобу.

Найвищу ефективність показала комбінація діосміну та тролоксу. Протиартритні ефекти цих двох речовин можуть бути опосередковані пригніченням NF-κB, активацією білка Nrf2 та антиоксидантної захисної системи, крім того вони пригнічували експресію матриксних металопротеїназ (ММР) і прозапальних цитокінів [90].

Також діосмін продемонстрував протизапальні та протиапоптозні властивості на клітинній лінії PC12, в якій викликали смерть клітин обробкою ліпополісахаридами. Діосмін чинив цитопротекторну дію через інгібування експресії TNF-α. Також він зменшував кількість проапоптозного білка Bcl-2 (BAD), та збільшував кількість протиапоптозного білка Bcl-2 [91].

Таким чином, діосмін та гесперидин, як зареєстровані активні фармацевтичні інгредієнти (АФІ), можна розглядати в якості потенційних високоефективних протизапальних агентів при розробці нових фармацевтичних композицій.

#### **1.4 Фармакологічний потенціал флавоноїдвмісних екстрактів з рослинної сировини *Cichorium intybus***

*Cichorium intybus* L. відомий як цикорій звичайний або цикорій дикий є важливою лікарською рослиною в усій Євразії та деяких країнах Африки. Незважаючи на тривалі традиції його застосування, він не включений ні до Європейської фармакопеї, ні до жодної з фармакопей держав-членів ЄС, ні до Української фармакопеї. Однак він широко використовується в традиційній медицині.

Всі морфологічні частини цикорію (коріння, трава, квіти і листя) містять велику кількість різноманітних біологічно активних речовин.

У лікувальних цілях найчастіше використовують свіжу та висушену сировину [92]. Це одна з найважливіших лікарських рослин родини айстрових. Екстракти з *Cichorium intybus* L. продемонстрували широкий спектр біологічних і

фармакологічних властивостей а саме: антигіперурикемічні, протизапальні, протидіабетичні, протигельмінтні, антиоксидантні, антипроліферативні, гепатопротекторні, антибактеріальні, протипротозойні та інші [92-99].

Одними з найбільш перспективних є протизапальні властивості екстрактів та окремих виділених речовин з *Cichorium intybus L.*

Наприклад, Waseem Rizvi et al. виявили, що водний та етанольний екстракти кореня *Cichorium intybus L.* значно та дозозалежно знижують швидкість набрякання і величину набряку лапок щурів, викликаного введенням каррагінану, в порівнянні з контрольною групою, при чому етанольний екстракт виявився ефективнішим та майже досяг значень групи, якій вводили аспірин. Крім того, і спиртовий і водний екстракти дозозалежно знижували рівні цитокінів плазми крові (TNF, IL-6, IL-1) та кількість одного з маркерів перекисного окислення ліпідів – малонового диальдегіду (MDA), підвищували активність антиоксидантних ферментів глутатіонпероксидаз (GPx) та каталаз (CAT). У всіх випадках етанольний екстракт був ефективнішим [10].

Nancy J Olsen et al. продемонстрували ефективність екстракту з кореня цикорію при остеоартрозі у плацебо контрольованих клінічних дослідженнях [10].

Гіркий смак цикорію залежить від наявності сесквітерпенових лактонів, зокрема в коренях [101, 102]. Сесквітерпенові лактони були описані як активні компоненти, що входять до складу лікарських рослин. Було показано, що вони мають широкий спектр біологічних та фармакологічних властивостей, таких як протимікробні, протипухлинні та протизапальні властивості [103-106].

C. Cavin et al. досліджували протизапальні властивості екстрактів кореня *Cichorium intybus L.*, які отримано з екстрагентами різних полярностей: гексаном, етилацетатом та метанолом. За вимірюванням виділення простагландину PGE2 вони визначали TNF- $\alpha$  опосередковану індукцію циклооксигенази-2 (COX-2) різними екстрактами *Cichorium intybus L.* в клітинах карциноми товстої кишки людини HT29. Помітне пригнічення TNF- $\alpha$  індукovanого виробництва PGE2

спостерігали в клітинах оброблених етилацетатним екстрактом. Такого пригнічення не спостерігалось з гексановим та метанольним екстрактами, що свідчить про те, що сесквітерпенові лактони, які екстрагуються в етилацетатну фазу, є біоактивними компонентами. Ця гіпотеза була додатково оцінена за допомогою етилацетатного екстракту іншого сорту цикорію з вищим вмістом сесквітерпенових лактонів (особливо 8-дезоксилактуцину). Використання екстракту збагаченого сесквітерпеновими лактонами підтвердило потенціал кореня цикорію як інгібітора TNF- $\alpha$  індукованого виробництва PGE<sub>2</sub>. Більше того, ефект був значно сильніший ніж для етилацетатного екстракту кореню цикорію [107].

Щоб охарактеризувати протизапальні властивості екстракту кореня цикорію Christophe Ripoll et al. виділили з нього деякі сесквітерпенові лактони, використовуючи препаративну хроматографію, та досліджували протизапальні властивості екстракту і окремих сесквітерпенових лактонів на клітинній лінії RAW 264.7 (макрофаги мишачих моноцитів (ATCC TIB-71)), індукуючи макрофаги ліпополісахаридами. Було продемонстровано, що і екстракт коренів цикорію і окремі сесквітерпенові лактони індукують виділення оксиду азоту, найсильніше виділення оксиду азоту індукували дезоксилактуцин та дигідролактокопікрин. Також дигідролактокопікрин інгібує експресію прозапальних циклооксигенази-2, індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS), інтерлейкіну 1 бета (IL1 $\beta$ ) та фактору некрозу пухлин альфа (TNF- $\alpha$ ) [108].

### **1.5 Супозиторії, як оптимальна лікарська форма протизапального лікарського засобу на основі флавоноїдвмісних активних фармацевтичних інгредієнтів**

Обрання оптимальної лікарської форми для кожного нового ЛЗ є важливою задачею фармацевтичної розробки, в тому числі при розробці протизапальних ЛЗ. Вдалий підбір лікарської форми може суттєво підвищити ефективність та безпеку

ЛЗ, забезпечити успіх нового продукту на ринку. Однією з перспективних лікарських форм для протизапальних засобів є тверда форма – супозиторії.

Супозиторії – це тверді лікарські форми (іноді їх відносять до м'яких форм), призначені для введення в отвори тіла (анальний отвір, вагіну та уретру), де вони плавляться, пом'якшуються або розчиняються та діють місцево або системно.

Незважаючи на те, що продовжується тенденція відмови від ректального введення препаратів для звичайного введення ліків, уретральні та вагінальні супозиторії стають більш прийнятними в деяких регіонах. Наприклад, уретральні супозиторії використовуються для лікування чоловічої еректильної дисфункції (MUSE, алпростадил; Vivus Inc., Каліфорнія, США), а останнім часом прогестеронові вагінальні супозиторії стали більш популярними для замісної гормональної терапії (ЗГТ) для жінок у постменопаузі. Використання ЗГТ з «біоідентичними гормонами», які ідентичні гормонам, що виробляються організмом, а не синтетичними чи напівсинтетичними гормонами, стає все більш популярним у лікуванні симптомів постменопаузи (припливи, нічна пітливість, перепади настрою, тощо) [109].

Після введення основа супозиторія плавиться, розм'якшується або розчиняється, розподіляючи АФІ між тканинами навколо. АФІ можуть діяти місцево навколо місця введення, або можуть абсорбуватись для системної дії. Супозиторії призначені для місцевої дії зазвичай використовуються для полегшення дефекації або полегшення болю, подразнення, свербіж при геморої та інших аноректальних захворюваннях. До складу протигемороїдальних супозиторіїв часто входить ряд компонентів, в тому числі і місцеві анестетики, судинозвужувальні, в'яжучі, анальгетики, емоменти та інші. Популярні послаблюючі засоби, – гліцеринові супозиторії, сприяють послабленню шляхом місцевого подразнення слизової оболонки, ймовірно, через зневоднювальну дію гліцерину. Вагінальні супозиторії або вкладиші призначені для місцевої дії. Вони в основному використовуються як контрацептиви, антисептики в жіночій гігієні та як

специфічні агенти в боротьбі з патогенами. До препаратів, у вигляді вагінальних супозиторіїв, що найчастіше застосовуються місцево, відносяться наноксинол-9 для контрацепції, трихомонациди для боротьби з вагінітом, викликаним *Trichomonas vaginalis*, протигрибкові засоби для лікування *Candida (Monilia) albicans* і протиінфекційні засоби/антибіотики, спрямовані на інші мікроорганізми. Уретральні супозиторії місцевої дії можуть бути антибактеріальними, а також місцево анестезуючими, що застосовуються при огляді уретри [110].

При системній дії слизові оболонки прямої кишки та піхви здатні всмоктувати багато розчинних препаратів, хоча піхва рідко використовується для системної доставки ліків. Серед переваг ректального введення ліків для системної дії перед пероральною терапією можна відмітити наступне [110, 111]:

1) лікарські засоби, що руйнуються або інактивуються рН або ферментативною системою шлунку чи кишечника не потрібно піддавати руйнівним діям цих середовищ;

2) лікарські засоби, що подразнюють шлунок, можна вводити, не викликаючи такого подразнення;

3) лікарські засоби, що руйнуються або метаболізуються в ворітному кровотоці, можуть обходити печінку при ректальному всмоктуванні (уникнення ефекту першого проходження);

4) маршрут зручний для введення лікарських засобів хворим, які не можуть, або не хочуть ковтати ліки;

5) маршрут зручний для лікування хворих з блювотою;

6) можна вводити препарати, що викликають блювоту або нудоту.

Проте крім переваг, супозиторії мають і деякі недоліки [110, 111]:

1) деякі лікарські засоби можуть викликати подразнення слизової оболонки;

2) комплаєнс пацієнта (небажання пацієнта використовувати супозиторії);

3) використання супозиторіїв може викликати дефекацію і, як наслідок, виштовхування лікарського засобу або його частини;

4) після плавлення супозиторія він може частково витікати, через що пацієнт не отримує потрібну дозу;

5) абсорбція лікарського засобу залежить від стану слизової оболонки та наявності аноректальних захворювань;

6) умови зберігання (зазвичай в холодильнику);

7) складність технологічного процесу, а саме складність очищення обладнання від супозиторних мас, що потребує розробки та впровадження нових методик очистки [112-114].

Супозиторна основа відіграє важливу роль у вивільненні АФІ з супозиторія і, отже, в біодоступності препарату. Основною вимогою до супозиторних основ є те, що вони повинні залишатися твердими при кімнатній температурі, але розм'якшуватись, плавитись та розчинятись при температурі тіла так щоб препарат був повністю доступний незабаром після введення. Певні основи більш ефективні для доставки АФІ, ніж інші. Наприклад, масло какао (масло теоброми) швидко тоне при температурі тіла, але оскільки воно не змішується з рідинами організму, жиророзчинні АФІ, як правило, залишаються в маслі і мають незначну тенденцію потрапляти в фізіологічні рідини. А водорозчинні препарати, навпаки, – гарно вивільняються з какао-масла і всмоктуються. Жиророзчинні препарати, легше вивільняються з гліцеринових, желатинових та поліетиленгліколевих основ.

## **Висновки до розділу 1**

Таким чином, на основі аналізу науково-технічної та патентної інформації показано, що наразі гостро стоїть проблема розробки нових та безпечних лікарських засобів для боротьби з запаленням. Останнім часом все більше досліджень присвячені пошуку нових плейотропних ефектів відомих активних фармацевтичних інгредієнтів, оскільки вони вже описані та досліджені, для них відомі фармакокінетичні та фармакодинамічні показники та досліджена



токсичність. Багатообіцяючими АФІ, в даному відношенні є діосмін та гесперидин, оскільки вони широко використовується в медицині як венотоніки та ангіопротектори та внесені в європейську фармакопею (Ph. Eur. 1611). Діосмін і гесперидин в дослідженнях проявляють велику кількість фармакологічних активностей, серед яких є і протизапальна [8, 9].

Також дуже перспективним напрямком є пошук фармакологічних активностей рослинних екстрактів. Важливою перевагою терапевтичного застосування лікарських рослин та екстрактів з них є їх відносна безпека, ефективність, економічна доцільність і доступність [11]. Останнім часом глобальний попит на лікарські рослинні продукти зріс з 19,6 млрд доларів США в 1996 році до 24,2 млрд доларів США в 2002 році і за прогнозами досягне 5 трлн доларів США до 2050 року [12]. Крім того можна ціленаправлено підвищити фармакологічну активність екстракту шляхом підбору потрібного екстрагенту щоб виділяти з рослини більшу кількість бажаних речовин [13]. Іншим способом підвищення кількості фармакологічно активних речовин в екстракті є отримання культур «волохатих» коренів потрібних лікарських рослин, що можуть продукувати значно більше бажаних речовин. Для отримання трансгенної культури «волохатих» коренів, бажану рослину піддають впливу бактерій *Agrobacterium rhizogenes*. Отримана культура тканини швидко росте та легко піддається культивуванню на промисловій основі, крім того в отриманій культурі іноді значно підвищується продукція деяких речовин [14].

Існує багато хронічних запальних захворювань, що потребують постійного прийому нестероїдних протизапальних препаратів, що негативно впливає на стінки шлунку та може призвести до гастриту чи виразки [115]. Ускладнювати пероральний прийом НПЗП, особливо в літньому та старечому віці можуть дисфагія та гастроєзофагеальна рефлюксна хвороба [116, 117, 118]. Крім того, існують проблеми прихильності до фармакотерапії, небажання людини літнього чи старечого віку приймати таблетки чи капсули, особливо при деменції [119]. Тому

дуже важливо мати альтернативний шлях введення лікарського засобу, який допоможе вирішити проблеми при небажанні чи проблемах при ковтанні таблеток чи капсул, а також уникнути зайвого подразнення стінок шлунку. Для вирішення усіх вищеперерахованих проблем найкраще підходять супозиторії.

Інформація науково-технічних джерел щодо одночасного застосування в лікарському засобі фармакопейних флавоноїдів та екстрактів з біотехнологічної лікарської рослинної сировини є обмеженою та не систематизованою, що не дозволяє прогнозувати та керувати рівнем протизапальних властивостей кінцевого продукту. Відсутні також порівняльний аналіз та аргументація доцільності застосування флавоноїдів в якості АФІ ректальних супозиторіїв. Огляд літературних даних дає підстави вважати, що саме дослідження та комбінація фармакопейних флавоноїдів діосміну та гесперидину з одним із сухих екстрактів з «волохатих» коренів *Cichorium intybus* в лікарській формі супозиторіїв може дозволити створити високоефективну протизапальну фармацевтичну композицію та доступний лікарський засіб на її основі, в першу чергу, для однієї з найбільших груп населення Європи – людей літнього та старечого віку.

## РОЗДІЛ 2

### ОБ'ЄКТ, ПРЕДМЕТ ДОСЛІДЖЕННЯ, ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРІАЛІВ І МЕТОДІВ, ЗАСТОСОВАНИХ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

**Об'єкт дослідження** – процеси формування протизапальних властивостей фармацевтичної композиції у виробництві лікарського засобу на основі біотехнологічної рослинної сировини (“волохатих” коренів) *Cichorium intybus*.

**Предмет дослідження** – технології комплексного використання флавоноїдів та водно-етанольних екстрактів з біотехнологічної рослинної сировини у виробництві протизапальних геріатричних лікарських засобів.

#### 2.1 Матеріали та обладнання, використані при проведенні експериментальних досліджень

При проведенні експериментальних досліджень були використані матеріали та реактиви, зазначені в табл. 2.1.

Таблиця 2.1 – Реактиви та матеріали

№	Реактиви	Кваліфікація	Рег. CAS №
1	2	3	4
1	Галова кислота (Sigma-Aldrich, США)	ВЕРХ	149-91-7
2	Кавова кислота (Sigma-Aldrich, США)	ВЕРХ	331-39-5
3	4-гідроксибензойна кислота (Sigma-Aldrich, США)	ВЕРХ	99-96-7

Продовження таблиці 2.1

1	2	3	4
4	Епікатехін (Sigma-Aldrich, США)	ВЕРХ	490-46-0
5	Апігенін (Sigma-Aldrich, США)	ВЕРХ	520-36-5
6	Лютеолін (Sigma-Aldrich, США)	ВЕРХ	491-70-3
7	Рутин (Sigma-Aldrich, США)	ВЕРХ	153-18-4
8	Кверцетин (Sigma-Aldrich, США)	ВЕРХ	849061-97-8
9	Кемпферол (Sigma-Aldrich, США)	ВЕРХ	520-18-3
10	Метанол (Sigma-Aldrich, США)	ВЕРХ	67-56-1
11	Ацетонітрил (Sigma-Aldrich, США)	ВЕРХ	75-05-8
12	Соева 15-ліпоксигеназа (15-sLOX) (Sigma-Aldrich, Німеччина)	ВЕРХ	9029-60-1
13	1,1-дифеніл-2-пікрилгідрозил (DPPH) (Sigma-Aldrich, Німеччина)	ч	1707-75-1
14	Хлорид алюмінію 98% (Sigma-Aldrich, США)	чда	7446-70-0
15	Гексаціаноферат(III) калію (Sigma-Aldrich, США)	чда	13746-66-2
16	Мурашина кислота (Sigma-Aldrich, США)	чда	64-18-6
17	Трихлороцтова кислота (Sigma-Aldrich, США)	чда	76-03-9

## 2.2 Біотехнологічна рослинна сировина

У дослідженнях були використані клони культури «волохатих» коренів *Chicory intybus L. Palla Rossa* з колекції Лабораторії адаптаційної біотехнології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. «Волохаті»

корені були отримані трансформацією сім'ядолей цикорію диким штамом А4 *Agrobacterium rhizogenes*. Трансгенна природа культури «волохатих» коренів підтверджена ПЛР аналізом [120]. Культуру коренів субкультивували кожні чотири тижні протягом 12 років при 24 °С у двічі відновленому та затверділому поживному середовищі Мурасіге та Скуга (1/2 МС) [121] (Duchefa Biochemie, Нідерланди) з додаванням сахарози (рис. 2.1).



Рисунок 2.1 – Культура «волохатих» коренів *Chicory intybus* L. [133]

Контрольний аналіз ПЛР з праймерами, специфічними до гену *rol B*, проводили щорічно.

### 2.3 Процедура екстракції

Перед процедурою екстракції «волохаті» корені збирали, промивали дистильованою водою, ліофілізували та подрібнювали в порошок за допомогою вібраційного млину (Retsch MM400, Німеччина). 70 % розчин етанолу або деіонізовану воду додавали до порошкоподібної культури (8 г/240 мл) і екстрагували протягом трьох днів на ротаційному змішувачі (Clim-O-Shake система Kuhner IRC-1-U) при 28 °С. Отримані екстракти двічі фільтрували через фільтрувальний папір і сушили у роторному випарнику з отриманням сухого ліофілизованого екстракту.

### 2.4 Визначення загального вмісту флавоноїдів

Визначення загального вмісту флавоноїдів проводили методом абсорбційної спектрофотометрії з алюміній хлоридом, що базується на здатності іонів  $Al^{3+}$  утворювати комплекси з флавоноїдами [122]. 0,25 мл екстракту швидко змішували з 1 мл води та 0,075 мл 5% розчину  $NaNO_2$  та залишали реагувати на 5 хв при кімнатній температурі. Потім 0,075 мл 10% розчину  $AlCl_3$ . Після 5 хв інкубації до реакційної суміші додавали 0,5 мл розчину  $NaOH$  (1 М) і 0,6 мл води. Абсорбцію зразку вимірювали на спектрофотометрі SPECORD 200 (Analytik Jena, Німеччина), при 510 нм. Загальний вміст флавоноїдів виражений в рутиновому еквіваленті ( $C_{рутин}$ , мг (РЕ)/г) в сухому ліофілизованому екстракті розраховували за калібрувальним графіком:  $C_{рутин}=0,7384 \cdot A_{510}$  ( $R^2=0,9975$ ).

### 2.5 DPPH тест

Визначення антиоксидантної активності ґрунтувалось на здатності екстрактів поглинати радикал 1,1-дифеніл-2-пікрілгідразилу (DPPH) [123]. 1 мл розчину 1,1-

дифеніл-2-пікрилгідрозилу в етанолі (0,0001 М) додавали до 3 мл розчину екстракту різних концентрацій (5, 10, 15, 20, 25, 30 мкг/мл), отриману суміш енергійно струшували та залишали на 30 хв при кімнатній температурі. Абсорбцію зразку вимірювали на спектрофотометрі SPECORD 200 (Analytik Jena, Німеччина) при 515 нм. Результати подані як напівмаксимальна ефективна концентрація ( $EC_{50}$ ), що показує кількість сухого ліофілізованого екстракту, що необхідна для нейтралізації радикалу DPPH в реакційній суміші на 50%. Нижчі значення  $EC_{50}$  вказує на вищу антиоксидантну активність.

## 2.6 Визначення відновлювальної здатності

Здатність екстрактів культури «волохатих» коренів відновлювати іони  $Fe^{3+}$  до іонів  $Fe^{2+}$  визначали методом спектрофотометрії [124]. Екстракти з відновлювальною здатністю реагують з гексаціаноферратом(III) калію ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) з утворенням гексаціаноферрату (II) калію ( $K_4[Fe(CN)_6]$ ). Реакційна суміш містила 0,30 мл фосфатного буферу (рН 6,6), 0,30 мл 1% розчину  $K_3[Fe(CN)_6]$  та 0,02-0,10 мл екстракту. Кювети з реакційною сумішшю інкубували на водяній бані при 50 °С протягом 30 хв. Потім до реакційної суміші додавали 0,30 мл 10% розчину трихлороцтової кислоти, 1,25 мл деіонізованої води та 0,25 мл 0,1% розчину  $FeCl_3$ . Абсорбцію отриманих сумішей вимірювали на спектрофотометрі SPECORD 200 (Analytik Jena, Німеччина) при 700 нм. Для визначення ефективної концентрації, що відповідає кількості сухого ліофілізованого екстракту (мг) необхідної для отримання абсорбції 0,5 ( $EC_{0,5}$ ) використовували метод лінійної регресії. Як позитивний контроль використовували розчин аскорбінової кислоти (1 мг/мл).

## 2.7 Хроматографічний аналіз

Екстракти змішували з етанолом (96%) для відділення цукрів перед хроматографічним аналізом. Отриману суспензію зберігали при 20-25 °С протягом 2 діб для повного випадання цукру в осад. Супернатанти аналізували комбінацією хроматографічних методів.

*Рідинна хроматографія – мас-спектрометрія високої роздільної здатності (LC-HRMS).* Для скринінгового аналізу та ідентифікації багатокомпонентної композиції етанольного екстракту культури «волохатих» коренів система надвисокоєфективної рідинної хроматографії (UHPLC) (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific) була поєднана з квадрупольним часпролітним мас-спектрометричним детектором (Q-ToF) з високою роздільною здатністю (Bruker Impact II), обладнаний джерелом елетроспрей-іонізації (ESI). Негативні та позитивні параметри джерела ESI в іонному режимі раніше були оптимізовані аналізом потокового впорскування. Мас-спектрометр працював у негативному режимі ESI з джерелом Duo-Spray, а діапазон сканування мас був встановлено на  $m/z$  50–2500 для сканування Q-ToF MS із роздільною здатністю 2700  $m/z$ . Використовували наступні параметри: напруга іонного спрею 3500 В, температура джерела іонів, зіткнення газу при 25 psi, енергія зіткнення 10 еВ, потенціал декластеризації 100. Наявність поліфенольних сполук в екстрактах визначали на основі їхньої масової фрагментації, низької масової похибки в межах прийнятного діапазону  $\pm 5$  мДа та іонного відгуку. Хроматографічне розділення було виконано за допомогою термостатованої (40 °С) UHPLC Kinetex® F5 (50 мм× 2,1 мм, 1,7 мкм) Core-Shell колонки (Phenomenex).

Рухома фаза складалась з 0,1% мурашиної кислоти у воді (елюція А) і метанолу (елюція Б) з використанням градієнта елюції (0,1 мл/хв) 30% елюції Б (0–5 хв), від 30% до 50% елюції Б (5–20 хв), від 50% до 90% елюції В (20–40 хв) і від 90% до 100% елюції В (40–45 хв).



Мефрусид використовувався як внутрішній стандарт (IS) для LC-HRMS вимірювань. Збір та обробку даних проводили з використанням робочої станції Xcalibur 2.1.

*Високоєфективна рідинна хроматографія з діодно-матричним детектором (HPLC-DAD).* HPLC-DAD аналіз екстрактів проводили на Shimadzu LC-20 (Японія). Поліфенольні сполуки були кількісно визначені за допомогою режиму зовнішнього стандарту з калібрувальними графіками шести репрезентативних речовин цього класу.

Рухома фаза складалась з суміші ацетонітрилу (елюція А) і 1,0 % розчину мурашиної кислоти (елюція Б). Градієнт ВЕРХ був запрограмований наступним чином: 10% елюція А (0–15,0 хв); від 10 до 60% елюції А (15,0–50,0 хв) і повернення до вихідних умов протягом наступних 10 хв. Розділення було досягнуто за допомогою колонки Zorbax Eclipse Plus C18 (5 мкм, 4,6 × 250 мм). Інші хроматографічні умови були наступними: швидкість потоку 0,8 мл/хв, температура термостатованої колонки становила 40 °С. Абсорбцію елюату моніторили при 250 нм та 295 нм.

Вихідні розчини стандартів готували в метанолі. Робочі розчини, що містять суміш поліфенольних речовин, готували в 1,0 (об./об.) % мурашиної кислоти в метанол/вода (2/3 об./об.) і аналізували на трьох повторах.

Основна частина досліджень з рідинної хроматографії – мас-спектрометрії високої роздільної здатності та високоєфективної рідинної хроматографія з діодно-матричним детектором виконані співавторами дослідження в університеті м. Овієдо (Іспанія) Оленою Хайнаковою та в Інституті колоїдної хімії та хімії води ім. А.В. Думанського НАН України Наталією Кобилінською.

## 2.8 *In Vitro* вимірювання інгібування 15-sLOX

Інгібування 15-sLOX проводили за традиційною процедурою [125] з деякими модифікаціями.

### 2.8.1 Методика визначення активності 15-ліпоксигенази *in vitro*

Дослідження проводили з використанням спектрофотометричного методу, фіксуючи збільшення ступеня поглинання реакційної суміші з часом при довжині хвилі 235 нм. Така довжина хвилі відповідає максимальному поглинанню спряженого дієнового хромофора в молекулі гідропероксиду лінолевої кислоти (молярний коефіцієнт поглинання – 23 000 М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>).

Активність ферменту оцінювали за значенням стаціонарної швидкості реакції ( $V_{st}$ ), як середнє арифметичне трьох вимірювань з відхиленням не більше, ніж 5 %.

Будували графік залежності оптичної густини від часу. За графіком визначали стаціонарну ділянку (початкова лінійна ділянка кінетичної кривої), з якої отримували  $\Delta C$  (після переведення оптичної густини в концентрацію) як різницю концентрацій початку та завершення стаціонарної ділянки, та  $\Delta t$  як проміжок часу, протягом якого спостерігалась стаціонарна ділянка.

Отриману при спектрофотометричному вимірюванні оптичну густину переводили в концентрацію за співвідношенням, в якому 1М гідропероксиду відповідає 23000 опт. од., а значення концентрації (X) дорівнює значенню отриманої оптичної густини.

Отримані значення концентрації використовували в розрахунку стаціонарної швидкості ( $V_{st}$ ) в одиницях вимірювання мкМ/сек за формулою (2.1):

$$V_{st} = \frac{\Delta C}{\Delta t}, \quad (2.1)$$

де  $\Delta C$  – різниця концентрацій за значеннями стаціонарної ділянки, мкМ;  
 $\Delta t$  – інтервал часу стаціонарної ділянки, с.

Обробка експериментальних даних включала розрахунок стаціонарних швидкостей та кінетичних параметрів інгібування та проводилася згідно стандартних методик, оцінку кінетики досліджуваного процесу проводили в програмі для аналізу та візуалізації даних SigmaPlot 14.0.

#### *Матеріали та обладнання.*

У роботі використовували наступне обладнання та матеріали: двопроменевий УФ-спектрофотометр SPECORD 200 (Analytik Jena, Німеччина), облаштований термостатом; кювети з кварцового скла з товщиною оптичного шару 1 см; одноканальні автоматичні дозатори 50, 200, 1000 мкл; рН-метр рН-150МИ (Вимірювальна техніка, РФ); таймер; ультразвукову баню JP-008 (Skymen, Китай).

#### *Реактиви.*

Для проведення дослідження активності 15-LOX використовували такі реактиви: Lipoxygenase (Sigma-Aldrich (Merck), США, номер партії 314-771-5750) типу I-B з сої; кислота лінолева 99% (Sigma-Aldrich (Merck), США, номер партії U-59A); калію гідроксид (Укроргсинтез, Україна, номер партії R1626755); спирт етиловий 96% (Медлев, Україна, номер партії 491220); диметилсульфоксид (ДМСО) 99% (Sigma-Aldrich (Merck), США, номер партії SZBG341SH); натрій фосфорнокислий 2-заміщений 12-водний (Merck, Німеччина, номер партії LN0705335); натрій фосфорнокислий 1-заміщений 2-водний (Merck, Німеччина, номер партії KA956576450); вода очищена III класу; гесперидин (Chengdu Okay Pharmaceutical Co., LTD, Китай); діосмін (Chengdu Okay Pharmaceutical Co., LTD, Китай); 70% етанольний екстракт цикорію.

#### *Приготування робочих розчинів.*

Як субстрат використовували кислоту лінолеву. Розчин з концентрацією 2,5 мМ готували наступним чином: до 19,5 мкл 99%-ї лінолевої кислоти додавали

концентрований розчин КОН об'ємом 40 мкл, утворену сіль розчиняли додаванням 500 мкл спирту етилового 96%-го з наступним додаванням води очищеної III класу до отримання загального об'єму суміші 25 мл. Отриманий розчин обробляли ультразвуком протягом 3 хвилин для утворення міцелярної системи.

Розчин ферменту готували з концентрацією 0,65 мг/мл: 0,0065 г Lipoxygenase (15-LOX) розчиняли у воді очищеній III класу до отримання загального об'єму 10 мл.

Фосфатний буфер рН=7,6 готували наступним чином: 2,78 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  розчиняли в 100 мл води очищеної. 35,85 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  розчиняли в 500 мл води очищеної. Змішували 65 мл розчину  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  та 435 мл розчину  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . Приготовлений розчин доводили до 1 л водою очищеною.

### **2.8.2 Визначення активності 15-ліпоксигенази без інгібіторів**

Налаштовували спектрофотометр за параметрами: температура 25 °С, довжина хвилі – 235 нм; час – 75 секунд; інтервал – 5 секунд.

Як розчин порівняння використовували фосфатний буфер (рН=7,6). В дослідну кювету вносили суміш загальним об'ємом 2500 мкл, що складалась із фосфатного буферу (рН=7,6), розчину лінолевої кислоти з концентрацією 2,5 мМ, реакцію ініціювали додаванням розчину 15-LOX з концентрацією 0,65 мг/мл.

Вимірювали абсорбцію розчину проти розчину порівняння. Кожен вимір повторювали по три рази. Проводили сім вимірів при концентрації субстрату в реакційній суміші 10-150 мкМ, за даними, що наведені в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2 – Склад системи для визначення активності 15-ліпоксигенази

№	Буфер фосфатний (рН=7,6), мкл	Розчин субстрату, мкл	Розчин 15-ЛОХ, мкл
1	2480	10	10
2	2460	30	10
3	2440	50	10
4	2420	70	10
5	2390	100	10
6	2370	120	10
7	2340	150	10

### 2.8.3 Визначення активності 15-ліпоксигенази в присутності досліджуваних розчинів

Проводили налаштування УФ-спектрофотометру за параметрами: температура 25 °С, довжина хвилі – 235 нм; час – 75 секунд; інтервал – 5 секунд.

Як розчин порівняння використовували фосфатний буфер (рН=7,6). В дослідну кювету вносили суміш загальним об'ємом 2500 мкл, що складалась із фосфатного буферу (рН=7,6), 2,5 мМ лінолевої кислоти та досліджуваного розчину в концентраціях 25, 50 та 100 мкМ. Як досліджуванні розчини використовувались гесперидин, діосмін, 70%-етанольний екстракт з “волохатих” коренів *Cichorium intybus*, та суміш діосміну з 70%-етанольним екстрактом з цикорію у співвідношенні 9:1. Загальний вміст флавоноїдів в 70%-етанольному екстракті з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* становить 18,63% за рутином. Реакцію ініціювали додаванням розчину 15-ЛОХ з концентрацією 0,65 мг/мл.

Вимірювали абсорбцію розчину проти розчину порівняння. Кожен вимір повторювали по три рази. Проводили сім вимірів при концентрації субстрату в

реакційній суміші 10-150 мкМ для кожної концентрації досліджуваних розчинів, за даними, що наведені в таблиці 2.3.

Таблиця 2.3 – Склад системи для визначення активності 15-ліпоксигенази в присутності досліджуваного розчину

№	Буфер форфатний, (рН=7,6), мкл	2,5 мМ лінолевої кислоти, мкл	Досліджуваний розчин, мкл	0,65 мг/мл 15-ЛОХ, мкл
1	2460	10	20	10
2	2440	30	20	10
3	2420	50	20	10
4	2400	70	20	10
5	2370	100	20	10
6	2350	120	20	10
7	2320	150	20	10

#### **2.8.4 Експериментальне дослідження впливу активних фармацевтичних інгредієнтів лікарського засобу на активність 15-ліпоксигенази в реакції ферментативного окислення лінолевої кислоти**

В результаті проведених досліджень розраховано середні значення стаціонарної швидкості реакції окиснення за каталітичної дії 15-ЛОХ при відповідній концентрації лінолевої кислоти.

Графічну інтерпретацію даних будували в координатах  $V_{st} = f([S])$ . Крива має гіперболічну форму, характерну для кінетики, яка описується рівнянням Міхаеліса-Ментен (формула 2.2):

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m}, \quad (2.2)$$

де  $v$  – швидкість реакції;

$V_{max}$  – максимальна швидкість реакції;

$[S]$  – концентрація субстрату;

$K_m$  – константа Міхаеліса, значення якої відповідає концентрації субстрату, за якої швидкість реакції дорівнює половині від максимальної швидкості.

Для визначення найбільш прийнятної кінетичної моделі та відповідного типу інгібування проведено серію розрахунків в різних умовах з ранжируванням результатів за критерієм значення коефіцієнта кореляції  $R^2$ . Розрахунок кінетичних параметрів проводили відповідно до стандартних методик та кінетичних моделей у програмному пакеті SigmaPlot 14.0.

## 2.9 Дослідження *in silico* біологічної активності флавоноїдів

Прогноз біологічної активності основних флавоноїдів, ідентифікованих в екстракті «волохатих» коренів *Cichorium intybus*, проводили з використанням онлайн-сервісу Way2Drug (<http://www.way2drug.com/>) [126]. Дослідження проводили методом *in silico* з використанням віртуального скринінгу у службі Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS), яка базується алгоритмі загальної необмеженої залежності структура – активність (GUSAR). Дані, отримані під час віртуального скринінгу, оцінювали за ймовірністю присутності (Pa) і відсутності (Pi) активності зі значеннями від 0 до 1. Флавоноїди з  $P_a > 0,5$  і  $P_i < 0,03$  були обрані як потенційно біологічні активні речовини.

Дослідження проведені дисертантом в ННЛ молекулярної фармакології, хемогеноміки та біогеронтології КНУТД паралельно зі співаторами роботи Володимиром Дуплієм та Надією Матвеевою з Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

## 2.10 Дослідження хімічної сумісності та стабільності

Прискорені дослідження хімічної сумісності та стабільності засновані на стрес-тестуванні досліджуваних зразків за температури  $40 \pm 2$  °C та відносної вологості  $75 \pm 5\%$  упродовж 6 місяців у закритих флаконах. Аналіз здійснювали на основі даних отриманих до початку випробування та в точках контролю через 3 та 6 місяців.

Усі дослідження виконано за умов зберігання встановлених згідно Настанови 42-3.3:2004 «Лікарські засоби. Випробування стабільності» [127].

Випробування стабільності супозиторіїв ДЦ та бінарних сумішей проводили в кліматичній камері HPP 750 (Memmert GmbH+Co.KG, Німеччина), призначеній для зберігання лікарських засобів при заданих умовах (за температури  $40 \pm 2$  °C та відносної вологості  $75 \pm 5\%$  упродовж 6 місяців). Температура всередині кліматичної камери може регулюватися в діапазоні від 5 до 70 °C, а вологість від 10 до 90 %. Робота кліматичної камери регулюється в ручному режимі або автоматично, за допомогою програми AtmoCONTROL.

## 2.11 Інфрачервона спектроскопія з Фур'є перетворенням

Інфрачервону спектроскопію з Фур'є перетворенням використано для з'ясування фізичного стану та молекулярної структури АФІ, а також для виявлення потенційних молекулярних взаємодій та структурних змін, які можуть виникнути упродовж певного проміжку часу зберігання зразків [128, 129]. За допомогою методу інфрачервоної спектроскопії з Фур'є перетворенням було здійснено порівняльний аналіз FTIR-спектрів до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців розроблених супозиторіїв ДЦ та окремих їх складових, які були поєднані між собою у бінарні суміші у всіх можливих комбінаціях.



Реєстрацію інфрачервоних спектрів з Фур'є перетворенням (FTIR) здійснювали у таблетках калію броміду на FTIR-спектрометрі Perkin Elmer Spectrum 100.

На початку роботи проводили попередню підготовку KBr шляхом висушування його протягом 1 години при температурі близько 250 °C для того, щоб спектри досліджуваних зразків в областях 3450 і 1630  $\text{cm}^{-1}$  не мали широких смуг поглинання, які характерні для адсорбованої води. Висушений калію бромід зважували у кількості 150 мг та перетирали в яшмовій ступці, а тоді пресували у прес-формі. Отримана прозора таблетка KBr використовувалася у якості зразка порівняння.

Далі отримували інфрачервоні спектри досліджуваних речовин. Для цього зважували 1 мг досліджуваного зразку та 149 мг калію броміду, перетирали суміш у ступці та пресували таблетку.

Інфрачервоні спектри реєстрували в інтервалі частот 4 000 – 400  $\text{cm}^{-1}$  при 100 скануваннях з роздільною здатністю 2  $\text{cm}^{-1}$ . ІЧ-спектри фіксували як залежність пропускання ІЧ-випромінювання (%) від хвильового числа  $\nu = 1/\lambda$  ( $\text{cm}^{-1}$ ). Через це максимуми піків поглинання спрямовані донизу.

## 2.12 Визначення кількісного вмісту АФІ в готовому лікарському засобі

Концентрацію діосміну визначали спектрофотометрично на УФ-спектрофотометрі OPTIZEN POP (Mecasys, Південна Корея) при довжині хвилі  $\lambda=348$  нм за попередньо побудованим калібрувальним графіком залежності концентрації діосміну від оптичної густини розчину ( $R^2=0,9987$ ).

Кількісне визначення екстракту *Cichorium intybus* проводили спектрофотометрично із визначенням загального вмісту флавоноїдів. Вміст флавоноїдів визначали стандартним методом: для цього 1 мл деіонізованої води змішували з 250 мкл розчину екстракту і 75 мкл 5 %-го розчину  $\text{NaNO}_2$ . Через 5 хв

інкубації додавали 75 мкл 10 %-го розчину  $AlCl_3$ , потім 0,5 мл 1 М розчину NaOH і 0,6 мл деіонізованої води. Інтенсивність поглинання вимірювали на спектрофотометрі OPTIZEN POP UV (Mesasys, Південна Корея) за довжини хвилі 510 нм.

### **2.13 Статистичний аналіз даних**

Результати були виражені як середнє  $\pm$  стандартне відхилення, оцінене у трьох незалежних повторях. Дані були проаналізовані на статистичну значущість за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу ANOVA з пост-факторним тестом Tukey HSD. Достовірними вважали значення  $p < 0,05$ .

### **Висновки до розділу 2**

Визначено матеріали, обладнання та методики проведення експериментальних досліджень з дослідження фізико-хімічних, біохімічних характеристик та питомої біологічної активності гесперидину, діосміну, екстрактів з “волохатих” коренів *Cichorium intybus*. Для здійснення експериментальної частини роботи залучено реактиви та матеріали, які використовуються в провідних лабораторіях світу для проведення аналогічних досліджень.

В роботі застосовано сучасні фізико-хімічні методи досліджень для визначення властивостей компонентів фармацевтичної композиції та сумісності і стабільності бінарних сумішей її компонентів. Для скринінгового аналізу та ідентифікації багатокомпонентної композиції етанольного екстракту культури «волохатих» коренів використано систему надвисокоєфективної рідинної хроматографії (UHPLC) (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific), яка була поєднана з квадрупольним часпролітним мас-спектрометричним детектором (Q-ToF) з високою роздільною здатністю (Bruker Impact II), обладнаний джерелом

елетроспрей-іонізації (ESI). HPLC-DAD аналіз екстрактів проводили на хроматографі Shimadzu LC-20 (Японія). Для вивчення структури АФІ та можливих продуктів взаємодій у бінарних сумішах компонентів лікарського засобу використано інфрачервону спектроскопію з Фур'є перетворенням (FTIR), яку здійснювали у таблетках калію броміду на FTIR-спектрометрі Perkin Elmer Spectrum 100 (Perkin Elmer, США). УФ-спектроскопічні дослідження здійснювали на спектрофотометрах SPECORD 200 (Analytik Jena, Німеччина) та OPTIZEN POP UV (Mesasys, Південна Корея).

В дослідженні використано сучасні методи статистичного аналізу.

Зважаючи на вищевикладене, отримані результати дослідження можна вважати достовірними.

### РОЗДІЛ 3

## ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КАНДИДАТІВ У КОМПОНЕНТИ ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ

Розробка ефективного складу та технології фармацевтичної композиції та лікарського засобу на її основі з прогнозованим та керованим рівнем протизапальних властивостей повинна базуватися на експериментальних дослідженнях фізико-хімічних та фармакологічних властивостей потенційних АФІ. Перспективним, на наш погляд, є одночасне застосування у такому складі фармакопейних флавоноїдів та екстрактів з біотехнологічної лікарської рослинної сировини *Cichorium intybus*, результатам дослідження яких присвячено цей розділ.

### 3.1 Вплив природи екстракційного розчинника на вміст флавоноїдів та RedOx властивості екстрактів з “волохатих” коренів *Cichorium intybus*

Щоб визначити вплив процедури екстракції на вихід біоактивних сполук у «волохатих» коренях *Cichorium intybus*, використовували два екстракційні розчинники – воду та етанол (70%). Антиоксидантна здатність, загальний вміст флавоноїдів і відновна здатність отриманих екстрактів були оцінені за допомогою аналізів поглинання радикалів DPPH, хелатування металів та аналізів з відновлення заліза відповідно.

Було встановлено, що загальний вміст флавоноїдів у водному та етанольному екстрактах становив 121,3 мг (RE)/г та 60,3 мг (RE)/г, відповідно. Таким чином, умови екстрагування істотно впливають на загальну кількість біологічно активних сполук в отриманих екстрактах. Етанольний екстракт був більш багатим джерелом флавоноїдів, ніж водний. Отримані результати можна порівняти з даними загального вмісту флавоноїдів у листі цикорію червоного, вирощеного *in vivo* [130].

Автори дослідження повідомили про загальний вміст флавоноїдів в екстрактах в межах 48,75–92,95 мг (QE)/100 г залежно від умов екстракції. Denev та ін. вивчали вміст флавоноїдів у висушених екстрактах цикорію, який коливався від  $1,0 \pm 0,1$  до  $2,8 \pm 0,2$  мг QE/г [131]. Порівняння наших результатів з даними досліджень, наведених вище, показують, що «волохате» коріння дійсно є багатообіцяючим джерелом флавоноїдів.

Найвищий загальний вміст флавоноїдів, а також найвища антиоксидантна активність і відновна здатність були виявлені в етанольному екстракті порівняно з водним. Таким чином, антиоксидантна та відновна активність водного екстракту ( $EC_{50}=0,350\pm 0,015$  мкг/мл та  $EC_{0,5}=0,42\pm 0,04$  мг/мл) була нижчою в 2 і 4 рази, відповідно (вищі значення  $EC_{50}$  та  $EC_{0,5}$ ), ніж ті самі активності етанольного екстракту ( $EC_{50}=0,165\pm 0,010$  мкг/мл та  $EC_{0,5}=0,10\pm 0,01$  мг/мл). Ця висока активність спиртового екстракту з «волохатих» коренів цикорію представляє інтерес, оскільки раніше повідомлялося про екстракти з високою антиоксидантною активністю, як перспективні джерела для приготування ефективних лікарських засобів [132]. Виходячи з цих очікувань, ми протестували етанольний екстракт на протизапальну активність.

### **3.2 Скринінг поліфенольних сполук в етанольному екстракті з “волохатих” коренів *Cichorium intybus***

Ми використовували надвисокоєфективну рідинну хроматографію в поєднанні з мас-спектрометрією високої роздільної здатності для швидкого аналізу хімічних компонентів екстракту (щоб на наступному етапі виявити серед них активні компоненти). Цей метод виявляє цільові сполуки у режимі повного сканування та успішно відокремлює заважаючі матричні сполуки. Крім того, метод має нижчу межу виявлення навіть при скануванні в повному діапазоні мас у

порівнянні з UPLC-MS/MS і HPLC-MS. Основні органічні складові цього екстракту досліджували після відділення полісахаридів.

Хроматографічне розділення за допомогою LC-HRMS зазвичай призводить до фракціонування та візуалізації складної суміші сполук, присутніх в сирих екстрактах, і це те, що ми намагалися отримати. Перший крок цієї роботи, – ідентифікація основних поліфенольних сполук, був пов'язаний з вивченням налаштування стандартних аналітів або відповідних похідних для шаблонів фрагментації MS. Мефрузід було обрано як внутрішній стандарт. Вибір ґрунтувався на тому, що ця сполука може бути виявлена в режимах позитивної, негативної та подвійної іонізації, що дозволяє моніторинг роботи приладу LC-HRMS в обох полярностях. Типова хроматограма етанольного екстракту представлена на рис. 3.1.

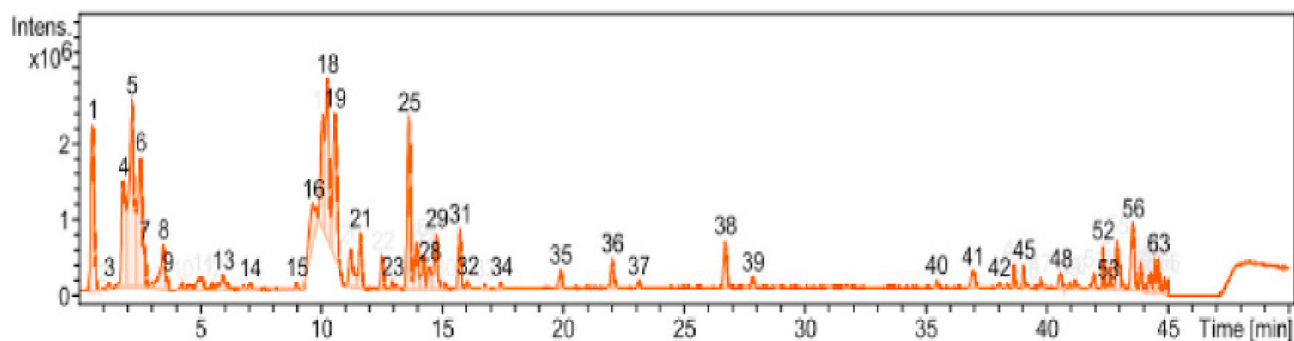


Рисунок 3.1 – Репрезентативна хроматограма етанольного екстракту з «волохатих» коренів *Cichorium intybus*, отримана у режимі негативних іонів. Номери піків відповідають маркуванню, прийнятому в таблиці 3.1 [133].

Віднесення органічних сполук до кожного класу на основі часу утримання стандартних сполук і даних HRMS проведено у відповідності до бази даних бібліотеки дослідницького центру, в порівнянні з літературними даними наведено нижче (табл. 3.1). У таблиці також перераховані ідентифіковані сполуки зі

значеннями  $m/z$  вихідного іона та дочірніми іонами, знайденими в спектрах МС. Хоча ідентифікація розташування в положеннях 6-О (6-С) і 8-О (8-С) фрагментів цукру у флавоноїдах часто є проблематичною, це було встановлено на основі відмінностей в інтенсивності іонів-продуктів у спектрах МС відповідно до результатів налаштування та бібліотеки. Дані MS етанольного екстракту показують накопичення флавоноїдів та фенолокислот у досліджуваному зразку (табл. 3.1).

*Фенольні кислоти.* Крім простих фенольних кислот (галової, кавової, хлорогенової, кафтарової), відповідні глікозильовані або складноефірні форми були також ідентифіковані. Сполуки 5 і 8 були ідентифіковані як кавова і хлорогенова кислоти відповідно за допомогою стандартів. 3-глікозид кофеїнової кислоти (16) і 3-глікозид хлорогенової кислоти (13) були ідентифіковані на основі порівняння даних про їх профіль, включно з порядком елюювання та МС-спектрами, як описано в літературі [134]. Сполука 2 з  $[M - H]^-$  при  $m/z$  137,0285 та фрагмент при  $m/z$  93,0255  $[M - H - COH]^-$ , утворений через втрату фрагмента COH, ідентифікували як гідроксибензойну кислоту. З'єднання 9, с  $[M - H]^-$  при  $m/z$  153,0182 та фрагменти при  $m/z$  83,0128  $[M - H - C_3H_2O_2]^-$  і 107,0138  $[M - H - COOH_2]^-$ , розпізнали як 2,5-дигідроксибензойну кислоту. Сполуку 39 з  $[M - H]$  при  $m/z$  473 було ідентифіковано як цикоринову кислоту (відому як гідроксикорична кислота). Цей компонент є похідним як кавової, так і винної кислот.

Таблиця 3.1 – Ідентифікація поліфенолів, фенольних кислот та їх похідних в етанольному екстракті з «волохатих» коренів *Cichorium intybus* [133].

Entry	Retention time, min	Proposed structure	Precursor ion [M – H] (m/z)	Detectable mass
1	0.68	Gallic acid [C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> ]	169.0142	125.0125; 153.0125; 108.01332
2	1.12	Hydroxybenzoic acid [C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ]	137.0285	93.0255; 65.1249
3	1.33	Baicalein [C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ]	269.0254	269.2357; 113.1956
4	2.04	Epicatechin [C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	271.0603	245.0811; 205.0812; 179.0346
5	2.51	Caffeic acid [C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O]	179.1574	135.1523; 107.1423; 79.1286
6	2.95	Apigenin [C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ]	315.1124	284.1125; 117.0124; 151.0127
8	3.54	Chlorogenic Acid [C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O <sub>9</sub> ]	353.3112	191.0124; 179.0114; 135.0235
9	3.65	2,5-dihydroxybenzoic acid [C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> ]	153.0182	107.0138; 83.0128
13	5.98	Chlorogenic acid-glycosides	341.0024	180.0125; 134.0235
14	6.98	<i>trans</i> -Caftaric acid [C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub> ]	311.2457	179.0025; 149.0120; 135.1255
15	9.01	3'-O-methyl-epicatechin-7-O-glucuronide [C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub> ]	479.0235	149.0256; 171.0235
16	9.56	Caffeic acid 3-glucoside [C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>9</sub> ]	515.2501	353.1423; 191.1452; 179.0423
18	10.05	Apigenin-7-O-glucoside [C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> ]	431.0424	269.0128; 268.0113; 117.0188
19	10.85	Quercetin-7-O-glucoside [C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> ]	463.0124	303.1001; 302.0117; 255.0447
20	11.34	Baicalein-7-O-glucuronide [C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub> ]	446.0233	445.1220; 269.0235; 113.0112
21	11.64	Luteolin [C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> ]	315.0332	257.0112; 133.0012
23	12.54	Petunidin-3-O-(6-O-malonyl)-glucoside [C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> O <sub>14</sub> ]	563.1235	317.0777;
25	13.63	Apigenin-7-O-apiosyl-glucoside (Apiin) [C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub> ]	563.2548	444.2536;
29	14.86	Quercetin 3-O-galactoside (Hyperoside) [C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> ]	463.4224	299.4257;
31	15.86	Kaempferol [C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> ]	285.2415	255.2536; 151.1235; 133.2458
34	17.34	Esculetin [C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> ]	177.1400	133.1233
35	19.61	Kaempferol-7-O-glucuronide [C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub> ]	461.0288	286.1201; 287.1008
36	22.01	Quercetin [C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> ]	301.0499	178.0127; 151.0159; 121.0253
37	23.04	6-O-Methyl-baicalin-7-O-β-glucopyranuronoside	459.1125	283.1278; 268.0153
38	26.56	Kaempferol-3-O-glucoside [C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> ]	447.0057	285.0024; 257.0036; 151.005
39	27.76	Chicoric acid [C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub> ]	473.0012	311.0021
41	36.98	Quercetin 3-O-glucoside (isoquercetin) [C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> ]	463.0125	301.0045; 155.0145
42	37.99	Kaempferol-7-O-(6-O-malonyl)-glucoside [C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub> ]	533.0023	449.0010; 287.0100; 286.0038
45	39.12	Quercetin-3-O-rhamnosylglucoside (rutin) [C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> ]	609.0078	463.0018; 301.0126; 274.0147
48	40.54	Kaempferol-3-O-glucosyl-7-O-(6-O-malonyl)-glucoside [C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub> ]	679.0128	535.0065; 449.0100; 287.0030
52	42.34	Luteolin-6-C-glucoside-8-C-arabinoside [C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> ]	609.0157	449.0109; 564.0164
56	43.64	Quercetin-3-O-diglucoside-7-O-glucoside	787.0249	609.1488; 462.0281; 301.0277
63	44.86	Kaempferol-3-O-glucosyl-7-O-(6-O-malonyl)-glucoside (robinin) [C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub> ]	739.0127	593.0258; 430.0268; 285.0357

*Флавоноїди.* Вільні флавоноїди, в основному кон'юговані з глікозидом/глюкуронідом, виявлені в екстракті з «волохатих» коренів цикорія. Сполуки 4, 6, 21, 31, 36 і 45 були ідентифіковані як епікатехін, апігенін, лютеолін, кемпферол, кверцетин і рутин порівняно зі стандартами. 3'-О-метил(-)-епікатехін-



7-О-глюкуронід (15), апігенін-7-О-апіозил-глюкозид (25), ізокверцетин (41), кемпферол-7-О-(6-О-малоніл)-глюкозид (42), лютеолін-6-С-глюкозид-8-С-арабінозид (52) визначали порівнюючи дані відповідного профілю з бібліотекою MS та даними літератури [134, 135].

Глікозильовані похідні флавоноїдів були легко розпізнані за інтенсивним піком у спектрах MS/MS з типовою нейтральною втратою глікозильної частини. Сполука 23, з  $[M - H]^-$  при  $m/z$  563,1235 і фрагменти при  $m/z$  317,0777 було запропоновано визначити як петунідин-3-О-(6-О-малоніл)-глюкозид. Крім того, масові піки було виявлено в спектрах, що відповідають розщепленню цукрового кільця, а також розщепленню малонілової групи (тобто фрагментаційні переходи для петунідин-3-О-(6-О-малоніл)-глюкозиду, кемпферол-7-О-(6-О-малоніл)-глюкозиду, кемпферол-3-О-глюкозил-7-О-(6-О-малоніл)-глюко сайт тощо). Сполуки, зазначені в записах 3, 20 і 37, були ідентифіковані як байкалеїн, байкалеїн з відповідною О-глюкуронідиловою частиною та його метилфлавоноїдне похідне (метилбайкалеїн). Сполука 25 з  $[M - H]^-$  при  $m/z$  563,2548 і фрагмент при  $m/z$  444.2536  $[M-H-C_4H_7O_4]^-$  був анований як апігенін-7-О-апіозил-глюкозид. Сполука 26 з аналогічним часом утримування і  $[M - H]^-$  було запропоновано вважати його ізомером. Сполуку 56 було ідентифіковано як лютеолін 6-С-глюкозид 8-С-арабінозид на основі фрагмента  $m/z$  609,1488.

*Розподіл біоактивних речовин в спиртовому екстракті з «волохатих» коренів.* Таким чином, всього 33 сполуки, включаючи 9 фенольних кислот і 24 флавоноїди, що належать до різних фенольних підкласів, були ідентифіковані або попередньо ідентифіковані, як обговорювалося раніше [136]. Апігенін, кверцетин, кемпферол, лютеолін та їх кон'югати (глікозиди, галактозиди, глюкуроніди та ін.) були основними флавонами в цьому екстракті. Флавоноїди та флавони були переважно у формі О-глікозиду, що легко гідролізується, з високою біодоступністю [135].

Як правило, фітохімічні речовини, такі як поліфеноли та флавоноїди, виділені з різних частин рослин, використовуються як антиоксиданти, протимікробні, противиразкові, протидіабетичні, протипухлинні, антигіперліпідемічні, протидіабетичні та гепатопротекторні кандидати [137]. Рутин [138], кверцетин [139], лютеолін [140], апігенін [141] мають антиоксидантні властивості, а також демонструють антиоксидантну та протизапальну дію [142]. Таким чином, комбінація флавоноїдів і фенольних кислот, що містяться в екстракті з «волохатих» коренів цикорію, є потенційно біоактивною.

### **3.3 Кількісне визначення поліфенольних сполук в етанольному екстракті з “волохатих” коренів *Cichorium intybus***

Кількісний аналіз окремих біологічно активних сполук дав більше інформації про майбутнє можливе застосування отриманих екстрактів з «волохатих» коренів *Cichorium intybus*. DAD та UV залишаються золотим стандартом режимів виявлення для рутинного визначення поліфенолів, навіть якщо в деяких випадках можна використовувати більш селективний детектор [137]. Для визначення концентрації використовували аналіз HPLC-DAD окремих компонентів екстрактів, включаючи флавоноїди як основні компоненти цих екстрактів. Метрологічні параметри застосованого аналізу HPLC-DAD наведено в таблиці 3.2. Дослідження параметрів валідації методу підтвердили застосованість кількісного аналізу виявлених поліфенольних сполук. Таким чином, основні фенольні та поліфенольні компоненти з екстрактів з «волохатих» коренів *Cichorium intybus* були кількісно визначені шляхом порівняння хроматограми екстракту з хроматограмою стандартів у водно-метаноловому розчині (табл. 3.2).

Двадцять шість основних компонентів, включаючи флавоноїди та фенольні кислоти були кількісно визначені в екстрактах. Були представлені фенольні кислоти: галовою, гідроксибензойною, 2,5-дигідроксибензойною, хлорогеновою,

кавовою кислотами та їх глікозидами в цьому списку. Концентрації лютеоліну, кемпферолу, кверцетину, апігеніну і епікатехіну, а також їх кон'югатів також були виявлені як в етанольному, так і в водному екстрактах.

Таблиця 3.2 – Кількісне визначення основних компонентів в екстрактах з «волохатих» коренів *Cichorium intybus* методом HPLC-DAD [133]

№	Compounds	Standard*	Concentration (mg/g)	
			Ethanollic extract	Aqueous extract
1	Gallic acid	<i>Gallic acid</i>	6.103 ± 0.008	1.165 ± 0.019
2	Hydroxybenzoic acid	<i>Hydroxybenzoic acid</i>	0.042 ± 0.010	0.011 ± 0.011
3	Epicatechin	<i>Epicatechin</i>	3.090 ± 0.047	0.052 ± 0.012
4	Caffeic acid	<i>Caffeic acid</i>	7.001 ± 0.068	1.013 ± 0.007
5	Apigenin	<i>Apigenin</i>	3.960 ± 0.059	0.051 ± 0.014
6	Chlorogenic acid	<i>Chlorogenic acid</i>	1.804 ± 0.038	0.032 ± 0.011
7	2,5-dihydroxybenzoic acid	<i>Hydroxybenzoic acid</i>	0.406 ± 0.052	0.122 ± 0.059
8	Chlorogenic acid glycosides	<i>Chlorogenic Acid</i>	1.514 ± 0.069	0.064 ± 0.063
9	3'-O-methyl-epicatechin-7-O-glucuronide	<i>Epicatechin</i>	0.410 ± 0.058	0.145 ± 0.054
10	Caffeic acid 3-glucoside	<i>Caffeic acid</i>	2.911 ± 0.076	1.052 ± 0.055
11	Apigenin-7-O-glucoside	<i>Apigenin</i>	5.109 ± 0.064	0.310 ± 0.057
12	Quercetin-7-O-glucoside	<i>Quercetin</i>	6.710 ± 0.052	0.401 ± 0.011
13	Luteolin	<i>Luteolin</i>	4.320 ± 0.085	0.31 ± 0.049
14	Apigenin-7-O-apiosyl-glucoside	<i>Apigenin</i>	6.401 ± 0.066	0.81 ± 0.025
15	Quercetin 3-O-galactoside	<i>Quercetin</i>	5.011 ± 0.045	0.607 ± 0.016
16	Kaempferol	<i>Kaempferol</i>	4.401 ± 0.048	1.531 ± 0.044
17	Kaempferol-7-O-glucuronide	<i>Kaempferol</i>	1.303 ± 0.072	0.474 ± 0.005
18	Quercetin	<i>Quercetin</i>	4.307 ± 0.016	0.068 ± 0.004
19	Kaempferol-3-O-glucoside	<i>Kaempferol</i>	4.030 ± 0.005	0.434 ± 0.006
20	Quercetin 3-O-glucoside (isoquercetrin)	<i>Quercetin</i>	1.707 ± 0.004	0.206 ± 0.005
21	Kaempferol-7-O-(6-O-malonyl)-glucoside	<i>Kaempferol</i>	0.201 ± 0.003	0.035 ± 0.005
22	Quercetin-3-O-glucoside (rutin)	<i>Rutin</i>	1.203 ± 0.005	0.031 ± 0.004
23	Kaempferol-3-O-glucosyl-7-O-(6-O-malonyl)-glucoside	<i>Kaempferol</i>	1.308 ± 0.004	0.482 ± 0.008
24	Luteolin-6-C-glucoside-8-C-arabinoside	<i>Luteolin</i>	1.703 ± 0.008	0.515 ± 0.007
25	Quercetin-3-O-diglucoside-7-O-glucoside	<i>Quercetin</i>	1.012 ± 0.005	0.025 ± 0.005
26	Kaempferol-3-O-glucosyl-7-O-(6-O-malonyl)-glucoside	<i>Kaempferol</i>	4.375 ± 0.006	0.454 ± 0.004

Результати показують, що вміст поліфенолів був значно вищим в етанольному екстракті, ніж у водному, і залежав залежав від властивостей екстрагованих сполук [143]. Наприклад, вміст кавової кислоти в етанольному екстракті становив  $7,001 \pm 0,068$  мг/г порівняно з  $1,013 \pm 0,007$  мг/г у водному. Концентрація рутину, лютеоліну та апігеніну становила в 38,8, 13,9 і 77,6 разів вище в етанольному, ніж у водному екстракті. Варто підкреслити, що відмінності в концентрації в етанольному та водному екстрактах були характерними для всіх ідентифікованих сполук.

Галова та кавова кислоти були найпоширенішими фенольними сполуками (7,61% та 8,74% відповідно) в етанольному екстракті з “волохатих” коренів *Cichorium intybus*, який досліджено в цій роботі (табл. 3.2). У низькій концентрації виявлено гідроксибензойну кислоту у етанольному екстракті ( $0,042 \pm 0,010$  мг/г). Кофеїнова кислота виявлена в екстракті переважно у вільній формі. Його зміст був порівняним з те саме у моркві (0,09 мг/г), салаті (1,57 мг/г), картоплі (2,80 мг/г) [144], листках цикорію червоного ( $11 \pm 1$  мг/100г) [145]. Ця сполука є однією з основних гідроксикоричних кислот і є відомим антиоксидантом, який підвищує імунітет, контролює рівень ліпідів у крові та має протиракові властивості [146].

Вміст рутину в спиртовому екстракті ( $1,203 \pm 0,005$  мг/г) з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* був вищим, ніж у листях таких рослин, як гречка звичайна (0,12 мг/г), меліса (0,30 мг/г), селера (0,046 мг/г), капуста (0,0001 мг/г), листя цикорію червоного ( $5,4 \pm 0,5$  мг/100 г) [145] та батату (0,0012 мг/г) [147]. Отже, можна розглядати «волохаті» корені *Cichorium intybus* як цінне і перспективне джерело рутину.

Кверцетин присутній в екстрактах не тільки у вільній формі, а й у вигляді глюкозиду (табл. 3.2). В етанольному екстракті з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* виявлено високу концентрацію кверцетину –  $4,307 \pm 0,016$  мг/г. Кверцетин продемонстрував антигістамінну, протипухлинну та протизапальну дії, які в основному слідують за його антиоксидантними властивостями [148].

Слід зазначити, що досі не проводилися дослідження кількісного вмісту флавоноїдів і фенолокіслот у екстрактах з “волохатих” коренів *Cichorium intybus*. Крім того, дані про такий вміст у рослинах цикорію, вирощених у ґрунті, досить обмежені. Отримані дані представляють значний інтерес та демонструють широкий спектр фенольних сполук у «волохатих» коренях *Cichorium intybus*. Оскільки етанольний екстракт містив досить високу концентрацію фенольних кислот і флавоноїдів, його використовували в подальших експериментах для вивчення протизапальної активності.

### 3.4 Дослідження *in silico* фармакологічних властивостей основних флавоноїдів, які містяться в етанольному екстракті з “волохатих” коренів *Cichorium intybus*

Прогноз біологічної активності основних флавоноїдів, ідентифікованих в екстракті з «волохатих» коренів *Cichorium intybus*, проводили з використанням онлайн-сервісу Way2Drug, як описано в розділі 2.9.

Дані цього аналізу демонструють можливу високу активність сполук  $P_a$  як акцепторів вільних радикалів (0,711–0,991), антиоксидантів (0,732–0,936), антимуtagenів (0,435–0,94), антиканцерогенів (0,641–0,988), протизапальну (0,548–0,767), протипухлинну (0,67–0,849) та хіміопрофілактичну активності (0,593–0,976) усіх флавоноїдів, що знаходяться у найвищих концентраціях в екстракті з «волохатих» коренів *Cichorium intybus* (табл. 3.3).

Таблиця 3.3 – Потенційна біологічна активність основних флавоноїдів, які містяться в етанольному екстракті з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* [133]

Activity	Apigenin		(–)-Epicatechin		Kaempferol		Luteolin		Quercetin		Rutin	
	$P_a$	$P_i$	$P_a$	$P_i$	$P_a$	$P_i$	$P_a$	$P_i$	$P_a$	$P_i$	$P_a$	$P_i$
LogBB	–0.472		–0.682		–0.472		–0.364		–0.52		–0.392	
Free radical scavenger	0.711	0.004	0.842	0.002	0.771	0.003	0.749	0.003	0.811	0.003	0.991	0.001
Antioxidant	0.732	0.004	0.81	0.003	0.856	0.003	0.775	0.004	0.872	0.003	0.936	0.002
Reductant	0.521	0.021	0.799	0.004	0.452	0.035	0.546	0.017	0.475	0.030	0.363	0.062
Antiviral (Herpes)	0.440	0.021	0.447	0.019	0.436	0.022	0.438	0.021	0.435	0.022	0.544	0.006
Antiviral (Influenza)	0.214	0.176	0.343	0.067	0.219	0.017	0.212	0.179	0.216	0.174	0.653	0.009
Antibacterial	0.388	0.033	0.32	0.053	0.389	0.033	0.386	0.034	0.387	0.033	0.648	0.006
Antifungal	0.518	0.026	0.552	0.023	0.486	0.033	0.513	0.028	0.481	0.034	0.786	0.006
Radioprotector	0.383	0.050	0.335	0.070	0.320	0.076	0.392	0.047	0.33	0.072	0.799	0.005
Antidote	0.312	0.029	0.287	0.038	0.303	0.108	0.326	0.024	0.317	0.027	0.716	0.003
Antimutagenic	0.921	0.002	0.571	0.011	0.919	0.002	0.940	0.001	0.940	0.001	0.435	0.019
Anticarcinogenic	0.641	0.011	0.795	0.005	0.715	0.008	0.690	0.009	0.757	0.007	0.988	0.001
Antineoplastic	0.774	0.015	0.675	0.030	0.791	0.013	0.783	0.014	0.797	0.012	0.849	0.007
Chemopreventive	0.593	0.010	0.788	0.004	0.669	0.008	0.648	0.008	0.712	0.006	0.976	0.001
Proliferative diseases treatment	0.541	0.015	0.681	0.007	0.588	0.011	0.566	0.013	0.614	0.010	0.959	0.001
Hepatoprotectant	0.612	0.011	0.679	0.008	0.589	0.013	0.644	0.009	0.623	0.011	0.980	0.001
Apoptosis agonist	0.847	0.005	0.649	0.021	0.881	0.005	0.860	0.005	0.887	0.005	0.722	0.013
Antihemorrhagic	0.521	0.003	0.537	0.003	0.480	0.003	0.598	0.003	0.601	0.003	0.888	0.001
Anti-inflammatory	0.644	0.024	0.548	0.044	0.676	0.019	0.661	0.021	0.689	0.017	0.767	0.009
Non-steroidal anti-inflammatory agent	0.311	0.040	–	–	0.375	0.025	0.319	0.037	0.385	0.023	0.674	0.005
Hepatic disorders treatment	0.509	0.011	0.495	0.012	0.391	0.016	0.515	0.011	0.407	0.021	0.734	0.004
Cardioprotectant	0.669	0.004	0.421	0.021	0.795	0.004	0.717	0.004	0.833	0.003	0.975	0.001
Hemostatic	0.622	0.004	0.334	0.019	0.701	0.003	0.665	0.003	0.771	0.003	0.982	0.001
Membrane integrity agonist	0.868	0.019	0.772	0.042	0.911	0.009	0.863	0.021	0.902	0.011	0.978	0.002
Membrane permeability inhibitor	0.924	0.003	0.739	0.924	0.924	0.003	0.935	0.003	0.938	0.003	0.984	0.001

Компоненти екстракту також є агоністами цілісності мембран (0,772–0,978) та інгібіторами проникності мембран (0,566–0,984).

Рутин був ідентифікований як найбільш біологічно активна сполука, яка має протигрипозний (0,653), протигрибковий (0,786) і кардіопротекторний ефект (0,975). Результати цього аналізу свідчать про можливу високу біоактивність екстракту з широким спектром дії.

### **3.5 Дослідження протизапальної активності флавоноїдів та етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* як потенційних активних фармацевтичних інгредієнтів фармацевтичної композиції**

#### **3.5.1 Дослідження запальних властивостей гесперидину**

Результати дослідження впливу гесперидину у концентраціях 0, 25, 50 та 100 мкМ на стаціонарну швидкість реакції ліпоксигеназного каталізу графічно представлено на рис 3.2.

В результаті дослідження вперше встановлено, що гесперидин проявляє запальні властивості (активує 15-LOX), значення коефіцієнту кореляції при цьому становить  $R^2 = 0,96616$ .

Зміни швидкості перетворення субстрату 15-ліпоксигеназою в залежності від початкової концентрації субстрату та концентрації гесперидину в зворотних координатах рівняння Лайнуівера-Берка представлено на рис. 3.3.

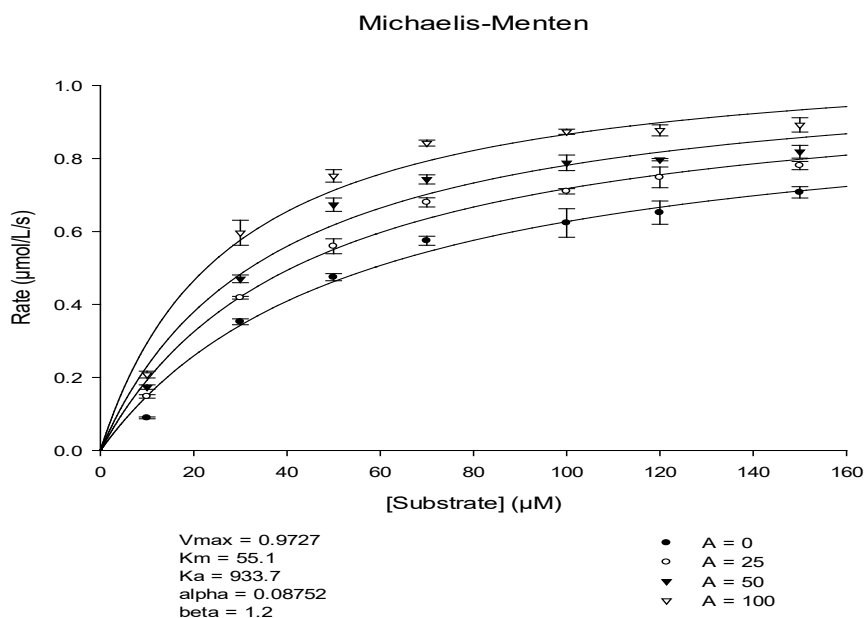


Рисунок 3.2 – Стаціонарні швидкості перетворення субстрату 15-ліпоксигеназою в залежності від концентрацій субстрату та в присутності гесперидину в концентраціях 0, 25, 50 і 100 мкМ

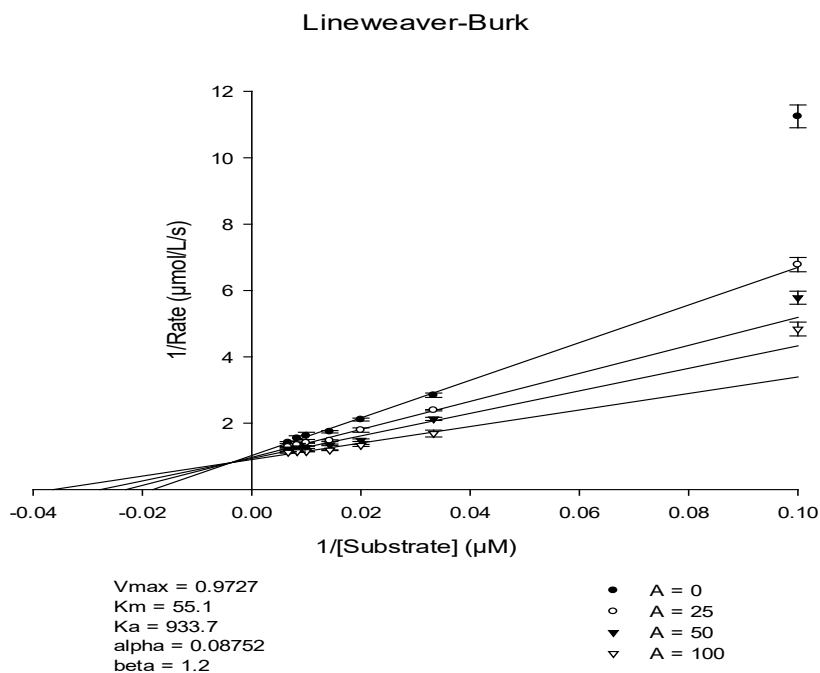


Рисунок 3.3 – Лінеаризація в координатах Лайнуівера-Берка ( $1/V_{st}=f([S])$ ) залежності швидкості реакції перетворення субстрату 15-ліпоксигеназою від концентрації лінолевої кислоти та гесперидину (A) в концентраціях 0, 25, 50, 100 мкМ

Обраховані за обраною моделлю кінетичні константи для гесперидину мають такі значення:

$$K_a = 933,67 \pm 98,44 \text{ мкМ};$$

$$K_m = 55,14 \pm 6,62 \text{ мкМ};$$

$$V_{\max} = 0,97 \pm 0,04 \text{ мкМ/сек.}$$

### 3.5.2 Дослідження протизапальних властивостей діосміну

При дослідженні діосміну найпридатнішою за критерієм значення коефіцієнту кореляції ( $R^2 = 0,97106$ ) є модель Mixed (Partial), тобто змішаного (часткового) типу інгібування.

Рівняння розрахунку швидкості ферментативного каталізу в умовах змішаного інгібування можна описати наступним чином (формула 3.1):

$$V = V_{\max} \cdot \left( \left( 1 + \frac{\beta[i]}{\alpha \cdot K_i} \right) / \left( 1 + \frac{[i]}{\alpha \cdot K_i} \right) / \left( 1 + \frac{K_m}{[S]} \cdot \left( \left( 1 + \frac{[i]}{K_i} \right) / \left( 1 + \frac{[i]}{\alpha \cdot K_i} \right) \right) \right) \right), \quad (3.1)$$

де  $K_m$  – константа Міхаеліса;

$K_i$  – константа інгібування.

Змішане (часткове) інгібування зустрічається в тому випадку, коли інгібітор зв'язується як у активному центрі ферменту, так і зовні, а фермент-субстратний комплекс зберігає часткову активність у порівнянні з нативним ферментом.

Результати дослідження впливу діосміну у концентраціях 25, 50 та 100 мкМ на стаціонарну швидкість реакції ліпоксигеназного каталізу графічно представлено на рис 3.4.



## Michaelis-Menten

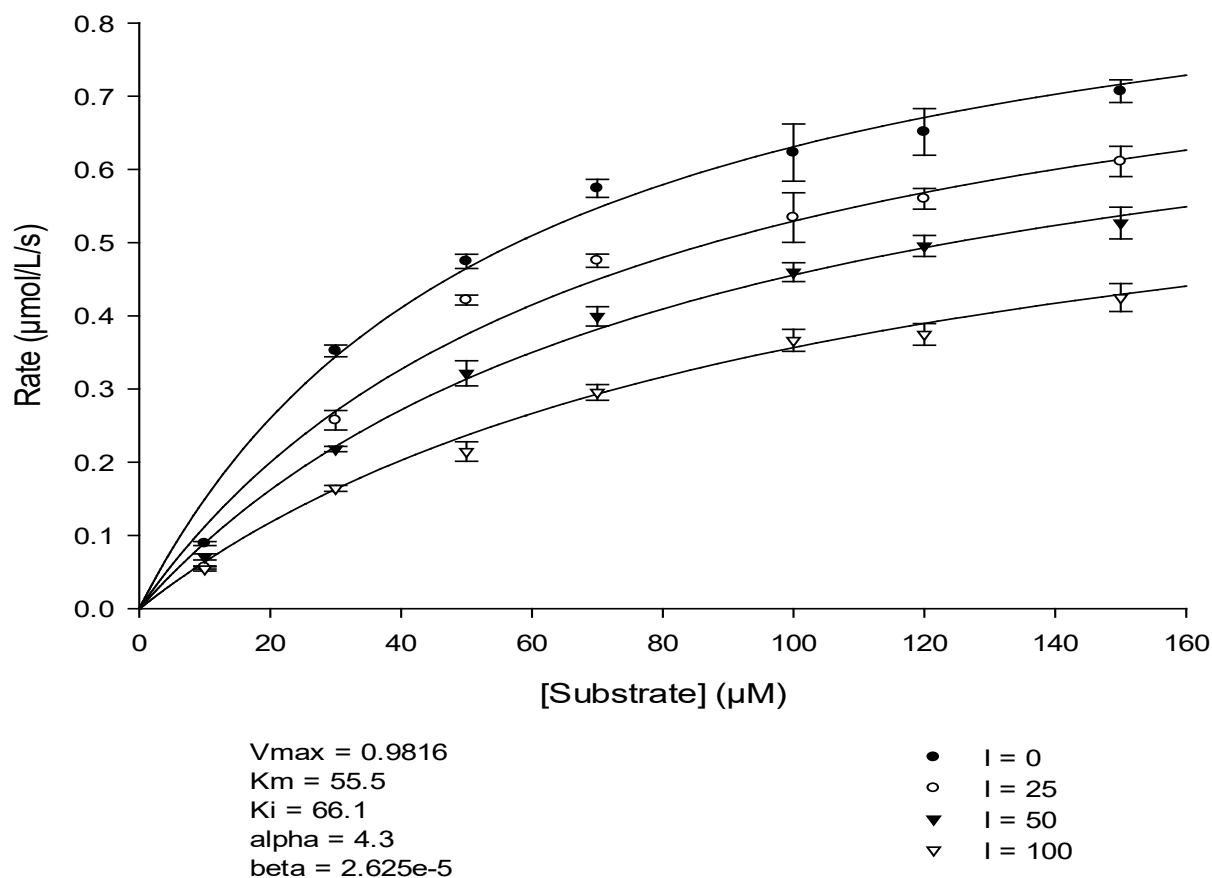


Рисунок 3.4 – Стаціонарні швидкості перетворення субстрату 15-ліпоксигеназою в залежності від концентрацій субстрату без інгібітору (0) та в присутності діосміну в концентраціях 25, 50 і 100 мкМ

Результати експерименту свідчать про те, що діосмін, як інгібітор 15-ліпоксигенази, зменшує максимальну швидкість ферментативної реакції та збільшує константу Міхаеліса, що повністю відповідає ефекту змішаного інгібування. Наявність цих ефектів показана на графіку зміни швидкості перетворення субстрату 15-ліпоксигеназою в залежності від початкової концентрації субстрату та концентрації інгібітора в зворотних координатах рівняння Лайнуївера-Берка (рис. 3.5).

## Lineweaver-Burk

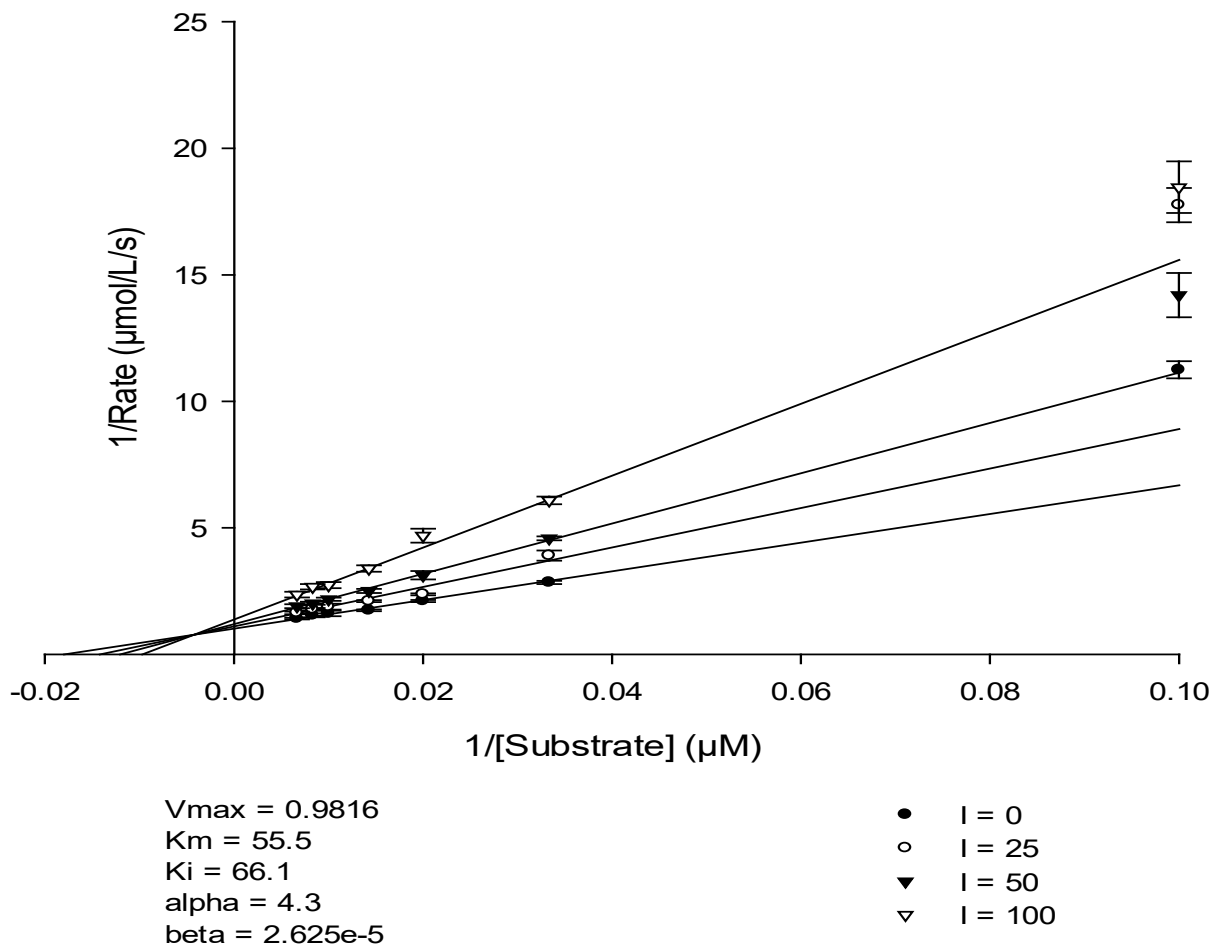


Рисунок 3.5 – Лінеаризація в координатах Лайнуівера-Берка ( $1/V_{st}=f([S])$ ) залежності швидкості реакції ліпоксигеназного каталізу від концентрації лінолевої кислоти та діосміну в концентраціях 0, 25, 50 і 100 мкМ

Обраховані за обраною моделлю кінетичні константи для діосміну мають такі значення:

$$K_i = 66,14 \pm 18,34 \text{ мкМ};$$

$$K_m = 55,54 \pm 5,86 \text{ мкМ};$$

$$V_{max} = 0,98 \pm 0,04 \text{ мкМ/сек.}$$

Для кількісного визначення інгібувальної здатності діосміну по відношенню до 15-ліпоксигенази була розрахована концентрація напівмаксимального

інгібування ( $IC_{50}$ ), виходячи з отриманих результатів, за рівнянням Ченга-Прусова (формула 1.2).

$$IC_{50} = K_i + \frac{K_i \cdot [S]}{K_m}, \quad (1.2)$$

де  $K_i$  – константа інгібування;

$K_m$  – константа Міхаеліса;

$[S]$  – максимальна концентрація субстрату в реакції.

Дане рівняння виражає концентрацію ліганда-інгібітора, яка необхідна для інгібування каталітичної активності ферменту на 50% відносно його нативного стану.

За розрахунками концентрація напівмаксимального інгібування діосміном 15-ліпоксигенази в даних умовах відповідає такому значенню:

$$IC_{50} = 244,75 \pm 19,91 \text{ мкМ.}$$

Проведені дослідження свідчать, що діосмін є інгібітором 15-ліпоксигенази середньої активності за змішаним (частковим) механізмом інгібування.

### **3.5.3 Дослідження протизапальних властивостей 70% етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus***

При дослідженні впливу 70% етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* на активність 15-ліпоксигенази, встановлено, що найпридатнішою за критерієм значення коефіцієнту кореляції ( $R^2 = 0,96079$ ) є модель Mixed (Partial), тобто змішаного (часткового) типу інгібування.

Результати дослідження впливу 70% етанольного екстракту цикорію у концентраціях 25, 50 та 100 мкМ за рутином на стаціонарну швидкість реакції ліпоксигеназного каталізу графічно представлено на рис. 3.6.

## Michaelis-Menten

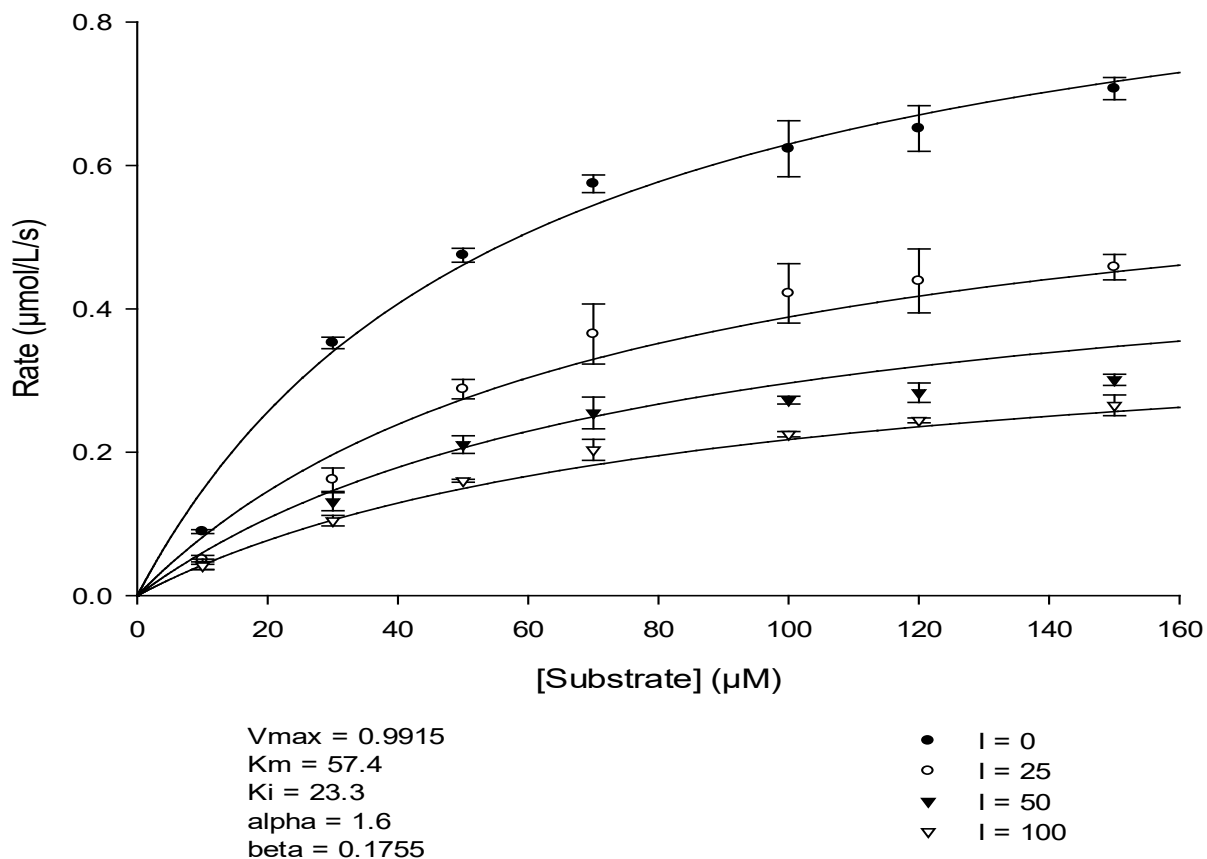
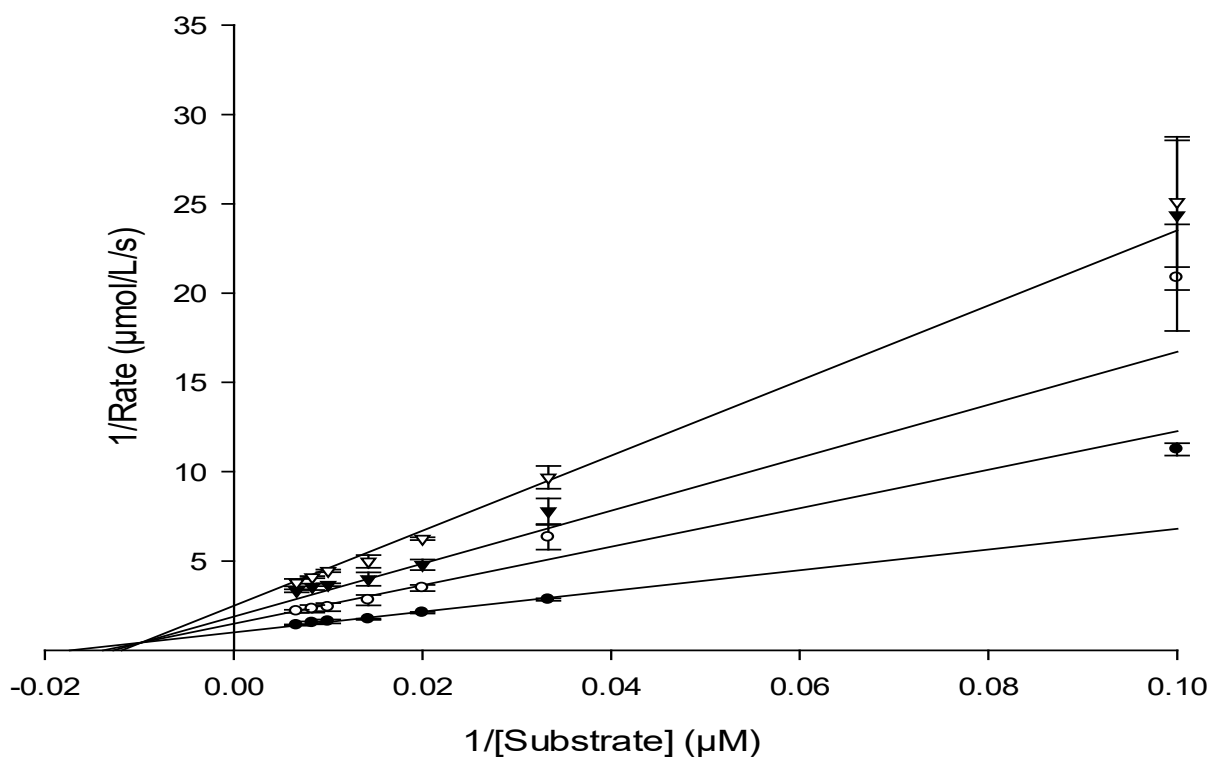


Рисунок 3.6 – Стаціонарні швидкості перетворення субстрату 15-ліпоксигеназою в залежності від концентрацій субстрату без інгібітору (0) та в присутності 70% етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* в концентраціях 25, 50 та 100 мкМ за рутином.

Результати досліджень свідчать про те, що 70%-етанольний екстракт з “волохатих” коренів *Cichorium intybus*, як інгібітор 15-ліпоксигенази, зменшує максимальну швидкість ферментативної реакції та збільшує константу Міхаеліса, що повністю відповідає ефекту змішаного інгібування. Наявність цих ефектів показана на графіку зміни швидкості перетворення субстрату 15-ліпоксигеназою в залежності від початкової концентрації субстрату та концентрації інгібітора в зворотних координатах рівняння Лайнуївера-Берка (рис. 3.7).

## Lineweaver-Burk



$V_{max} = 0.9915$   
 $K_m = 57.4$   
 $K_i = 23.3$   
 $\alpha = 1.6$   
 $\beta = 0.1755$

● I = 0  
 ○ I = 25  
 ▼ I = 50  
 ▽ I = 100

Рисунок 3.7 – Лінеаризація в координатах Лайнуівера-Берка залежності швидкості реакції ліпоксигеназного каталізу від концентрації лінолевої кислоти та в присутності 70% етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* в концентраціях 0, 25, 50 і 100 мкМ за рутином

Обраховані за обраною моделю кінетичні константи для 70% етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* мають такі значення:

$$K_i = 23,29 \pm 5,42 \text{ мкМ};$$

$$K_m = 57,44 \pm 7,52 \text{ мкМ};$$

$$V_{max} = 0,99 \pm 0,05 \text{ мкМ/сек.}$$

$$IC_{50} = 84,13 \pm 7,22 \text{ мкМ.}$$

### 3.5.4 Дослідження протизапальних властивостей суміші активних фармацевтичних інгредієнтів діосміну, гесперидину та екстракту цикорію

На наступному етапі досліджень було визначено вплив на 15-ліпоксигеназу суміші діосміну, гесперидину та 70% етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* у співвідношенні 9:1:2.

За критерієм значення коефіцієнту кореляції ( $R^2=0,98106$ ) найпридатнішою для даної суміші є модель Mixed (Partial), тобто змішаного (частково) типу інгібування. Результати дослідження впливу суміші діосміну, гесперидину та екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* у концентраціях 25, 50 та 100 мкМ за рутином на стаціонарну швидкість реакції ліпоксигеназного каталізу графічно представлено на рис. 3.8.

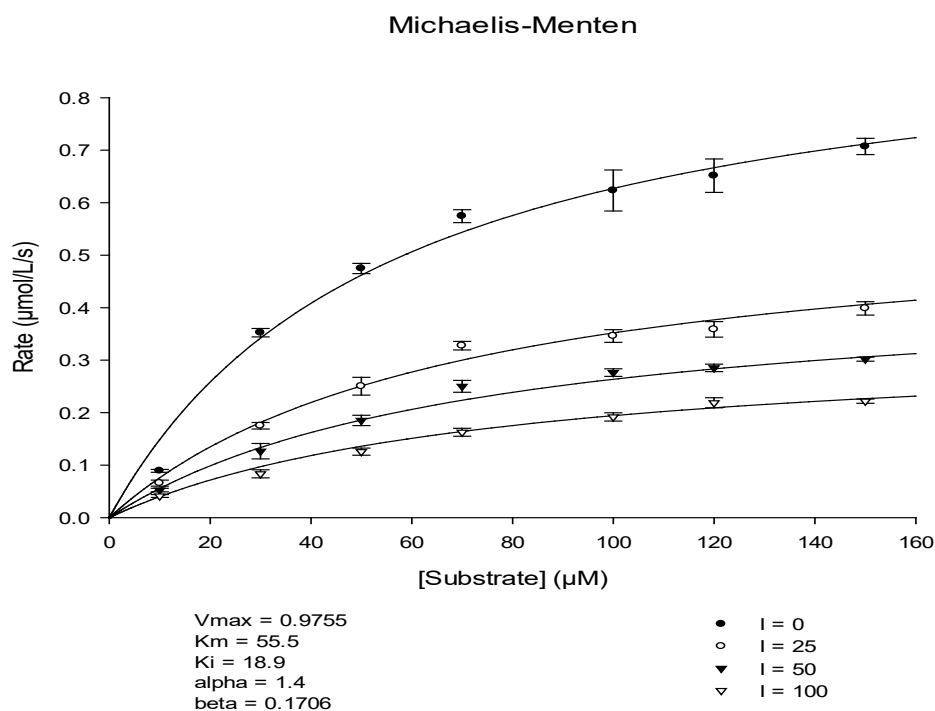


Рисунок 3.8 – Залежність швидкості реакції перетворення субстрату 15-ліпоксигеназою від концентрацій субстрату без інгібітору (0) та в присутності суміші діосміну, гесперидину та 70% етанольного екстракту цикорію (9:1:2) в концентраціях 25 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ за рутином.

Ефект змішаного інгібування наочно демонструє графік залежності швидкості перетворення субстрату 15-ліпоксигеназою від початкової концентрації субстрату та концентрації інгібітора в зворотних координатах рівняння Лайнуївера-Берка (рис. 3.9).

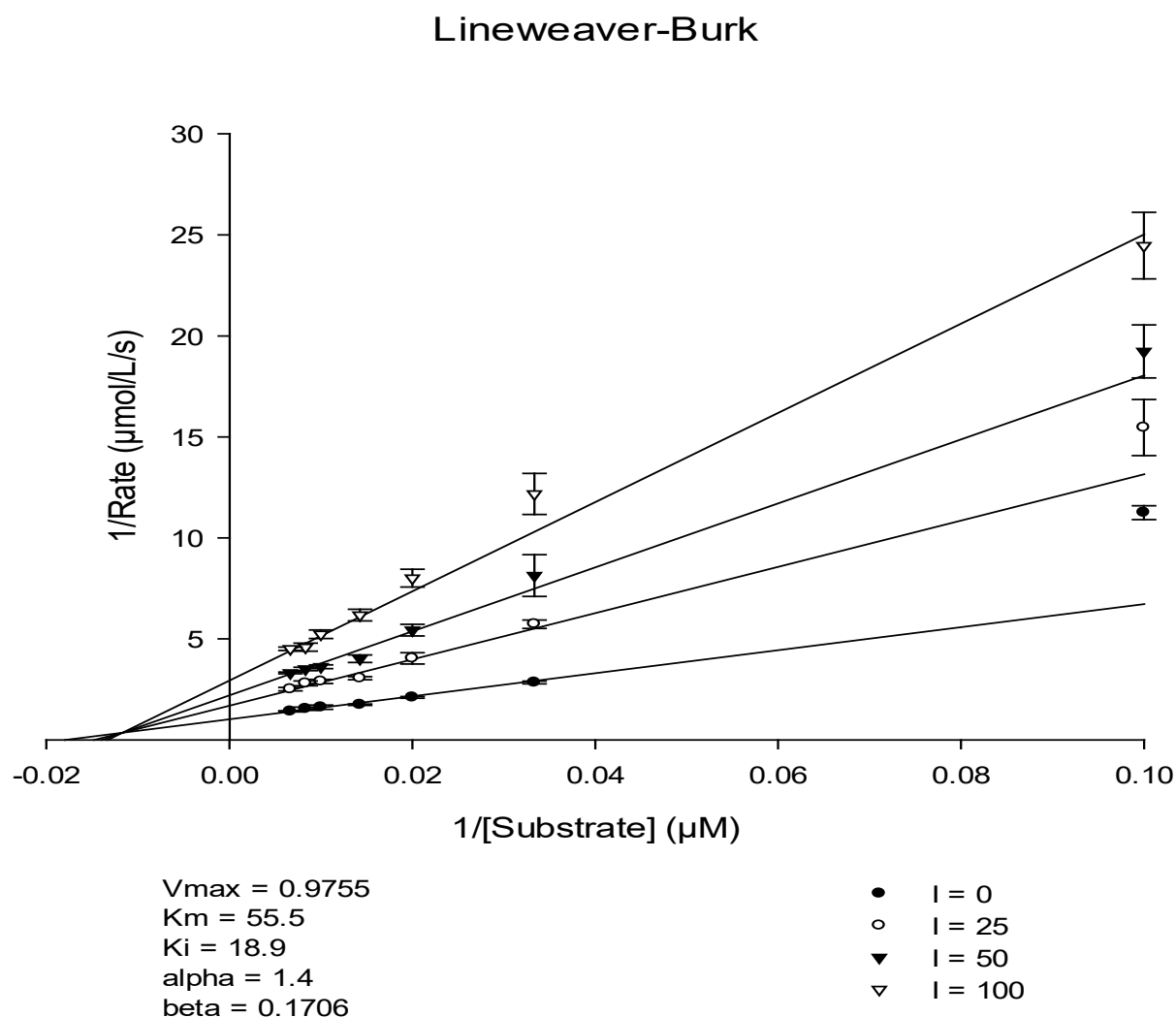


Рисунок 3.9 – Лінеаризація в координатах Лайнуївера-Берка залежності швидкості реакції ліпоксигеназного каталізу від концентрації лінолевої кислоти та в присутності суміші діосміну, гесперидину та 70% етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* (9:1:2) в концентраціях 25 мкМ, 50мкМ, і 100 мкМ за рутином.

Основні кінетичні константи за обраною моделю інгібування для суміші діосміну, гесперидину та 70% етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* (9:1:2) мають наступні значення:

$$K_i = 18,86 \pm 3,04 \text{ мкМ};$$

$$K_m = 55,54 \pm 5,00 \text{ мкМ};$$

$$V_{\max} = 0,98 \pm 0,04 \text{ мкМ/сек};$$

$$IC_{50} = 69,82 \pm 4,56 \text{ мкМ}.$$

### **3.5.5 Дослідження протизапальних властивостей суміші активних фармацевтичних інгредієнтів діосміну та 70% етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus***

Фінальним етапом досліджень було визначення інгібуючого впливу суміші діосміну та 70% етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* у співвідношенні 9:1.

За критерієм значення коефіцієнту кореляції ( $R^2 = 0,97965$ ) найпридатнішою для даної суміші є модель Mixed (Partial), тобто змішаний (частково) тип інгібування.

Результати дослідження впливу суміші діосміну та екстракту цикорію у концентраціях 25 мкМ, 50 мкМ та 100 мкМ за рутином на стаціонарну швидкість реакції ліпоксигеназного каталізу графічно представлені на рис. 3.10.



## Michaelis-Menten

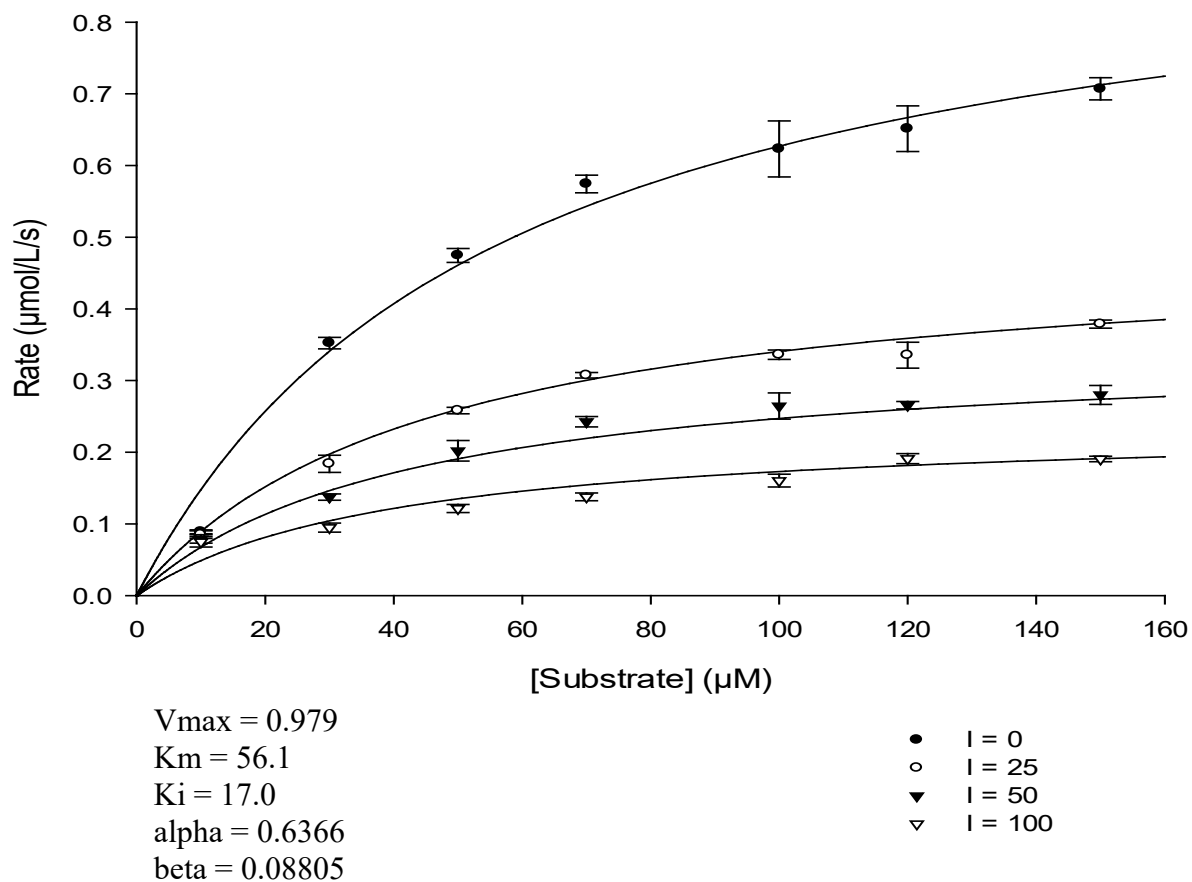
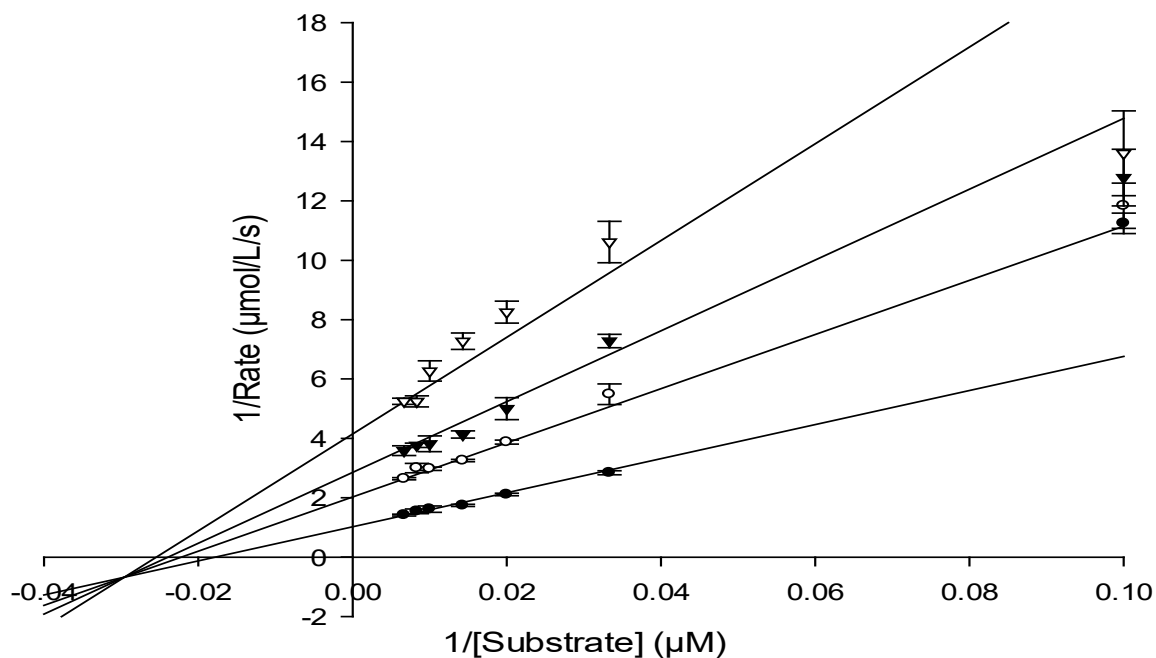


Рисунок 3.10 – Стаціонарні швидкості перетворення субстрату 15-ліпоксигеназою в залежності від концентрацій субстрату без інгібітору (0) та в присутності суміші діосміну та 70% етанольного екстракту цикорію (9:1) в концентраціях 25 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ за рутином.

Ефект змішаного інгібування демонструє графік зміни швидкості перетворення субстрату 15-ліпоксигеназою в залежності від початкової концентрації субстрату та концентрації інгібітора в зворотних координатах рівняння Лайнуівера-Берка (Рис. 3.11).

## Lineweaver-Burk



$V_{max} = 0.979$   
 $K_m = 56.1$   
 $K_i = 17.0$   
 $\alpha = 0.6366$   
 $\beta = 0.08805$

●  $I = 0$   
 ○  $I = 25$   
 ▼  $I = 50$   
 ▽  $I = 100$

Рисунок 3.11 – Лінеаризація в координатах Лайнуівера-Берка залежності швидкості реакції ліпоксигеназного каталізу від концентрації лінолевої кислоти та в присутності суміші діосміну та 70% етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* (9:1) в концентраціях 0, 25, 50 і 100 мкМ за рутином

Основні кінетичні константи за обраною моделлю інгібування для суміші діосміну та 70% етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* (9:1) мають наступні значення:

$K_i = 17,98 \pm 4,14$  мкМ;  
 $K_m = 56,14 \pm 5,14$  мкМ;  
 $V_{max} = 0,98 \pm 0,04$  мкМ/сек;

$$IC_{50} = 66,04 \pm 6,16 \text{ мкМ.}$$

Результати проведених досліджень свідчать, що діосмін та 70%-етанольний екстракт з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* є інгібіторами 15-ліпоксигенази за змішаним (частковим) механізмом інгібування. Отримані результати дозволяють стверджувати, що суміш даних АФІ у співвідношенні 9:1 може потенційно використовуватись для лікарських засобів протизапальної дії, оскільки має високу ефективність як інгібітор 15-ліпоксигенази. Концентрація напівмаксимального інгібування 15-ліпоксигенази  $IC_{50}$  в даних умовах становить  $66,04 \pm 6,16$  мкМ.

### Висновки до розділу 3

Досліджено склад етанольного та водного екстрактів з «волохатих» коренів *Cichorium intybus* та досліджено їх RedOx та інші потенційні фармакологічні властивості. Показано, що 70% етанольний екстракт в порівнянні з водним екстрактом містить значно більше флавоноїдних сполук (загальний вміст флавоноїдів у водному та етанольному екстрактах становить 121,3 мг (RE)/г та 60,3 мг (RE)/г, відповідно) та володіє значно вищими показниками антиоксидатної та відновлювальної активностей (антиоксидантна та відновна активність водного екстракту ( $EC_{50} = 0,350 \pm 0,015$  мкг/мл та  $EC_{0,5} = 0,42 \pm 0,04$  мг/мл) була нижчою в 2 і 4 рази, відповідно (вищі значення  $EC_{50}$  та  $EC_{0,5}$ ), ніж ті самі активності етанольного екстракту ( $EC_{50} = 0,165 \pm 0,010$  мкг/мл та  $EC_{0,5} = 0,10 \pm 0,01$  мг/мл).

Встановлено, що АФІ діосмін та 70%-етанольний екстракт з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* інгібують 15-ліпоксигеназу, при цьому концентрації напівмаксимального інгібування  $IC_{50}$  становлять  $244,75 \pm 19,91$  мкМ та  $84,13 \pm 7,22$  мкМ відповідно. Вперше встановлено, що гесперидин є активатором 15-ліпоксигенази ( $K_a = 933,77 \pm 98,44$  мкМ) і, таким чином, потенційно володіє прозапальними властивостями.

При порівнянні суміші діосміну, гесперидину та 70% етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* у співвідношенні 9:1:2 з сумішшю діосміну з 70% етанольним екстрактом з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* (9:1) встановлено, що їхні концентрації напівмаксимального інгібування 15-ліпоксигенази  $IC_{50}$  мають подібні значення ( $p \geq 0,05$ ):  $69,82 \pm 4,56$  мкМ та  $66,04 \pm 6,16$  мкМ відповідно.

Таким чином, оптимальний склад АФІ протизапальної фармацевтичної композиції може бути наступним: суміш діосміну з 70% етанольним екстрактом з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* у масовому співвідношенні 9:1.

## РОЗДІЛ 4

**РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ  
ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ ДІОСМІНУ ТА ЕТАНОЛЬНОГО  
ЕКСТРАКТУ З CICHORIUM INTYBUS**

#### 4.1 Опис, склад та фармацевтична розробка лікарського засобу

##### 4.1.1 Опис і склад лікарського засобу

**Назва:** Діосмін-Цикорій (ДЦ), супозиторії ректальні ДЦ по 500 мг; по 5 супозиторіїв у стрипі, по 2 стрипа у картонній коробці.

**Опис:** Торпедоподібні супозиторії світло-коричневого кольору з жовтуватим сірватим відтінком, без борозен, щільні, не м'які.

Таблиця 4.1 – Склад лікарського засобу ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг

Найменування діючих і допоміжних речовин	Вміст компонентів в одному супозиторії		Функція кожної складової лікарської форми	Стандарти діючих і допоміжних речовин [149-154]
	г	%		
<b>Діюча речовина</b>				
Діосмін	0,45	15,00	Діюча речовина	Ph. Eur. 8 (с. 2072); Ph. Eur. 9 (с. 2286)
Екстракт цикорію	0,05	1,66	Діюча речовина	
<b>Допоміжні речовини</b>				
Твердий жир Suprocire NA 15	1,25	41,67	Супозиторна основа	Ph. Eur. 8 (с. 2386)
Твердий жир Suprocire NAS 50	1,25	41,67	Супозиторна основа	Ph. Eur. 8 (с. 2386)
<b>Маса супозиторія ректального:</b>	<b>3,00</b>	100		

#### 4.1.2 Фармацевтична розробка

Розроблено препарат ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг.

Активними фармацевтичними інгредієнтами в даному препараті є діосмін і 70% етанольний екстракт з “волохатих” коренів *Cichorium intybus*.

Розроблений лікарський засіб має лікарську форму (супозиторії) та вміст діючих речовин: 1 супозиторій містить 450 мг діосміну, 50 мг сухого 70% етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus*.

Відповідно до класифікації АТС розроблюваний препарат відноситься до фармакологічної групи С05СА53 – Капіляростабілізуючі засоби. Біофлавоноїди. Діосмін, комбінації.

Препарати цієї групи, що містять діосмін в комбінації з екстрактом цикорію, застосовують для лікування симптомів венозно-лімфатичної недостатності: біль; судоми нижніх кінцівок; відчуття тяжкості і розпирання в ногах; «втома» ніг, а також проявів венозно-лімфатичної недостатності: набряки нижніх кінцівок; трофічні зміни шкіри і підшкірної клітковини; венозні трофічні виразки; гострого і хронічного геморою. Комбінація діосмін і екстракт цикорію володіє венотонізуючими і ангіопротективним властивостями: зменшує розтяжність вен і венозний застій, знижує проникність капілярів і підвищує їх резистентність, поліпшує показники венозної гемодинаміки. Впливає на наступні венозні плетизмографічні параметри: венозна ємність, венозна розтяжність, час венозного спорожнення. Комбінація діосмін і екстракт цикорію підвищує венозний тонус за рахунок зменшення часу венозного спорожнення. У пацієнтів з ознаками вираженого порушення мікроциркуляції відзначається підвищення капілярної резистентності. Комбінація діосмін і екстракт цикорію також зменшує взаємодію лейкоцитів та ендотелію, адгезію лейкоцитів у посткапілярних венулах. Це знижує пошкоджувальну дію медіаторів запалення на стінки вен і стулки клапанів вен [155-157].

#### 4.1.2.1. Компоненти лікарського засобу

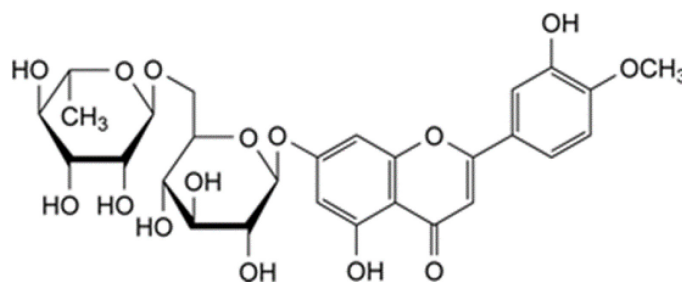
##### Діючі речовини

1. **Діосмін** – активний фармацевтичний інгредієнт розробленого лікарського засобу ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг.

**Хімічна назва:** 5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-7-[(2S,3R,4S, 5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-one

**МНН:** Diosmin

**Структурна формула:**



**Емпірична формула:** C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>15</sub>

**Молекулярна маса:** 608,54

**Код АТС:** C05CA03 – Ангіопротектори. Препарати, що знижують проникність капілярів. Біофлавоноїди. Діосмін.

**Фізико-хімічні властивості:**

##### *Опис*

Діосмін – флавоноїд, відноситься до хімічної групи поліфенольних сполук флавонової структури.

Зовнішній вигляд. Сірувато-жовтий або світло-жовтий гігроскопічний порошок.

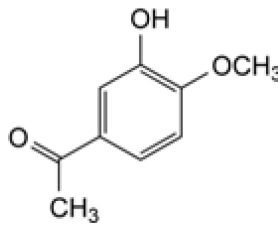
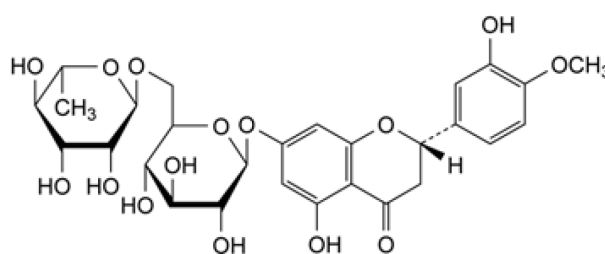
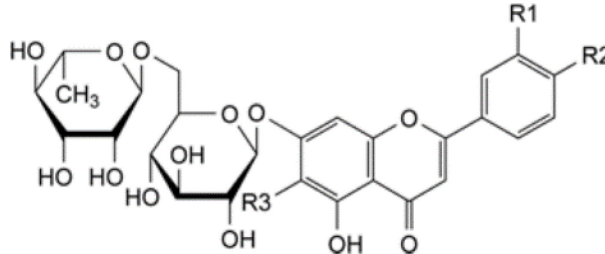
Розчинність. Практично нерозчинний у воді, розчинний у диметилсульфоксиді, практично нерозчинний в етанолі. Він розчиняється в розведених розчинах лужних гідроксидів.

Температура плавлення. 283 °С.

### Домішки

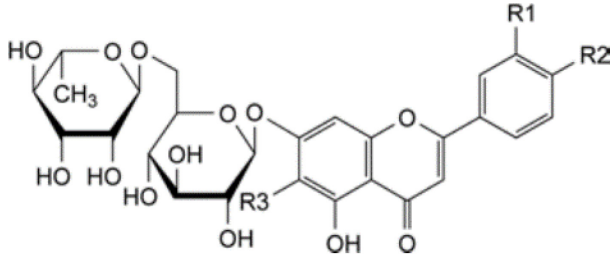
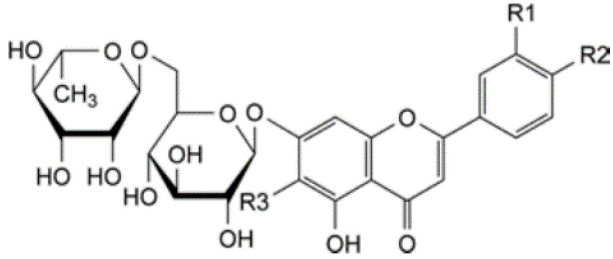
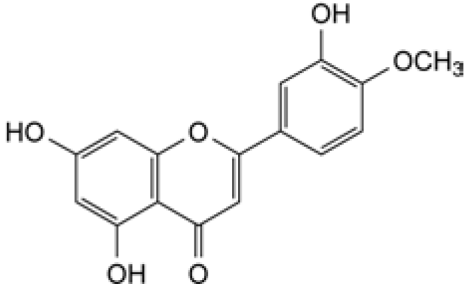
Інформація про потенційно можливі домішки згідно документації виробника АФІ, фірми Chengdu Okay Pharmaceutical Co., Ltd, Китай надана в таблиці 4.2

Таблиця 4.2 – Інформація про потенційно можливі домішки в АФІ діосмін

Назва	Структура	Нормування
<b>Домішка А</b> 1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethanone (acetoisovanillone)		Не більше 0,5 %
<b>Домішка В</b> (2S)-7-[[6-O-(6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]oxy]-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-1-benzopyran-4-one (hesperidin)		Не більше 4 %
<b>Домішка С</b> 7-[[6-O-(6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]oxy]-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one (isorhoifolin)	 <p style="text-align: center;"><math>R_1 = R_3 = H, R_2 = OH</math></p>	Не більше 3 %



## Продовження таблиці 4.2

<p><b>Домішка D</b> 7-[[6-O-(6-deoxy-<math>\alpha</math>-Lmannopyranosyl)-<math>\beta</math>-D-glucopyranosyl]oxy]-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-6-iodo-4H-1-benzopyran-4-one (6-iododiosmin)</p>	 <p><math>R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OCH}_3, R_3 = \text{I}</math>:</p>	Не більше 0,6 %
<p><b>Домішка E</b> 7-[[6-O-(6-deoxy-<math>\alpha</math>-Lmannopyranosyl)-<math>\beta</math>-D-glucopyranosyl]oxy]-5-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one (linarin)</p>	 <p><math>R_1 = R_3 = \text{H}, R_2 = \text{OCH}_3</math></p>	Не більше 3 %
<p><b>Домішка F</b> 5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one (diosmetin)</p>		Не більше 2 %

Згідно з документацією виробника діосміну Chengdu Okay Pharmaceutical Co., Ltd, Китай, вміст супровідних речовин в субстанції контролюють методом ВЕРХ (Ph. Eur., 2.2.29) на відповідність встановленим критеріям:

- Acetoisovanillone - не більше 0,5 %;
- Hesperidin - не більше 4 %;
- Isorhoifolin - не більше 3 %;
- 6-iodo-diosmin – не більше 0,6 %;
- Linarin – не більше 3 %;
- Diosmetin не більше не більше 2 %.
- будь яка інша домішка: не більше 0,4 %;
- сума домішок: не більше 8,5 %.

Для проведення вхідного контролю субстанції діосміну розроблена специфікація згідно вимог виробника АФІ (табл. 4.3).

Таблиця 4.3 – Специфікація вхідного контролю АФІ діосмін

Показники якості	Допустимі межі (Ph. Eur. 9 [151])
<b>Опис</b>	Сірувато-жовтий або світло-жовтий гігроскопічний порошок
<b>Розчинність</b>	Практично нерозчинний у воді, розчинний у диметилсульфоксиді, практично нерозчинний в етанолі. Він розчиняється в розведених розчинах лужних гідроксидів
<b>Ідентифікація</b>	<b>А.</b> Інфрачервоний спектр субстанції має відповідати спектру ФСЗ діосміну (Ph. Eur., 2.2.24) <b>В.</b> Основний пік хроматограми, отриманої з випробувальним розчином, схожий за часом утримування та розміром до основного піку в хроматограмі, отриманому з еталонним розчином (а) (Ph. Eur., 2.2.29)
<b>Йод</b>	Не більше 0, 1 % (Ph. Eur., 2.3.36. після спалювання в колбі з киснем Ph. Eur., 2.5.10)

## Продовження таблиці 4.3

<b>Супровідні домішки:</b>	
- домішка A:	Не більше 0,5 % (Ph. Eur., 2.2.29);
- домішка B:	Не більше 4 % (Ph. Eur., 2.2.29);
- домішка C:	Не більше 3 % (Ph. Eur., 2.2.29);
- домішка D:	Не більше 0,6 % (Ph. Eur., 2.2.29);
- домішка E:	Не більше 3 % (Ph. Eur., 2.2.29);
- домішка F:	Не більше 2 % (Ph. Eur., 2.2.29);
- будь яка інша домішка та домішка A:	Не більше 0,4 % (Ph. Eur., 2.2.29);
- сума домішок:	Не більше 8,5 % (Ph. Eur., 2.2.29).
<b>Важкі метали:</b>	Не більше 20 ppm (Ph. Eur., 2.4.8).
<b>Вода:</b>	Не більше 6.0 % (Ph. Eur., 2.5.12).
<b>Сульфатна зола</b>	Не більше 0,2 % (Ph. Eur., 2.4.14).
<b>Кількісне визначення діосміну</b> <i>C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>15</sub></i>	Як описано в випробуванні на «Супровідні домішки». Інжекція: випробуваний розчин та еталонний розчин (a) (Ph. Eur., 2.2.29): 90% - 102%
<b>TAMC:</b>	Не більше 1000 КУО/г (Ph. Eur., 2.6.12; Ph. Eur., 5.1.4);
<b>TUMC:</b>	Не більше 100 КУО/г (Ph. Eur., 2.6.12; Ph. Eur., 5.1.4);
<b>E.coli:</b>	Відсутні (Ph. Eur., 2.6.12; Ph. Eur., 5.1.4);
<b>Salmonella:</b>	Відсутні (Ph. Eur., 2.6.12; Ph. Eur., 5.1.4);
<b>Coliforms:</b>	Не більше 10 КУО/г (Ph. Eur., 2.6.12; Ph. Eur., 5.1.4).
<b>Умови зберігання</b>	У герметичній ємності

2. Сухий 70%-етанольний екстракт з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* – активний фармацевтичний інгредієнт розробленого лікарського засобу ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг.

**Ботанічна назва:** Цикорій звичайний (Від лат. *Cichorium intybus*), з роду Цикорій (*Cichorium*) родини Айстрові (*Asteraceae*).

**Ботанічний опис:** Багаторічна шорстка рослина висотою 40–80 см. Прикореневі листки виімчасто-перистороздільні, стеблові – ланцетні. Всі квітки язичкові. Кошики 3–5 см у діаметрі, сидять здебільшого пучками в пазухах листків. Обгортка кошиків 2-рядна. Цвіте з червня до осені. Ростає на вигонах, схилах, уздовж доріг [158-160].

**Хімічний склад:** Основними діючими речовинами є вуглеводи [161]: фруктозани (4,7–6,5%), які містять до 4,5–9,5% вільної фруктози і її полімер інулін – до 49% у дикорослого цикорію, у культурних сортах – до 61% [162]. На інулін багаті також його листя і насіння. Крім інуліну, сировина містить й інші, менш полімеризовані інуліни, які складаються з 10–12 залишків фруктози і слабо розчиняються у воді; сахарозу, левульозу, левулін, глюкофруктозани; специфічний глікозид інтибін (0,032–0,2%); органічні кислоти; фенолкарбонові кислоти та їх похідні; ефірну олію, жирну олію, до складу якої входять *n*-пентадеканова, лінолева, пальмітинова, олеїнова, ліноленова кислоти; стерини:  $\alpha$ -амірин, таракастерол,  $\beta$ -ситостерол; смоли, холін. Молочний сік містить сесквітерпенові лактони: лактуцин, 8-дезоксилактуцин, лактукопікрин – ефір *n*-гідроксифенілоцтової кислоти і лактуцину, магноліалід, артезин; тритерпеноїди: таракастерол [163, 164]. Трава цикорію містить оксикумарини: ескулетин, умбеліферон, ескулін і цикоріїн; флавоноїди: апігенін, лютеолін-7-О- $\beta$ -D-глюкопіранозид, кверцетин-3-О- $\beta$ -L-рамнозид, кверцетин-3-О- $\beta$ -D-галактозид, апігенін-7-О-L-арабінозид; конденсовані дубильні речовини;  $\alpha$ - і  $\beta$ - каротини, вітаміни С, В1, В2, В3, РР. Досліджений загальний вміст флавоноїдів в 70%-етанольному екстракті з “волохатих” коренів *Cichorium intybus*, що становить 121,3 мг (RE)/г.

#### **Допоміжні речовини.**

Якісний склад допоміжних речовин, здатних впливати на терапевтичну ефективність препарату, ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг, обрано з урахуванням науково-технічної інформації щодо супозиторних основ [165-167].

Кількісний вміст використовуваних допоміжних речовин забезпечує фізико-хімічні та фармако-технологічні показники якості розроблюваного препарату [150, 151, 153].

Функціональне призначення допоміжних речовин, що входять до складу препарату *ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг* наступне:

**Твердий жир SUPPOSIRE NA 15 PELLETS** використовується в якості складової супозиторної основи.

**Твердий жир SUPPOSIRE NA 50 PELLETS** використовується в якості складової супозиторної основи.

Співвідношення між рекомендованими і використаними кількостями допоміжних речовин приведено в таблиці 4.4.

Таблиця 4.4 – Співвідношення між рекомендованими і використаними кількостями допоміжних речовин

Найменування речовини	Кількість, що рекомендується, % [153]	Кількість, що використовується, %
<b>Твердий жир SUPPOSIRE NA 15 PELLETS</b>	Не регламентується	41,67
<b>Твердий жир SUPPOSIRE NAS 50 PELLETS</b>	Не регламентується	41,67

Кількісний вміст допоміжних речовин було підібрано в процесі експериментальних досліджень з розробки складу лікарського засобу.

Основні властивості допоміжних речовин, що входять до складу *ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг*, наведено в таблиці 4.5.

Таблиця 4.5 – Основні властивості допоміжних речовин, що входять до складу лікарського препарату ДЦ

Найменування допоміжної речовини	Функціональне призначення	Типові властивості
<p><b>Твердий жир SUPPOSIRE NA 15 PELLETS</b> (Ph. Eur. 8, с.2386)</p>	<p>Супозиторна основа</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>Опис:</i> воскоподібні тверді пелети білого або майже білого кольору (за шкалою Гарднера -1,3).</li> <li>2. <i>Розчинність:</i> практично нерозчинний у воді, слабо розчинний у безводному етанолі.</li> <li>3. <i>Температура плавлення:</i> від 33,5°С до 35,5 °С.</li> <li>4. <i>Кислотне число:</i> не більше 0,5 мг КОН/г</li> <li>5. <i>Число омилення:</i> від 230 мг КОН/г до 245 мг КОН/г.</li> <li>6. <i>Йодне число:</i> не більше 2,0 г I<sub>2</sub>/100г.</li> <li>7. <i>Перекисне число:</i> не більше 1 мг-екв O<sub>2</sub>/кг.</li> <li>8. <i>Гідроксильне число:</i> від 5 мг КОН/г до 15 мг КОН/г.</li> <li>9. <i>Неомилювані речовини:</i> не більше 3%*.</li> <li>10. <i>Лужні домішки:</i> не більше 0,15 мл 0,01 М НСІ/2 г.</li> <li>11. <i>Сульфатна зола:</i> не більше 0,05 %.</li> <li>12. <i>Важкі метали:</i> не більше 10 ppm.</li> <li>13. <i>Вміст води:</i> не більше 0,50 %</li> </ol>
<p><b>Твердий жир SUPPOSIRE NAS 50 PELLETS</b> (Ph. Eur. 8, с.2346)</p>	<p>Супозиторна основа</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>Опис:</i> воскоподібні тверді пелети білого або майже білого кольору (за шкалою Гарднера -1,3).</li> <li>2. <i>Розчинність:</i> практично нерозчинний у воді, слабо розчинний у безводному етанолі.</li> <li>3. <i>Температура плавлення:</i> від 33,5°С до 35,5 °С.</li> <li>4. <i>Кислотне число:</i> не більше 0,30 мг КОН/г</li> <li>5. <i>Число омилення:</i> від 225 мг КОН/г до 235 мг КОН/г.</li> <li>6. <i>Йодне число:</i> не більше 3,0 г I<sub>2</sub>/100г.</li> <li>7. <i>Перекисне число:</i> не більше 1 мг-екв O<sub>2</sub>/кг.</li> <li>8. <i>Гідроксильне число:</i> від 40 мг КОН/г до 50 мг КОН/г.</li> <li>9. <i>Неомилювані речовини:</i> менше 0,3%.</li> <li>10. <i>Лужні домішки:</i> не більше 0,15 мл 0,01 М НСІ/2 г.</li> <li>11. <i>Загальна зола:</i> не більше 0,05 %.</li> <li>12. <i>Важкі метали:</i> менше 10 ppm.</li> <li>13. <i>Вміст води:</i> не більше 0,50 %</li> </ol>

### Дослідження сумісності компонентів

Використовувані в складі лікарського засобу допоміжні речовини хімічно інертні по відношенню до діючої речовини та один до одного.

Інформація про потенційну несумісність допоміжних речовин представлена в таблиці 4.6.

Таблиця 4.6 – Інформація про потенційну несумісність допоміжних речовин

Найменування речовини	Функціональна категорія	Несумісність
<p><b>Твердий жир SUPPOSIRE NA 15 PELLETS</b></p>	<p>Компонент супозиторної основи</p>	<p>Виникнення хімічної реакції між твердою жирною основою супозиторіїв та АФІ можливо порівняно рідко, але будь-яка ймовірність для такої реакції може бути визначена по гідроксильному числу. Ризик гідролізу аспірину, наприклад, може бути зменшено за рахунок використання основи з низьким гідроксильним числом (&lt;5) і, крім того, шляхом мінімізації вмісту води як у основі, так і в аспірині. Є дані, що амінофілін реагує з гліцеридами в деяких твердих жирних основах з утворенням діамідів. Під впливом підвищеної температури деградація основи супроводжується помітним підвищенням температури плавлення супозиторіїв. Вміст етилендіаміну також знижується. Деякі жиророзчинні АФІ, наприклад хлоралгідрат, можуть знижувати температуру плавлення супозиторної основи. Аналогічно, велика кількість активної речовини, твердої або рідкої, впливає на реологічні характеристики отриманих супозиторіїв та відповідно на вивільнення та біодоступність АФІ [153].</p>

## Продовження таблиці 4.6

<p><b>Твердий жир SUPPOSIRE NAS 50 PELLETS</b></p>	<p>Компонент супозиторної основи</p>	<p>Виникнення хімічної реакції між твердою жирною основою супозиторіїв та АФІ можливо порівняно рідко, але будь-яка ймовірність для такої реакції може бути визначена по гідроксильному числу. Ризик гідролізу аспірину, наприклад, може бути зменшено за рахунок використання основи з низьким гідроксильним числом (&lt;5) і, крім того, шляхом мінімізації вмісту води як у основі, так і в аспірині. Є дані, що амінофілін реагує з гліцеридами в деяких твердих жирних основах з утворенням діамідів. Під впливом підвищеної температури деградація основи супроводжується помітним підвищенням температури плавлення супозиторіїв. Вміст етилендіаміну також знижується. Деякі жиророзчинні АФІ, наприклад хлоралгідрат, можуть знижувати температуру плавлення супозиторної основи. Аналогічно, велика кількість активної речовини, твердої або рідкої, впливає на реологічні характеристики отриманих супозиторіїв та відповідно на вивільнення та біодоступність АФІ [153].</p>
--	--	--

При розробці була підтверджена сумісність діючих речовин діосміну та екстракту цикорію з вибраними фармацевтичними допоміжними речовинами.

Дослідження сумісності діючих речовин та допоміжних речовин засноване на стрес-тестуванні бінарних сумішей, що зберігаються при 50 °С в закритих флаконах



або при 50 °C / 75% RH у відкритих флаконах протягом 4-х тижнів, підтвердило сумісність діючих речовин з вибраними допоміжними речовинами.

Результати дослідження фізичної стабільності модельних сумішей представлені в табл. 4.7 (бінарні суміші з діосміном) та табл. 4.8 (бінарні суміші з екстрактом цикорію).

Таблиця 4.7 – Бінарні суміші з діосміном

Допоміжна речовина	Умови експозиції	Опис суміші протягом часу експозиції зразка		Результат
		0 діб	28 діб	
<b>Твердий жир SUPPOSIRE NA 15 PELLETS</b>	50 °C в закритих флаконах	Суспензія світло бежевого кольору	Суспензія світло бежевого кольору	Відповідає
	50 °C / 75% RH в відкритих флаконах	Суспензія світло бежевого кольору	Суспензія світло бежевого кольору	Відповідає
<b>Твердий жир SUPPOSIRE NAS 50 PELLETS</b>	50 °C в закритих флаконах	Суспензія світло бежевого кольору	Суспензія світло бежевого кольору	Відповідає
	50 °C / 75% RH в відкритих флаконах	Суспензія світло бежевого кольору	Суспензія світло бежевого кольору	Відповідає

Таблиця 4.8 – Бінарні суміші з екстрактом цикорію

Допоміжна речовина	Умови експозиції	Опис суміші протягом часу експозиції зразка		Результат
		0 діб	28 діб	
<b>Твердий жир SUPPOSIRE NA 15 PELLETS</b>	50 °C в закритих флаконах	Суспензія світло бежевого кольору	Суспензія світло бежевого кольору	Відповідає
	50 °C / 75% RH в відкритих флаконах	Суспензія світло бежевого кольору	Суспензія світло бежевого кольору	Відповідає
<b>Твердий жир SUPPOSIRE NAS 50 PELLETS</b>	50 °C в закритих флаконах	Суспензія світло бежевого кольору	Суспензія світло бежевого кольору	Відповідає
	50 °C / 75% RH в відкритих флаконах	Суспензія світло бежевого кольору	Суспензія світло бежевого кольору	Відповідає

#### 4.1.2.2 Лікарський засіб

##### Етапи фармацевтичної розробки лікарського засобу:

- характеристика розроблюваного лікарського засобу;
- визначення цільового профілю якості розроблюваного лікарського засобу;
- визначення критичних параметрів якості АФІ, допоміжних речовин, елементів упаковки;
- вибір і обґрунтування кількісного складу розроблюваного лікарського засобу;
- вибір оптимальної технології виробництва лікарського засобу;
- ідентифікація потенційних критичних параметрів якості лікарського засобу, які повинні бути досліджені і контролюватися, виходячи з їх впливу на якість продукту.

Таблиця 4.9 – Характеристика розроблюваного лікарського засобу ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг

Назва лікарського засобу	ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг
Код АТС	C05C A53
Форма випуску	Супозиторії ректальні по 500 мг у однодозовому супозиторному контейнері
МНН	Comb drug
Діюча речовина	Діосмін
	70%-етанольний екстракт з “волохатих” коренів <i>Cichorium intybus</i>
Допоміжні речовини	Твердий жир SUPPOSIRE NA 15 PELLETS; Твердий жир SUPPOSIRE NAS 50 PELLETS
Фармакотерапевтична група	Капіляростабілізуючі засоби. Біофлавоноїди. Діосмін, комбінації
Основні фізико-хімічні властивості	Торпедоподібні супозиторії світло-коричневого кольору з жовтувато-сіруватим відтінком
Шлях введення	Для місцевого (ректального) застосування
Мінімальна застосована доза	Дорослим і дітям старше 14 років - по 1 супозиторію 2 рази на добу
Упаковка	По 5 супозиторіїв у стрипі, по 2 стрипи у картонній коробці.

### Цільовий профіль якості продукту (QTPP)

Грунтуючись на клінічних, фармакокінетичних характеристиках, а також на фізико-хімічних характеристиках активних фармацевтичних інгредієнтів, було визначено цільовий профіль якості для розробки оригінального лікарського засобу *ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг* (Таблиця 4.10)

Таблиця 4.10 – Цільовий профіль якості продукту (QTPP)

Елемент цільового профілю якості	Ціль	Обґрунтування
Лікарська форма	Супозиторії	Вимоги терапевтичного призначення
Дизайн форми	Супозиторії місцевої дії	Дизайн форми розроблюваного лікарського засобу повинен забезпечувати зручність та ефективність застосування
Шлях введення/ прийому	Для місцевого застосування	Необхідність забезпечення оптимального терапевтичного застосування
Сила дії (дозування)	450 мг діосміну 50 мг екстракту цикорію	Вимоги терапевтичного призначення
Система упаковки/укупорки	<i>Первинна упаковка:</i> по 500 мг у супозиторному контейнері, по 5 супозиторіїв у стрипі. <i>Вторинна упаковка:</i> По 2 стрипи (10 супозиторіїв) разом з інструкцією для медичного застосування в картонній коробці.	Необхідність забезпечення цільового терміну придатності
Термін придатності	3 роки. Зберігати в недоступному для дітей місці, при температурі не вище 25 ° С	Термін придатності встановлений відповідно до вимог Настанови 42-3.3: 2004 «Випробування стабільності»
Критичні показники якості ГЛЗ (CQAs)	<b>Опис</b>	Вимоги Ph. Eur. та ДФУ поточних редакцій до ректальних лікарських засобів
	<b>Ідентифікація:</b> - діосмін - екстракт цикорію	
	<b>Однорідність вмісту</b>	
	<b>Однорідність маси</b>	
	<b>Розпадання</b>	
	<b>Мікробіологічна чистота</b>	

Елемент цільового профілю якості	Ціль	Обґрунтування
	<b>Кількісне визначення</b> - діосміну - екстракту цикорію	
<b>Критичні фізико-хімічні та фармако-технологічні показники якості</b>	<b>Опис</b>	Вимоги Ph. Eur. та ДФУ поточних редакцій до ректальних лікарських засобів.
	<b>Однорідність вмісту</b>	
	<b>Однорідність маси</b>	
	<b>Розпадання</b>	

### Розробка складу

Якісний склад лікарського препарату *ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг*, представлено в таблиці 4.11.

Таблиця 4.11 – Якісний склад розроблюваного лікарського засобу

<b>Розроблюваний ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг</b>
<b>Діюча речовина</b>
Діосмін
Сухий 70%-етанольний екстракт з “волохатих” коренів <i>Cichorium intybus</i>
<b>Допоміжні речовини</b>
Твердий жир SUPPOSIRE NA 15 PELLETS
Твердий жир SUPPOSIRE NAS 50 PELLETS

При розробці вирішувалося завдання створення лікарського засобу з кількісним складом допоміжних речовин і технологією виробництва, що в комплексі забезпечують терапевтичну дію *ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг*.

## **Вибір технології та кількісного складу**

Базуючись на даних наукової і патентної інформації за діючими речовинами, лікарськими засобами на їх основі, сучасних відомостях про технології виробництва ректальних нестерильних лікарських засобів для місцевого застосування, для фармацевтичної розробки була опрацьована та обрана технологія виготовлення оригінального лікарського засобу *ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг* з застосуванням змішувача, реактора з мішалкою та обогрівом та устаткування для заповнення та герметизації стрипів.

Оптимальний кількісний склад лікарського засобу *ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг* підбирався з використанням:

- методу математичного планування експерименту;
- апріорної інформації про об'єкт дослідження;
- інформації про фізико-хімічні властивості компонентів і впливу цих властивостей на якісні характеристики розроблюваного лікарського засобу.

**Оптимальний кількісний склад і технологія лікарського засобу *ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг* визначені за результатами експериментів і апробацій, проведених в кілька етапів:**

- **Етап 1:** повний факторний експеримент по вибору складу і технології *ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг*;
- **Етап 2:** апробація обраного складу в лабораторних умовах для ЛЗ *ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг*.

**ЕТАП 1. Повний факторний експеримент по вибору складу і технології лікарського засобу *ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг***

На етапі експериментальних робіт проведено рандомізований повний факторний експеримент. У цій конструкції оцінювали 2 фактора, один на 2-х рівнях і один на 3-х. Експериментальні дослідження проведено для 6 можливих композицій.

## 1. Постановка завдання і вибір параметра оптимізації (відгуку)

В якості параметрів оптимізації було обрано такі критичні показники якості:

Таблиця 4.12 – Критичні показники якості

Параметр оптимізації	Характеристика параметра	Критерій прийнятності параметра оптимізації
$y^1$	Опис	Світло-коричневий колір з жовтувато-сіруватим відтінком
$y^2$	Гомогенність маси при охолодженні	Однорідна маса (відсутність седиментації)
$y^3$	Однорідність вмісту діючих речовин*: - діосмін - екстракт цикорію	0.1583 г - 0,1750 г 0,0158 г - 0,0175 г

\* - в перерахунку на середню масу вмісту супозиторія у контейнері

## 2. Вибір факторів, що впливають на досліджуваний процес, основного рівня факторів і інтервалів варіювання факторів

Важливим фактором вибору якісного та кількісного складу супозиторіїв є основа, яка істотно впливає на ефективність ректальних ліків (вивільнення та всмоктування лікарської субстанції, час повної деформації, стабільність, рівномірність розподілу речовин в лікарській системі, дозування ліків) [168].

В якості першого чинника варіювання (А) вибрано кількість твердого жиру SUPPOSIRE NA 15 PELLETS виробництва Gattefossé, Франція.

Другим фактором варіювання (В) вибрано кількість твердого жиру SUPPOSIRE NAS 50 PELLETS виробництва Gattefossé, Франція.

Обрані тверді жири SUPPOSIRE NA 15 PELLETS (далі – SUP-NA 15) і SUPPOSIRE NAS 50 PELLETS (далі – SUP-NAS 50) відповідають наступним вимогам до супозиторних основ: стабільні, не мають подразнюючого ефекту,

хімічно та фізіологічно інертні, сумісні з діючими речовинами, плавляться у фізіологічних рідинах, забезпечують рівномірний розподіл активних інгредієнтів та їх вивільнення. Обидва компоненти супозиторної основи, отримані прямою етерифікацією жирних кислот з гліцерином. Довгий ланцюг тригліцеридів забезпечує швидке затвердіння, внаслідок чого супозиторії характеризуються високою механічною стійкістю. Продукти з низьким гідроксильним числом (SUPPOSIRE NA 15 PELLETS) забезпечують: високу швидкість кристалізації в індивідуальній супозиторній одиниці; підходять для одержання супозиторіїв великими за об'ємом серіями на високопродуктивному технологічному обладнанні; підходять для чутливих діючих речовин. Продукти з більш високим гідроксильним числом (SUPPOSIRE NAS 50 PELLETS) забезпечують універсальність для менших серій на менш швидкісному обладнанні.

Монографію на твердий жир містять Державна фармакопея України та провідні світові фармакопеї: європейська ЄФ, британська ВР, американська USP. Також твердий жир включено до FDA Inactive Ingredients Database (у складі ректальних і вагінальних препаратів) та дозволено до використання у складі непарентеральних препаратів в УК [153]. В Україні використання твердого жиру як допоміжної речовини регламентовано Наказом МОЗ № 8 від 15.01.2003 "Перелік допоміжних речовин, дозволених для застосування у виробництві лікарських засобів, що (лікарські засоби) реєструються в Україні та виготовляються в аптечних умовах за рецептами лікарів і замовленнями лікувально-профілактичних закладів" (зі змінами, внесеними згідно з наказами МОЗ № 314 від 21.06.2004, № 391 від 04.08.2004). В експерименті оцінювали два фактора, один на двох рівнях і один на трьох (табл. 4.13).

Таблиця 4.13 – Фактори та рівні факторів

Фактори	Рівні факторів
<i>A</i> – кількість SUP-NA 15	$a_1 - 21,67\%$ $a_2 - 31,67\%$ $a_3 - 41,67\%$ $a_4 - 51,67\%$ $a_5 - 61,67\%$
<i>B</i> – кількість SUP-NAS 50	$b_1 - 21,67\%$ $b_2 - 31,67\%$ $b_3 - 41,67\%$ $b_4 - 51,67\%$ $b_5 - 61,67\%$

### 3. Вибір плану експеримента, побудова робочої матриці

Вибір плану експеримента, побудова робочої матриці наведено в табл. 4.14

Таблиця 4.14 – Робоча матриця

<b>B</b> \ <b>A</b>	<b>a<sub>1</sub></b>	<b>a<sub>2</sub></b>	<b>a<sub>3</sub></b>	<b>a<sub>4</sub></b>	<b>a<sub>5</sub></b>
<b>b<sub>1</sub></b>	-	-	-	-	$a_5b_1$
<b>b<sub>2</sub></b>	-	-	-	$a_4b_2$	-
<b>b<sub>3</sub></b>	-	-	$a_3b_3$	-	-
<b>b<sub>4</sub></b>	-	$a_2b_4$	-	-	-
<b>b<sub>5</sub></b>	$a_1b_5$	-	-	-	-

### Матриця планування експеримента

Експериментальні дослідження проводили для всіх можливих композицій (табл. 4.15).

Таблиця 4.15 – Можливі композиції факторів А та В

Дослід №1	Дослід №2	Дослід №3
$a_1 - 21,67\%$ SUP-NA 15 $b_5 - 61,67\%$ SUP-NAS 50	$a_2 - 31,67\%$ SUP-NA 15 $b_4 - 51,67\%$ SUP-NAS 50	$a_3 - 41,67\%$ SUP-NA 15 $b_3 - 41,67\%$ SUP-NAS 50
Дослід №4	Дослід №5	
$a_4 - 51,67\%$ SUP-NA 15 $b_2 - 31,67\%$ SUP-NAS 50	$a_5 - 61,67\%$ SUP-NA 15 $b_1 - 21,67\%$ SUP-NAS 50	

### 4. Оцінка отриманих результатів

Для вибору найкращих варіантів застосовано узагальнений показник - функцію бажаності (табл. 4.16).



Таблиця 4.16 – Співвідношення між кількісною оцінкою за шкалою бажаності та бажаності значення відгуку

Кількісна оцінка за шкалою бажаності	Бажаність значення відгуку
0,92-1,00	Дуже добре
0,63-0,91	Добре
0,37-0,63	Задовільно
0,20-0,37	Погано
0,00-0,20	Дуже погано

Таблиця 4.17 – Результати повного факторного експерименту

Номер досліджу	Відгук (параметр оптимізації)						D
	Опис	y <sup>1</sup>	Гомогенність маси при охолодженні	y <sup>2</sup>	Однорідність вмісту діючих речовин	y <sup>3</sup>	
<b>№1</b> a <sub>1</sub> – 21,67 % SUP-NA 15 b <sub>5</sub> – 61,67 % SUP- NAS 50	Світло-коричневий колір з жовтуватосіруватим відтінком	0,70	Седиментація	-	0.1583 г діосміну, 0,0175 г екстракту цикорію	0,90	<b>Н/д</b> (зразки не відповідають показнику «Гомогенність маси при охолодженні»)
<b>№2</b> a <sub>2</sub> – 31,67 % SUP-NA 15 b <sub>4</sub> – 51,67 % SUP-NAS 50	Світло-коричневий колір з жовтуватосіруватим відтінком	0,90	Гомогенна маса	0,8	0.1595 г діосміну, 0,0175 г екстракту цикорію	0,90	<b>0,86</b>
<b>№3</b> a <sub>3</sub> – 41,67 % SUP-NA 15 b <sub>3</sub> – 41,67 % SUP- NAS 50	Світло-коричневий колір з жовтуватосіруватим відтінком	0,90	Гомогенна маса	0,98	0.1689 г діосміну, 0,0171 г екстракту цикорію	0,90	<b>0,93</b>

Номер досліджу	Відгук (параметр оптимізації)					D	
	Опис	y <sup>1</sup>	Гомогенність маси при охолодженні	y <sup>2</sup>	Однорідність вмісту діючих речовин		y <sup>3</sup>
<b>№4</b> a <sub>4</sub> – 51,67 % SUP-NA 15 b <sub>2</sub> – 31,67 % SUP-NAS 50	Світло-коричневий колір з жовтуватосіруватим відтінком	0,90	Гомогенна маса	0,8	0.1595 г діосміну, 0,0175 г екстракту цикорію	0,90	<b>0,86</b>
<b>№5</b> a <sub>1</sub> – 61,67 % SUP-NA 15 b <sub>3</sub> – 21,67 % SUP-NAS 50	Світло-коричневий колір з жовтуватосіруватим відтінком	0,70	Седиментація	-	0.1583 г діосміну, 0,0175 г екстракту цикорію	0,90	<b>Н/д</b> (зразки не відповідають показнику «Гомогенність маси при охолодженні»)

### Висновки за результатами проведеного повного факторного експерименту

1. Підтверджено оптимальність технології одержання супозиторіїв ректальних в реакторі з мішалкою для розроблюваного лікарського засобу.

2. Вивчено вплив співвідношення компонентів супозиторної основи на показники якості розроблених супозиторіїв ректальних. При розподіленні компонентів 21,67; 61,67 (зразок № 1), 31,67; 51,67 (зразок № 2), 51,67; 31,67 (зразок № 4), 61,67; 21,67 (зразок № 5) одержано незадовільні результати за показником «Гомогенність маси при охолодженні»

3. Найкращі показники були одержані при розподіленні компонентів основи SUPPOSIRE NA 15 PELLETS і SUPPOSIRE NAS 50 PELLETS – 41,67;41,67 (зразок № 3).

4. Оптимальна комбінація вивчених факторів впливу, при якій отримано оптимальне значення оцінки за шкалою бажаності (0,93 – дуже добре):

- кількість SUPPOSIRE NA 15 PELLETS: 41,67 %;

- кількість SUPPOSIRE NAS 50 PELLETS: 41,67 %.

В результаті проведеного математичного планування і експериментальних робіт по розробці складу визначено оптимальний кількісний склад препарату ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг (табл. 4.18).

Таблиця 4.18 – Оптимальний кількісний склад препарату ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг

Найменування діючих та допоміжних речовин	Вміст компонентів в одному супозиторії		Функція кожної складової лікарської форми
	г	%	
Діосмін	0,45	15,00	Діюча речовина
Екстракт цикорію	0,05	1,66	Діюча речовина
Твердий жир SUPPOSIRE NA 15 PELLETS	1,25	41,67	Супозиторна основа
Твердий жир SUPPOSIRE NAS 50 PELLETS	1,25	41,67	Супозиторна основа
<b>Маса 1 супозиторія:</b>	<b>3,00 г</b>		

**ЕТАП 2. Апробація в лабораторних умовах обраного складу для лікарського засобу ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг**

Напрацювання лабораторних серій лікарського засобу ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг проведена з використанням діосміну виробництва Chengdu Oka Pharmaceutical Co. Ltd, Китай, 70% етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus*. Співвідношення компонентів наведено в таблиці 4.18.

**Проведення технологічного процесу**

*Приготування суміші АФІ.* В змішувач завантажують діосмін і екстракт цикорію. Перемішують при кімнатній температурі до повного змішування.

*Приготування супозиторної основи.* Компоненти основи завантажують в реактор 1 з мішалкою та підігрівом, перемішують до повного розплавлення та змішування.

*Приготування супозиторної маси.* В супозиторну основу поступово додають суміш АФІ, перемішують і гомогенізують.

*Дозування та формування супозиторіїв.* Стрипи заповнюють супозиторною масою, герметизують та охолоджують. Зразки лабораторної серії направляють на проведення випробувань на відповідність вимогам проекту МКЯ.

Результати контролю лабораторної серії на відповідність вимогам проекту МКЯ представлені в таблиці 4.19.

Таблиця 4.19 - Результати контролю лабораторної серії на відповідність вимогам проекту МКЯ

Показник	Вимоги проекту МКЯ	Результати контролю
<b>Опис</b>	Торпедоподібні супозиторії світло-коричневого кольору з жовтувато-сіруватим відтінком	Відповідає
<b>Ідентифікація:</b> - діосмін	<b>А.</b> Інфрачервона абсорбційна спектрофотометрія (Ph. Eur.9, 2.2.24) <b>В.</b> Основний пік хроматограми, отриманої з випробувальним розчином, схожий за часом утримування та розміром до основного піку в хроматограмі, отриманому з еталонним розчином (а)	Відповідає  Відповідає
- екстракт цикорію	<b>А.</b> Визначення вмісту рутину за допомогою ультрафіолетової спектрофотометрії, вміст повинен збігатися з еталоном	Відповідає

Показник	Вимоги проекту МКЯ	Результати контролю
<b>Однорідність вмісту діючої речовини</b>	Повинні витримувати вимоги (Ph. Eur.9, 2.9.6)	Відповідає
<b>Однорідність маси</b>	Повинні витримувати вимоги (Ph. Eur.9, 2.9.5)	Відповідає
<b>Розпадання</b>	Повинні витримувати вимоги (Ph. Eur.9, 2.9.2)	Відповідає
<b>Супровідні домішки:</b> <b><u>-діосмін:</u></b> - домішка A: - домішка B: - домішка C: - домішка D - домішка E: - домішка F:  - будь яка інша домішка та домішка A: - сума домішок:	Не більше 0,5 % (Ph. Eur., 2.2.29); Не більше 4 % (Ph. Eur., 2.2.29); Не більше 3 % (Ph. Eur., 2.2.29); Не більше 0,6 % (Ph. Eur., 2.2.29); Не більше 3 % (Ph. Eur., 2.2.29); Не більше 2 % (Ph. Eur., 2.2.29);  Не більше 0,4 % (Ph. Eur., 2.2.29); Не більше 8,5 % (Ph. Eur., 2.2.29).	Відповідає Відповідає Відповідає Відповідає Відповідає Відповідає  Відповідає Відповідає
<b>Мікробіологічна чистота</b>	Критерії прийнятності: Загальна кількість аеробних мікроорганізмів (ТАМС) – $10^3$ КУО в 1 г. Загальна кількість дріжджових цвілевих грибів (ТУМС) – $10^2$ КУО в 1 г.	< 1000 КУО  < 100 КУО
<b>Кількісне визначення</b> - діосміну - екстракту цикорію	Від 0,1583 г до 0,1750 г, в перерахунку на середню масу вмісту супозиторія у контейнері Від 0,0158 г до 0,0175 г, в перерахунку на середню масу вмісту супозиторія у контейнері	Відповідає  Відповідає

### Оцінка результатів

Отримані супозиторії відповідають вимогам нормованих показників.

## 4.2 Розробка лабораторного регламенту приготування лікарського засобу на основі діосміну та етанольного екстракту з *Cichorium intybus*

### 4.2.1 Розробка технологічного процесу

Оптимальний метод виготовлення лікарського засобу ДГ, супозиторії ректальні по 500 мг, враховуючи особливості та основні характеристики активних фармацевтичних інгредієнтів діосміну та екстракту цикорію визначено на етапі вибору технології і кількісного складу лікарського засобу. Це – приготування супозиторної маси в реакторі з мішалкою та підогрівом, що забезпечує належні фізико-хімічні та фармако-технологічні показники якості препарату.

Розробка технологічного процесу проведена з використанням лабораторного обладнання:

- *лабораторних ваг* з точністю до третього знака для зважування сировини;
- *лабораторного змішувача* для приготування суміші діосміну та екстракту цикорію;
- *лабораторного реактора з мішалкою та підогрівом* для приготування супозиторної основи та напрацювання супозиторної маси.

Контроль критичних параметрів в процесі змішування АФІ – візуально, приготування супозиторної основи – візуально, температура; отримання супозиторної маси - візуально, час, температура.

На даному етапі розробки технологічного процесу проведено напрацювання трьох лабораторних серій лікарського засобу ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг з використанням діосміну виробництва Chengdu Okay Pharmaceutical Co. Ltd, Китай, 70% етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus*. Лабораторна рецептура наведена в таблиці 4.20.

Таблиця 4.20 – Лабораторна рецептура

Сировина	Склад на 1 супозиторій		Маса компонентів (для одержання 60,0 г супозиторної маси, без урахування втрат)
	г	%	г
Діосмін	0,45	15,0	9
Екстракт цикорію	0,05	1,66	1
Твердий жир Suprocire NA 15	1,25	41,67	25
Твердий жир Suprocire NAS 50	1,25	41,67	25
<b>Всього, г :</b>	<b>3</b>	<b>100,0</b>	<b>60</b>

### Опис критичних стадій і параметрів процесу

#### Стадія 1. Підготовка сировини

Параметри	Регламентовано, г	Фактично, г		
		с. 1	с. 2	с. 3
<b>Маса сировини, кг</b>				
Діосмін	9	9	9	9
Екстракт цикорія	1	1	1	1
Твердий жир Suprocire NA 15	25	25	25	25
Твердий жир Suprocire NAS 50	25	25	25	25

#### Стадія 2 Приготування суміші АФІ

Параметри	Регламентовано	Фактично		
		с. 1	с. 2	с. 3
<b>Діосмін, екстракт цикорія зі стадії 1</b>				
Повнота змішування	Візуально	Візуально	Візуально	Візуально
Час	10 – 15 хв	10 – 15 хв	10 – 15 хв	10 – 15 хв

### Стадія 3 Приготування супозиторної основи

Параметри	Регламентовано	Фактично		
		с. 1	с. 2	с. 3
<b>Твердий жир Suprocire NA 15 та Твердий жир Suprocire NAS 50 зі стадії 1)</b>				
Повнота змішування	Візуально	Візуально	Візуально	Візуально
Час, хв	10 – 15 хв	10 – 15 хв	10 – 15 хв	10 – 15 хв
Температура, °С	50±1	50±1	50±1	50±1

### Стадія 4 Приготування супозиторної маси

Параметри	Регламентовано	Фактично		
		с. 1	с. 2	с. 3
<b>Суміш АФІ зі стадії 2. Супозиторна основа зі стадії 3</b>				
Повнота змішування	Візуально	Візуально	Візуально	Візуально
Час, хв	15 – 20 хв	15 – 20 хв	15 – 20 хв	15 – 20 хв
Температура, °С	50±1	50±1	50±1	50±1

### Стадія 5 Пакування та герметизація

Параметри	Регламентовано	Фактично		
		с. 1	с. 2	с. 3
<b>Дозування напівпродукта зі стадії 4 у стрипи</b>				
Середня маса, г	3± 0,15	3± 0,15	3± 0,15	3± 0,15
Герметичність	Візуально	Візуально	Візуально	Візуально

Результати контролю лабораторних серій по проекту МКЯ лікарських засобів наведено в табл. 3.2



Таблиця 4.21 – Результати контролю лабораторних серій

Показники якості	Критерії прийнятності	Результати контролю ДЦ супозиторії ректальні по 500 мг
<b>Опис</b>	Торпедоподібні супозиторії світло-коричневого кольору з жовтувато-сіруватим відтінком	Відповідає
<b>Ідентифікація:</b> - діосмін  - екстракт цикорію	<b>А.</b> Інфрачервона абсорбційна спектрофотометрія (Ph. Eur.9, 2.2.24) <b>В.</b> Основний пік хроматограми, отриманої з випробувальним розчином, схожий за часом утримування та розміром до основного піку в хроматограмі, отриманому з еталонним розчином (а)  <b>А.</b> Визначення вмісту рутину за допомогою ультрафіолетової спектрофотометрії, вміст повинен збігатися з еталоном	Відповідає  Відповідає  Відповідає
<b>Однорідність вмісту діючої речовини</b>	Повинні витримувати вимоги (Ph. Eur.9, 2.9.6)	Відповідає
<b>Однорідність маси</b>	Повинні витримувати вимоги (Ph. Eur.9, 2.9.5)	Відповідає
<b>Розпадання</b>	Повинні витримувати вимоги (Ph. Eur.9, 2.9.2)	Відповідає
<b>Супровідні домішки:</b> <b>-діосмін:</b> - домішка А: - домішка В: - домішка С: - домішка D - домішка E: - домішка F: - будь яка інша домішка та домішка А: - сума домішок:	Не більше 0,5 % (Ph. Eur., 2.2.29); Не більше 4 % (Ph. Eur., 2.2.29); Не більше 3 % (Ph. Eur., 2.2.29); Не більше 0,6 % (Ph. Eur., 2.2.29); Не більше 3 % (Ph. Eur., 2.2.29); Не більше 2 % (Ph. Eur., 2.2.29);  Не більше 0,4 % (Ph. Eur., 2.2.29); Не більше 8,5 % (Ph. Eur., 2.2.29).	Відповідає Відповідає Відповідає Відповідає Відповідає Відповідає  Відповідає Відповідає
<b>Мікробіологічна чистота</b>	Критерії прийнятності: Загальна кількість аеробних мікроорганізмів (ТАМС) – $10^3$ КУО в 1 г. Загальна кількість дріжджових цвілевих грибів (ТУМС) – $10^2$ КУО в 1 г.	< 1000 КУО  < 100 КУО

#### **4.2.2. Технологічна схема та опис технологічного процесу**

За результатами розробки технологічного процесу приготування лікарського засобу ДГ, супозиторії ректальні по 500 мг в лабораторних умовах описано технологічний процес та оформлена технологічна схема виробництва лікарського засобу ДГ, супозиторії ректальні по 500 мг з урахуванням вимог належної виробничої практики GMP.

##### **Опис стадій технологічного процесу**

###### **Стадія 1. Підготовка сировини**

Активні фармацевтичні інгредієнти, які відповідають показникам якості, зважуються на електронних вагах.

Допоміжна сировина, яка відповідає показникам якості, зважується на електронних вагах.

###### **Стадія 2. Приготування суміші АФІ**

В змішувач завантажують діосмін і екстракт цикорію, перемішують при кімнатній температурі до утворення однорідної маси.

###### **Стадія 3. Приготування супозиторної основи**

В реактор з мішалкою та підогрівом завантажують твердий жир Suprocire NA 15 та твердий жир Suprocire NAS 50, розплавляють при температурі  $(50 \pm 1)$  °C і перемішують до утворення гомогенної маси.

###### **Стадія 4. Приготування супозиторної маси**

В розплавлену супозиторну масу зі стадії 3 при перемішуванні поступово завантажують суміш АФІ зі стадії 2, перемішують до утворення однорідної супозиторної маси.

###### **Стадія 5. Пакування та герметизація**

Пакування і герметизацію супозиторіїв проводять на устаткуванні для заповнення і герметизації однодозових супозиторних контейнерів.

### **Стадія 6. Пакування в пачки**

Пакування в пачки 2-х стрипів (1 стрип містить 5 заповнених однодозових контейнерів) та інструкції по медичному застосуванню проводять вручну за пакувальним столом або на машині для упаковки в пачки.

### **Стадія 7. Пакування в короба**

Упаковку пачок в короба здійснюють вручну за пакувальним столом. Заповнений короб оклеюють лентою (скотчем) с логотипом. Прозорим скотчем до коробки приклеюють етикетку групової тари.

### **Контроль процесу**

Контроль виробничого процесу представлено на технологічній схемі (рис. 4.1).

### **Система упаковка / закупорювання**

Лікарський засіб ДГ, супозиторії ректальні по 500 мг упаковують по 5 супозиторіїв в 1 стрипі з полімерного матеріалу медичного призначення, по 2 стрипи в картонну коробку разом з інструкцією для медичного застосування.

### **Мікробіологічні характеристики**

Лікарський засіб ДГ, супозиторії ректальні по 500 мг має відповідати критеріям прийнятності мікробіологічної чистоти нестерильних лікарських засобів (ДФУ 5.1.4). Випробування кількісного визначення аеробних мікроорганізмів (ТАМС) і дріжджових і цвілевих грибів (ТУМС) проводять відповідно до вимог Ph. Eur., 2.6.12. Випробування, що дозволяють встановити відсутність *Escherichia coli* в 1 г препарату, проводять відповідно до вимог Ph. Eur., 2.6.12.

Технологічна схема наведена із зазначенням критичних стадій та параметрів контролю процесу.



Критичними стадіями для якості оригінального лікарського засобу ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг є стадії підготовки сировини, приготування суміші активних фармацевтичних інгредієнтів, приготування супозиторної основи, супозиторної маси, пакування та герметизації супозиторіїв і пакування супозиторіїв у пачки.

#### **4.3 Результати випробування на хімічну сумісність та стабільність компонентів лікарського засобу на основі діосміну та етанольного екстракту з *Cichorium intybus***

Вивчення стабільності лікарських засобів є одним з основоположних питань системи забезпечення якості, адже стабільність – це показник якості лікарських препаратів, який забезпечує збереження їхніх терапевтичних властивостей упродовж декількох років у процесі зберігання [127, 169]. Відповідно до діючого законодавства розвинених країн світу, правил Належної виробничої практики одним з обов'язків виробника є дослідження стабільності, які необхідно здійснювати вже на етапі розроблення активної речовини та ЛЗ.

Ціль проведення випробування стабільності – отримання даних про зміну якості діючої речовини або ЛЗ з плином часу під впливом різних факторів оточуючого середовища, таких як температура, вологість та світло, а також встановлення рекомендованих умов зберігання та періоду проведення повторних випробувань для діючої речовини або строку зберігання для ЛЗ [127].

У даній роботі проведено прискорені випробування на хімічну сумісність та стабільність розробленого лікарського засобу супозиторії ДЦ та окремих його складових, які були поєднані між собою у бінарні суміші у всіх можливих комбінаціях (розділ 2.10). Прискорені дослідження хімічної сумісності та стабільності засновані на стрес-тестуванні досліджуваних зразків за температури  $40 \pm 2$  °C та відносної вологості  $75 \pm 5\%$  упродовж 6 місяців у закритих флаконах.

Аналіз здійснювали на основі даних отриманих до початку випробування та в точках контролю через 3 та 6 місяців.

Усі дослідження виконано за умов зберігання встановлених згідно Настанови 42-3.3:2004 «Лікарські засоби. Випробування стабільності» [127].

#### 4.3.1 Матеріали та методи

На початку проведення досліджень щодо хімічної сумісності компонентів та стабільності було виготовлено супозиторії, а також бінарні суміші на основі АФІ та фармацевтичних допоміжних речовин, які входять до складу ЛЗ, у всіх можливих комбінаціях. Склад бінарних сумішей, які піддавалися дослідженням щодо хімічної сумісності компонентів та стабільності, представлено в таблиці 4.22.

Таблиця 4.22 – Склад бінарних сумішей для проведення досліджень щодо хімічної сумісності компонентів та стабільності

№ бінарної суміші	Склад
1	Діосмін та екстракт з «волохатих» коренів <i>Cichorium intybus</i>
2	Діосмін та твердий жир Suprocire NA 15
3	Діосмін та твердий жир Suprocire NAS 50
4	Екстракт з «волохатих» коренів <i>Cichorium intybus</i> та твердий жир Suprocire NA 15
5	Екстракт з «волохатих» коренів <i>Cichorium intybus</i> та твердий жир Suprocire NAS 50
6	Твердий жир Suprocire NA 15 та твердий жир Suprocire NAS 50

Випробування стабільності супозиторіїв ДЦ та бінарних сумішей проводили в кліматичній камері HPP 750 (Memmert GmbH+Co.KG, Німеччина), призначеній для зберігання лікарських засобів при заданих умовах (за температури  $40 \pm 2$  °C та відносної вологості  $75 \pm 5\%$  упродовж 6 місяців). Температура всередині кліматичної камери може регулюватися в діапазоні від 5 до 70 °C, а вологість від 10 до 90 %. Робота кліматичної камери регулюється в ручному режимі або автоматично, за допомогою програми AtmoCONTROL.

Для контролю можливих змін у хімічному складі ЛЗ використовували метод інфрачервоної спектроскопії з Фур'є перетворенням, як описано в пункті 2.11, та УФ-спектрофотометричний метод визначення вмісту АФІ в ЛЗ, як описано в пункті 2.12.

#### **4.3.2 Результати контролю фізичної стабільності за органолептичними показниками**

З метою доведення фізичної стабільності розробленого лікарського засобу супозиторіїв ДЦ фіксували чи відбуваються зміни органолептичних показників як супозиторіїв, так і окремих комбінацій компонентів (бінарних сумішей), які піддавалися експозиції в кліматичній камері за температури  $40 \pm 2$  °C і відносної вологості  $75 \pm 5\%$  упродовж 6 місяців. Контроль здійснювали візуально до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців. Результати контролю наведено у таблиці 4.23.

Таблиця 4.23 – Результати візуального контролю змін у зовнішньому вигляді супозиторіїв та бінарних сумішей до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців

№ бінарної суміші	Склад	Опис	Контроль через 3 місяці	Контроль через 6 місяців
1	Діосмін та екстракт з «волохатих» коренів <i>Cichorium intybus</i>	Порошкоподібна суміш жовто-коричневого кольору	Відповідає	Відповідає
2	Діосмін та твердий жир Suprocire NA 15	Пластинчаста суміш темно-жовтого кольору	Відповідає	Відповідає
3	Діосмін та твердий жир Suprocire NAS 50	Пластинчаста суміш жовтого кольору	Відповідає	Відповідає
4	Екстракт з «волохатих» коренів <i>Cichorium intybus</i> та твердий жир Suprocire NA 15	Пластинчаста суміш темно-коричневого кольору	Відповідає	Відповідає
5	Екстракт з «волохатих» коренів <i>Cichorium intybus</i> та твердий жир Suprocire NAS 50	Пластинчаста суміш коричневого кольору	Відповідає	Відповідає
6	Твердий жир Suprocire NA 15 та твердий жир Suprocire NAS 50	Пластинчаста суміш білого кольору	Відповідає	Відповідає
7	Супозиторії ДЦ	Торпедоподібні супозиторії світло-коричневого кольору з жовтувато-сіруватим відтінком, без борозен, щільні	Відповідає	Відповідає

Таким чином за результатами візуального контролю встановлено, що упродовж усього терміну випробувань не спостерігається змін у зовнішньому вигляді як супозиторіїв, так і окремих комбінацій компонентів. Отже, можна зробити висновок про підтвердження фізичної сумісності діючих речовин діосміну



та екстракту *Cichorium intybus* з вибраними фармацевтичними допоміжними речовинами, твердими жирами Suprocire NA 15 та Suprocire NAS 50.

#### 4.3.3 Результати досліджень хімічної сумісності та стабільності за допомогою методу інфрачервоної спектроскопії з Фур'є перетворенням

До початку випробувань та у точках контролю через 3 та 6 місяців реєстрували FTIR-спектри бінарних сумішей та супозиторіїв, а тоді описували отримані спектри за характеристичними смугами поглинання з врахуванням значень частот максимумів поглинання, форми та інтенсивності смуг і співставляли їх з відповідними структурними елементами досліджуваних зразків.

Також до початку випробувань були отримані FTIR-спектри чистих АФІ та допоміжних речовин з метою встановлення характеристичних смуг поглинання для кожної із використовуваних речовин. FTIR-спектри діосміну, екстракту з «волохатих» коренів *Cichorium intybus*, твердого жиру Suprocire NA 15 та твердого жиру Suprocire NAS 50 представлено на рисунках 4.2-4.5.

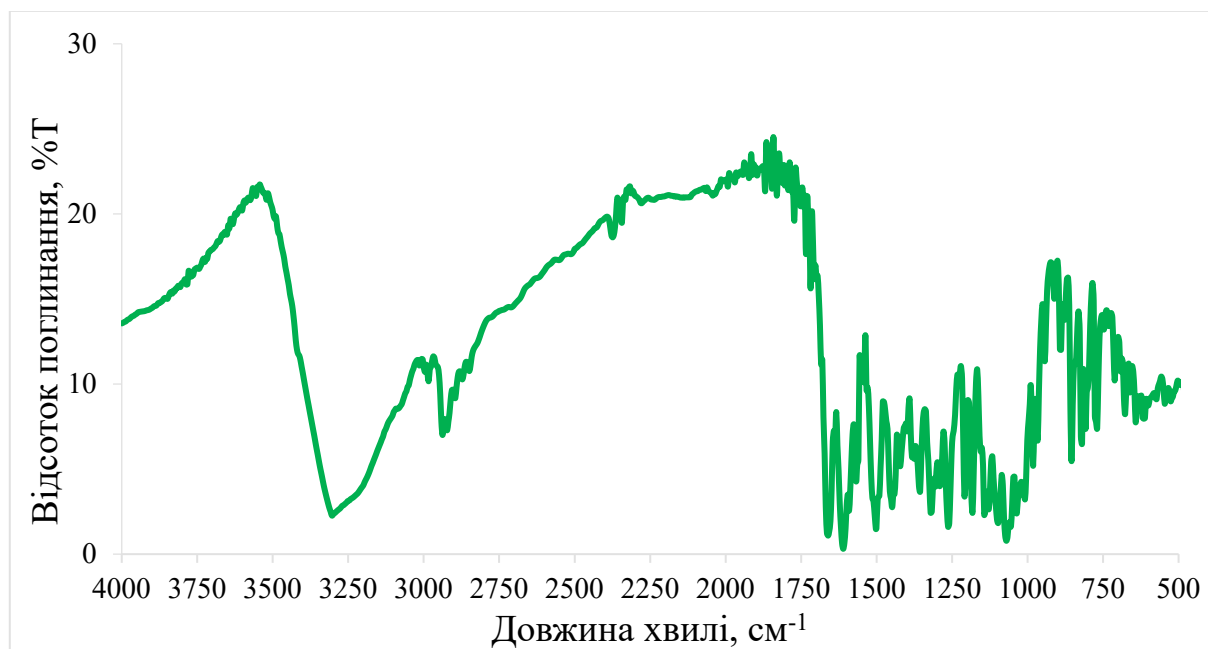


Рисунок 4.2 – FTIR-спектр діосміну

Опис FTIR-спектра діосміну. Перша характерна смуга поглинання знаходиться у діапазоні  $3530\text{--}3000\text{ см}^{-1}$  і вказує наявність водневих зв'язків у сполуці. Наступна смуга поглинання із вершиною у  $2928\text{ см}^{-1}$  відповідає валентним коливанням ароматичних груп C–H.

Характерний пік поглинання також спостерігається при  $1664\text{ см}^{-1}$  внаслідок розтягування ароматичного кетонного карбоніла (коливання груп C=O). Два характерних піки поглинання при  $1611\text{ см}^{-1}$  і  $1502\text{ см}^{-1}$  пов'язані з розтягуванням зв'язку C=C в ароматичному кільці. Смути поглинання в інтервалі  $1250\text{--}1150\text{ см}^{-1}$  вказують на площинні деформаційні коливання зв'язків C<sub>аромат.</sub>–H. А піки поглинання при  $1108$  та  $1070\text{ см}^{-1}$  свідчать про валентні коливання груп –C–O. Це спостереження та висновки узгоджуються з даними, що були отримані дослідниками раніше [170, 171].

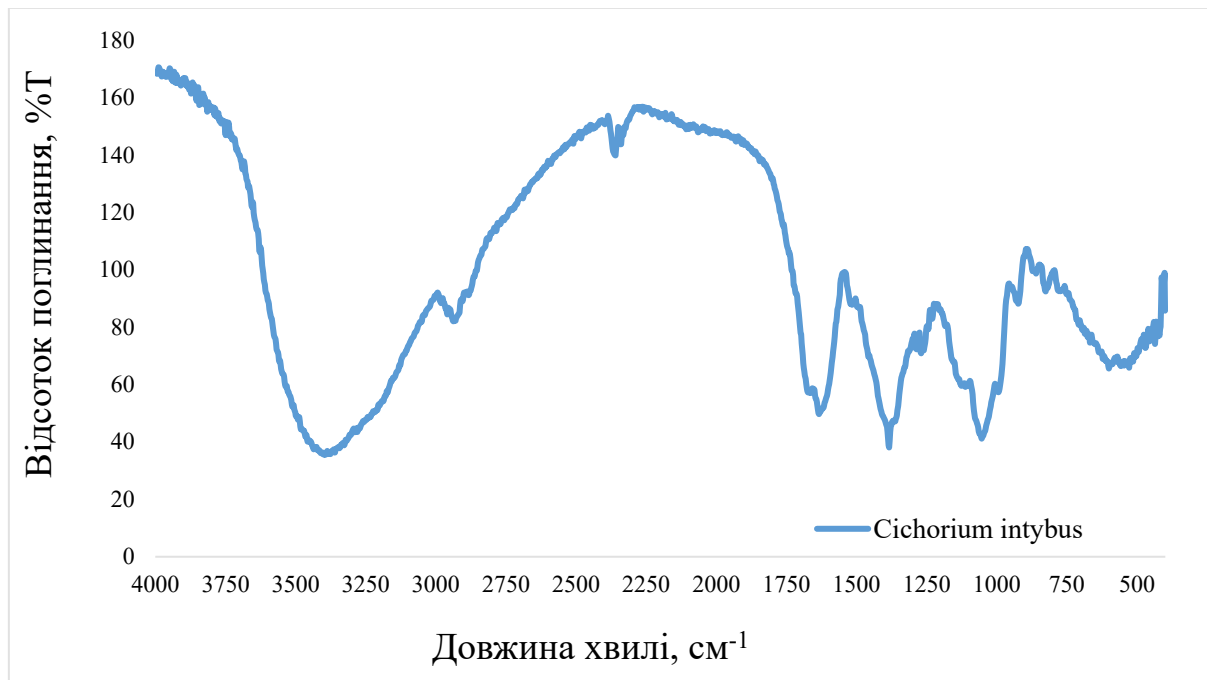


Рисунок 4.3 – FTIR-спектр екстракту з «волохатих» коренів *Cichorium intybus*

*Опис FTIR-спектра екстракту з «волохатих» коренів Cichorium intybus.* У даному спектрі валентні коливання зв'язків O–H представлені дуже широкою смугою з максимумом поглинання при  $3392\text{ см}^{-1}$ .

Смуга поглинання з максимумом при  $2938\text{ см}^{-1}$  та плечем  $2884\text{ см}^{-1}$  відповідають коливанням валентних зв'язків аліфатичних груп C–H. На частоті  $1680\text{--}1600\text{ см}^{-1}$  спостерігаються коливання зв'язків C=O з максимумами  $1670\text{ см}^{-1}$  та  $1636\text{ см}^{-1}$ . Максимум поглинання при  $1384\text{ см}^{-1}$  підтверджує площинні деформаційні коливання ароматичних зв'язків C<sub>аромат.</sub>–H, а пік поглинання при  $1052\text{ см}^{-1}$  свідчать про валентні коливання груп –C–O [172, 173].

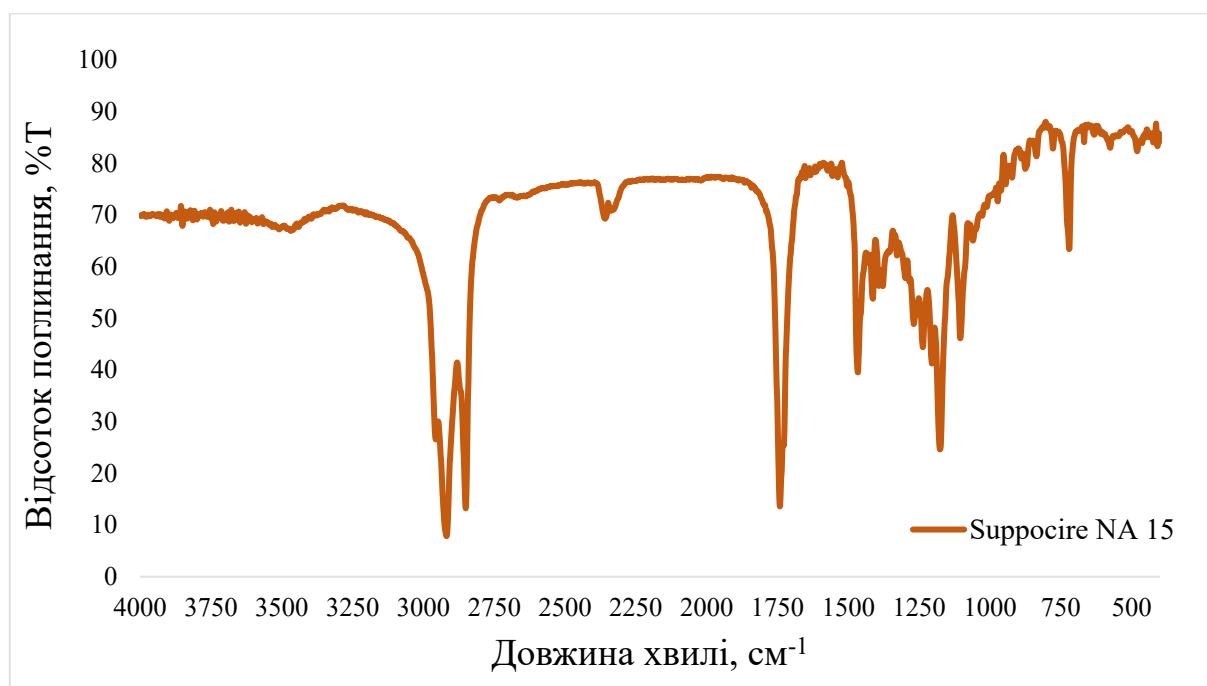


Рисунок 4.4 – FTIR-спектр твердого жиру Suprocire NA 15

*Опис FTIR-спектру твердого жиру Suprocire NA 15.* У FTIR-спектрі на частоті  $3000\text{--}2750\text{ см}^{-1}$  присутні смуги поглинання валентних зв'язків аліфатичних груп C–H, з максимумами поглинання при  $2921$  і  $2851\text{ см}^{-1}$ . Смуга поглинання зв'язків C=O має максимум на частоті  $1742\text{ см}^{-1}$ . Деформаційні коливання зв'язків C–H наявні на частоті  $1500\text{--}1300\text{ см}^{-1}$  з максимумами на  $1466$ ,  $1414$ ,  $1378\text{ см}^{-1}$  – смуги

середньої та середньо-високої інтенсивності. Смуги поглинання в інтервалі 1300-950  $\text{cm}^{-1}$  відповідають площинним деформаційним коливанням зв'язків  $\text{C}_{\text{аромат.}}-\text{H}$  та валентних коливанням груп  $-\text{C}-\text{O}$  [129].



Рисунок 4.5 – FTIR-спектр твердого жиру Suprocire NAS 50

*Опис FTIR-спектру твердого жиру Suprocire NAS 50.* У спектрі присутня смуга поглинання валентних коливань аліфатичних груп  $\text{C}-\text{H}$  на частоті 3000-2750  $\text{cm}^{-1}$  з максимумами поглинання при 2917 і 2852  $\text{cm}^{-1}$ . Смуга поглинання з максимумом 1740  $\text{cm}^{-1}$  відповідає коливанням зв'язків  $\text{C}=\text{O}$ . Деформаційні коливання зв'язків  $\text{C}-\text{H}$  представлені смугами середньої та середньо-високої інтенсивності, які мають максимуми на 1467, 1412, 1392, 1379  $\text{cm}^{-1}$ . Площинним деформаційним коливанням зв'язків  $\text{C}_{\text{аромат.}}-\text{H}$  відповідають смуги поглинання в інтервалі 1220-950  $\text{cm}^{-1}$ .

Наступним кроком був аналіз FTIR-спектрів бінарних сумішей та супозиторіїв до початку випробувань та порівняння з ними спектрів, які отримано впродовж прискорених випробувань у точках контролю через 3 та 6 місяців.

На рисунку 4.6 представлено FTIR-спектри бінарної суміші №1 до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців.

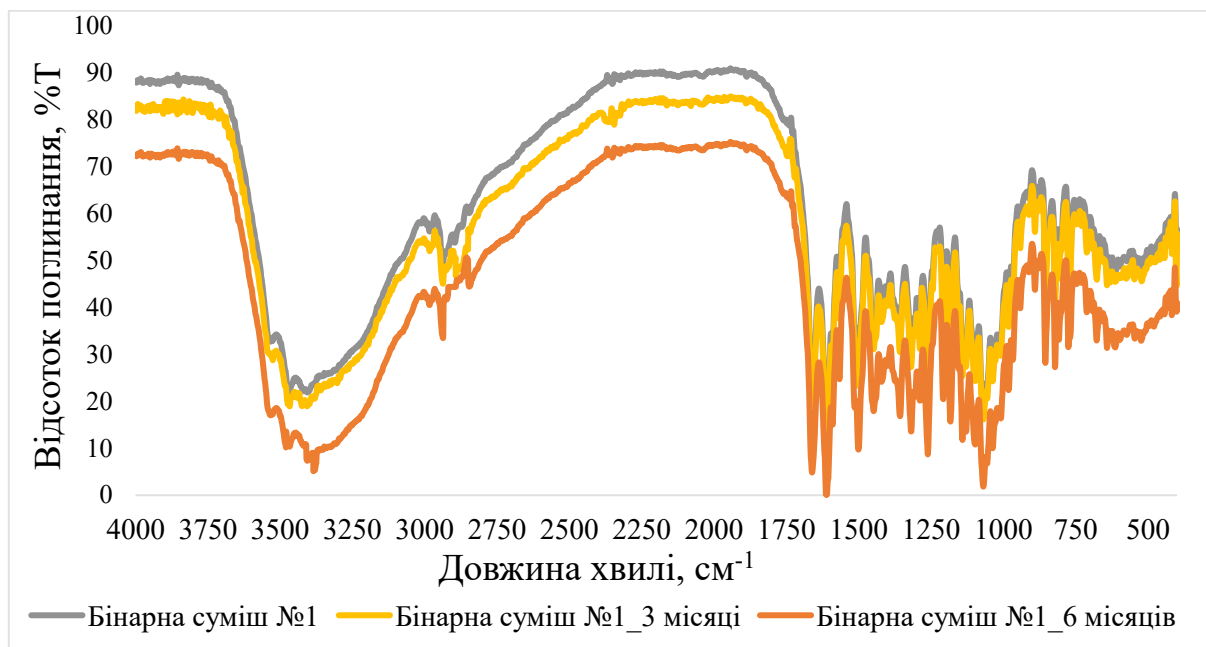


Рисунок 4.6 – FTIR-спектри бінарної суміші №1 до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців

З рисунку видно, що у FTIR-спектрі бінарної суміші №1 деякі максимуми поглинання походять від діосміну, а деякі характерні для екстракту з «волохатих» коренів *Cichorium intybus*. Максимуми характеристичних смуг поглинання бінарної суміші №1 до початку випробування та у точках контролю через 3 та 6 місяців представлено у таблиці 4.24.

Таблиця 4.24 – Максимуми характеристичних смуг поглинання бінарної суміші №1 до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців

Назва групи	Частота максимуму, $\text{cm}^{-1}$		
	До випробування	Через 3 місяці	Через 6 місяців
О–Н	3537, 3480, 3391	3539, 3478, 3393	3539, 3473, 3392
Валентні С–Н	2933, 2852	2935, 2853	2938, 2852
С=О	1664	1664	1662
С=С	1615, 1503	1614, 1502	1614, 1502
Деформаційні С–Н	1449, 1359, 1323	1449, 1359, 1321	1448, 1358, 1320
–С–О	1048	1050	1052

На рисунку 4.7 зображено FTIR-спектри бінарної суміші №2 до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців.

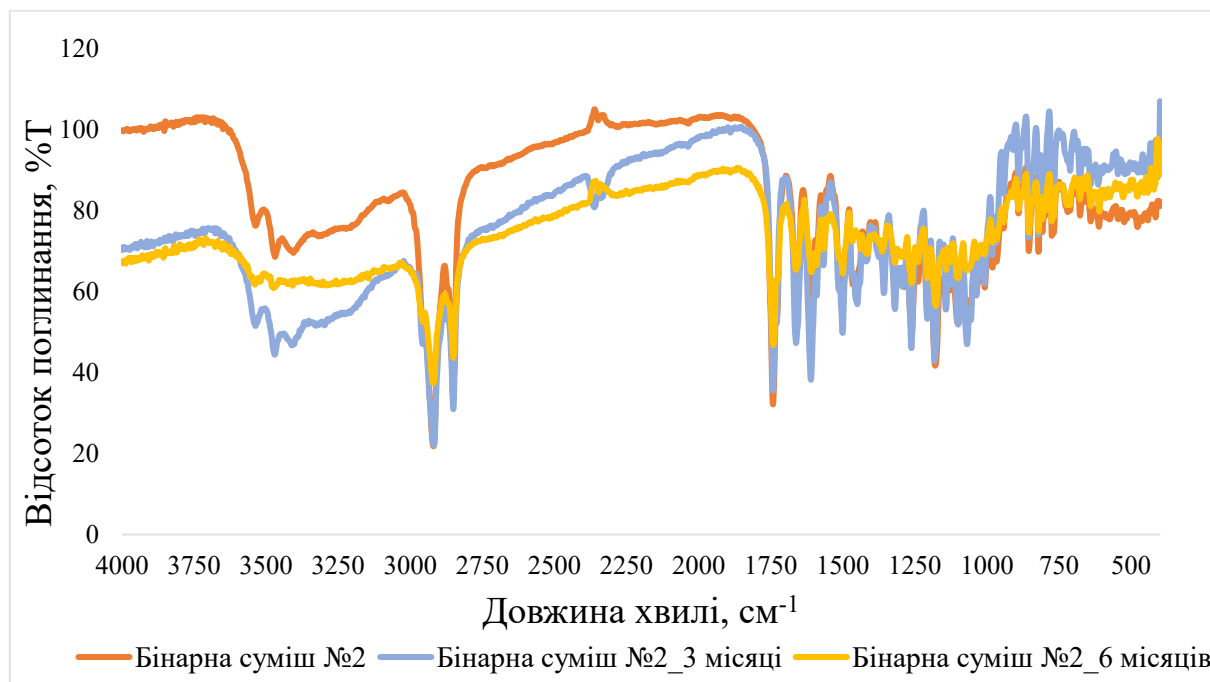


Рисунок 4.7 – FTIR-спектри бінарної суміші №2 до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців

У FTIR-спектрах бінарної суміші №2 можна відстежити наявність характерних для діосміну та твердого жиру Suprocire NA 15 максимумів поглинання.

Максимуми характеристичних смуг поглинання бінарної суміші №2 до початку випробування та у точках контролю через 3 та 6 місяців представлено у таблиці 4.25.

Таблиця 4.25 – Максимуми характеристичних смуг поглинання бінарної суміші №2 до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців

Назва групи	Частота максимуму, $\text{cm}^{-1}$		
	До випробування	Через 3 місяці	Через 6 місяців
О–Н	3536, 3470, 3408	3538, 3470, 3410	3540, 3472, 3410
Валентні С–Н	2919, 2852	2919, 2851	2921, 2849
С=О	1742, 1662	1742, 1662	1742, 1660
С=С	1611, 1504	1610, 1503	1610, 1503
Деформаційні С–Н	1449, 1357, 1319	1449, 1357, 1319	1448, 1356, 1321
–С–О	1068	1068	1070

На рисунку 4.8 наведено FTIR-спектри бінарної суміші №3 до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців.

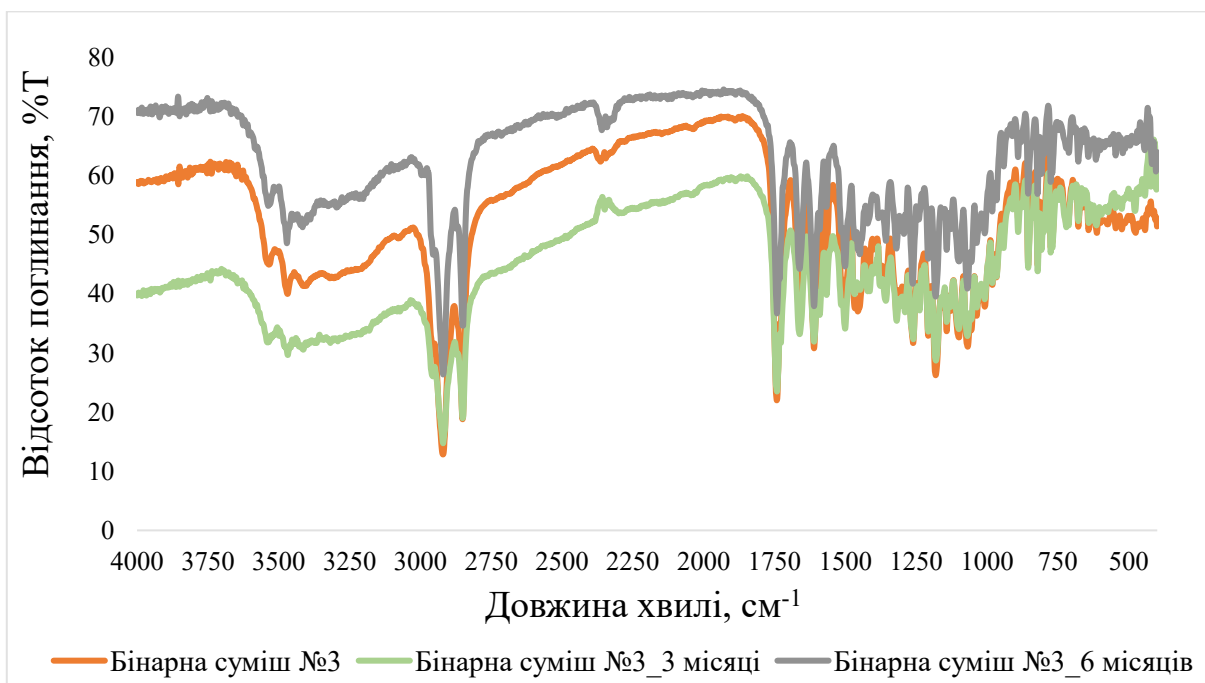


Рисунок 4.8 – FTIR-спектри бінарної суміші №3 до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців

У FTIR-спектрі бінарної суміші №3 деякі максимуми поглинання походять від діосміну, деякі – від твердого жиру Suprocire NAS 50. Максимуми характеристичних смуг поглинання бінарної суміші №3 до початку випробування та у точках контролю через 3 та 6 місяців представлено у таблиці 4.26.

Таблиця 4.26 – Максимуми характеристичних смуг поглинання бінарної суміші №3 до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців

Назва групи	Частота максимуму, $\text{cm}^{-1}$		
	До випробування	Через 3 місяці	Через 6 місяців
О–Н	3538, 3468, 3406	3539, 3468, 3408	3540, 3472, 3411
Валентні С–Н	2918, 2852	2918, 2852	2919, 2851
С=О	1742, 1661	1742, 1661	1741, 1660



C=C	1612, 1502	1610, 1504	1610, 1504
Деформаційні C–H	1448, 1356, 1319	1450, 1353, 1322	1452, 1350, 1320
–C–O	1070	1070	1072

На рисунку 4.9 зображено FTIR-спектри бінарної суміші №4 до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців.

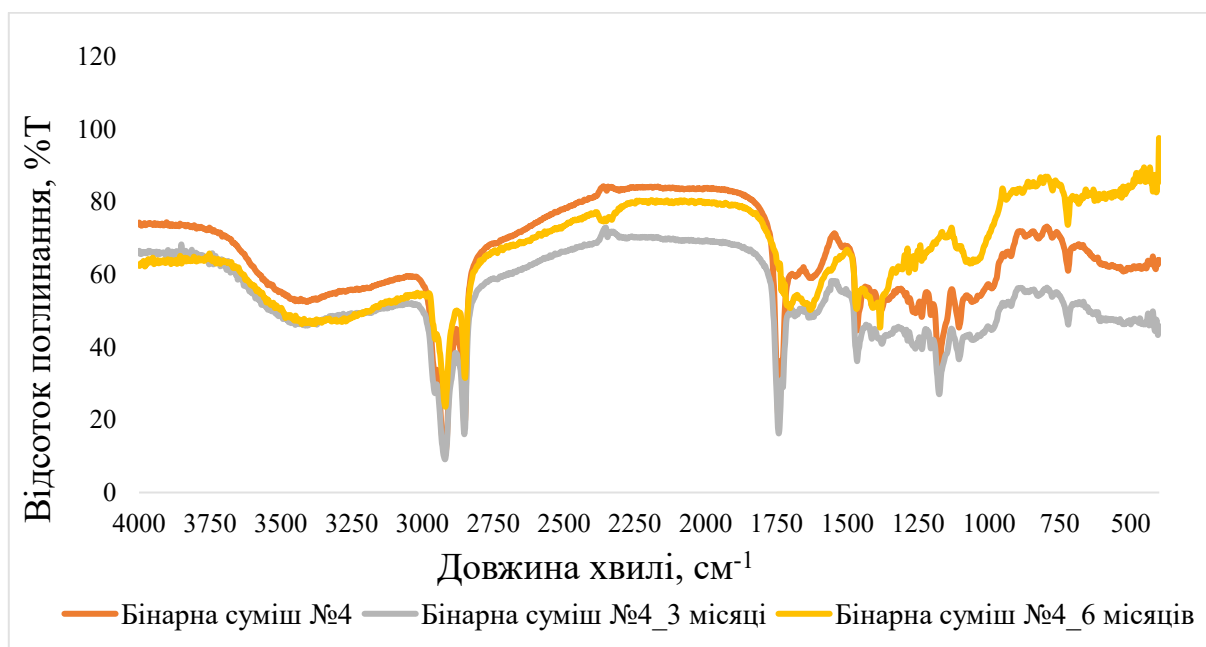


Рисунок 4.9 – FTIR-спектри бінарної суміші №4 до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців

У FTIR-спектрі бінарної суміші №4 можна відзначити наявність максимумів поглинання, які характерні для екстракту з «волохатих» коренів *Cichorium intybus* та твердого жиру Suprocire NA 15. Максимуми характеристичних смуг поглинання бінарної суміші №4 до початку випробування та у точках контролю через 3 та 6 місяців представлено у таблиці 4.27.

Таблиця 4.27 – Максимуми характеристичних смуг поглинання бінарної суміші №4 до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців

Назва групи	Частота максимуму, $\text{cm}^{-1}$		
	До випробування	Через 3 місяці	Через 6 місяців
O–H	3396	3401	3405
Валентні C–H	2922, 2852	2922, 2852	2920, 2840
C=O	1742, 1661	1742, 1661	1741, 1660
C=C	1618	1623	1625
Деформаційні C–H	1465, 1383	1467, 1383	1470, 1387
–C–O	1106	1102	1100

На рисунку 4.10 представлено FTIR-спектри бінарної суміші №5 до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців.

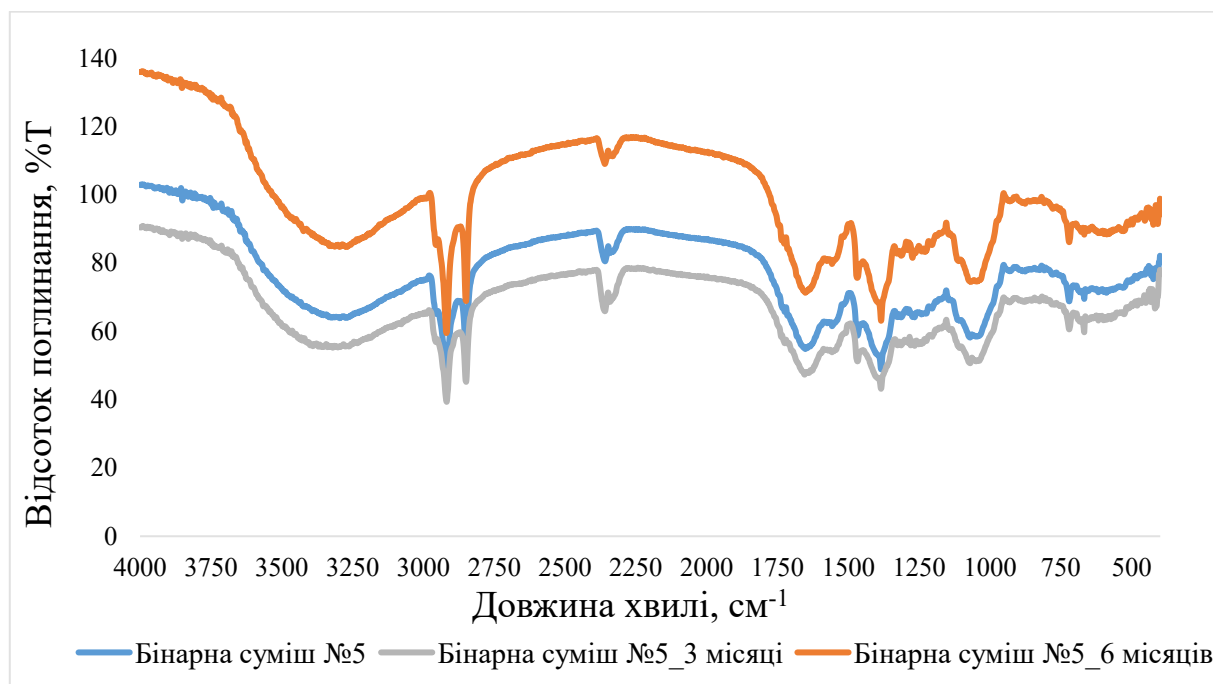


Рисунок 4.10 – FTIR-спектри бінарної суміші №5 до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців

У FTIR-спектрі бінарної суміші №5 присутні максимуми поглинання, які характерні як для екстракту з «волохатих» коренів *Cichorium intybus*, так і для твердого жиру Suprocire NAS 50. Максимуми характеристичних смуг поглинання бінарної суміші №4 до початку випробування та у точках контролю через 3 та 6 місяців представлено у таблиці 4.28.

Таблиця 4.28 – Максимуми характеристичних смуг поглинання бінарної суміші №5 до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців

Назва групи	Частота максимуму, см <sup>-1</sup>		
	До випробування	Через 3 місяці	Через 6 місяців
О–Н	3392	3398	3400
Валентні С–Н	2919, 2850	2919, 2850	2916, 2851
С=О	1655	1654	1652
С=С	1559	1559	1558
Деформаційні С–Н	1470, 1385	1470, 1383	1470, 1382
–С–О	1055	1055	1053

На рисунку 4.11 представлено FTIR-спектри бінарної суміші №6 до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців.

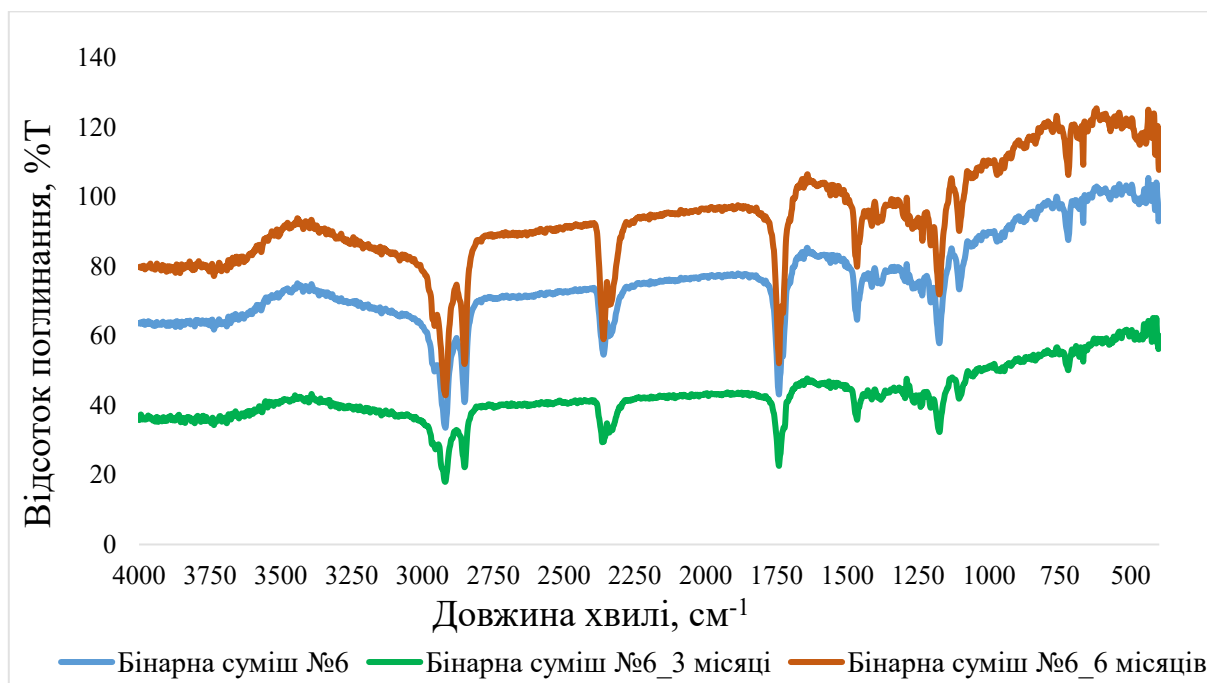


Рисунок 4.11 – FTIR-спектри бінарної суміші №6 до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців

У FTIR-спектрі бінарної суміші №6 до початку випробування та у точках контролю через 3 та 6 місяців можна відстежити наявність характерних для твердих жирів Suprocire NA 15, Suprocire NAS 50 максимумів поглинання. Максимуми характеристичних смуг поглинання бінарної суміші №6 представлено у таблиці 4.29.

Таблиця 4.29 – Максимуми характеристичних смуг поглинання бінарної суміші №6 до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців

Назва групи	Частота максимуму, $\text{cm}^{-1}$		
	До випробування	Через 3 місяці	Через 6 місяців
Валентні С–Н	2920, 2852	2919, 2852	2919, 2851
С=О	1706	1704	1704
Деформаційні С–Н	1467, 1385	1467, 1383	1467, 1382
–С–О	1176	1174	1174

На рисунку 4.12 представлено FTIR-спектри супозиторіїв ДЦ до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців.

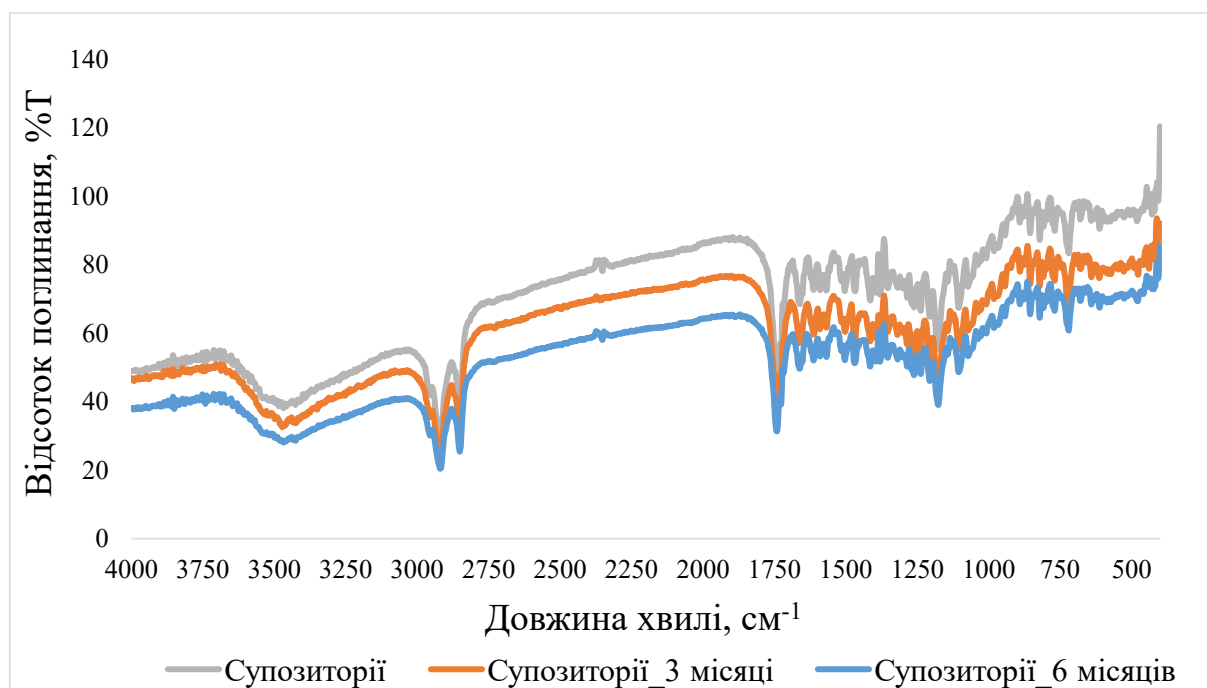


Рисунок 4.12 – FTIR-спектри супозиторіїв до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців

У FTIR-спектрах супозиторіїв можна відзначити наявність характерних для АФІ та допоміжних речовин діапазонів смуг поглинання та максимумів поглинання.

Максимуми характеристичних смуг поглинання супозиторіїв до початку випробування та у точках контролю через 3 та 6 місяців наведено у таблиці 4.30.

Таблиця 4.30 – Максимуми характеристичних смуг поглинання супозиторіїв до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців

Назва групи	Частота максимуму, $\text{cm}^{-1}$		
	До випробування	Через 3 місяці	Через 6 місяців
O–H	3529, 3484, 3399	3533, 3484, 3398	3532, 3484, 3398
Валентні C–H	2920, 2852	2919, 2852	2917, 2850
C=O	1742, 1662	1741, 1662	1739, 1661
C=C	1614, 1504	1612, 1501	1614, 1501
Деформаційні C–H	1471, 1414, 1381	1472, 1415, 1383	1472, 1415, 1384
–C–O	1103	1105	1105

Згідно отриманих даних, які представлені на рисунках 4.2-4.12, та їх порівняльного аналізу, встановлено, що упродовж усього терміну випробування відсутні істотні відмінності у смугах поглинання досліджуваних зразків, а точніше не було зафіксовано великих зсувів, подовжень, розширення чи вкорочення основних характеристичних смуг поглинання. Таким чином на основі проведеного аналізу за допомогою методу інфрачервоної спектроскопії з Фур'є перетворенням можна зробити висновок, що розроблений лікарський засіб у формі супозиторіїв та усі його компоненти являють хімічно сумісними та стабільними у досліджених умовах.

#### 4.3.4 Результати визначення кількісного вмісту АФІ в готовому лікарському засобі

Для визначення терміну придатності супозиторіїв ДЦ виконано аналіз результатів визначення кількісного вмісту АФІ в умовах прискореного дослідження

для трьох дослідно-лабораторних серій, результати дослідження яких наведено в таблиці 4.31.

Таблиця 4.31 – Результати кількісного визначення АФІ в супозиторіях до початку випробувань та в точках контролю через 3 та 6 місяців

Період вивчення	Кількісний вміст АФІ в супозиторіях ДЦ, г	
	Діосмін, г (від 0,440 г до 0,460 г)	Екстракт <i>Cichorium intybus</i> , г (від 0,045 г до 0,055 г)
0 точка	<b>0,449±0,001</b>	<b>0,051±0,001</b>
3 місяці	<b>0,450±0,003</b>	<b>0,050±0,003</b>
6 місяців	<b>0,449±0,003</b>	<b>0,051±0,001</b>

Для підтвердження можливості встановлення терміну придатності препарату супозиторії ДЦ, здійснено статистичне оброблення даних і екстраполяцію за межі періоду прискорених випробувань [169].

На рисунках 4.13-4.14 наведено екстраполяцію експериментальних даних визначення вмісту діючих речовин діосміну та екстракту *Cichorium intybus* в супозиторіях ДЦ в умовах прискорених випробувань.

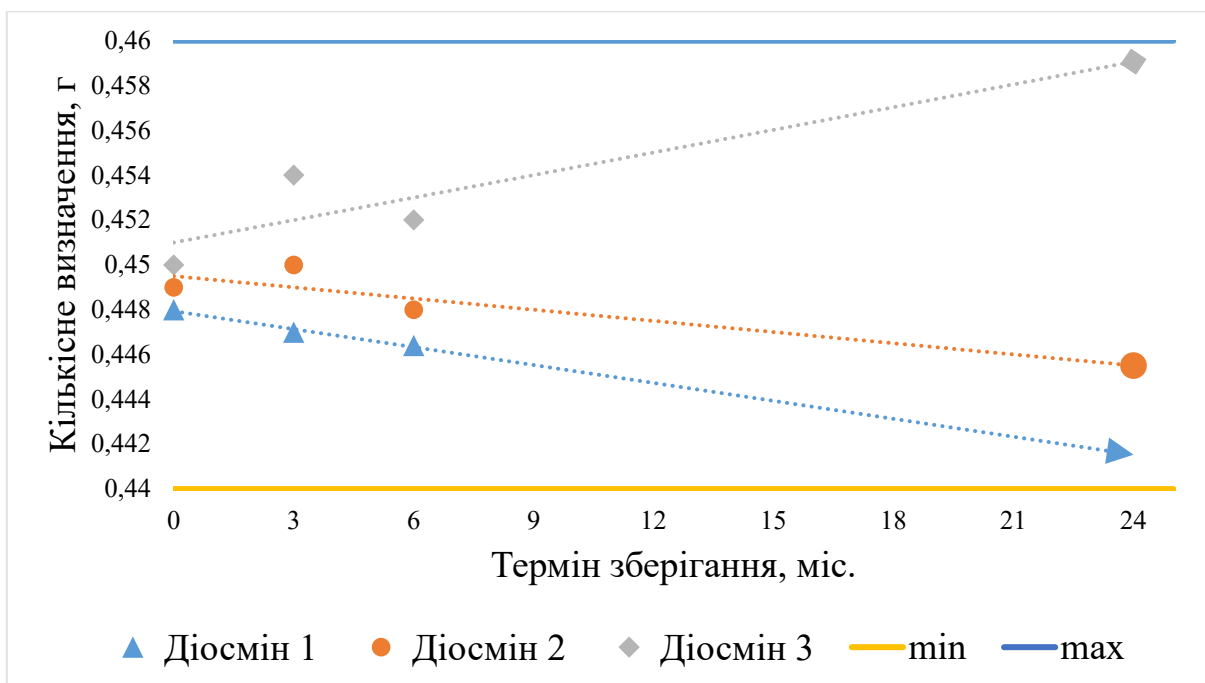


Рисунок 4.13 – Екстраполяція експериментальних даних визначення вмісту діючої речовини діосміну в супозиторіях ДЦ в умовах прискорених випробувань

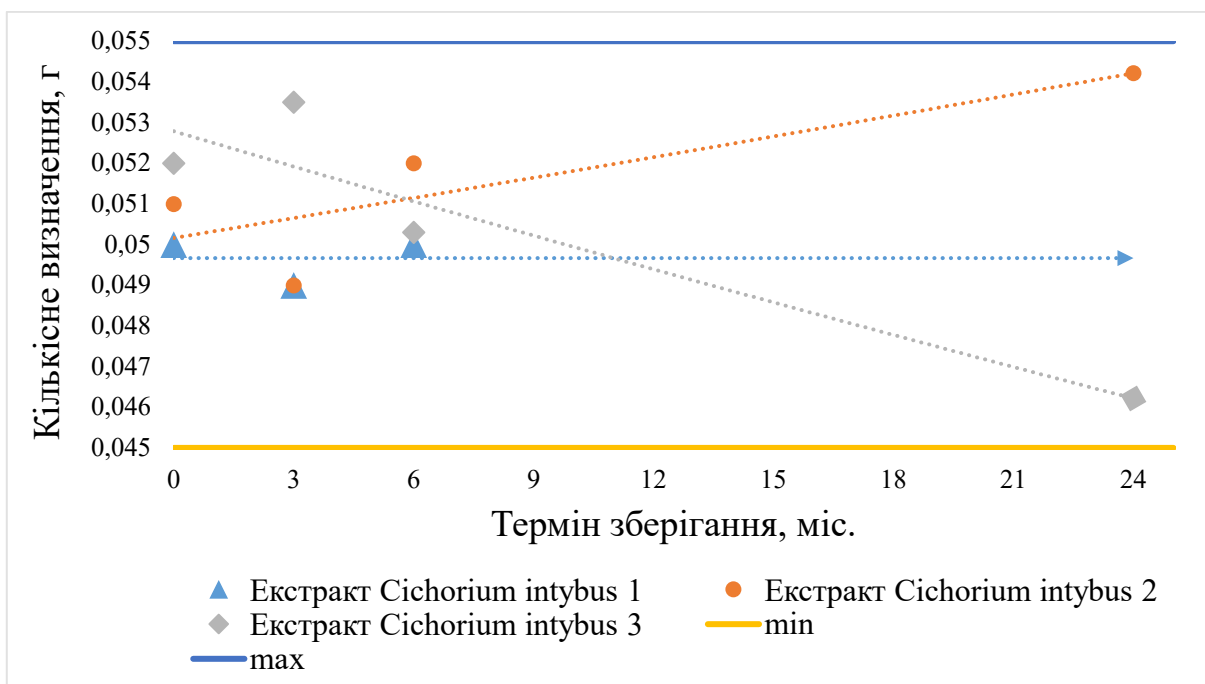


Рисунок 4.14 – Екстраполяція експериментальних даних визначення вмісту діючої речовини екстракту *Cichorium intybus* в супозиторіях ДЦ в умовах прискорених випробувань



Дані екстраполяції досліджень стабільності періоду 6 місяців свідчать про те, що на момент зберігання 24 місяця (2 роки) кількісний вміст діючих речовин в супозиторіях ДЦ знаходиться в межах критерію прийнятності [169].

Отже, ґрунтуючись на результатах комплексних досліджень випробувань щодо хімічної сумісності та стабільності досліджуваних зразків (супозиторіїв ДЦ та бінарних сумішей) в умовах прискорених випробувань протягом 6 місяців за температури  $40 \pm 2$  °C та відносної вологості  $75 \pm 5\%$  можна стверджувати, що умовний термін придатності розробленого лікарського засобу супозиторії ректальні ДЦ становить 2 роки.

#### **Висновки до розділу 4**

За результатами розробки технологічного процесу приготування лікарського засобу ДГ, супозиторії ректальні по 500 мг та з урахуванням вимог належної виробничої практики GMP розроблено лабораторний регламент приготування лікарського засобу ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг, який включає лабораторну рецептуру, опис технологічного процесу, технологічну схему із зазначенням критичних стадій та параметрів контролю в процесі виробництва.

На основі проведеного аналізу за допомогою методу інфрачервоної спектроскопії з Фур'є перетворенням зроблено висновок, що розроблений лікарський засіб у формі супозиторіїв та усі його компоненти являють хімічно сумісними та стабільними у досліджених умовах.

ґрунтуючись на результатах комплексних досліджень випробувань щодо хімічної сумісності та стабільності досліджуваних зразків (супозиторіїв ДЦ та бінарних сумішей) в умовах прискорених випробувань протягом 6 місяців за температури  $40 \pm 2$  °C та відносної вологості  $75 \pm 5\%$  показано, що умовний термін придатності розробленого лікарського засобу супозиторії ректальні ДЦ становить 2 роки.

## РОЗДІЛ 5

### РОЗРОБЛЕННЯ ДЕКОНТАМІНАЦІЙНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ ОЧИСТКИ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ ПРИ ВИРОБНИЦТВІ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ СУПОЗИТОРІЇ РЕКТАЛЬНІ ДЦ ПО 500 МГ

В переліку факторів, які впливають на собівартість лікарського засобу, в останні десятиліття все більший вклад вносить вартість очищення технологічного обладнання після завершення випуску партії цільового продукту. Зважаючи на склад розробленого ЛЗ, ДЦ, супозиторії ректальні, 500 мг, в який входять діосмін, багатокомпонентний етанольний екстракт з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* та в якості основи твердий жир Suprocire NA 15 та твердий жир Suprocire NAS 50, як це показано на технологічній схемі (рис. 4.1), можна передбачити суттєві труднощі з якісною деконтамінацією технологічного обладнання після виробництва партії супозиторіїв. В зв'язку з цим, а також спираючись на попередній досвід розроблення деконтамінаційних систем для очищення обладнання хіміко-фармацевтичних виробництв, було зроблено припущення, що міцелярна система деконтамінація на основі активованого пероксиду водню може забезпечити якісне руйнування компонентів ЛЗ та відповідне очищення обладнання від залишків робочою суміші компонентів. В якості модельної речовини для оптимізації системи нами обрано N-фосфометилгліцин, який є похідним амінокислоти гліцину, самим поширеним гербіцидом у світі та для якого немає ефективної системи деконтамінації, зважаючи на особливості молекулярної структури.

Ефективним методом руйнування подібних сполук є лужний гідроліз в присутності металів та алкоголіз моноетаноламіном. Загальними недоліками таких схем дезактивації є високе корозійне навантаження на технологічне обладнання деконтамінації та токсичність продуктів розпаду. Крім того, луги, що використовуються в промисловій технології для знешкодження токсичних речовин, мають низьку хімічну активність відносно кислот фосфору [174, 175]. Наслідком

цього є відносно невисокі значення констант швидкості руйнування токсичних речовин.

Збільшити швидкість розкладання органічних компонентів в складних фосфорвмісних сумішах можна шляхом застосування  $\alpha$ -нуклеофілів [176], типовим представником яких є пероксид-аніон ( $\text{HO}_2^-$ ) [177] та пероксоаніони [178]. Крім високої реакційної здатності пероксид водню  $\text{H}_2\text{O}_2$ , забезпечує універсальну дію за нуклеофільним та окислювальним механізмами, а також задовольняє всі вимоги охорони навколишнього середовища [179].

Відповідно до існуючих досліджень перекис водню не виявляє значних окиснюючих властивостей. Задля його активації в реакційне середовище вводять борати [180], карбонати і т. д., які активують перекис водню утворюючи перокси кислоти, що мають високу реакційну здатність [181].

Серед активуючих сполук найперспективнішими є гідрокарбонати та борна кислота [182]. У випадку з гідрокарбонатами утворюється пероксомонокарбонат-аніон ( $\text{HCO}_4^-$ ), що виявляє значну активуючу здатність у слабо лужних розчинах. При використанні, у якості активатора, борної кислоти утворюються декілька активуючих сполук, кожна з яких, в свою чергу збільшує швидкість інактивації контамінованого розчину [183]. Однак вплив гідрокарбонатів та борної кислоти на швидкість розкладання N-фосфометилгліцину в лужному розчині пероксиду водню до сьогодні не вивчено. Таким чином, дослідження деконтамінації N-фосфометилгліцину в умовах м'якого міцелярного каталізу має теоретичне та вагоме прикладне значення, обумовлене мінімізацією ризиків, пов'язаних з виробництвом, використанням та утилізацією подібних за структурою речовин.

### **5.1 Системи деконтамінації N-фосфометилгліцину**

Під час дослідження методів дезактивації N-фосфометилгліцину у рамках даного дослідження як базові використовували вже відомі методики [179, 180, 183].

Деконтамінацію N-фосфометилгліцину здійснювали за рахунок створення умов для лужного пергідролізу при введенні в систему пероксид-аніонів, в якості  $\alpha$ -нуклеофілу, та активаторів нуклеофільного заміщення, а також, утворення міцелярних систем з використанням ПАР.

Пероксид-аніон в систему вводили у вигляді пероксиду водню ( $H_2O_2$ ).

Пероксид водню являє собою «м'який» нуклеофіл з точки зору екологічної безпеки та корозійної активності щодо легованих сталей, використовуваних в хімічній промисловості.

Для утворення міцелярних умов у якості добавки-детергента, в систему включали цетилпіридиній хлорид (ЦПХ). В системах для деконтамінації ЦПХ має дві суттєві переваги: по-перше, катіоногенний ПАР створює необхідні умови для нуклеофільної атаки на електрофільні центри речовин, а, по-друге, ЦПХ – один з найбезпечніших міцелоутворюючих агентів, що дозволяє застосовувати його у всіх без винятку сферах хімічної промисловості.

При теоретичному моделюванні серій для дослідження було використано твердження про два напрямки перебігу хімічної деструкції органічної сполуки: пергідроліз за участю  $HO_2^-$ -аніону та лужний гідроліз за рахунок  $OH^-$ -аніону [179].

## 5.2 Методика дослідження кінетики деградації N-фосфометил-гліцину

Контроль за розчепленням N-фосфометилгліцину проводили у відповідності з валідованою методикою СІРАС \*284/ТС/(М)/, на рідинному хроматографі LC-2030C 3D (Shimadzu, Японія) з PDA-детектором та використанням програмного забезпечення LabSolutions.

У ході аналізу використовували аналітичну колонку Zorbax<sup>®</sup> 5  $\mu$ m SB-CN 80 Å, LC Column 250 \* 4.6 mm.

Умови проведення хроматографічного аналізу:

– мобільна фаза: фосфатний буферний розчин:метанол =96:4 (об/об);

- швидкість потоку: 2 см<sup>3</sup>/хв;
- у ході аналізу розчинник не використовувався через відсутність необхідності додаткової екстракції;
- температура термостату колонки: 40 °С;
- температура термостату інжектора: 20 °С;
- об'єм інжекції 50 мкл;
- довжина хвилі детектування: PDA,  $\lambda=195$  нм;
- час утримування N-фосфонометилгліцину: 5,5±0,5 хв;
- час хроматографування: 10 хв.

*Приготування стандартного розчину (розчину порівняння):*

У дві мірні колби місткістю 25,0 см<sup>3</sup> вносили 50 мг N-фосфонометилгліцину і додавали 15 см<sup>3</sup> розчинника. Колби поміщали в ультразвукову ванну і обробляли ультразвуком протягом 2–3 хвилин. Потім колби видаляли з ванни, витримували 5–10 хвилин при кімнатній температурі, доводили об'єм розчинником для розведення до мітки.

*Придатність хроматографічної системи:*

RSD для 5 послідовних інжекцій стандартного розчину не повинно перевищувати 1,5 %. Число теоретичних тарілок для піку N-фосфонометилгліцину на хроматограмі стандартного розчину не менше 2500.

## **5.3 Результати дослідження нуклеофільного розкладання N-фосфонометилгліцину**

### **5.3.1 Лужний гідроліз N-фосфонометилгліцину**

Дослідження розкладання N-фосфонометилгліцину проводили в діапазоні [ОН<sup>-</sup>] від 0,001 до 100,0 ммоль/л (рН=8,0–13,0). Відповідний рівень концентрації

гідроксильних іонів забезпечували додаванням до робочого розчину концентрованого розчину КОН.

Зміна концентрації (за площею піку) N-фосфонометилгліцину контролювалась методом високоефективної рідинної хроматографії шляхом трикратного аналізу проб з проміжками у часі по 60 хв (табл. 5.1).

Таблиця 5.1 – Залежність концентрації N-фосфонометилгліцину від концентрації гідроксильних іонів та часу реакції

[OH <sup>-</sup> ], ммоль/л	Час аналізу проби, с			Стандартне відхилення, %
	3600	7200	86400	
	Площа піку (S), у.о.			
0,001	660805	660124	660435	0,09
0,003	662679	662139	662598	0,12
0,01	660585	661266	661037	0,08
0,03	671112	671578	671953	0,25
0,1	666494	661292	665888	0,39
0,3	660802	661919	661551	0,21
1	771730	768523	769197	0,35
3	767636	767716	767644	0,03
10	735898	739943	736890	0,31
30	768123	768523	768413	0,14
100	767603	767716	767711	0,01

Значення стандартного відхилення у ході аналізу не перевищує 0,39 % (табл. 5.1), що у відповідності до даного методу говорить про відсутність процесу лужного гідролізу N-фосфонометилгліцину в дослідженому інтервалі рН розчинів 8–13.

### 5.3.2 Пергідроліз N-фосфонометилгліцину за участі гідроксиду калію та пероксиду водню у якості $\alpha$ -нуклеофілу

Для визначення оптимального рівня концентрації гідроксильних іонів при розщепленні N-фосфонометилгліцину було проаналізовано серію проб робочого

розчину із концентрацією перекису водню 0,2 М у діапазоні  $[\text{OH}^-] = 0,001\text{--}100$  ммоль/л, що відповідає значенням рН 8–13.

Площа піку контрольного розчину, тобто площа піку на початку реакції становила 735793 у.о. Мінімальна площа піку, тобто площа піку після завершення реакції, становила 215722 у.о.

На основі отриманих даних визначено спостережувані константи швидкостей реакції першого порядку ( $k_i$ ,  $\text{с}^{-1}$ ), розраховані за формулою (1):

$$k_i = \frac{1}{t} \times \ln \frac{S_\infty - S_0}{S_\infty - S_t}, \quad (5.1)$$

де  $t$  – час реакції, с;

$S_\infty$  – площа піку N-фосфометилгліцину після завершення реакції, у. о.;

$S_t$  – площа піку N-фосфометилгліцину в певний момент часу, у.о.;

$S_0$  – площа піку N-фосфометилгліцину на початку реакції, у.о.

Відповідно до отриманих даних залежність константи швидкості реакції  $k_i$  від рН середовища має екстремальний характер: в діапазоні  $[\text{OH}^-]$  від 0,001 до 0,1 ммоль/л (рН 8–10) зростає, досягає максимальних значень у проміжку  $[\text{OH}^-]=0,3\text{--}3,0$  ммоль/л (рН 10,5–11,5), після чого стрімко зменшується (рис. 5.1).

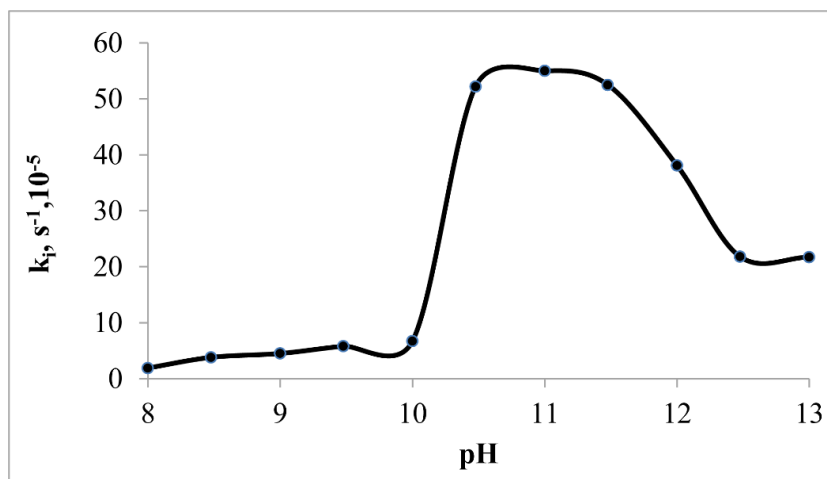


Рисунок 5.1 – Залежність константи швидкості реакції першого порядку  $k_i$  від рН у системі  $\text{OH}^-/\text{H}_2\text{O}_2$

В системі  $\text{OH}^-/\text{H}_2\text{O}_2$  найбільш вірогідними механізмами розкладення N-фосфометилгліцину є нуклеофільний пергідроліз  $\text{HOO}^-$  аніоном та окислення пероксидом водню  $\text{H}_2\text{O}_2$ . У цьому випадку рівняння для спостережуваної константи швидкості  $k_i$  має вираз:

$$k_i = k_{\text{HOO}^-}^2 \times [\text{HOO}^-] + k_{\text{H}_2\text{O}_2}^2 \times [\text{H}_2\text{O}_2]_e, \quad (5.2)$$

де  $k_{\text{HOO}^-}^2$  та  $k_{\text{H}_2\text{O}_2}^2$  – константи швидкості реакцій другого порядку нуклеофільного заміщення та окислення відповідно;

$[\text{HOO}^-]$  та  $[\text{H}_2\text{O}_2]_e$  – концентрації пероксид аніону та пероксиду водню при заданому значенні рН.

В табл. 5.2 наведено дані для розрахунку  $k_{\text{HOO}^-}^2$  та  $k_{\text{H}_2\text{O}_2}^2$  за рівнянням (5.2).

Таблиця 5.2 – Кінетичні результати розкладання N-фосфометил-гліцину у системі  $\text{OH}^-/\text{H}_2\text{O}_2$

$[\text{OH}^-]$ , ммоль/л	$k_i \times 10^4$ , $\text{с}^{-1}$	$[\text{HOO}^-] \times 10^2$ , МОЛЬ/Л	$[\text{H}_2\text{O}_2]_e$ , МОЛЬ/Л	$k_i / [\text{H}_2\text{O}_2]_e \times 10^4$ , МОЛЬ/Л
0,001	0,35	0,005	0,2000	1,75
0,003	0,52	0,015	0,1999	2,60
0,01	0,53	0,050	0,1995	2,65
0,03	0,59	0,149	0,1985	2,97
0,1	0,80	0,488	0,1951	4,10
0,3	4,90	1,395	0,1861	26,3
1	4,91	4,00	0,1600	30,7

Результати лінеаризація кінетичних даних розкладання N-фосфометилгліцину в координатах  $k_i / [\text{H}_2\text{O}_2]_e - [\text{HOO}^-] / [\text{H}_2\text{O}_2]_e$  для системи  $\text{OH}^- / \text{H}_2\text{O}_2$



представлено на рис. 5.2. Розрахунок в рамках лінійної регресії дозволяє визначити значення  $k_{\text{HOO}^-}^2 = 2,0 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  та  $k_{\text{H}_2\text{O}_2}^2 = 1,25 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  з задовільним коефіцієнтом кореляції  $R=0,960$ .

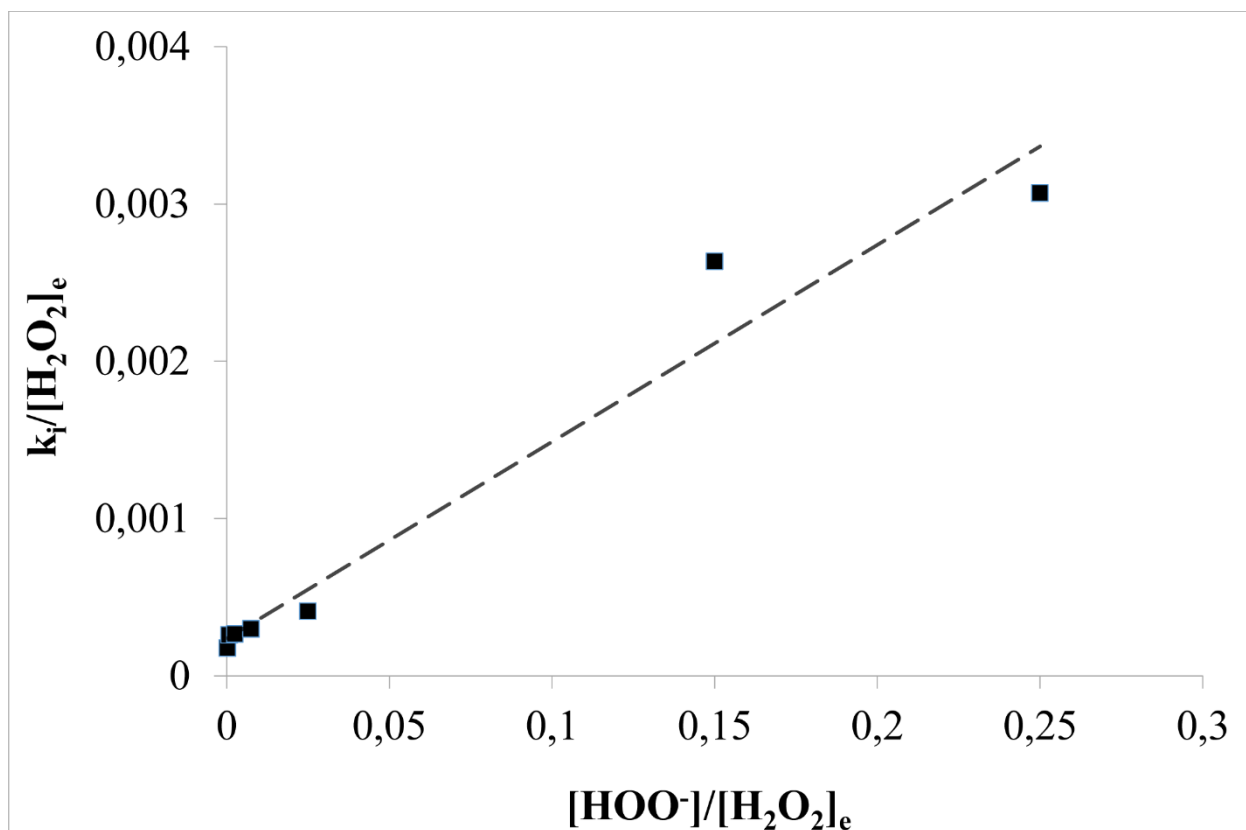


Рисунок 5.2 – Лінеаризація кінетичних даних розкладання N-фосфометилгліцину в координатах  $k_i/[\text{H}_2\text{O}_2]_e - [\text{HOO}^-]/[\text{H}_2\text{O}_2]_e$  для системи  $\text{OH}^-/\text{H}_2\text{O}_2$

Для визначення оптимальної концентрації пероксиду водню як  $\alpha$ -нуклеофілу для системи деконтамінації N-фосфометилгліцину було проведено дослідження залежності константи швидкості реакції другого порядку  $k_{\text{HOO}^-}^2$  від концентрації  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  при  $\text{pH}=10,5$  ( $[\text{OH}^-]=0,3 \text{ ммоль/л}$ ). Результати представлено на рис. 5.3.

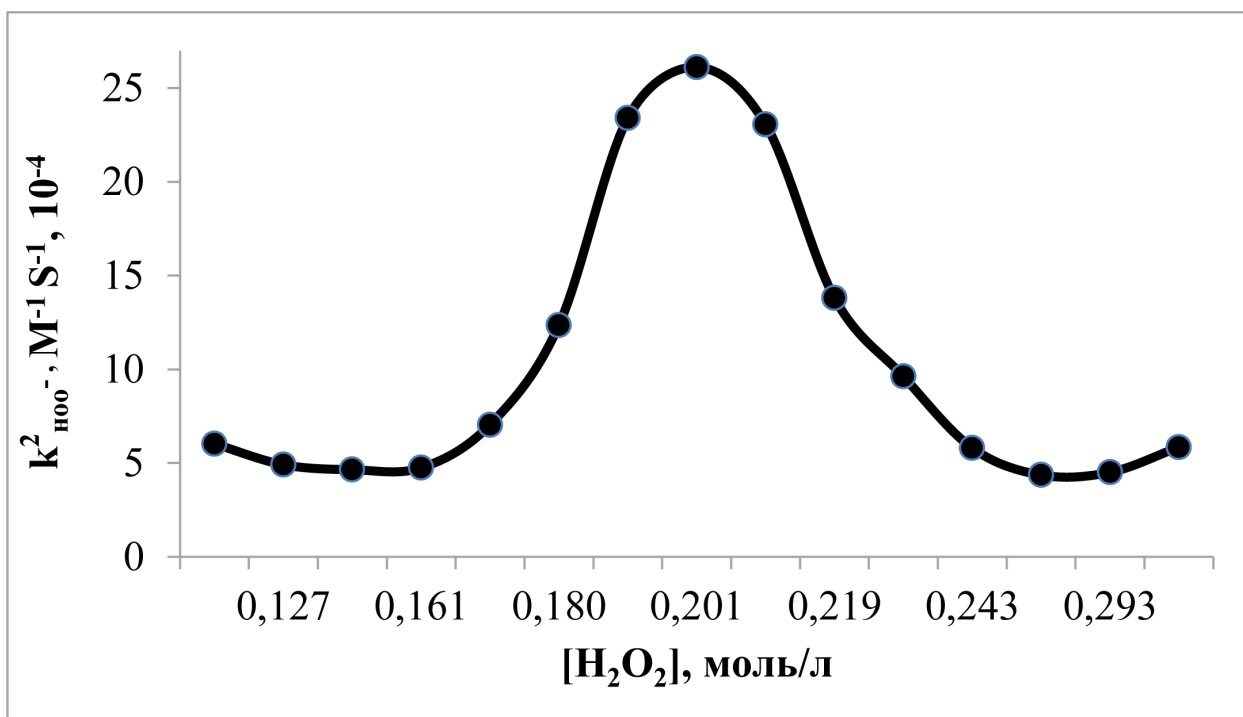


Рисунок 5.3 – Залежність константи швидкості реакції другого порядку  $k_{HOO}^2$  від  $[H_2O_2]$  у пробах системи  $OH^- / H_2O_2$

На основі отриманих даних можна стверджувати, що за  $[OH^-]=0,3$  ммоль/л, тобто за  $pH=10,5$  оптимальна концентрація перекису водню для систем деконтамінації N-фосфометилгліцину становить 0,2 моль/л.

### 5.3.3 Вплив борної кислоти на швидкість розкладання N-фосфометилгліцину

Шляхом попереднього аналізу робочого розчину визначено площу піку N-фосфометилгліцину до початку реакції 589531 у. о. Площа піку N-фосфометилгліцину після завершення реакції становила 160736 у. о.

Дослідним шляхом встановлено, що реакція розкладання N-фосфометилгліцину активується не раніше ніж через 1 годину 30 хвилин. У зв'язку з чим початок аналізу проб змістився до 5400 секунд.

За даними кінетичного дослідження, використовуючи формулу (5.3), визначено константи швидкостей реакції другого порядку  $k_{\text{H}_2\text{O}_2}^2$  для системи  $\text{OH}^-/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ЦПХ}/\text{В}(\text{OH})_3$ .

$$k_{\text{H}_2\text{O}_2}^2 = k_f / [\text{H}_2\text{O}_2]. \quad (5.3)$$

Залежність константи швидкості реакції другого порядку від вмісту борної кислоти у системі відображено на рис. 5.3.

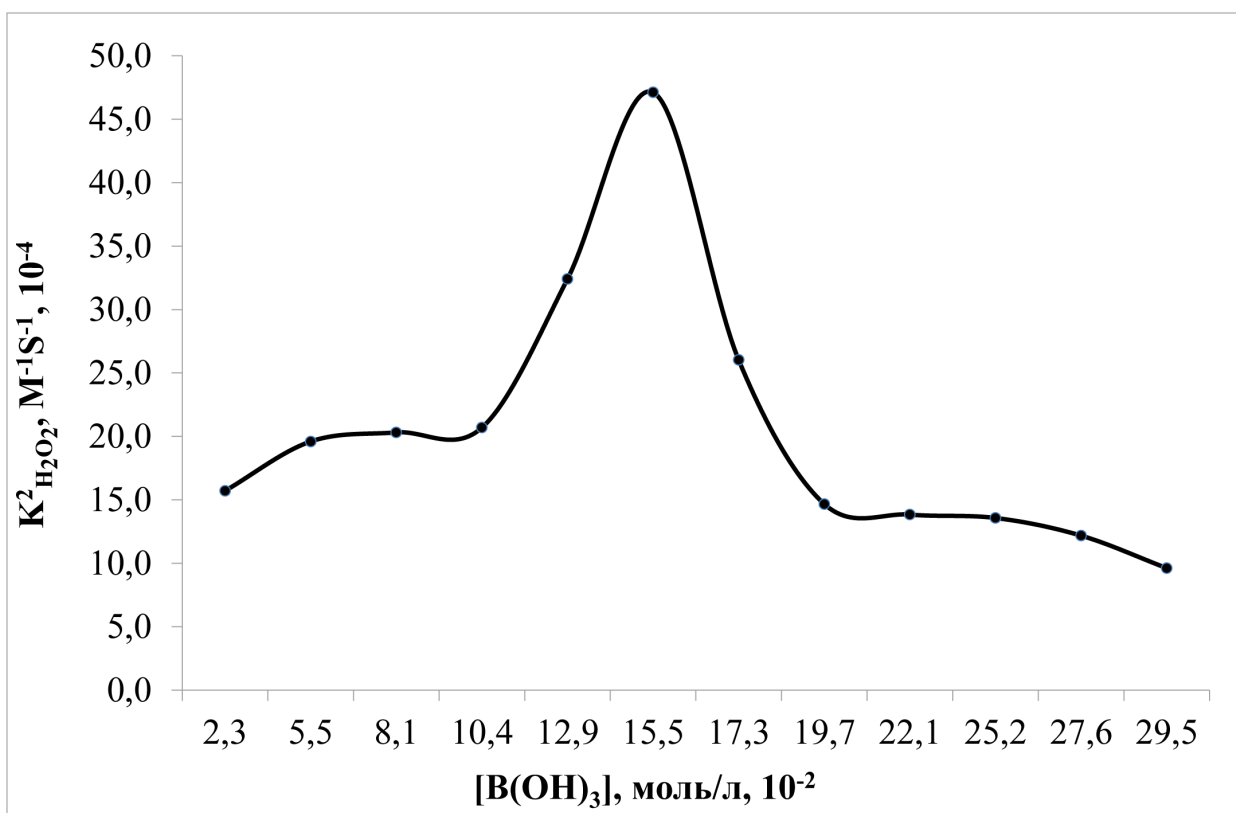


Рисунок 5.4 – Залежність константи швидкості реакції другого порядку  $k_{\text{H}_2\text{O}_2}^2$  від  $[\text{B}(\text{OH})_3]$  в системі  $\text{OH}^-/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ЦПХ}/\text{В}(\text{OH})_3$

Ця залежність має чітко виражений екстремальний характер (рис. 5.4). Результати дослідження безпосередньо вказують на концентрацію борної кислоти

в системі, при якій константа швидкості другого порядку розкладання N-фосфометилгліцину приймає максимальне значення.

### **5.3.4 Розроблення складу деконтамінаційної системи для розкладання N-фосфометилгліцину**

З огляду на технологічні аспекти використання засобів зі значним вмістом ПАР не є економічно та практично обґрунтованим. З цієї причини оптимальним рівнем концентрації ЦПХ з точки зору «вміст-ефективність» є концентрація в 0,025 моль/л.

Отримані результати дозволяють рекомендувати як базову основу деконтамінаційної системи такий склад компонентів:  $[\text{OH}^-]=0,3$  ммоль/л;  $[\text{H}_2\text{O}_2]=0,2$  моль/л та  $[\text{ЦПХ}]=0,25$  моль/л.

Аналіз залежності константи швидкості реакції другого порядку  $k_{\text{H}_2\text{O}_2}^2$  від  $[\text{B}(\text{OH})_3]$  в системі  $\text{OH}^-/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ЦПХ}/\text{B}(\text{OH})_3$  (рис. 5.4) дозволяє визначити оптимальну концентрацію борної кислоти, як активатора в системі деконтамінації N-фосфометилгліцину.

З результатів, що представлені на рис. 5.4, походить, що константа швидкості реакції другого порядку досягає свого максимуму у  $4,71 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  за концентрації борної кислоти 0,15 моль/л.

### **5.4 Випробування розробленої деконтамінаційної системи для розкладання N-фосфометилгліцину для очистки технологічного обладнання після циклу виробництва лікарського засобу ДЦ, супозиторії ректальні 500 мг**

Випробування розробленої деконтамінаційної системи для розкладання N-фосфометилгліцину для очистки технологічного обладнання після циклу виробництва лікарського засобу ДЦ, супозиторії ректальні 500 мг проведено на базі

технологічної лабораторії ТОВ «Ковлар груп» (акт про впровадження результатів дисертаційного дослідження від 10 червня 2020 р., Додаток В).

В лабораторний реактор ємністю 500 мл згідно лабораторної рецептури (табл. 3.1) завантажували послідовно компоненти (АФІ та тверді жири) для одержання 60,0 г супозиторної маси, без урахування втрат, з урахуванням вимог технологічної схеми приготування супозиторіїв ДЦ (рис. 4.1) та постадійних вимог до параметрів процесу. Супозиторну масу змішували 20 хв при температурі  $50 \pm 1$  °С. На наступному етапі охолоджували супозиторну масу до температури  $37 \pm 1$  °С.

Готували деконтамінаційну суміш для очищення реактора наступного складу:  $[\text{OH}^-]=0,3$  ммоль/л;  $[\text{H}_2\text{O}_2]=0,2$  моль/л, [борна кислота]= 0,15 моль/л та [ЦПХ]=0,25 моль/л. рН системи знаходився у проміжку від 10,5 до 11,5.

150 мл деконтамінаційної суміші додавали в реактор і при постійному перемішуванні (60 об/хв) витримували 120 хв. Процес очищення реактора завершували декантацією деконтамінаційного розчину та промиванням реактора двічі водою 3 класу по 150 мл.

У промивній воді проводили стандартні випробування на кількісний вміст діосміну та екстракту цикорію (розділ 2.12 та HPLC). Дослід повторювали тричі. В кожному випадку кількість можливого вмісту АФІ у промивній воді знаходилась за межами визначення застосованих методик.

Додатково проводили візуальний контроль поверхні реактора після деконтамінації. Фіксували відсутність залишків жирової основи на поверхні.

## **Висновки до розділу 5**

Розроблено склад деконтамінаційної суміші для деструкції суміші органічних речовин з використанням в якості модельної сполуки N-фосфометилгліцину:  $[\text{OH}^-]=0,3$  ммоль/л;  $[\text{H}_2\text{O}_2]=0,2$  моль/л, [борна кислота]= 0,15 моль/л та [ЦПХ]=0,25 моль/л. рН системи – у проміжку від 10,5 до 11,5.

Показано можливість застосування розробленої системи деконтамінації для ефективного очищення технологічного обладнання після виробництва партії лікарського засобу ДЦ, супозиторії ректальні 500 мг.

## ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі вирішено важливу науково-технічну задачу розроблення технології отримання фармацевтичної композиції протизапальної дії з керованими фізико-хімічними та фармакологічними властивостями на основі рослинної сировини *Cichorium intybus*. При цьому отримані наступні результати:

1. Визначено зв'язок між структурою, властивостями активних фармацевтичних інгредієнтів флавоноїдної природи діосміну, гесперидину та етанольного екстракту з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* та впливом на активність 15-ліпоксигенази. При цьому концептуально обґрунтовано склад та технологію фармацевтичної композиції, яка забезпечує високий показник протизапальних властивостей на рівні концентрації напівмаксимального інгібування 15-ліпоксигенази  $IC_{50}=66,04\pm 6,16$  мкМ.

2. Вперше здійснено порівняння впливу діосміну, гесперидину та водно-етанольного екстракту з біотехнологічної рослинної сировини *Cichorium intybus* на активність ензиму 15-ліпоксигенази як маркера запалення. Показано, що АФІ діосмін та 70%-етанольний екстракт з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* інгібують 15-ліпоксигеназу, при цьому концентрації напівмаксимального інгібування  $IC_{50}$  становлять  $244,75\pm 19,91$  мкМ та  $84,13\pm 7,22$  мкМ відповідно.

3. Вперше встановлено, що гесперидин є активатором 15-ліпоксигенази ( $K_a=933,77\pm 98,44$  мкМ) і, таким чином, потенційно володіє прозапальними властивостями.

4. Продемонстровано ефект підвищення протизапальної ефективності фармацевтичної композиції при застосуванні суміші діосміну з 70% етанольним екстрактом з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* у співвідношенні 9:1, в порівнянні з протизапальною ефективністю індивідуальних АФІ з дослідженої суміші у порівняних концентраціях.

5. Вперше встановлено молекулярний механізм інгібування 15-ліпоксигенази діосміном, 70% етанольним екстрактом з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* та їх сумішшю: модель Mixed (Partial), тобто змішаного (часткового) типу інгібування, коли інгібітор зв’язується як у активному центрі ензиму, так і зовні, а ензим-субстратний комплекс зберігає часткову активність у порівнянні з нативним ензимом.

6. Досліджено склад та антиоксидантні властивості екстрактів з “волохатих” коренів *Cichorium intybus*. Ідентифіковано основні поліфенольні сполуки, які екстрагуються з цієї біотехнологічної сировини. Показано, що 70% етанольний екстракт в порівнянні з водним екстрактом містить значно більше флавоноїдних сполук (загальний вміст флавоноїдів у водному та етанольному екстрактах становить 121,3 мг (RE)/г та 60,3 мг (RE)/г, відповідно) та володіє значно вищими показниками антиоксидатної та відновлювальної активностей (антиоксидантна та відновна активність водного екстракту ( $EC_{50}=0,350\pm 0,015$  мкг/мл та  $EC_{0,5}=0,42\pm 0,04$  мг/мл) нижчі в 2 і 4 рази, відповідно (вищі значення  $EC_{50}$  та  $EC_{0,5}$ ), ніж ті самі активності етанольного екстракту ( $EC_{50}=0,165\pm 0,010$  мкг/мл та  $EC_{0,5}=0,10\pm 0,01$  мг/мл).

7. Досліджено *in silico* біологічну активність основних флавоноїдів, які ідентифіковано в екстрактах з “волохатих” коренів *Cichorium intybus*. Показано, потенційну високу активність  $P_a$  цих сполук як акцепторів вільних радикалів (0,711–0,991), антиоксидантів (0,732–0,936), антимуtagenів (0,435–0,94), антиканцерогенів (0,641–0,988). Встановлено потенційну протизапальну (0,548–0,767), протипухлинну (0,67–0,849) та хіміопрофілактичну активності (0,593–0,976)  $P_a$  усіх флавоноїдів, що знаходяться у найвищих концентраціях в екстракті з «волохатих» коренів *Cichorium intybus*.

8. Вперше показано, що суміш діосміну з 70% етанольним екстрактом з “волохатих” коренів *Cichorium intybus* у співвідношенні 9:1 може використовуватись в якості комплексу активних фармацевтичних інгредієнтів для фармацевтичних



композицій протизапальної дії. На цій основі розроблено технологію фармацевтичної композиції протизапальної дії з керованими фізико-хімічними та фармакологічними властивостями.

9. Розроблено лабораторний регламент приготування лікарського засобу ДЦ, супозиторії ректальні по 500 мг, який включає лабораторну рецептуру, опис технологічного процесу, технологічну схему із зазначенням критичних стадій та параметрів контролю в процесі виробництва.

Грунтуючись на результатах комплексних випробувань щодо хімічної сумісності та стабільності досліджуваних зразків (супозиторіїв ДЦ та бінарних сумішей) в умовах прискорених випробувань протягом 6 місяців за температури  $40 \pm 2$  °C та відносної вологості  $75 \pm 5\%$  показано, що розроблений лікарський засіб у формі супозиторіїв та усі його компоненти являються хімічно сумісними та стабільними у досліджених умовах, а умовний термін придатності розробленого лікарського засобу ДЦ, супозиторії ректальні 500 мг становить 2 роки.

10. Розроблено склад деконтамінаційного засобу для ефективного очищення технологічного обладнання після виробництва лікарського засобу ДЦ, супозиторії ректальні 500 мг:  $[\text{OH}^-]=0,3$  ммоль/л;  $[\text{H}_2\text{O}_2]=0,2$  моль/л, [борна кислота]= 0,15 моль/л та  $[\text{ЦПХ}]=0,25$  моль/л. рН системи – у проміжку від 10,5 до 11,5.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ahmed, A. U. (2011). An overview of inflammation: mechanism and consequences. *Frontiers in Biology*, 6(4), 274-281. <https://doi.org/10.1007/s11515-011-1123-9>
2. Majno, G., & Joris, I. (2004). *Cells, tissues, and disease: principles of general pathology*. Oxford University Press.
3. Kumar, V., Abbas, A., Aster, J., & Olszewski, W. (2019). *Robbins Patologia X-wydanie polskie*. Edra Urban & Partner.
4. Agrawal, A. D. (2011). Pharmacological activities of flavonoids: a review. *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol*, 4(2), 1394-1398 <https://doi.org/10.37285/ijpsn.2011.4.2.3>
5. Здерко Н.П., Горюшин І.А. (2016) Флавоноїди як можливі інгібітори холінестераз. XVIII Наукова молодіжна конференція «Проблеми та досягнення сучасної хімії», Київ, ТОВ НВП «Інтерсервіс», 57.
6. Bessarabov, V. I., Kuzmina, G. I., Shelihatska, O. V., Vasilev, V. I., Saliy, O. O., Horiushyn, I. A., & Zderko, N. P. (2017). The hesperidin inhibits the butyrylcholinesterase from serum of human. *IX-th International chemistry conference "Kyiv-Toulouse" dedicated to the 100-th anniversary of Fedir Babichev*. Taras Shevchenko National University of Kyiv, 127.
7. Бессарабов, В. І., Кузьміна, Г. І., Шелігацька, О. В., Васильєв, В. І., Баула, О. П., Горюшин, І. А., & Здерко, Н. П. (2017). Інгібування бутирилхолінестерази сироватки крові людини гесперидином. «Нанотехнології у фармації та медицині»: матеріали Української науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю, 48.
8. Crespo, M. E., Gálvez, J., Cruz, T., Ocete, M. A., & Zarzuelo, A. (1999). Anti-inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rat colitis induced by TNBS. *Planta medica*, 65(7), 651–653. <https://doi.org/10.1055/s-2006-960838>

9. Проццаев К.И., Бессарабов В.И., Здерко Н.П., Кузьмина Г.И., Тарасенко А.В., Шамараева И.В. (2015). Статус противовоспалительной системы организма при биофлавоноидной терапии хронической венозной недостаточности у людей пожилого возраста. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії*: матеріали II Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції, м. Харків, 368-369.
10. Rizvi, W., Fayazuddin, M., Shariq, S., Singh, O., Moin, S., Akhtar, K., & Kumar, A. (2014). Anti-inflammatory activity of roots of *Cichorium intybus* due to its inhibitory effect on various cytokines and antioxidant activity. *Ancient science of life*, 34(1), 44–49. <https://doi.org/10.4103/0257-7941.150780>
11. Bharti, V. K., Malik, J. K., & Gupta, R. C. (2016). *Ashwagandha. Nutraceuticals*, 717-733. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802147-7.00052-8>
12. Tee, L. H., Yang, B., Nagendra, K. P., Ramanan, R. N., Sun, J., Chan, E. S., Tey, B. T., Azlan, A., Ismail, A., Lau, C. Y., & Jiang, Y. (2014). Nutritional compositions and bioactivities of *Dacryodes* species: a review. *Food chemistry*, 165, 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.084>
13. Cavin, C., Delannoy, M., Malnoe, A., Debefve, E., Touché, A., Courtois, D., & Schilter, B. (2005). Inhibition of the expression and activity of cyclooxygenase-2 by chicory extract. *Biochemical and biophysical research communications*, 327(3), 742–749. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.061>
14. Shanks, J. V., & Morgan, J. (1999). Plant 'hairy root' culture. *Current opinion in biotechnology*, 10(2), 151–155. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(99\)80026-3](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(99)80026-3)
15. Medzhitov R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
16. Barton G. M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of clinical investigation*, 118(2), 413–420. <https://doi.org/10.1172/JCI34431>

17. Pober, J. S., & Sessa, W. C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 7(10), 803–815. <https://doi.org/10.1038/nri2171>
18. Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews. Immunology*, 6(3), 173–182. <https://doi.org/10.1038/nri1785>
19. Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420(6917), 846–852. <https://doi.org/10.1038/nature01320>
20. Serhan, C. N., & Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology*, 6(12), 1191–1197. <https://doi.org/10.1038/ni1276>
21. Serhan C. N. (2007). Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annual review of immunology*, 25, 101–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141647>
22. Thauinat, O., Patey, N., Caligiuri, G., Gautreau, C., Mamani-Matsuda, M., Mekki, Y., Dieu-Nosjean, M. C., Eberl, G., Ecochard, R., Michel, J. B., Graff-Dubois, S., & Nicoletti, A. (2010). Chronic rejection triggers the development of an aggressive intragraft immune response through recapitulation of lymphoid organogenesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(1), 717–728. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903589>
23. Medzhitov R. (2010). Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, 140(6), 771–776. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>
24. Medzhitov, R., & Janeway, C. A., Jr (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91(3), 295–298. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80412-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80412-2)
25. Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W. P., Weinrauch, Y., Monack, D. M., & Dixit, V. M. (2006).

Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 440(7081), 228–232. <https://doi.org/10.1038/nature04515>

26. Sokol, C. L., Barton, G. M., Farr, A. G., & Medzhitov, R. (2008). A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nature immunology*, 9(3), 310–318. <https://doi.org/10.1038/ni1558>

27. Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118(2), 229–241. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.002>

28. Turer, E. E., Tavares, R. M., Mortier, E., Hitotsumatsu, O., Advincula, R., Lee, B., Shifrin, N., Malynn, B. A., & Ma, A. (2008). Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20. *The Journal of experimental medicine*, 205(2), 451–464. <https://doi.org/10.1084/jem.20071108>

29. Rizki, T. M., & Rizki, R. M. (1992). Lamellocyte differentiation in *Drosophila* larvae parasitized by *Leptopilina*. *Developmental and comparative immunology*, 16(2-3), 103–110. [https://doi.org/10.1016/0145-305x\(92\)90011-z](https://doi.org/10.1016/0145-305x(92)90011-z)

30. Dostert, C., Pétrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B. T., & Tschopp, J. (2008). Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5876), 674–677. <https://doi.org/10.1126/science.1156995>

31. Rock, K. L., Kono, H. (2008). The inflammatory response to cell death. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 3, 99–126. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151456>

32. Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203–210. <https://doi.org/10.1038/35093019>

33. Park, J. S., Gamboni-Robertson, F., He, Q., Svetkauskaite, D., Kim, J. Y., Strassheim, D., Sohn, J. W., Yamada, S., Maruyama, I., Banerjee, A., Ishizaka, A., & Abraham, E. (2006). High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like

receptors. *American journal of physiology. Cell physiology*, 290(3), 917–924.  
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00401.2005>

34. Hofmann, M. A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., Avila, C., Kambham, N., Bierhaus, A., Nawroth, P., Neurath, M. F., Slattery, T., Beach, D., McClary, J., Nagashima, M., Morser, J., Stern, D., & Schmidt, A. M. (1999). RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, 97(7), 889–901. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80801-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80801-6)

35. Vogl, T., Tenbrock, K., Ludwig, S., Leukert, N., Ehrhardt, C., van Zoelen, M. A., Nacken, W., Foell, D., van der Poll, T., Sorg, C., & Roth, J. (2007). Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nature medicine*, 13(9), 1042–1049. <https://doi.org/10.1038/nm1638>

36. Pull, S. L., Doherty, J. M., Mills, J. C., Gordon, J. I., Stappenbeck, T. S. (2005). Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(1), 99–104. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405979102>

37. Vermeer, P. D., Einwalter, L. A., Moninger, T. O., Rokhlina, T., Kern, J. A., Zabner, J., & Welsh, M. J. (2003). Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. *Nature*, 422(6929), 322–326. <https://doi.org/10.1038/nature01440>

38. Martinon, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., & Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, 440(7081), 237–241. <https://doi.org/10.1038/nature04516>

39. Brownlee, M., Cerami, A., & Vlassara, H. (1988). Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *The New England journal of medicine*, 318(20), 1315–1321. <https://doi.org/10.1056/NEJM198805193182007>

40. Yan, S. F., Barile, G. R., D'Agati, V., Du Yan, S., Ramasamy, R., Schmidt, A. M. (2007). The biology of RAGE and its ligands: uncovering mechanisms at the heart of diabetes and its complications. *Current diabetes reports*, 7(2), 146–153. <https://doi.org/10.1007/s11892-007-0024-4>
41. Navab, M., Anantharamaiah, G. M., Reddy, S. T., Van Lenten, B. J., Ansell, B. J., & Fogelman, A. M. (2006). Mechanisms of disease: proatherogenic HDL--an evolving field. *Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism*, 2(9), 504–511. <https://doi.org/10.1038/ncpendmet0245>
42. Jiang, D., Liang, J., Fan, J., Yu, S., Chen, S., Luo, Y., Prestwich, G. D., Mascarenhas, M. M., Garg, H. G., Quinn, D. A., Homer, R. J., Goldstein, D. R., Bucala, R., Lee, P. J., Medzhitov, R., & Noble, P. W. (2005). Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nature medicine*, 11(11), 1173–1179. <https://doi.org/10.1038/nm1315>
43. Jiang, D., Liang, J., & Noble, P. W. (2007). Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annual review of cell and developmental biology*, 23, 435–461. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123337>
44. Higgs, G. A. (1986). The role of eicosanoids in inflammation. *Progress in lipid research*, 25, 555-561. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(86\)90113-X](https://doi.org/10.1016/0163-7827(86)90113-X)
45. Yamaguchi, A., Botta, E., & Holinstat, M. (2022). Eicosanoids in inflammation in the blood and the vessel. *Frontiers in pharmacology*, 13, 997403. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.997403>
46. Turnbull, A. V., & Rivier, C. L. (1999). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiological reviews*, 79(1), 1–71. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.1>
47. Ander, B. P., Dupasquier, C. M., Prociuk, M. A., & Pierce, G. N. (2003). Polyunsaturated fatty acids and their effects on cardiovascular disease. *Experimental and clinical cardiology*, 8(4), 164–172.

48. Capra, V., Bäck, M., Barbieri, S. S., Camera, M., Tremoli, E., Rovati, G. E. (2013). Eicosanoids and their drugs in cardiovascular diseases: focus on atherosclerosis and stroke. *Medicinal research reviews*, 33(2), 364–438. <https://doi.org/10.1002/med.21251>
49. Canals, S., Casarejos, M. J., de Bernardo, S., Rodríguez-Martín, E., & Mena, M. A. (2003). Nitric oxide triggers the toxicity due to glutathione depletion in midbrain cultures through 12-lipoxygenase. *The Journal of biological chemistry*, 278(24), 21542–21549. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213174200>
50. Praticò, D., Zhukareva, V., Yao, Y., Uryu, K., Funk, C. D., Lawson, J. A., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2004). 12/15-lipoxygenase is increased in Alzheimer's disease: possible involvement in brain oxidative stress. *The American journal of pathology*, 164(5), 1655–1662. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63724-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63724-8)
51. Lambeau, G., & Gelb, M. H. (2008). Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annual review of biochemistry*, 77, 495–520. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.062405.154007>
52. Natarajan, R., & Nadler, J. L. (2004). Lipid inflammatory mediators in diabetic vascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(9), 1542–1548. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000133606.69732.4c>
53. Kuhn, H., Banthiya, S., & van Leyen, K. (2015). Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochimica et biophysica acta*, 1851(4), 308–330. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2014.10.002>
54. Funk, C. D., Chen, X. S., Johnson, E. N., & Zhao, L. (2002). Lipoxygenase genes and their targeted disruption. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 68-69, 303–312. [https://doi.org/10.1016/s0090-6980\(02\)00036-9](https://doi.org/10.1016/s0090-6980(02)00036-9)
55. Funk, C. D., Hoshiko, S., Matsumoto, T., Rdmark, O., & Samuelsson, B. (1989). Characterization of the human 5-lipoxygenase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(8), 2587–2591. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.8.2587>



56. Funk, C. D., Furci, L., & FitzGerald, G. A. (1990). Molecular cloning, primary structure, and expression of the human platelet/erythrocyte cell 12-lipoxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(15), 5638–5642. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.15.5638>
57. Virmani, J., Johnson, E. N., Klein-Szanto, A. J., & Funk, C. D. (2001). Role of 'platelet-type' 12-lipoxygenase in skin carcinogenesis. *Cancer letters*, 162(2), 161–165. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(00\)00634-0](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(00)00634-0)
58. Conrad, D. J., Kuhn, H., Mulkins, M., Highland, E., & Sigal, E. (1992). Specific inflammatory cytokines regulate the expression of human monocyte 15-lipoxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(1), 217–221. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.1.217>
59. Sigal, E., Grunberger, D., Cashman, J. R., Craik, C. S., Caughey, G. H., & Nadel, J. A. (1988). Arachidonate 15-lipoxygenase from human eosinophil-enriched leukocytes: partial purification and properties. *Biochemical and biophysical research communications*, 150(1), 376–383. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(88\)90531-1](https://doi.org/10.1016/0006-291x(88)90531-1)
60. Sigal, E., Dicharry, S., Highland, E., & Finkbeiner, W. E. (1992). Cloning of human airway 15-lipoxygenase: identity to the reticulocyte enzyme and expression in epithelium. *The American journal of physiology*, 262(4 Pt 1), 392–398. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1992.262.4.L392>
61. Brash, A. R., Boeglin, W. E., & Chang, M. S. (1997). Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), 6148–6152. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6148>
62. Boeglin, W. E., Kim, R. B., & Brash, A. R. (1998). A 12R-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 6744–6749. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6744>

63. Krieg, P., & Fürstenberger, G. (2014). The role of lipoxygenases in epidermis. *Biochimica et biophysica acta*, 1841(3), 390–400.

<https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2013.08.005>

64. Singh, N. K., & Rao, G. N. (2019). Emerging role of 12/15-Lipoxygenase (ALOX15) in human pathologies. *Progress in lipid research*, 73, 28–45.

<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.11.001>

65. Sachs-Olsen, C., Sanak, M., Lang, A. M., Gielicz, A., Mowinckel, P., Lødrup Carlsen, K. C., Carlsen, K. H., & Szczeklik, A. (2010). Eoxins: a new inflammatory pathway in childhood asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 126(4), 859–867.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.07.015>

66. Ono, E., Mita, H., Taniguchi, M., Higashi, N., Hasegawa, M., Miyazaki, E., Kumamoto, T., & Akiyama, K. (2009). Concentration of 14,15-leukotriene C4 (eoxin C4) in bronchoalveolar lavage fluid. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 39(9), 1348–1352.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03261.x>

67. Thomson, N. C., Chaudhuri, R., Spears, M., Messow, C. M., Jelinsky, S., Miele, G., Nocka, K., Takahashi, E., Hilmi, O. J., Shepherd, M. C., Miller, D. K., & McSharry, C. (2014). Arachidonic acid metabolites and enzyme transcripts in asthma are altered by cigarette smoking. *Allergy*, 69(4), 527–536. <https://doi.org/10.1111/all.12376>

68. Rathee, P., Chaudhary, H., Rathee, S., Rathee, D., Kumar, V., & Kohli, K. (2009). Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review.

*Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)(Discontinued)*, 8(3), 229-235.

<https://doi.org/10.2174/187152809788681029>

69. Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., & Kang, S. S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of pharmacological sciences*, 96(3), 229–245. <https://doi.org/10.1254/jphs.crj04003x>

70. Park, H. H., Lee, S., Son, H. Y., Park, S. B., Kim, M. S., Choi, E. J., Singh, T. S., Ha, J. H., Lee, M. G., Kim, J. E., Hyun, M. C., Kwon, T. K., Kim, Y. H., & Kim, S. H. (2008). Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Archives of pharmacal research*, *31*(10), 1303–1311. <https://doi.org/10.1007/s12272-001-2110-5>
71. Saponara, R., & Bosisio, E. (1998). Inhibition of cAMP-phosphodiesterase by biflavones of Ginkgo biloba in rat adipose tissue. *Journal of natural products*, *61*(11), 1386–1387. <https://doi.org/10.1021/np970569m>
72. Huang, Y. T., Kuo, M. L., Liu, J. Y., Huang, S. Y., & Lin, J. K. (1996). Inhibitions of protein kinase C and proto-oncogene expressions in NIH 3T3 cells by apigenin. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, *32A*(1), 146–151. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(95\)00540-4](https://doi.org/10.1016/0959-8049(95)00540-4)
73. Cheeke, P. R., Piacente, S., & Oleszek, W. (2006). Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of Yucca schidigera: a review. *Journal of inflammation (London, England)*, *3*, 1-7. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-3-6>
74. Choi, J. S., Park, K. Y., Moon, S. H., Rhee, S. H., & Young, H. S. (1994). Antimutagenic effect of plant flavonoids in the Salmonella assay system. *Archives of pharmacal research*, *17*(2), 71–75. <https://doi.org/10.1007/BF02974226>
75. Zderko N.P., Bessarabov V.I. (2015) Anticarcinogenic and radioprotective activity of diosmin and hesperidin. *Pharmacology, Pharmaceutical Technology and Pharmacotherapy in Active Longevity: book of abstracts of the II International Scientific Conference, Vilnius*, 22-23.
76. Silambarasan, T., & Raja, B. (2012). Diosmin, a bioflavonoid reverses alterations in blood pressure, nitric oxide, lipid peroxides and antioxidant status in DOCA-salt induced hypertensive rats. *European journal of pharmacology*, *679*(1-3), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.12.040>
77. Om, H., El-Naggar, M. E., El-Banna, M., Fouda, M. M. G., Othman, S. I., Allam, A. A., & Morsy, O. M. (2020). Combating atherosclerosis with targeted Diosmin

nanoparticles-treated experimental diabetes. *Investigational new drugs*, 38(5), 1303–1315. <https://doi.org/10.1007/s10637-020-00905-6>

78. Pehlivan, M., Hazinedaroglu, S. M., Kayaoglu, H. A., Erkek, A. B., Keklik, T., Canbolat, O., & Kocak, S. (2004). The effect of diosmin hesperidin on intestinal ischaemia--reperfusion injury. *Acta chirurgica Belgica*, 104(6), 715–718. <https://doi.org/10.1080/00015458.2004.11679649>

79. Martínez Conesa, C., Vicente Ortega, V., Yáñez Gascón, M. J., Alcaraz Baños, M., Canteras Jordana, M., Benavente-García, O., & Castillo, J. (2005). Treatment of metastatic melanoma B16F10 by the flavonoids tangeretin, rutin, and diosmin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(17), 6791–6797. <https://doi.org/10.1021/jf058050g>

80. Rizk, S. M., & Sabri, N. A. (2009). Evaluation of clinical activity and safety of Daflon 500 mg in type 2 diabetic female patients. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 17(3), 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2009.08.008>

81. Здерко, Н. П., Бессарабов, В. І., Баула, О. П. (2016) Потенціал діосміну та гесперидину як активних фармацевтичних інгредієнтів лікарських засобів для лікування хвороби альцгеймера. *Хімічні проблеми сьогодення: збірник тез доповідей Дев'ятої Української наукової конференції студентів, аспірантів і молодих учених з міжнародною участю, Вінниця, ТОВ «Нілан-ЛТД»*, 31.

82. Кулик, В. Б., Бессарабов, В. І., Здерко, Н. П., & Вакуленко, О. С. (2019). Дослідження впливу терапії діосміном на ліпідний спектр крові і окисно-антиоксидантну систему щурів, які знаходились на дієті з високим вмістом холестерину. *Фізико-органічна хімія, фармакологія та фармацевтична технологія біологічно активних речовин*, 297-305.

83. Повшедна, І. О., Бессарабов, В. І., Кузьміна, Г. І., Лісовий, В. М., Закаблущий, Н. А., Здерко, Н. П., & Пашенко, І. О. (2021). Дослідження антиоксидантних властивостей цитрусового флавоноїду гесперидину. *Фізико-*

органічна хімія, фармакологія та фармацевтична технологія біологічно активних речовин, 252-258.

84. Patel, K., Gadewar, M., Tahilyani, V., & Patel, D. K. (2013). A review on pharmacological and analytical aspects of diosmetin: a concise report. *Chinese journal of integrative medicine*, 19(10), 792–800. <https://doi.org/10.1007/s11655-013-1595-3>

85. Russo, R., Chandradhara, D., & De Tommasi, N. (2018). Comparative Bioavailability of Two Diosmin Formulations after Oral Administration to Healthy Volunteers. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(9), 2174. <https://doi.org/10.3390/molecules23092174>

86. Hilary, S., Tomás-Barberán, F. A., Martínez-Blázquez, J. A., Kizhakkayil, J., Souka, U., Al-Hammadi, S., Habib, H., Ibrahim, W., & Platat, C. (2020). Polyphenol characterisation of Phoenix dactylifera L. (date) seeds using HPLC-mass spectrometry and its bioaccessibility using simulated in-vitro digestion/Caco-2 culture model. *Food chemistry*, 311, 125969. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125969>

87. Shalkami, A. S., Hassan, M., & Bakr, A. G. (2018). Anti-inflammatory, antioxidant and anti-apoptotic activity of diosmin in acetic acid-induced ulcerative colitis. *Human & experimental toxicology*, 37(1), 78–86. <https://doi.org/10.1177/0960327117694075>

88. Anwer, M. K., Aldawsari, M. F., Iqbal, M., Almutairy, B. K., Soliman, G. A., & Aboudzadeh, M. A. (2023). Diosmin-Loaded Nanoemulsion-Based Gel Formulation: Development, Optimization, Wound Healing and Anti-Inflammatory Studies. *Gels (Basel, Switzerland)*, 9(2), 95. <https://doi.org/10.3390/gels9020095>

89. Tahir, M., Rehman, M. U., Lateef, A., Khan, R., Khan, A. Q., Qamar, W., Ali, F., O'Hamiza, O., & Sultana, S. (2013). Diosmin protects against ethanol-induced hepatic injury via alleviation of inflammation and regulation of TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B activation. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 47(2), 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2012.12.010>

90. Shaaban, H. H., Hozayen, W. G., Khaliefa, A. K., El-Kenawy, A. E., Ali, T. M., & Ahmed, O. M. (2022). Diosmin and Trolox Have Anti-Arthritic, Anti-Inflammatory and Antioxidant Potencies in Complete Freund's Adjuvant-Induced Arthritic Male Wistar Rats: Roles of NF- $\kappa$ B, iNOS, Nrf2 and MMPs. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(9), 1721. <https://doi.org/10.3390/antiox11091721>
91. Dholakiya, S. L., & Benzeroual, K. E. (2011). Protective effect of diosmin on LPS-induced apoptosis in PC12 cells and inhibition of TNF- $\alpha$  expression. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 25(5), 1039–1044. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.04.003>
92. Street, R. A., Sidana, J., & Prinsloo, G. (2013). Cichorium intybus: Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2013, 579319. <https://doi.org/10.1155/2013/579319>
93. Das, S., Vasudeva, N., & Sharma, S. (2016). Cichorium intybus: A concise report on its ethnomedicinal, botanical, and phytopharmacological aspects. *Drug Development and Therapeutics*, 7(1), 1-1. <https://www.doi.org/10.4103/2394-6555.180157>
94. Pushparaj, P. N., Low, H. K., Manikandan, J., Tan, B. K., & Tan, C. H. (2007). Anti-diabetic effects of Cichorium intybus in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 111(2), 430–434. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.028>
95. Migliorini, A. A., Piroski, C. S., Daniel, T. G., Cruz, T. M., Escher, G. B., Vieira do Carmo, M. A., Azevedo, L., Marques, M. B., Granato, D., & Rosso, N. D. (2019). Red Chicory (Cichorium intybus) Extract Rich in Anthocyanins: Chemical Stability, Antioxidant Activity, and Antiproliferative Activity In Vitro. *Journal of food science*, 84(5), 990–1001. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14506>
96. Chandra, K., Jain, V., Jabin, A., Dwivedi, S., Joshi, S., Ahmad, S., & Jain, S. K. (2020). Effect of Cichorium intybus seeds supplementation on the markers of glycem

control, oxidative stress, inflammation, and lipid profile in type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind placebo study. *Phytotherapy research : PTR*, 34(7), 1609–1618. <https://doi.org/10.1002/ptr.6624>

97. Janda, K., Gutowska, I., Geszke-Moritz, M., & Jakubczyk, K. (2021). The Common Cichory (*Cichorium intybus* L.) as a Source of Extracts with Health-Promoting Properties-A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(6), 1814. <https://doi.org/10.3390/molecules26061814>

98. Лижнюк, В. В., Лісовий, В. М., Бессарабов, В. І., Кузьміна, Г. І., Здерко, Н. П., & Матвєєва, Н. А. (2022). Визначення активності екстракту *Cichorium intybus* в редок системі аутоокиснення адреналіну. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології*: Матеріали II міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції, Харків: НФаУ, 154.

99. Savchenko, K., Lisovyi, V., Zderko, N., Bessarabov, V., Kuzmina, G., Matvieieva, N., & Kharytonenko, H. (2022). Research of anti-inflammatory properties *Cichorium intybus* extract. *IOpen Readings 2022: 65th international conference for students of Physics and Natural sciences*. Vilnius University Press, 297.

100. Olsen, N. J., Branch, V. K., Jonnala, G., Seskar, M., & Cooper, M. (2010). Phase 1, placebo-controlled, dose escalation trial of chicory root extract in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *BMC musculoskeletal disorders*, 11, 156. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-11-156>

101. Poli, F., Sacchetti, G., Tosi, B., Fogagnolo, M., Chillemi, G., Lazzarin, R., & Bruni, A. (2002). Variation in the content of the main guaianolides and sugars in *Cichorium intybus* var. “Rosso di Chioggia” selections during cultivation. *Food Chemistry*, 76(2), 139-147. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00254-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00254-0)

102. Van Beek, T. A., Maas, P., King, B. M., Leclercq, E., Voragen, A. G., & De Groot, A. (1990). Bitter sesquiterpene lactones from chicory roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(4), 1035-1038. <https://doi.org/10.1021/jf00094a026>

103. García-Piñeres, A. J., Castro, V., Mora, G., Schmidt, T. J., Strunck, E., Pahl, H. L., & Merfort, I. (2001). Cysteine 38 in p65/NF-kappaB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. *The Journal of biological chemistry*, 276(43), 39713–39720. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101985200>

104. Hehner, S. P., Hofmann, T. G., Dröge, W., & Schmitz, M. L. (1999). The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kappa B by targeting the I kappa B kinase complex. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(10), 5617–5623.

105. Rüngeler, P., Castro, V., Mora, G., Gören, N., Vichnewski, W., Pahl, H. L., Merfort, I., & Schmidt, T. J. (1999). Inhibition of transcription factor NF-kappaB by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 7(11), 2343–2352. [https://doi.org/10.1016/s0968-0896\(99\)00195-9](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(99)00195-9)

106. Picman, A. K. (1986). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical systematics and Ecology*, 14(3), 255-281. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(86\)90101-8](https://doi.org/10.1016/0305-1978(86)90101-8)

107. Cavin, C., Delannoy, M., Malnoe, A., Debefve, E., Touché, A., Courtois, D., & Schilter, B. (2005). Inhibition of the expression and activity of cyclooxygenase-2 by chicory extract. *Biochemical and biophysical research communications*, 327(3), 742–749. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.061>

108. Ripoll, C., Schmidt, B. M., Ilic, N., Poulev, A., Dey, M., Kurmukov, A. G., & Raskin, I. (2007). Anti-inflammatory effects of a sesquiterpene lactone extract from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots. *Natural Product Communications*, 2(7), 1934578X0700200702. <https://doi.org/10.1177/1934578X07002007>

109. Costantino, D., & Guaraldi, C. (2008). Effectiveness and safety of vaginal suppositories for the treatment of the vaginal atrophy in postmenopausal women: an open, non-controlled clinical trial. *European review for medical and pharmacological sciences*, 12(6), 411–416.



110. Allen, L., & Ansel, H. C. (2011). *Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*. Lippincott Williams & Wilkins.

111. Allen, L. V., Worthen, D. B., & Mink, B. (2008). *Suppositories*. Pharmaceutical Press.

112. Bessarabov, V., Vasylenko, V., Vakhitova, L., Kuzmina, G., Zderko, N., Plavan, V., & Zagoriy, G. (2019). Development of a decontamination system for decomposing N-(phosphonomethyl) glycine. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 3(6), 6-13. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2019.168391>

113. Бессарабов, В. І. Вахітова Л. М., Кузьміна Г. І., Здерко Н. П. Дерипапа В. С. (2017) Нові системи для деконтамінації фосфорорганічних активних фармацевтичних інгредієнтів. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії*: матеріали III Міжнародної науково-практичної інтернет – конференції, Харків: НФаУ, 36.

114. Бессарабов, В. І., Вахітова, Л. М., Кузьміна, Г. І., Баула, О. П., Лісовий, В. М., Здерко, Н. П. (2018). Розробка методу оцінки ефективності деконтамінації фосфорорганічних сполук. *Вісник Київського національного університету технологій та дизайну. Серія Технічні науки*. 5 (126), 114-122. <https://doi.org/10.30857/1813-6796.2018.5.13>

115. Melcarne, L., García-Iglesias, P., & Calvet, X. (2016). Management of NSAID-associated peptic ulcer disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 10(6), 723-733. <https://doi.org/10.1586/17474124.2016.1142872>

116. Carnaby-Mann, G., & Crary, M. (2005). Pill swallowing by adults with dysphagia. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 131(11), 970-975. <https://doi.org/10.1001/archotol.131.11.970>

117. Henderson, R. D., Woolf, C., & Marryatt, G. (1976). Pharyngoesophageal dysphagia and gastroesophageal reflux. *The Laryngoscope*, 86(10), 1531-1539. <https://doi.org/10.1288/00005537-197610000-00007>

118. Tibbling, L., & Gustafsson, B. (1991). Dysphagia and its consequences in the elderly. *Dysphagia*, 6, 200-202. <https://doi.org/10.1007/BF02493526>
119. Kyle, G. (2012). Medication management in older people with dementia. *Journal of Community Nursing*, 26(1), 31-34.
120. Matvieieva, N. A., Kishchenko, O. M., Potrochov, A. O., Shakhovsky, A. M., & Kuchuk, M. V. (2011). Regeneration of transgenic plants from hairy roots of *Cichorium intybus* L. var. *Foliosum* Hegi. *Cytology and Genetics*, 45, 277-281. <https://doi.org/10.3103/S0095452711050082>
121. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
122. Pełkal, A., & Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*, 7, 1776-1782 <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>
123. Leaves, L., & Leaves, L. (2014). Antioxidant activity by DPPH radical scavenging method of *ageratum conyzoides*. *American Journal of Ethnomedicine*, 1(4), 244-249.
124. Chan, S. G., Murphy, P. A., Ho, S. C., Kreiger, N., Darlington, G., So, E. K., & Chong, P. Y. (2009). Isoflavonoid content of Hong Kong soy foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(12), 5386-5390. <https://doi.org/10.1021/jf803870k>
125. Muñoz-Ramírez, A., Mascayano-Collado, C., Barriga, A., Echeverría, J., & Urzúa, A. (2020). Inhibition of soybean 15-lipoxygenase and human 5-lipoxygenase by extracts of leaves, stem bark, phenols and catechols isolated from *Lithraea caustica* (Anacardiaceae). *Frontiers in Pharmacology*, 11, 594257. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.594257>
126. . Druzhilovskiy, D. S., Rudik, A. V., Filimonov, D. A., Glorizova, T. A., Lagunin, A. A., Dmitriev, A. V., ... & Poroikov, V. V. (2017). Computational platform

Way2Drug: from the prediction of biological activity to drug repurposing. *Russian Chemical Bulletin*, 66, 1832-1841. <https://doi.org/10.1007/s11172-017-1954-x>.

127. Георгієвський В., Ляпунов М., Безугла О. та ін. (2004). *Настанова з якості. Лікарські засоби. Випробування стабільності. Настанова 42-3.3.2004*. Міністерство охорони здоров'я України. Моріон, 60 с.

128. Yampolskaya, G. P., Tarasevich, B. N., Elenskii, A. A. (2005). Secondary structure of globular proteins in adsorption layers at the solution-air interface by the data of fourier transform IR spectroscopy. *Colloid Journal*, 67(3), 385-391.

129. Purohit, T. J., Amirapu, S., Wu, Z., & Hanning, S. M. (2023). Rectal Bioavailability of Amoxicillin from Hollow-Type Suppositories: Effect of Chemical Form of Amoxicillin. *Pharmaceutics*, 15(7), 1865. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071865>

130. Migliorini, A. A., Piroski, C. S., Daniel, T. G., Cruz, T. M., Escher, G. B., Vieira do Carmo, M. A., Azevedo, L., Marques, M. B., Granato, D., & Rosso, N. D. (2019). Red Chicory (*Cichorium intybus*) Extract Rich in Anthocyanins: Chemical Stability, Antioxidant Activity, and Antiproliferative Activity In Vitro. *Journal of food science*, 84(5), 990–1001. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14506>

131. Denev, P., Petkova, N., Ivanov, I., Sirakov, B., Vrancheva, R., & Pavlov, A. (2014). Determination of biologically active substances in taproot of common chicory (*Cichorium intybus* L.). *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, 18, 124-129.

132. Yu, M., Gouvinhas, I., Rocha, J., & Barros, A. I. R. N. A. (2021). Phytochemical and antioxidant analysis of medicinal and food plants towards bioactive food and pharmaceutical resources. *Scientific reports*, 11(1), 10041. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89437-4>

133. Matvieieva, N., Bessarabov, V., Khainakova, O., Duplij, V., Bohdanovych, T., Ratushnyak, Y., Kuzmina, G., Lisovyi, V., Zderko, N., & Kobylinska, N. (2023). *Cichorium intybus* L. "hairy" roots as a rich source of antioxidants and anti-inflammatory compounds. *Heliyon*, 9(3), e14516. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14516>

134. Carazzone, C., Mascherpa, D., Gazzani, G., & Papetti, A. (2013). Identification of phenolic constituents in red chicory salads (*Cichorium intybus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Food chemistry*, *138*(2-3), 1062–1071. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.060>
135. Bergantin, C., Maietti, A., Cavazzini, A., Pasti, L., Tedeschi, P., Brandolini, V., & Marchetti, N. (2017). Bioaccessibility and HPLC-MS/MS chemical characterization of phenolic antioxidants in Red Chicory (*Cichorium intybus*). *Journal of Functional Foods*, *33*, 94-102. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.02.037>
136. Kandil, A. S., Abou-Elella, F., & El Shemy, H. A. (2019). Cytotoxic profile activities of ethanolic and methanolic extracts of chicory plant (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, *12*(1), 106-111. <https://doi.org/10.1080/16878507.2019.1594136>
137. Sun, M. F., Jiang, C. L., Kong, Y. S., Luo, J. L., Yin, P., & Guo, G. Y. (2022). Recent advances in analytical methods for determination of polyphenols in tea: A comprehensive review. *Foods*, *11*(10), 1425. <https://doi.org/10.3390/foods11101425>
138. Enogieru, A. B., Haylett, W., Hiss, D. C., Bardien, S., & Ekpo, O. E. (2018). Rutin as a Potent Antioxidant: Implications for Neurodegenerative Disorders. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2018*, 6241017. <https://doi.org/10.1155/2018/6241017>
139. Salehi, B., Machin, L., Monzote, L., Sharifi-Rad, J., Ezzat, S. M., Salem, M. A., Merghany, R. M., El Mahdy, N. M., Kılıç, C. S., Sytar, O., Sharifi-Rad, M., Sharopov, F., Martins, N., Martorell, M., & Cho, W. C. (2020). Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. *ACS omega*, *5*(20), 11849–11872. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01818>

140. Ahmadi, S. M., Farhoosh, R., Sharif, A., & Rezaie, M. (2020). Structure-Antioxidant Activity Relationships of Luteolin and Catechin. *Journal of food science*, 85(2), 298–305. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14994>

141. Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kręgiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A., Lucarini, M., Santini, A., Souto, E. B., Novellino, E., Antolak, H., Azzini, E., Setzer, W. N., & Martins, N. (2019). The Therapeutic Potential of Apigenin. *International journal of molecular sciences*, 20(6), 1305. <https://doi.org/10.3390/ijms20061305>

142. Rathee, P., Chaudhary, H., Rathee, S., Rathee, D., Kumar, V., & Kohli, K. (2009). Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflammation & allergy drug targets*, 8(3), 229–235. <https://doi.org/10.2174/187152809788681029>

143. Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035–1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>

144. Schmidlein, H., & Herrmann, K. (1975). Über die Phenolsäuren des Gemüses. IV. Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren weiterer Gemüsearten und der Kartoffeln [On the phenolic acids of vegetables. IV. Hydroxycinnamic acids and hydroxybenzoic acids of vegetables and potatoes (author's transl)]. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 159(5), 255–263. <https://doi.org/10.1007/BF01139577>

145. Migliorini, A. A., Piroski, C. S., Daniel, T. G., Cruz, T. M., Escher, G. B., Vieira do Carmo, M. A., Azevedo, L., Marques, M. B., Granato, D., & Rosso, N. D. (2019). Red Chicory (*Cichorium intybus*) Extract Rich in Anthocyanins: Chemical Stability, Antioxidant Activity, and Antiproliferative Activity In Vitro. *Journal of food science*, 84(5), 990–1001. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14506>

146. Zaitone, S. A., Ahmed, E., Elsherbiny, N. M., Mehanna, E. T., El-Kherbetawy, M. K., ElSayed, M. H., Alshareef, D. M., & Moustafa, Y. M. (2019). Caffeic acid improves locomotor activity and lessens inflammatory burden in a mouse model of

rotenone-induced nigral neurodegeneration: Relevance to Parkinson's disease therapy. *Pharmacological reports : PR*, 71(1), 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.08.004>

147. Naveen, P., Lingaraju, H. B., Anitha, & Prasad, K. S. (2017). Simultaneous determination of rutin, isoquercetin, and quercetin flavonoids in *Nelumbo nucifera* by high-performance liquid chromatography method. *International journal of pharmaceutical investigation*, 7(2), 94–100. [https://doi.org/10.4103/jphi.JPHI\\_33\\_17](https://doi.org/10.4103/jphi.JPHI_33_17)

148. Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J. F., Flamm, G. W., Williams, G. M., & Lines, T. C. (2007). A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 45(11), 2179–2205. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.05.015>

149. *European Pharmacopoeia 8.0 Volume 1*. (2014). Strasbourg: Council of Europe.

150. *European Pharmacopoeia 8.0 Volume 2*. (2014). Strasbourg: Council of Europe.

151. *European Pharmacopoeia 9.0 Volume 2*. (2018). Strasbourg: Council of Europe.

152. Тараховський, Ю. С., Ким, Ю. А., Абдрасилов, Б. С., & Музафаров, Е. Н. (2013). Флавоноиди: біохімія, біофізика, медицина. *Пуціно: Synchronbook*.

153. Rowe, R. C., Sheskey, P., & Quinn, M. (2009). *Handbook of pharmaceutical excipients*. Libros Digitales-Pharmaceutical Press.

154. Державний реєстр лікарських засобів України URL: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument>

155. Panpimanmas, S., Sithipongsri, S., Sukdanon, C., & Manmee, C. (2010). Experimental comparative study of the efficacy and side effects of *Cissus quadrangularis* L. (Vitaceae) to Daflon (Servier) and placebo in the treatment of acute hemorrhoids.

*Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*, 93(12), 1360–1367.

156. Sezer, A., Usta, U., Kocak, Z., & Yagci, M. A. (2011). The effect of a flavonoid fractions diosmin + hesperidin on radiation-induced acute proctitis in a rat model. *Journal of cancer research and therapeutics*, 7(2), 152–156. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.82927>

157. Carballo-Villalobos, A. I., González-Trujano, M. E., Pellicer, F., & López-Muñoz, F. J. (2016). Antihyperalgesic Effect of Hesperidin Improves with Diosmin in Experimental Neuropathic Pain. *BioMed research international*, 2016, 8263463. <https://doi.org/10.1155/2016/8263463>

158. Демьяненко, В. Г. (1986). *Исследования в области технологии и получения фенольных препаратов из надземной части цикория обыкновенного*. Харків: ХарГУ.

159. Соколов, П. Д. (1993). *Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство Asteraceae (Compositae)*. СПб: Наука. 352 с.

160. Зузук, Б. М., & Куцик, Р. В. (2002). Цикорий дикий (Цикорий обыкновенный) *Cichorium intybus* L.(Аналитический обзор). *Провизор*, (22), 27-31.

161. Elias, T.S., Dykeman, P.A. (2009). *Edible Wild Plants: A North American Field Guide to Over 200 Natural Foods*. New York: Sterling Publishing Co., 288 p.

162. O'Neill, J. (2008). Using inulin and oligofructose with high-intensity sweeteners. *Functional Ingredients*.

163. Madrigal, L., & Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales [Inulin and derivatives as key ingredients in functional foods]. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 57(4), 387–396.

164. Wilson, R. G., Smith, J. A. (2004). Chicory Root Yield and Carbohydrate Composition is Influenced by Cultivar Selection, Planting, and Harvest Date. *Crop Science*. 44 (3), 748–752. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0748>

165. Гаммель, И. В., Пятигорская, Н. В., & Рудакова, И. П. (2018). Эволюция номенклатуры вспомогательных веществ в технологии суппозиториев. *Фармация*, 67(7), 3-7.
166. Suppocire® NA 15. URL: <https://www.gattefosse.com/pharmaceuticals-products/suppocire-na-15>
167. Suppocire® NAS 50. URL: <https://www.gattefosse.com/pharmaceuticals-products/suppocire-nas-50>
168. Литвиненко, Т. М. (2014). Сучасний стан асортименту супозиторних основ і фактори їх вибору. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*, 1, 35–38.
169. Гурєєва, С. М., Кондратова, Ю. А. (2016). Вивчення стабільності лікарського засобу Антраль, таблетки, вкриті оболонкою. *Фармацевтичний журнал*, 2, 70-76.
170. Abd El Hady, W. E., Mohamed, E. A., Soliman, O. A. E., & El-Sabbagh, H. M. (2019). In vitro-in vivo evaluation of chitosan-PLGA nanoparticles for potentiated gastric retention and anti-ulcer activity of diosmin. *International journal of nanomedicine*, 14, 7191–7213. <https://doi.org/10.2147/IJN.S213836>
171. Udapurkar, P. P., Bhusnure, O. G., & Kamble, S. R. (2018). Diosmin Phytosomes: development, optimization and physicochemical characterization. *Indian J Pharm Educ Res*, 52(4), 29-S36. <https://doi.org/10.5530/ijper.52.4s.73>
172. Haghizadeh, M., Zare, K., Aghaie, H., & Monajjemi, M. (2020). Preparation and characterization of Chicory leaf powder and its application as a nano-native plant sorbent for removal of Acid Blue 25 from aqueous media: isotherm, kinetic and thermodynamic study of the adsorption phenomenon. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 10, 75-86.
173. Behboodi, S., Baghbani-Arani, F., Abdalan, S., & Sadat Shandiz, S. A. (2019). Green Engineered Biomolecule-Capped Silver Nanoparticles Fabricated from Cichorium intybus Extract: In Vitro Assessment on Apoptosis Properties Toward Human



Breast Cancer (MCF-7) Cells. *Biological trace element research*, 187(2), 392–402.  
<https://doi.org/10.1007/s12011-018-1392-0>

174. Affam, A. C., Chaudhuri, M., & Kutty, S. R. M. (2012). Fenton treatment of chlorpyrifos, cypermethrin and chlorothalonil pesticides in aqueous solution. *Journal of Environmental Science and Technology*, 5(6), 407-418.  
<https://doi.org/10.3923/jest.2012.407.418>

175. Sahu, C., & Das, A. K. (2017). Solvolysis of organophosphorus pesticide parathion with simple and  $\alpha$  nucleophiles: a theoretical study. *Journal of Chemical Sciences*, 129, 1301-1317. <https://doi.org/10.1007/s12039-017-1322-2>

176. Singh, B., Prasad, G. K., Pandey, K. S., Danikhel, R. K., & Vijayaraghavan, R. (2010). Decontamination of chemical warfare agents. *Defence science journal*, 60(4), 428–441. <https://doi.org/10.14429/dsj.60.487>

177. Blinov, V., Volchek, K., Kuang, W., Brown, C. E., & Bhalerao, A. (2013). Two-Stage Decontamination of Organophosphorus Compounds on Sensitive Equipment Materials. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(4), 1405-1413.  
<https://doi.org/10.1021/ie302012y>

178. Mandal, D., Mondal, B., & Das, A. K. (2012). Nucleophilic degradation of fenitrothion insecticide and performance of nucleophiles: a computational study. *The journal of physical chemistry. A*, 116(10), 2536–2546.  
<https://doi.org/10.1021/jp2100057>

179. Vahitova, L. N., Matvienko, K. V., Taran, N. A., Rybak, V. V., Burdina, Ya. F. (2014). Kineticheskaya model' reaktsiy gidroliza i pergidroliza paraoksona v mikroemul'sii. *Naukovi pratsi Donetskoho natsionalnoho tekhnichnoho universytetu. Ser.: Khimiya i khimichna tekhnolohiya*, 2, 121–127.

180. Vakhitova, L. N., Lakhtarenko, N. V., Popov, A. F. (2015). Kinetics of the Oxidation of Methyl Phenyl Sulfide by Peroxoborate Anions. *Theoretical and Experimental Chemistry*, 51 (5), 307–313. <https://doi.org/10.1007/s11237-015-9430-x>

181. Bessarabov, V. I., Vakhitova, L. M., Kuzmina, H. I., Baula, O. P., Palchevska, T. A., Matvienko, K. V. et. al. (2016). Okysniuvalni vlastyvoli peroxydu vodniu v systemakh dekontaminatsiyi zastarilykh fosfororhanichnykh pestytsydiv. *Khimichna promyslovist Ukrainy*, 5(6), 74–78.

182. Vakhitova, L., Bessarabov, V., Taran, N., Kuzmina, G., Zagoriy, G., Baula, O., Popov, A. (2017). Decontamination of methyl parathion in activated nucleophilic systems based on carbamide peroxisolvate. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 6 (10 (90)), 31–37. doi: <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2017.119495>

183. Bessarabov, V., Vakhitova, L., Kuzmina, G., Zagoriy, G., Baula, O. (2017). Development of micellar system for the decontamination of organophosphorus compounds to clean technological equipment. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 1 (6 (85)), 42–49. doi: <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2017.92034>

ДОДАТОК А  
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

1. Matvieieva N., Bessarabov V., Khaynakova O., Duplij V., Bohdanovych T., Ratushnyak Ya., Kuzmina G., Lisovyi V., **Zderko N.**, Kobylinska N. Cichorium Intybus L.'Hairy' Roots as Rich-Source of Antioxidants and Anti-Inflammatory Compounds. *Heliyon*. 2023. Vol. 9, № 3. E14516. (наукометрична база даних Scopus).
2. Bessarabov, V. I., & **Zderko, N. P.** (2023). Механізм інгібування 15-ліпоксигенази діосміном. *Фармацевтичний часопис*, (2), 41–45.
3. Bessarabov V., Vasylenko V., Vakhitova L., Kuzmina G., **Zderko N.**, Plavan V., Zagoriy G. Development of a Decontamination System for Decomposing N-(phosphonomethyl)glycine. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2019. Vol. 3, №6. P. 6-13. (наукометрична база даних Scopus).
4. Бессарабов В.І., Вахітова Л.М., Кузьміна Г.І., Баула О.П., Лісовий В.М., **Здерко Н.П.** Розробка методу оцінки ефективності деконтамінації фосфорорганічних сполук. *Вісник КНУТД. Хімічні та біофармацевтичні технології*. 2018. №5 (126). С. 114-122.
5. Бессарабов В.І., **Здерко Н.П.**, Кузьміна Г.І., Баула О.П. Дослідження *in silico* можливої протигрипозної активності деяких рослинних екстрактів. *Загальноотерапевтична практика: нові технології та міждисциплінарні питання: Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, 7 листопада 2013 р., м. Харків / за ред. Г.Д. Фадєєнко та ін. – Х., 2013. – С. 28.*
6. Karyna Savchenko, Vadym Lisovyi, **Nazar Zderko**, Volodymyr Bessarabov, Galyna Kuzmina, Nadia Matvieieva, Hanna Kharytonenko. Research of anti-inflammatory properties Cichorium intybus extract. *Open Readings 2022 : 65th international conference for students of Physics and Natural sciences*. Vilnius : Vilnius University, 2022. P. 297.

7. Лижнюк В.В., Лісовий В.М., Бессарабов В.І., Кузьміна Г.І., **Здерко Н.П.**, Матвєєва Н.А. Визначення активності екстракту *Cichorium intybus* в redox системі аутоокиснення адреналіну. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології* : Матеріали II міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції. Харків : НФаУ, 2022. С. 154.

8. **Zderko N.P.**, Bessarabov V.I. Anticarcinogenic and radioprotective activity of diosmin and hesperidin. *Pharmacology, Pharmaceutical Technology and Pharmacotherapy in Active Longevity*: book of abstracts of the II International Scientific Conference / edited by K. Prashchayeu and V. Bessarabov - Vilnius: OIHN, 2015. Pp. 22-23p. - ISBN 978-609-95788-0-4 (PDF).

9. Савченко К.І., Лісовий В.М., Бессарабов В.І., Харитоненко Г.І., Гой А.М., **Здерко Н.П.** Дизайн лікарського засобу протизапальної дії. *Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології*: матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції (м. Харків, 13 жовтня 2022 р.). Х.: Вид-во НФаУ, 2022. С. 182-183. <https://er.knutd.edu.ua/handle/123456789/23288>

10. Volodymyr Bessarabov, Nadia Matvieieva, Galyna Kuzmina, Vadym Lisovyi, Iryna Pashchenko, Viktor Kostyuk, **Nazar Zderko**. Anti-inflammatory properties of *Artemisia tilesii* ledeb extract. *22nd World Congress of Gerontology and Geriatrics. IAGG World Congress*. 2022. P. 106.

11. **Здерко Н.П.**, Бессарабов В.І. Противірусна активність діосміну та гесперидину. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії*: матеріали II Міжнародної науково-практичної інтернет - конференції (м. Харків, 12-13 листопада 2015 р.) - Х. : Вид-во НФаУ, 2015. – С. 123-124.

12. **Здерко Н.П.**, Бессарабов В.І., Баула О.П. Потенціал діосміну та гесперидину як активних фармацевтичних інгредієнтів лікарських засобів для лікування хвороби Альцгеймера. *Хімічні проблеми сьогодення* : збірник тез доповідей Дев'ятої Української наукової конференції студентів, аспірантів і

молодих учених з міжнародною участю / Донецький національний університет ; редколегія : О. М. Шендрик (відп. ред.) [та ін.]. – Вінниця : ТОВ «Нілан-ЛТД», 2016. С. 31.

13. Кузьміна Г.І., Бессарабов В.І., Харченко А.Ю., Лісовий В.М., Шахматова К.А., **Здерко Н.П.** Фармацевтична композиція для лікування запальних захворювань у людей літнього віку. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології* : збірник наукових праць. Випуск 9. Харків: НФаУ, 2021. С. 33.

14. **Здерко Н.П.**, Горюшин І.А. Флавоноїди як можливі інгібітори холінестераз. XVIII Наукова молодіжна конференція «Проблеми та досягнення сучасної хімії» збірник тез доповідей, Київ, ТОВ НВП «Інтерсервіс» 2016. – С. 57.

15. Bessarabov V. I., Kuzmina G. I., Shelihatska O. V., Vasilev V. I., Saliy O.O., Horiushun I. A., **Zderko N. P.** The hesperidin inhibits the butyrylcholinesterase from serum of human. *IX-th International chemistry conference "Kyiv-Toulouse" dedicated to the 100-th anniversary of Fedir Babichev : materials of reports and performances (Kyiv, 4-9 june 2017).* – Kyiv : TSNUK, 2017. – P. 127.

16. Бессарабов В.І., Кузьміна Г.І., Шелігацька О.В., Васильєв В.І., Баула О.П., Горюшин І.А., **Здерко Н.П.** Інгібування бутирилхолінестерази сироватки крові людини гесперидином. Матеріали Української науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю «Нанотехнології у фармації та медицині» X.: 2017, С. 48.

17. Семенкова І.Л., Скрипка А.В., **Здерко Н.П.**, Бессарабов В.І., Кузьміна Г.І. Підвищення біодоступності активного фармацевтичного інгредієнту рослинного походження. *Наукові розробки молоді на сучасному етапі* : тези доповідей XVII Всеукраїнської наукової конференції молодих вчених та студентів (26-27 квітня 2018 р., Київ). - Київ : КНУТД, 2018. - Т. 1 : Сучасні матеріали і технології виробництва виробів широкого вжитку та спеціального призначення. - С. 561-562.

18. Ященко К.С., Шевчук А.І., Лісовий В.М., Бессарабов В.І., **Здерко Н.П.** Підвищення біодоступності флавоноїдів. *Наукові розробки молоді на сучасному етапі*: тези доповідей XVIII Всеукраїнської наукової конференції молодих учених та студентів, 18-19 квітня 2019 року. Київ: КНУТД, 2019. С. 594.

19. Vadym Lisovyi, Artem Kharchenko, **Nazar Zderko**, Olga Kovalevska, Volodymyr Bessarabov. Centrifugal formation of fibers of solid dispersed system of polymer with hesperidine. *Open Readings 2022* : 65th international conference for students of Physics and Natural sciences. Vilnius : Vilnius University, 2022. P. 302.

20. Харченко А.Ю., Лісовий В.М., Таран Д.С., **Здерко Н.П.**, Ковалевська О.І., Костюк В.Г., Бессарабов В.І. Формування волокон полімерної твердої дисперсної системи гесперидину. *Сучасні аспекти створення лікарських засобів* : матеріали II Міжнародної науково-практичної дистанційної конференції (1 лютого 2022 р., м. Харків). Харків : НФаУ, 2022. С. 225.

21. Кузьмич М.О., Мазура С.О., **Здерко Н.П.**, Кузьміна Г.І., Бессарабов В.І. Лікарські засоби для лікування нейродегенеративних захворювань. *Наукові розробки молоді на сучасному етапі* : тези доповідей XVII Всеукраїнської наукової конференції молодих вчених та студентів (26-27 квітня 2018 р., Київ). - Київ : КНУТД, 2018. - Т. 1 : Сучасні матеріали і технології виробництва виробів широкого вжитку та спеціального призначення. - С. 585-586.

22. Шелігацька О.В., Бессарабов В.І., Куришко Г.Г., Вахітова Л.М., **Здерко Н.П.**, Максименко С.П. Механізми токсичної дії фосфорорганічних пестицидів. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології* : збірник наукових праць. – Х.: Вид-во НФаУ, 2016. – С. 691-693.

23. Пищик М.М., Прищепя С.М., **Здерко Н.П.**, Бессарабов В.І. Ферментні системи детоксикації фосфорорганічних сполук. Тези доповідей XV Всеукраїнської наукової конференції молодих учених та студентів "*Наукові розробки молоді на сучасному етапі*". Т. 1 : Секція "Нові наукомісткі технології виробництва

матеріалів, виробів широкого вжитку та спеціального призначення" : 28-29 квітня 2016 р. — К. : КНУТД, 2016. — С. 407.

24. Бессарабов В.І., Вахітова Л.М., Кузьміна Г.І., **Здерко Н.П.**, Дерипапа В.С. Нові системи для деконтамінації фосфорорганічних активних фармацевтичних інгредієнтів. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії*: матеріали III Міжнародної науково-практичної інтернет -конференції -Х. : Вид-во НФаУ, 2017. – С. 36.

25. Ташак Д.С., **Здерко Н.П.**, Качалова О.А., Кузьміна Г.І., Бессарабов В.І. Косметичні композиції з лікувальними УФ-захисними властивостями. *Наукові розробки молоді на сучасному етапі* : тези доповідей XVII Всеукраїнської наукової конференції молодих вчених та студентів (26-27 квітня 2018 р., Київ). - Київ : КНУТД, 2018. - Т. 1 : Сучасні матеріали і технології виробництва виробів широкого вжитку та спеціального призначення. - С. 577-578.

26. Козачок Г.С., **Здерко Н.П.**, Кузьміна Г.І., Бессарабов В.І. Застосування УФ-фільтрів в anti-age косметичній продукції. *Наукові розробки молоді на сучасному етапі* : тези доповідей XVI Всеукраїнської наукової конференції молодих вчених та студентів (27-28 квітня 2017 р., Київ). - К. : КНУТД, 2017. - Т. 1 : Сучасні матеріали і технології виробництва виробів широкого вжитку та спеціального призначення. - С. 594-595.

27. Мідякова М.В., **Здерко Н.П.**, Бессарабов В.І., Кузьміна Г.І. Порівняльний аналіз методів дослідження фотозахисних властивостей фармацевтичних композицій. *Наукові розробки молоді на сучасному етапі* : тези доповідей XVI Всеукраїнської наукової конференції молодих вчених та студентів (27-28 квітня 2017 р., Київ). - К. : КНУТД, 2017. - Т. 1 : Сучасні матеріали і технології виробництва виробів широкого вжитку та спеціального призначення. - С. 592-593.

28. Мислик К.О., Приймак В.І., **Здерко Н.П.**, Кузьміна Г.І., Бессарабов В.І. Структура ринку лікарських засобів, що містить вітамін D. *Наукові розробки молоді*

на сучасному етапі : тези доповідей XVI Всеукраїнської наукової конференції молодих вчених та студентів (27-28 квітня 2017 р., Київ). - К. : КНУТД, 2017. - Т. 1 : Сучасні матеріали і технології виробництва виробів широкого вжитку та спеціального призначення. - С. 596-597.

29. Бессарабов В.І., Васильєв В.І., Баула О.П., Кузьміна Г.І., Здерко Н.П. Технологія віртуального експериментального дослідження у додипломній підготовці фахівців для фармацевтичної галузі. *Фармація XXI століття* : тенденції та перспективи: матеріали VIII Нац. з'їзду фармацевтів України: у 2 т. Т. 2 / М-во охорони здоров'я України. Нац. фармац. ун-т; ред. кол.: В П. Черних (голова) та ін.; уклад.: С. Ю. Данильченко та ін. - Харків: НФаУ, 2016. – С. 326.

30. Кулик В.Б., Бессарабов В.І., Здерко Н.П., Вакуленко О.С. Дослідження впливу терапії діосміном на ліпідний спектр крові і окисно-антиоксидантну систему щурів, які знаходились на дієті з високим вмістом холестерину. *Фізико-органічна хімія, фармакологія та фармацевтична технологія біологічно активних речовин* : збірник наукових праць / за заг. ред. А. Ф. Попова. - Київ : КНУТД, 2019. - Вип. 2, Т. 1. - С. 297-305.

31. Повшедна І.О., Бессарабов В.І., Кузьміна Г.І., Лісовий В.М., Закаблущий Н.А., Здерко Н.П., Пашенко І.О. Дослідження антиоксидантних властивостей цитрусового флавоноїду гесперидину. *Фізико-органічна хімія, фармакологія та фармацевтична технологія біологічно активних речовин*: збірник наукових праць, випуск 3 / за заг. ред. А. Ф. Попова. – Київ: КНУТД, 2021. С. 252-258.

32. Здерко Н.П., Бессарабов В.І., Кузьміна Г.І., Плаван В.П. Огляд методів підвищення розчинності поганорозчинних активних фармацевтичних інгредієнтів. *Modern physical-organic chemistry and pharmacy*: collective monograph. Tallinn: Nordic Sci Publisher, 2021. P. 15-29.

33. Бессарабов В.І., Кузьміна Г.І., Вахітова Л.М., Горюшин І.А., Шинкарьова М.Ю., Баула О.П., Здерко Н.П., Качалова Н.М. Антиоксидантні



властивості флороглуцинолу в redox системі на основі аутоокиснення адреналіну. *KyivPharma-2017. Фармакологія та фармацевтична технологія в забезпеченні активного довголіття* : збірник наукових праць III Міжнародної науково-практичної конференції (8 грудня 2017 р., м. Київ) / під заг. ред. В. В. Страшного. – Київ : КНУТД, 2017. – С. 19-24.

**ДОДАТОК Б**  
**Висновок комісії з питань етики та біоетики наукових досліджень**

Міністерство освіти і науки України  
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ  
**КОМІСІЯ З ПИТАНЬ ЕТИКИ ТА БІОЕТИКИ НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ**  
м. Київ, вул. Мала Шияновська, 2, 01011  
e-mail: voloshina.im@knuud.edu.ua

**ВИТЯГ**  
**з протоколу № 1**  
**засідання комісії з питань етики та біоетики наукових досліджень**  
**від «10» серпня 2023 року**

**ПРИСУТНІ:** доц. Волошина І.М., проф. Галавська Л.Є., доц. Кислова О.В.,  
доц. Харитоненко Г.І., доц. Шидловська О.А.

**СЛУХАЛИ:** Волошину І.М. про надання висновку щодо дисертаційної роботи аспіранта четвертого року навчання кафедри промислової фармації КНУТД Здерка Назара Петровича на тему «Розроблення фармацевтичної композиції протизапальної дії на основі рослинної сировини *Cichorium intybus*».

**УХВАЛИЛИ:** Комісія зазначила відсутність зауважень до виконаної дисертаційної роботи згідно міжнародного та національного законодавства з біоетики, оскільки у науковій роботі Здерка Назара Петровича на тему «Розроблення фармацевтичної композиції протизапальної дії на основі рослинної сировини *Cichorium intybus*» відсутні будь-які випробування та дослідження на тваринах, культурах клітин, органах людини чи тварин, а також з залученням пацієнтів та здорових добровольців. Рішення прийнято одногосно.

Голова комісії з питань етики  
та біоетики наукових досліджень,  
к.т.н., доцент



Ірина ВОЛОШИНА

Секретар комісії з питань етики  
та біоетики наукових досліджень,  
к.б.н., доцент



Ганна ХАРИТОНЕНКО



**ДОДАТОК Г**  
**Акт впровадження результатів дисертаційного дослідження в**  
**діяльність ТОВ «Ковлар Груп»**

«ЗАТВЕРДЖУЮ»  
 Директор ТОВ «Ковлар Груп»  
 Калафат К.В.  
 « 01 » вересня 2023 р.

АКТ

про впровадження результатів дисертаційного дослідження  
 на здобуття наукового ступеня доктора філософії  
 Здерко Назара Петровича  
 в діяльність ТОВ «Ковлар Груп»

1. **Назва пропозиції для впровадження:** лабораторна технологія одержання та дослідження властивостей екстрактів з біотехнологічної рослинної сировини *Cichorium intybus*.
2. **Установа, автор:** Київський національний університет технологій та дизайну, кафедра промислової фармації, 01011 Київ, вул. Мала Шиянівська (Немировича-Данченка), 2; асп. Здерко Н. П.
3. **Джерело інформації:**  
 1. 1. Nadiia Matvieieva, Volodymyr Bessarabov, Olena Khaynakova, Volodymyr Duplij, Taisa Bohdanovych, Yakiv Ratushnyak, Galina Kuzmina, Vadym Lisovyi, Nazar Zderko, Natalia Kobylinska (2023) *Cichorium Intybus* L.'Hairy' Roots as Rich-Source of Antioxidants and Anti-Inflammatory Compounds. *Heliyon*, 9(3), E14516. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14516> (Scopus, Q1).
4. **Впроваджено:** В умовах технологічної лабораторії відтворено методики отримання водних та водно-етанольних екстрактів з біотехнологічної рослинної сировини *Cichorium intybus* та методика дослідження його антиоксидантних властивостей.
5. **Термін впровадження:** II квартал 2023 року.
6. **Зауваження і пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження

Директор з виробництва ТОВ «Ковлар Груп»,  
 канд. хім. наук, с.н.с

 Л.М. Вахігова

« 01 » вересня 2023 р.

**ДОДАТОК Д**  
**Акт впровадження результатів дисертаційного дослідження в діяльність Національного фармацевтичного університету МОЗУ**

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**

Проректор з науково-педагогічної  
 роботи Національного фармацевтичного  
 університету  
 д.фарм.н., проф. Інна ВЛАДИМИРОВА  
 « 5 » *Ірина* 2023 р.



**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

**1. Назва пропозиції для впровадження:** Дослідження біологічної активності екстрактів з біотехнологічної рослинної сировини *Cichorium intybus*

**2. Установа, її адреса, виконавці:** Київський національний університет технологій та дизайну, кафедра промислової фармації, 01011 Київ, вул. Мала Шияновська (Немировича-Данченка), 2; асп. Здерко Н. П., д. техн. н., проф. Бессарабов В. І.

**3. Джерела інформації:**

1. Nadiia Matvieieva, Volodymyr Bessarabov, Olena Khaynakova, Volodymyr Duplij, Taisa Bohdanovych, Yakiv Ratushnyak, Galina Kuzmina, Vadym Lisovyi, Nazar Zderko, Natalia Kobylinska (2023) *Cichorium Intybus L.'Hairy' Roots as Rich-Source of Antioxidants and Anti-Inflammatory Compounds*. *Heliyon*, 9(3), E14516. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14516> (Scopus, Q1)
2. Бессарабов В.І., Здерко Н.П. Механізм інгібування 15-ліпоксигенази діосміном. *Фармацевтичний часопис*, 2023. 2/66. С. 41-45. DOI: <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2023.2.14053>
3. Volodymyr Bessarabov, Nadia Matvieieva, Galyna Kuzmina, Vadym Lisovyi, Iryna Pashchenko, Viktor Kostyuk, Nazar Zderko. Anti-inflammatory properties of *Artemisia tilesii* ledeb extract. 22nd World Congress of Gerontology and Geriatrics. IAGG World Congress. 2022. P. 106.
4. Karyna Savchenko, Vadym Lisovyi, Nazar Zderko, Volodymyr Bessarabov, Galyna Kuzmina, Nadia Matvieieva, Hanna Kharytonenko. Research of anti-inflammatory properties *cichorium intybus* extract. Open Readings 2022 : 65th international conference for students of Physics and Natural sciences. Vilnius : Vilnius University, 2022. P. 297.

**4. Впроваджено:** в освітній процес кафедри аптечної технології ліків у лекційний курс «Біофармація» для здобувачів вищої освіти за ОПП «Фармація» на другому (магістерському) рівні вищої освіти.

Відповідальний за впровадження:

Завідувачка кафедрою аптечної технології  
 ліків Національного фармацевтичного  
 університету, д. фарм. н, професор

Лілія ВИШНЕВСЬКА

« 5 » *Вересень* 2023 р.