

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Суворова Зінаїда Сергіївна**

УДК 615.281.9: 615.282.84: 615.015

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**«ФАРМАКОТЕРАПЕВТИЧНА АКТИВНІСТЬ КВЕРЦЕТИНУ У  
СКЛАДІ РІЗНИХ СИСТЕМ ТРАНСПОРТУ ПРИ ГОСТРОМУ  
РЕСПІРАТОРНОМУ ДИСТРЕС-СИНДРОМІ»**

Подається на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань  
09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія (ОНП Біологія/Фармакологія) –  
ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»

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

З.С. Суворова

Наукові керівники:

**Ядловський Олег Євгенович**, доктор біологічних наук;

**Григор'єва Ганна Савівна**, доктор хімічних наук

**Київ – 2026**

## АНОТАЦІЯ

*Суворова З.С.* Фармакотерапевтична активність кверцетину у складі різних систем транспорту при гострому респіраторному дистрес-синдромі. – кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія (ОНП Біологія/Фармакологія) – ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», Київ, 2026.

Дисертаційна робота присвячена комплексному дослідженню фармакологічних властивостей кверцетину та оцінці ефективності його застосування при гострому респіраторному дистрес-синдромі з урахуванням використання сучасних систем доставки лікарських засобів.

Гострий респіраторний дистрес-синдром у роботі розглядається як тяжкий поліетіологічний стан, що супроводжується дифузним ушкодженням легеневої тканини, порушенням альвеолярно-капілярного бар'єра та розвитком вираженої гіпоксемії. Важливою особливістю цього синдрому є те, що його прогресування значною мірою визначається не лише первинним ушкоджувальним фактором, а й надмірною, недостатньо контрольованою запальною відповіддю організму. Така відповідь характеризується активацією імункомпетентних клітин, інтенсивним вивільненням цитокінів, змінами судинної проникності та порушенням мікроциркуляції, що в сукупності призводить до формування замкненого патологічного кола.

Незважаючи на впровадження сучасних методів інтенсивної терапії, включаючи респіраторну підтримку, питання ефективної фармакологічної корекції ГРДС залишається відкритим. Існуючі лікарські засоби здебільшого впливають на окремі ланки патологічного процесу, не забезпечуючи достатнього контролю над його перебігом. Це обумовлює необхідність пошуку нових підходів, орієнтованих на мультимодальний вплив.

У цьому контексті особливий інтерес становить кверцетин — природний флавоноїд, який характеризується широким спектром біологічної активності. Його антиоксидантні, протизапальні та мембраностабілізуючі властивості створюють передумови для застосування при патологіях, пов'язаних із оксидативним стресом та запаленням. Водночас практичне використання кверцетину обмежується його низькою розчинністю у водному середовищі та недостатньою біодоступністю, що знижує ефективність реалізації фармакологічних ефектів.

У роботі запропоновано підхід до подолання цих обмежень шляхом використання систем транспорту лікарських речовин. Зокрема, досліджено ліпосомальні форми кверцетину, а також нову композицію, що поєднує кверцетин із іонами цинку. Передбачається, що такі системи здатні підвищувати стабільність сполуки, покращувати її проникнення у тканини та забезпечувати більш ефективну взаємодію з молекулярними мішенями.

Для досягнення поставленої мети використано комплексний методичний підхід, що включає молекулярне моделювання, експериментальні фармакологічні дослідження, біохімічний аналіз та морфологічну оцінку стану легеневої тканини. Застосування методів докінгу дозволило встановити, що кверцетин потенційно здатний взаємодіяти з ключовими ферментами запального каскаду, зокрема циклооксигеназами та компонентами сигнальних шляхів, пов'язаних із регуляцією запальної відповіді.

Експериментальні дослідження проведено на моделях гострого респіраторного дистрес-синдрому різного генезу, що дало змогу оцінити ефективність досліджуваних сполук в умовах варіабельності патогенетичних механізмів. Показано, що застосування кверцетину супроводжується зменшенням ступеня ушкодження легеневої тканини, зниженням вираженості запальної реакції та покращенням функціональних показників.

Особливу увагу приділено порівняльній оцінці різних форм препарату. Встановлено, що ліпосомальні системи доставки забезпечують більш

виражений фармакологічний ефект порівняно з традиційними формами. Це може бути пов'язано з покращенням фармакокінетичних характеристик та підвищенням доступності активної речовини у зоні патологічного процесу.

Додатково показано, що включення іонів цинку до складу ліпосомальної композиції супроводжується посиленням протизапальної та протекторної дії. Отримані результати свідчать про можливість використання комбінованих систем як більш ефективного підходу до фармакологічної корекції запальних станів.

Таким чином, проведене дослідження розширює уявлення про механізми дії кверцетину та обґрунтовує доцільність використання систем його доставки при гострому респіраторному дистрес-синдромі. Отримані дані можуть бути використані як експериментальне підґрунтя для подальших доклінічних і клінічних досліджень, спрямованих на впровадження нових фармакологічних підходів у лікування патологій, що супроводжуються вираженою запальною реакцією.

У роботі вперше встановлено спрогнозовану на підставі інформаційного аналізу та докінг аналізу активність систем транспорту кверцетину щодо фармакологічної корекції запальних процесів та наслідків ГРДС. Розроблено оригінальну ліпосомальну композицію кверцетину з цинком із конкурентним рівнем фармакологічного ефекту щодо наслідків ГРДС, яка захищена патентом. Наукова новизна результатів дисертації підтверджується нововведеннями (інформаційний бюлетень НАН України та додаток до «Журналу НАМН України»).

Результати дисертаційної роботи мають практичне значення та можуть бути використані як наукове підґрунтя для впровадження ліпосомальних систем транспорту кверцетину в доклінічну й клінічну практику як патогенетично обґрунтованих засобів фармакокорекції гострого респіраторного дистрес-синдрому та його ускладнень, а також при розробці нових лікарських форм і комбінованих препаратів на основі кверцетину, зокрема з іонами цинку. Встановлені протизапальні, антифібротичні та

радіозахисні властивості ліпосомального кверцетину розширюють можливості його застосування при гострих і віддалених ураженнях легень, а матеріали роботи можуть бути використані в науково-дослідній діяльності та освітньому процесі. Результати також апробовано та впроваджено у освітній процес вітчизняних закладів вищої освіти.

**Публікації:** Результати дисертаційного дослідження відображено у 13 наукових публікаціях, з них 4 статті, у тому числі 1 стаття у виданні, включеному до наукометричної бази *Scopus*, та 3 статті у наукових фахових виданнях, рекомендованих МОН України (категорія «Б»); 1 патент США, 1 заявка на патент України, та 7 тез доповідей наукових заходів.

**Ключові слова:** *кверцетин, drug delivery systems, ліпосоми, Лінофлавон, Корвітин, гострий респіраторний дистрес-синдром, протизапальна дія, антифібротичний ефект, радіозахисні властивості.*

## ANNOTATION

*Suvorova Z.S.* Pharmacotherapeutic Activity of quercetin within different delivery systems in acute respiratory distress syndrome. – Qualification scientific work on the rights of a manuscript.

**Dissertation submitted for the degree of Doctor of Philosophy** in the field of knowledge 09 Biology, specialty 091 Biology (Educational and Scientific Program “Biology/Pharmacology”) – State Institution “Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Kyiv, 2026.

The dissertation is devoted to a comprehensive investigation of the pharmacological properties of quercetin and the evaluation of its therapeutic efficacy in acute respiratory distress syndrome (ARDS), taking into account the application of modern drug delivery systems.

Within this study, ARDS is considered a severe polyetiological condition characterized by diffuse lung injury, disruption of the alveolar–capillary barrier, and the development of pronounced hypoxemia. A key feature of this syndrome is that its progression is determined not only by the primary damaging factor but also by an excessive and poorly controlled inflammatory response. This response involves activation of immunocompetent cells, intensive cytokine release, alterations in vascular permeability, and impaired microcirculation, ultimately leading to the formation of a self-sustaining pathological cycle.

Despite advances in intensive care, including respiratory support strategies, effective pharmacological correction of ARDS remains a challenge. Currently available drugs mainly target individual components of the pathological process and fail to provide sufficient control over disease progression. This underscores the need for new therapeutic approaches with multimodal mechanisms of action.

In this context, quercetin, a natural flavonoid with a broad spectrum of biological activity, is of particular interest. Its antioxidant, anti-inflammatory, and

membrane-stabilizing properties make it a promising candidate for the treatment of conditions associated with oxidative stress and inflammation. However, its clinical application is limited by poor aqueous solubility and low bioavailability, which reduce the effectiveness of its pharmacological action.

To overcome these limitations, the present study proposes the use of drug delivery systems. In particular, liposomal formulations of quercetin as well as a novel composition combining quercetin with zinc ions were investigated. Such systems are expected to enhance compound stability, improve tissue penetration, and facilitate more efficient interaction with molecular targets.

A comprehensive methodological approach was employed, including molecular modeling, experimental pharmacological studies, biochemical assays, and morphological evaluation of lung tissue. Molecular docking analysis indicated that quercetin is capable of interacting with key enzymes of the inflammatory cascade, including cyclooxygenases, as well as with components of signaling pathways involved in the regulation of inflammatory responses.

Experimental studies were performed using ARDS models of different origins, allowing the assessment of therapeutic efficacy under varying pathogenic conditions. The administration of quercetin was associated with a reduction in the severity of lung tissue damage, attenuation of the inflammatory response, and improvement of functional parameters.

Particular attention was given to the comparative evaluation of different formulations. Liposomal delivery systems demonstrated a more pronounced pharmacological effect compared to conventional forms, which may be attributed to improved pharmacokinetic properties and enhanced bioavailability at the site of injury.

Furthermore, incorporation of zinc ions into the liposomal composition resulted in an enhanced anti-inflammatory and protective effect. These findings suggest that combined delivery systems may represent a more effective strategy for the pharmacological management of inflammatory conditions.

Thus, the study expands current understanding of the mechanisms of quercetin action and substantiates the feasibility of using delivery systems for its application in ARDS. The obtained results provide a scientific basis for further preclinical and clinical investigations aimed at implementing novel pharmacological approaches for the treatment of inflammatory lung diseases.

For the first time, based on integrated information analysis and molecular docking, the potential activity of quercetin delivery systems in the pharmacological correction of inflammatory processes and ARDS-related complications has been predicted and experimentally supported. An original liposomal formulation of quercetin with zinc, demonstrating a competitive pharmacological effect against ARDS consequences, has been developed and protected by a patent. The scientific novelty of the dissertation is confirmed by officially registered innovations (NAS of Ukraine information bulletin and supplement to the “Journal of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”).

The results of the dissertation have practical significance and may serve as a scientific basis for the implementation of liposomal quercetin delivery systems in preclinical and clinical practice as pathogenetically justified agents for the pharmacological correction of ARDS and its complications. They may also be used in the development of new dosage forms and combined preparations based on quercetin, including those with zinc ions. The identified anti-inflammatory, antifibrotic, and radioprotective properties of liposomal quercetin broaden its potential application in both acute and long-term lung injuries. The materials of the study may be applied in research activities and educational processes. The results have also been tested and implemented in the educational process of domestic higher education institutions.

**Publications:** The results of the dissertation research are reflected in 13 scientific publications, including 4 articles, of which 1 article was published in a journal indexed in the *Scopus* scientometric database and 3 articles in scientific professional journals recommended by the Ministry of Education and Science of

Ukraine (Category “B”); 1 U.S. patent, 1 application for a patent of Ukraine and 7 abstracts of conference presentations.

**Key words:** *quercetin, drug delivery systems, liposomes, Lipoflavon, Corvitin, acute respiratory distress syndrome, anti-inflammatory activity, antifibrotic effect, radioprotective properties.*

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

**Статті у фахових наукових виданнях України та виданнях, що індексуються у Scopus:**

1. Ядловський О. Є., Суворова З. С., Бобкова Л. С., Бухтіарова Т. А. *In silico* аналіз молекулярних механізмів фармакологічної дії кверцетину. Фармакологія та лікарська токсикологія, 2023, 17 (6): 359–375. <https://doi.org/10.33250/17.06.359>. (Дисертанткою здійснено аналіз літературних джерел, проведено *in silico* дослідження, інтерпретацію результатів та підготовку статті до друку).

2. Суворова З. С. Протизапальна активність ліпосомальної форми кверцетину. Фармакологія та лікарська токсикологія, 2024, 18 (3): 185–190. <https://doi.org/10.33250/18.03.185>. (Дисертанткою самостійно виконано експериментальні біологічні дослідження, статистичну обробку результатів та підготовку рукопису статті).

3. Суворова З. С. Визначення ефективності ліпосомальних форм кверцетину в LPS-моделі гострого респіраторного дистрес-синдрому. Фармакологія та лікарська токсикологія, 2025, 19 (3): 258–266. <https://doi.org/10.33250/19.03.258>. (Дисертанткою виконано повний цикл експериментальних досліджень на біологічній моделі, аналіз та узагальнення результатів).

4. Stepanova N. V., Suvorova Z. S., Yadlovski O. Ye., Grygorieva G. S., Konakhovich N. F. Pharmacotherapeutic effects of quercetin delivery systems in experimental acute respiratory distress syndrome induced by acid aspiration. *Modern Medical Technology*, 2025, 17 (4): 314–320. <https://doi.org/10.14739/mmt.2025.4.340570>. Scopus Q4. (Дисертанткою здійснено аналіз літератури, виконано експериментальні біологічні дослідження та інтерпретацію результатів).

**Патенти та заявки на об'єкти інтелектуальної власності:**

5. Patent US Application No. 18399141. IPC A61K 31/685 et al. Pharmacologically active liposomal composition comprising quercetin and zinc. Inventors: Grygorieva G., Konakhovich N., Krasnopolski Y., Pylypenko O., Prokhorov V., Suvorova Z., Yadlovski O. Applicants: Consortium “Ukrindustri”; SI “Institute of Pharmacology and Toxicology of the NAMS of Ukraine”. Application date: 28.12.2023; Priority date: 14.09.2023 (UA).

6. Григор'єва Г. С., Конахович Н. Ф., Краснопольський Ю. М., Пилипенко О. Я., Прохоров В. В., Суворова З. С., Ядловський О. Є. Заявка на патент України № а2023 04351 від 14.09.2023. Фармакологічно активна ліпосомальна композиція, що містить кверцетин і цинк.

**Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

7. Суворова З. С., Григор'єва Г. С., Конахович Н. Ф., Бобкова Л. С., Ядловський О. Є. Оцінка ефективності кверцетину в ліпосомальній системі транспорту при гострому респіраторному дистрес-синдромі. Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку: тези доповідей Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю (Одеса, 9–12 квітня 2024 р.). Одеса, 2024. С. 318–320.

8. Суворова З. С., Білоткач І.-О. А., Бобкова Л. С. Докінгові дослідження взаємодії кверцетину з активними центрами СОХ-I та СОХ-II. Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування: матеріали Міжнар. наук. конф. (Харків, 25–26 квітня 2024 р.). Харків: Держ. біотехнол. ун-т, 2024. С. 67–69.

9. Суворова З. С., Полунін А. О., Григор'єва Г. С., Зінчик А. Г., Кириленко І. В. Дослідження протизапальної дії препарату на основі кверцетину «Ліпофлавіон». Молодіжна військова наука у Київському національному університеті ім. Т. Г. Шевченка: матеріали Всеукр. наук.-практ. онлайн-конф. (Київ, 26 квітня 2024 р.). Київ, 2024.

10. Суворова З. С., Полунін А. О., Григор'єва Г. С. Дослідження протизапальної дії препарату на основі кверцетину «Корвітин». Комплементарна/народна медицина, освіта, культура: від традиційних практик до клінічного дослідження: матеріали наук. конф. з міжнар. участю. До 20-річчя асоціації і 22-річчя фахового видання України (категорія «Б», SCOPUS-2024) «Фітотерапія. Часопис». (Київ, 13–14 червня 2024 р.). Київ, 2024. С. 216.

11. Суворова З. С., Білоткач І.-О. А., Науменко М. В., Добреля Н. В. Біоетичні аспекти використання тварин у фармакологічних дослідженнях: альтернатива евтаназії. Актуальні питання фармакології та лікарської токсикології: матеріали наук.-практ. конф. молодих учених з міжнар. участю (Київ–Краків, 25–26 вересня 2024 р.). Фармакологія та лікарська токсикологія. 2024. Т. 18, № 3. С. 201–203. (Диплом № 010-25.09.2024)

12. Suvorova Z. S., Polunin A. O. Pharmacological study of Lipoflavin in acute respiratory distress syndrome. The Impact of Digitalization on Healthcare Development: Proceedings of the International Scientific Conference (Riga, October 3–4, 2024). Riga: Baltija Publishing, 2024. P. 48–52. <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-486-3-13>.

13. Суворова З. С., Полунін А. О., Азарова О. В., Ядловський О. Є., Бобкова Л. С. Альтернативні методи дослідження біологічної активності нових лікарських засобів. Застосування методів *in silico* у фармакології. Етика життя і знання: біоетичні аспекти сучасної біології та медицини: матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. (16 жовтня 2025 р.). Київ–Івано-Франківськ–Херсон, 2025. С. 62–65. (Сертифікат № 19-25/2041)

## ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ЗМІСТ.....	13
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	15
ВСТУП.....	17
1 Роль протизапальних засобів та систем транспорту ліків на основі кверцетину в фармакотерапії ГРДС: стан проблеми та перспективи (огляд літератури).....	24
2 Матеріали та методи дослідження.....	43
2.1 Матеріали досліджень.....	43
2.2 Методи дослідження.....	48
2.3 Створення ліпосомальної композиції кверцетину з цинком.....	58
3 Докінг-аналіз <i>in silico</i> зв'язків та молекулярних мішеней кверцетину, що визначають протизапальну дію.....	63
3.1 Циклооксигеназа (ЦОГ) та кверцетин.....	63
3.2 Ліпоксигеназа (5-LOX) та кверцетин.....	69
3.3 Розробка складу ліпосомальної композиції кверцетину з цинком.....	71
4 Визначення протизапальних ефектів кверцетину в системах транспорту при ексудативному запаленні.....	75
4.1 Антиексудативна дія Ліпофлавонолу та Корвітіну.....	75
4.2 Оцінка антиексудативної дії оригінальної ліпосомальної композиції кверцетину з цинком.....	81
5 Визначення ефективності drug delivery systems кверцетину при ГРДС.....	84
5.1 Ефективність кверцетину у системах транспорту при аспіраційному ГРДС за різних парентеральних способів уведення.....	84
5.2 Ефективність кверцетину у системах транспорту при «фатальному» LPS-ГРДС.....	107

5.3 Оцінка впливу кверцетину в системах транспорту на медіатори запалення при ГРДС.....	125
6 Лікувально-профілактична дія кверцетину в системах транспорту (Ліпофлавіон) за розвитку фіброзу легень та наслідків опікових уражень ока.....	135
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	156
ВИСНОВКИ.....	160
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	162
ДОДАТКИ.....	181

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І СКОРОЧЕНЬ**

AA – arachidonic acid;

ALOX5 – arachidonate 5-lipoxygenase;

CRP (СРБ) – C-reactive protein;

IC<sub>50</sub> – 50% inhibitory concentration;

iNOS – inducible nitric oxide synthase;

L – ligand molecule with polar hydrogen atoms;

LH – ligand molecule with all hydrogen atoms;

logP – lipophilicity;

LT – leukotrienes;

MAPK – mitogen-activated protein kinase;

MCV – mean cell volume, fL – average erythrocyte volume;

MCH – mean corpuscular hemoglobin, pg – mean hemoglobin content per erythrocyte;

MCHC – mean corpuscular hemoglobin concentration, g/dL – mean hemoglobin concentration in erythrocyte mass;

NDGA – nordihydroguaiaretic acid, standard lipoxygenase inhibitor;

NIK – NF-κB inducing kinase;

PDB – Protein Data Bank;

pdb file – file in pdb format;

PDW – platelet distribution width, % – index of platelet size heterogeneity;

PLCR – platelet large cell ratio, % – proportion of large platelets;

PLT – platelet, 10<sup>3</sup>/μL – absolute platelet count;

TNF-α – tumor necrosis factor-α;

5-LOX (5-ЛОГ) – 5-lipoxygenase;

АК – амінокислота;

ГЕС – гранулярна ендоплазматична сітка;

ГРДС – гострий респіраторний дистрес-синдром;

ГРС – гострий радіаційний синдром;

Езв. – енергія зв'язування;

КВ – кверцетин;

КВ-Zn – комплекс кверцетину з цинком;

ЛФ – препарат «Ліпофлавіон»;

НПЗП – нестероїдні протизапальні препарати;

РСА – рентгеноструктурний аналіз;

СТЖ – середня тривалість життя;

ФХ – фосфатиділхолін;

ХОЗЛ – хронічне обструктивне захворювання легень;

ЦОГ-1 (СОХ-1) – циклооксигеназа-1;

ЦОГ-2 (СОХ-2) – циклооксигеназа-2;

5-ЛОГ-АП – комплекс 5-ліпоксигенази з активуючим протеїном.

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Актуальність дослідження зумовлена значною поширеністю гострого респіраторного дистрес-синдрому та високим ризиком несприятливих клінічних наслідків [1]. ГРДС розглядають як гетерогенний синдром, розвиток якого пов'язаний із дифузним запальним ураженням легеневої тканини, формуванням дихальної недостатності та порушенням оксигенації крові. Характерними проявами є гіпоксемія та двобічні інфільтративні зміни, зумовлені некардіогенним набряком легень [2]. Важливою ланкою патогенезу є надмірна активація запальної відповіді, що супроводжується інтенсивним вивільненням прозапальних медіаторів. Такий стан, відомий як «цитокіновий шторм», асоціюється з ушкодженням ендотелію та порушенням судинної цілісності [2, 3].

Поширення ГРДС значно зросло під час пандемії COVID-19 [4], однак сьогодні його розвиток також пов'язують із неінфекційними чинниками, зокрема аспірацією при травматичних ушкодженнях та надзвичайних ситуаціях [5]. Ключовими клінічними проблемами залишаються висока летальність та обмежена ефективність наявних фармакотерапевтичних підходів [2].

Лікування ГРДС базується на поєднанні респіраторної підтримки із застосуванням фармакологічних засобів, ефективність яких є варіабельною [2]. Використання широкого спектра препаратів, спрямованих на різні патогенетичні ланки, часто супроводжується явищем поліпрагмазії.

У цьому контексті перспективною біологічно активною сполукою є кверцетин – природний поліфенол із групи флавоноїдів, для якого описано широкий спектр фармакологічних ефектів [6]. Виражені антиоксидантні властивості кверцетину обумовлюють його здатність впливати на різні патогенетичні механізми, включаючи запалення, порушення коагуляції та гладком'язову реактивність [6, 7]. Враховуючи поширення ГРДС при

коронавірусній хворобі внаслідок інфікування SARS-CoV-2 слід також вказати на спрогнозований *in vitro* та *in silico* [8, 9] противірусний ефект КВ.

Для оцінки можливих механізмів дії кверцетину важливе значення мають дослідження *in silico*, зокрема молекулярний докінг, який дозволяє аналізувати взаємодію між лігандом і білковими мішенями. Показано, що зв'язування кверцетину з окремими білками реалізується через водневі взаємодії та супроводжується сприятливими енергетичними характеристиками. Зокрема показано, що міжмолекулярна взаємодія КВ, наприклад із ВАХ протеїном (The Bcl-2-associated X, apoptosis regulator) (PDB ID: 1F16) реалізується через водневі зв'язки з віддалями порядку 2,3 – 2,5 Å та характеризується кращою докінг енергією порівняно з іншими БАР, що також містять фенольні групи [10].

У контексті протизапальної специфіки КВ важливими видаються міжмолекулярні взаємодії із специфічними мішенями – циклооксигеназами, що охарактеризовані *in silico* водневими та гідروفобними зв'язками в сайті зв'язування відповідного рецептору [10, 11]. Така схильність до переважної реалізації водневих та гідروفобних взаємодій пояснює практичну нерозчинність КВ у фізіологічних системах, це зумовлює низьку біодоступність сполуки, що обмежує досягнення терапевтичних концентрацій, особливо при тяжких патологічних станах [7].

З огляду на зазначені обмеження актуальним є використання сучасних систем доставки лікарських засобів, які дозволяють підвищити ефективність транспорту кверцетину в організмі [12].

Серед доступних лікарських форм кверцетину слід відзначити препарати на основі його транспортних систем, зокрема Корвітин і Ліпофлавіон. Вони відрізняються складом і шляхами введення, що визначає особливості їх фармакологічної дії та сфери застосування.

Серед транспортних форм природних поліфенолів, зокрема КВ, можна розглядати комплекси з есенціальними металами (цинком, міддю, залізом), в яких флавоноїду відведено роль іонофора [13]. Так, *in vitro* показано,

зокрема, що комплексоутворення із катіоном цинку сприяє проходженню КВ крізь клітинну мембрану, яка імітована моношаровою ліпосоною [14]. Транспортна роль комплексу КВ-Zn безперечно розширює розуміння важливого фізіологічного статусу цього біометалу, але досі відсутня інформація про фармакологічно ідентифіковані системи КВ з цинком з прогнозом клінічної трансляції. Створення таких систем, особливо у ліпосомальному оточенні, може сприяти конкурентоздатності протизапальних ефектів транспортних систем КВ.

Функціональна відповідність Ліпофлавона і Корвітина лікуванню ГРДС, а також відомості про протизапальну дію цих транспортних систем КВ за різних шляхів введення досі залишаються недостатньо вивченими. Незважаючи на пул наукової інформації щодо кверцетину, дані про прояви його активності, зокрема стосовно бронхо-легеневої специфіки, вкрай обмежені, а систематичне фармакологічне вивчення протизапальної дії не проведене.

Орієнтація на залучення Ліпофлавона і Корвітина може вперше виявити потенційно високий функціонал систем транспорту КВ щодо ГРДС та вирішити актуальну задачу розширення клінічного застосування безпечних лікарських засобів КВ, які за парентеральних способів уведення до організму проявляють фармакотерапевтичну активність при аспіраційному ГРДС та мають протизапальну дію.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** Дисертаційне дослідження виконане в межах науково-дослідної теми, що виконується у відділі медичної хімії ДУ «Інституту фармакології та токсикології НАМН України», під назвою «Фармако-математичний прогноз та експериментальне обґрунтування протизапальної дії drug delivery systems кверцетину» (державний реєстраційний номер 0123U101201). Автор дисертації залучений до виконання цієї теми як відповідальний виконавець. Дисертантка особисто проводила дослідження.

**Метою роботи** є експериментальне та теоретичне обґрунтування фармакотерапевтичної ефективності кверцетину у різних системах транспорту при гострому респіраторному дистрес-синдромі та запаленні.

**Завдання дослідження:**

1. Встановити лікувально-профілактичну активність Ліпофлавона та Корвітина за різних способів уведення при ГРДС у моделях гострої кислотної аспірації та ліпополісахарид-індукованої.

2. Обґрунтувати склад та розробити спосіб отримання оригінальної ліпосомальної композиції кверцетину з цинком; визначити ефективність ліпосомальної композиції при ГРДС у моделі гострої кислотної аспірації.

3. Визначити антиексудативну активність Ліпофлавона, Корвітина та ліпосомальної композиції кверцетину з цинком в експериментальних моделях запалення.

4. Встановити лікувально-профілактичний вплив Ліпофлавона на віддалені наслідки ГРДС (розвиток фіброзу легень).

5. Оцінити протизапальну та регенеруючу дію Ліпофлавоноу за опіків рогівки ока, що супроводжує аспіраційний ГРДС.

*Об'єкт дослідження* – фармакологічна корекція запальних процесів та наслідків ГРДС за застосування кверцетину у різних системах транспорту.

*Предмет дослідження* – протизапальні властивості та показники лікувально-профілактичного впливу кверцетину у різних системах транспорту на наслідки ГРДС в HCl- та LPS-моделях.

**Методи дослідження:**

- фармакологічні (встановлення протизапальної дії проводили методами *in vivo* з використанням стандартних методик, моделі ГРДС (HCl- та LPS-модель);

- біохімічні (імуноферментний аналіз, гематологічний аналіз);

- фізико-хімічні (спектрофотометрія);

- морфологічні (оцінка структурних змін тканин легенів та серця);

- докінг-аналіз (*in silico* прогноз взаємодії кверцетина з активними сайтами протизапальних ензимів);
- математичні (обробка числових значень результатів експериментів за методом варіаційної статистики).

### **Наукова новизна одержаних результатів.**

У роботі вперше обґрунтовано мультимішеневий характер протизапальної дії кверцетину. Показано, що його ефекти реалізуються через взаємодію з ключовими регуляторами запальної відповіді, зокрема ЦОГ-1, ЦОГ-2 та MAPK14.

Встановлено, що використання систем доставки підвищує ефективність реалізації фармакологічного потенціалу кверцетину та забезпечує більш виражений терапевтичний ефект у моделях ГРДС. Розроблено та експериментально обґрунтовано нову ліпосомальну композицію кверцетину з іонами цинку, що характеризується потенційованою протизапальною та протекторною дією, інноваційність якої підтверджено патентом.

Наукова новизна результатів дисертаційної роботи підтверджується впровадженими нововведеннями, які у 2026 році планується оприлюднити в Інформаційних бюлетенях Національної академії наук України, в Інформаційних бюлетенях у Додатку до «Журналу Національної академії медичних наук України».

### **Практичне значення отриманих результатів.**

Отримані результати можуть бути використані як наукове підґрунтя для подальшого впровадження систем транспорту кверцетину у доклінічну та клінічну практику. Отримані дані можуть бути використані при розробці нових лікарських форм і комбінованих препаратів на основі кверцетину, зокрема композицій з іонами цинку, а також для оптимізації шляхів введення залежно від локалізації та тяжкості патологічного процесу.

Встановлені протизапальні, антифібротичні та радіозахисні властивості ліпосомального кверцетину розширюють можливості його практичного застосування при гострих ушкодженнях легень, пост-ГРДС-фіброзі та радіаційно-індукованих ураженнях. Матеріали роботи можуть бути

використані у науково-дослідній діяльності та навчальному процесі при викладанні фармакології, патологічної фізіології й експериментальної медицини. Результати дослідження апробовано та впроваджено під час навчання на кафедрі Біотехнології, біофізики та аналітичної хімії Навчально-наукового інституту хімічних технологій та інженерії, що засвідчено актом впровадження (див. Додатки).

### **Особистий внесок здобувача.**

Дисертаційна робота є результатом самостійної науково-дослідної діяльності здобувачки. Авторка особисто здійснила патентний пошук та критичний аналіз вітчизняних і зарубіжних літературних джерел за темою дослідження, обґрунтувала науковий підхід, брала участь у формуванні мети та завдань дисертаційної роботи, а також у плануванні експериментальних досліджень. Здобувачка самостійно опанувала та відтворила експериментальні моделі аспіраційного та «фатального» гострого респіраторного дистрес-синдрому, провела серії експериментів з оцінкою ефективності досліджуваних фармакологічних засобів.

Авторка безпосередньо виконала біохімічні, імуноферментні, гістологічні та молекулярно-біологічні дослідження, здійснила статистичну обробку цифрових даних, проаналізувала та узагальнила отримані результати, підготувала таблиці, рисунки та основні розділи дисертації. У співпраці з науковими керівниками було проведено інтерпретацію результатів та сформульовано узагальнюючі висновки роботи. Здобувачка не запозичувала ідеї або результати інших авторів у сумісних публікаціях; у наукових працях, виконаних у співавторстві, вона брала провідну участь у виконанні експериментів, обробці та інтерпретації результатів, а також у підготовці матеріалів до публікації.

### **Апробація результатів дисертації.**

Результати дисертаційної роботи оприлюднено на: всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку» (м. Одеса, 9–12 квітня 2024 р.);

міжнародній науковій конференції «Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування» (Державний біотехнологічний університет, м. Харків, 25–26 квітня 2024 р.); всеукраїнській науково-практичній онлайн-конференції «Молодіжна військова наука у Київському національному університеті ім. Т. Г. Шевченка» (м. Київ, 26 квітня 2024 р.); науковій конференції з міжнародною участю, залученням молодих вчених і студентів «Комплементарна/народна медицина, освіта, культура: від традиційних практик до клінічного дослідження». до 20-річчя асоціації і 22-річчя фахового видання України (категорія «Б», SCOPUS-2024) «Фітотерапія. Часопис» (м. Київ, 13–14 червня 2024 р.); науково-практичній конференції молодих учених із міжнародною участю «Актуальні питання фармакології та лікарської токсикології» (м. Київ-Краків, 25–26 вересня 2024 р.); International Scientific Conference «The Impact of Digitalization on Healthcare Development», Riga: Baltija Publishing (Riga, October 3–4, 2024); всеукраїнській науково-практичній конференції «Етика життя і знання: біоетичні аспекти сучасної біології та медицини» (Київ – Івано-Франківськ – Херсон, 16 жовтня 2025 р.).

**Публікації.** Результати дисертаційної роботи висвітлено у 13 наукових публікаціях. Серед них – 4 статті, з яких одна опублікована у виданні, що входить до наукометричної бази Scopus, а три – у наукових фахових журналах, рекомендованих МОН України (категорія «Б»). Крім того, за матеріалами дослідження отримано 1 патент США, подано 1 заявку на патент України, а також опубліковано 7 тез доповідей у матеріалах науково-практичних конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація написана державною мовою і містить 213 сторінок комп'ютерного набору, з яких основний зміст займає 165 сторінок. Структурно робота охоплює вступ, огляд літературних джерел, опис використаних матеріалів і методик, чотири розділи з результатами досліджень, розділ з аналізом та узагальненням отриманих даних, висновки, список використаних джерел (173 найменувань, серед яких 147 – іноземні публікації) та додатки. Дисертаційна робота містить 30 таблиць та 53 ілюстрацій.

## РОЗДІЛ 1

### РОЛЬ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЗАСОБІВ ТА СИСТЕМ ТРАНСПОРТУ ЛІКІВ НА ОСНОВІ КВЕРЦЕТИНУ В ФАРМАКОТЕРАПІЇ ГРДС: СТАН ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Захворювання нижніх дихальних шляхів стабільно входять до провідних причин смертності у світі, посідаючи п'яте місце в глобальній структурі летальності, що підкреслює їх значну медико-соціальну вагу [15]. Їх патогенез значною мірою обумовлений вираженням запальним компонентом, що лежить в основі більшості патологічних процесів у легеневій тканині. Цей факт зумовлює нагальну потребу у вдосконаленні існуючих терапевтичних підходів і пошуку нових медичних технологій, спрямованих на ефективне лікування запальних уражень легень та асоційованих із ними критичних станів, таких як гостра дихальна недостатність [11].

Запальна реакція розглядається як універсальний механізм відповіді організму на ушкодження, що забезпечує локалізацію патологічного процесу та створює умови для подальшої репарації тканин. Її реалізація відбувається за участю численних клітинних і гуморальних факторів. Класичні уявлення про запалення сформувалися ще в античний період і включають основні клінічні прояви, що залишаються актуальними й у сучасній медицині, хоча їх інтерпретація значно поглиблена з позицій молекулярної біології [12, 13].

З позицій сучасної біології запалення розглядають як складну, багаторівневу захисно-приспосувальну реакцію. Воно спрямовано на локалізацію ушкодження, елімінацію патогенного чинника та ініціацію репаративних процесів. Реалізація цієї відповіді відбувається за участю клітин вродженого та адаптивного імунітету. Також в ній приймають участь широкого спектра біологічно активних медіатори – цитокіни, хемокіни, ліпідні похідні і компонентів системи комплементу. Пусковими факторами

можуть виступати як біологічні агенти, так і хімічні або фізичні впливи. Сукупною метою цих процесів є відновлення порушеної структурно-функціональної цілісності тканин і повернення організму до стану гомеостатичної рівноваги [12, 13].

Попри свою захисну роль, запалення за певних умов може втрачати адаптивний характер і набувати патологічних ознак. За певних умов воно може набувати патологічних рис, стаючи надмірним або неконтрольованим. У таких випадках запальна реакція або не забезпечує повного усунення первинного ушкодження, переходячи у хронічну форму, як це спостерігається при аутоімунних, онкологічних та дегенеративних захворюваннях, або ж надмірно посилюється, що характерно для тяжких системних станів, зокрема сепсису [13].

Особливе місце серед патологій, що супроводжуються запаленням, займають захворювання дихальної системи. Дихальні шляхи людини щоденно контактують із значними об'ємами атмосферного повітря, яке, поряд із відносно інертними газами, може містити потенційно небезпечні мікроорганізми, токсини та аерозольні частинки. За таких умов ефективне функціонування місцевих та системних механізмів імунного захисту є критично важливим. Координовану регуляцію запального процесу в легеневій тканині забезпечують, зокрема, інтерлейкіни та хемокіни, які діють у тісній взаємодії з іншими медіаторами, поступово залучаючи імунокомпетентні клітини до вогнища ушкодження [14].

У цьому контексті значний науковий та клінічний інтерес викликає гострий респіраторний дистрес-синдром (ГРДС, англ. Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) – поліетиологічний, клінічно гетерогенний синдром, що виникає як ускладнення різноманітних гострих станів, зокрема тяжкої пневмонії, аспірації шлункового вмісту, сепсису, поліорганної недостатності, а також внаслідок воєнних поранень та катастрофічних травм [2]. Уперше цей синдром був виокремлений як самостійна нозологічна форма у 1967 році, коли Д. Ешбоу описав серію клінічних випадків гострої

дихальної недостатності у дорослих пацієнтів, що супроводжувалася гіпоксією, зниженням комплаєнсу легень і була подібною за клініко-морфологічними ознаками до респіраторного дистресу новонароджених [16].

На сьогодні провідним інструментом діагностики та стратифікації ГРДС залишаються Берлінські критерії, які ґрунтуються на часових характеристиках розвитку симптомів, результатах візуалізації органів грудної клітки, некардіогенному походженні набряку легень та кількісній оцінці порушення оксигенації за співвідношенням  $PaO_2/FiO_2$  з урахуванням рівня позитивного тиску наприкінці видиху. Зниження цього показника корелює зі зростанням тяжкості перебігу синдрому та погіршенням прогнозу [16, 17].

Разом із тим, сучасні уявлення про ГРДС зазнають подальшого розширення. Міжнародні експертні консенсуси останніх років пропонують включення пацієнтів, які отримують високопотокową оксигенотерапію або неінвазивну вентиляцію легень, а також використання співвідношення  $SpO_2/FiO_2$  як альтернативного маркера оксигенації. Окрім цього, заохочується застосування методів діагностики безпосередньо біля ліжка хворого, зокрема ультразвукового дослідження легень, що сприяє ранньому виявленню синдрому та персоналізації лікувальної тактики [18].

Таким чином, ГРДС слід розглядати не лише як клінічний синдром, але як складний патофізіологічний процес, в основі якого лежить дисрегульована імунна відповідь [17]. За даними Національного інституту серця, легень і крові США (NHLBI), летальність серед пацієнтів із діагностованим ГРДС сягає (30-60)% залежно від ступеня тяжкості та супутніх ускладнень, а загальна захворюваність становить приблизно 75 випадків на 100 000 населення щорічно [19].

Пандемія COVID-19 суттєво актуалізувала проблему ГРДС, оскільки значна частка тяжких випадків супроводжувалась розвитком критичної дихальної недостатності з необхідністю інтенсивної терапії [20]. Згідно з результатами міжнародних клінічних спостережень, майже 40% пацієнтів з тяжким перебігом COVID-19 розвивали ГРДС, причому смертність у цій

групі перевищувала 50% [21]. Таким чином, проблема ГРДС набула особливої клінічної та соціальної актуальності, що стимулює подальші дослідження патофізіологічних механізмів синдрому та розробку інноваційних підходів до його лікування.

Епідеміологічні дослідження стабільно підтверджують, що захворювання нижніх дихальних шляхів залишаються однією з найсерйозніших глобальних медичних проблем, які супроводжуються значною захворюваністю та високим рівнем летальності, особливо серед вразливих груп населення [1, 22]. Вони займають провідні позиції серед причин госпіталізацій, потреби в інтенсивній терапії та смерті, що обумовлює їх значну соціально-економічну вагу.

ГРДС є проявом дифузного пошкодження альвеоло-капілярної мембрани з розвитком некардіогенного набряку легень, що клінічно характеризується гострим початком, рефрактерною гіпоксемією та наявністю білатеральних інфільтратів у легенях за даними візуалізаційних методів, зокрема рентгенографії або комп'ютерної томографії грудної клітки [2]. Основним патофізіологічним механізмом розвитку ГРДС є надмірна та неконтрольована імунна відповідь, що спричиняє пошкодження легеневого ендотелію, підвищену проникність судинної стінки, розвиток легеневої гіпертензії, альвеолярні крововиливи та посилення дихальної недостатності, що створює замкнене патологічне коло [3, 23].

На фоні таких серйозних патофізіологічних змін клінічне ведення пацієнтів із ГРДС є надзвичайно складним завданням, яке потребує мультидисциплінарного підходу та часто передбачає застосування високотехнологічної респіраторної підтримки, включаючи штучну вентиляцію легень із використанням захисних стратегій, оксигенацію крові з екстракорпоральною мембранною оксигенацією (ЕСМО) тощо [2].

Оскільки ГРДС має високий ризик смертності навіть за умов інтенсивної терапії, збереження функції легень та запобігання прогресуванню ушкодження є ключовими цілями у клінічному менеджменті пацієнтів. У

зв'язку з цим наукові дослідження зосереджені на розробці нових патогенетично обґрунтованих стратегій лікування, спрямованих на модуляцію імунної відповіді, зниження прозапального навантаження та підтримку бар'єрної функції легеневого епітелію.

У 2022-2024 роках з'явився ряд оновлених настанов, які уточнюють діагностичні критерії ГРДС, включаючи використання  $SpO_2/FiO_2$  як маркеру у разі відсутності інвазивної вентиляції, а також виділяють окремі фенотипи захворювання для більш точного підбору терапії [24, 25].

Патогенез гострого респіраторного дистрес-синдрому (ГРДС) є складним, багатокомпонентним процесом, що проходить через три основні стадії розвитку: ексудативну, проліферативну та фібротичну фази [19].

Ексудативна фаза, яка розвивається протягом перших (1-7) діб, характеризується значною судинною проникністю, набряком альвеолярної тканини та масивним викидом прозапальних медіаторів – так званим «цитокіновим штормом». Цей стан супроводжується гіперцитокінемією, в основі якої лежить каскад взаємодії імунних клітин (макрофагів, нейтрофілів, Т-лімфоцитів), які активуються під дією інтерлейкіну- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), інтерлейкіну-6 (IL-6) та фактора некрозу пухлин-альфа (TNF- $\alpha$ ) [3, 23]. Наявність позитивного зворотного зв'язку між цими медіаторами і клітинними відповідями лише посилює запальний процес, провокуючи подальше пошкодження ендотелію легневих капілярів та епітелію альвеол [26].

Проліферативна фаза зазвичай настає на 7-14 день хвороби і супроводжується частковим зменшенням запального процесу, але з активізацією репаративних механізмів – проліферацією фібробластів, міофібробластів та відновленням пошкодженого альвеолярного епітелію. Однак, через порушення мікроциркуляції ці процеси часто є дизрегульованими [19].

Фібротична фаза, що розвивається у частини пацієнтів (зазвичай після 3-4 тижнів), характеризується розвитком фіброзу легеневої тканини, втратою

еластичності легень та тяжкою рестриктивною дихальною недостатністю, що значно погіршує прогноз [27].

У другій половині патогенезу ГРДС важливе місце посідає ендотеліальне ураження та тромбогенез. Активовані ендотеліальні клітини виділяють прозапальні молекули та тканинний фактор, що запускає коагуляційний каскад. У результаті спостерігається агрегація тромбоцитів, формування мікротромбів у судинах легень і, в тяжчих випадках, системна коагулопатія [28]. Це призводить до гіперкоагуляційного стану, що підтверджується лабораторно: у пацієнтів із ГРДС виявляється підвищення D-димеру в 3-4 рази, а також зміни протромбінового часу, кількості тромбоцитів та рівня фібриногену [29].

Згідно з даними клінічних спостережень, тромботичні ускладнення – включаючи легенеvu тромбоемболію та тромбоз глибоких вен – зустрічаються приблизно у 20–30% пацієнтів із тяжким перебігом ГРДС, особливо при його COVID-19-асоційованих формах [29].

Важкий глобальний досвід, набутий під час пандемії COVID-19, особливо в контексті гострого респіраторного дистрес-синдрому (ГРДС), продемонстрував критичні виклики сучасній медицині. ГРДС, як клінічне ускладнення вірусної пневмонії, виявився однією з провідних причин смертності у пацієнтів із тяжким перебігом коронавірусної інфекції. Зокрема, ураження легень унаслідок SARS-CoV-2 часто набувало рис ГРДС із надзвичайно тяжким перебігом та високим рівнем летальності [30]. Така ситуація гостро поставила перед світовою медичною спільнотою два ключові виклики: неприпустимо високий рівень смертності серед пацієнтів з ГРДС та низька ефективність наявних фармакологічних втручань [31].

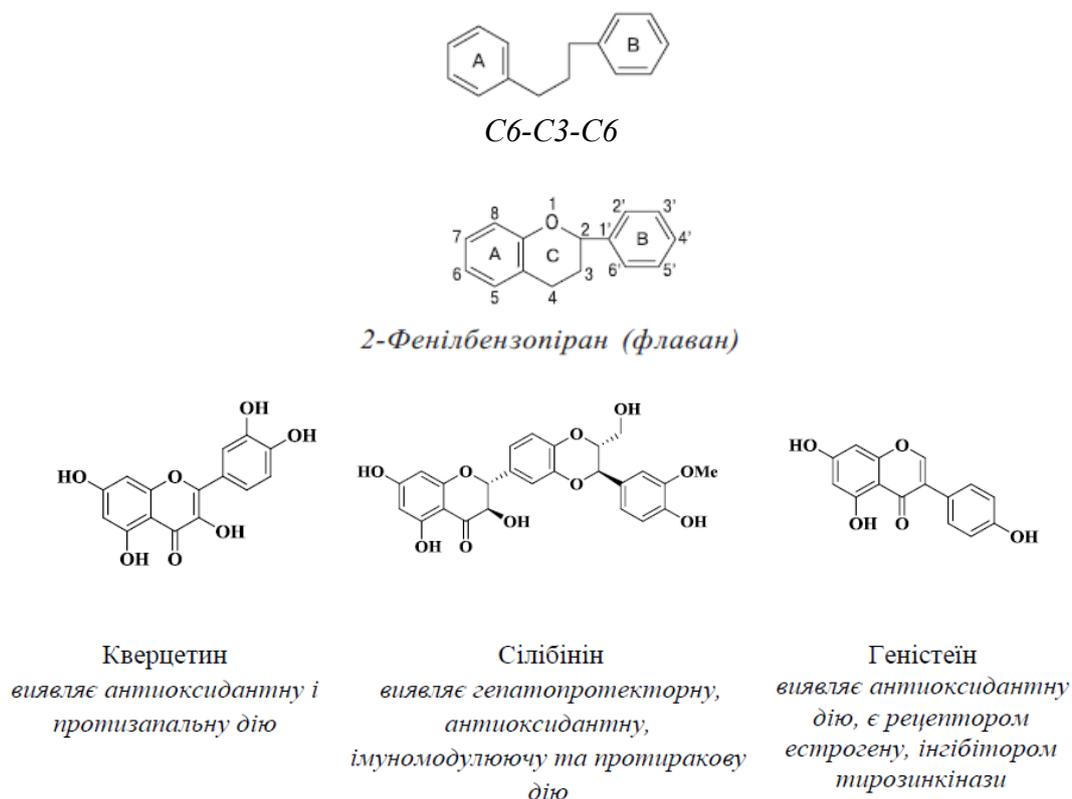
Сучасні медичні технології впливу на перебіг ГРДС фокусуються переважно на респіраторній підтримці, зокрема, використанні штучної вентиляції легень (ШВЛ), включаючи захисні режими вентиляції, положення на животі, а також екстракорпоральну мембранну оксигенацію (ЕКМО) у тяжких випадках [19]. Підтримуюча фармакотерапія передбачає застосування

сурфактанту, інгаляційного оксиду азоту, засобів для корекції порушень гемодинаміки та системи коагуляції, а також глюкокортикоїдів і протизапальних препаратів, спрямованих на зменшення продукції прозапальних медіаторів, таких як ІЛ-6, ІЛ-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  [31].

До таких препаратів належать, зокрема, ібупрофен, кетоконазол, лізофілін, інгібітори JAK/STAT-сигнального шляху, та деякі моноклональні антитіла [33, 34]. Водночас, слід підкреслити, що рівень доказовості ефективності більшості підтримуючих медикаментозних втручань у лікуванні ГРДС, як правило, не перевищує категорій В або С згідно з системою GRADE [35].

З урахуванням цих обмежень, сучасна фармакотерапія ГРДС вважається недостатньо ефективною, і наукова спільнота дедалі більше звертається до пошуку нових терапевтичних підходів, включаючи репозиціювання існуючих лікарських засобів, тобто їх застосування з новою протизапальною метою в контексті ГРДС [36]. Такий підхід передбачає пріоритетне обрання молекул із вже вивченим профілем безпеки, які водночас демонструють перспективні антицитокінові або антиоксидантні властивості. Найважливішим критерієм у цьому випадку є оптимальний баланс між протизапальною активністю та безпечністю, що є надзвичайно актуальним у критично хворих пацієнтів, де навіть мінімальні побічні ефекти можуть мати фатальні наслідки [37].

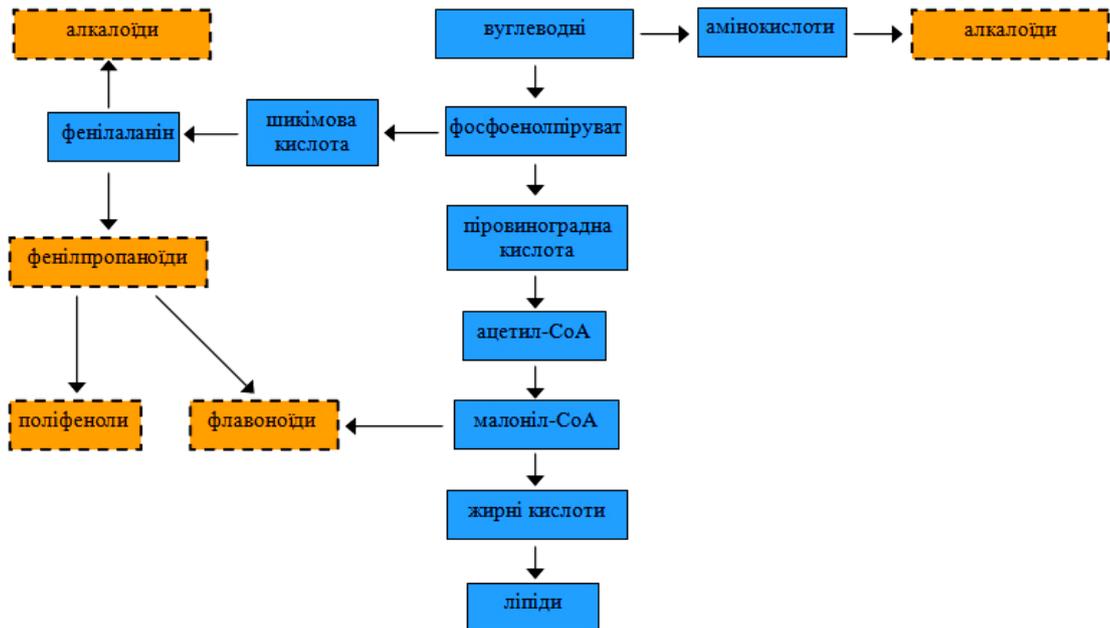
У світлі пошуку нових безпечних і ефективних засобів для протизапального втручання, особливо в умовах надмірної імунної відповіді при ГРДС, природні флавоноїди стали об'єктом активного наукового інтересу [7]. Серед них кверцетин (2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,5,7-тригідрокси-4Н-хромен-4-ОН) вирізняється високою фармакологічною перспективністю. Його хімічна структура належить до класу флавонолів – підгрупи флавоноїдів, що базуються на загальному каркасі дифенілпропану (С6–С3–С6). Цей скелет включає два бензольних кільця (А і В), з'єднані трьохатомним ланцюгом, який формує гетероциклічне кільце С, анельоване до кільця А (рис. 1.1) [38].



**Рис. 1.1** Структурні особливості представників флавоноїдних сполук.

Рисунок створено авторкою.

Біосинтез кверцетину у рослинній клітині проходить через каскад ферментативних реакцій, що беруть початок з фенілаланіну. Залучення ферментів PAL, CHS та CHI призводить до утворення нуклею флавоноїдів, з якого шляхами гідроксилювання та метилювання формується кверцетин і його глікозиди (рис. 1.2.) [39].



**Рис. 1.2** Схема синтезу флавоноїдів рослинною клітиною (пунктиром виділені класи вторинних метаболітів) [39]. Рисунок створено авторкою.

За фізико-хімічними характеристиками кверцетин є жовтою кристалічною речовиною, малорозчинною у воді, з незначною розчинністю в етанолі (до 0,345 г/100 мл) та значно більшою в оцтовій кислоті (4,35 г/100 мл) [40]. Така розчинність обмежує біодоступність, але відкриває перспективи для створення нових фармацевтичних форм, включаючи нанопрепарати та ліпосомальні системи [40].

Кверцетин проявляє універсальну біологічну активність – він не лише антиоксидант, але й імунно-, нейро-, кардіо- та гепатопротектор, а також демонструє антипроліферативну та противірусну дію [40]. Особливе значення має протизапальний потенціал кверцетину у контексті патологій, пов'язаних із цитокіновим штормом. Кверцетин здатен знижувати експресію ключових прозапальних медіаторів – IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  – через гальмування транскрипційного фактора NF- $\kappa$ B [42, 43].

Важливими є і дані щодо *in silico* та *in vitro* ефектів кверцетину на різні білкові мішені, зокрема протеази SARS-CoV-2 (PLpro, 3CLpro), білки запалення та оксидативного стресу. За результатами молекулярного докінгу,

кверцетин показує високу спорідненість до активних центрів зазначених білків [44, 45].

У дослідженнях на тваринах кверцетин продемонстрував антиексудативну дію при моделях асептичного запалення, зокрема на основі карагеніну, гістаміну, зимозану, простагландинів. Порівняльна оцінка із диклофенаком та їх композицією (табл. 1.1) свідчить, що навіть без посилення синергічного ефекту, кверцетин помітно знижує запальні реакції [45, 47].

Таблиця 1.1.

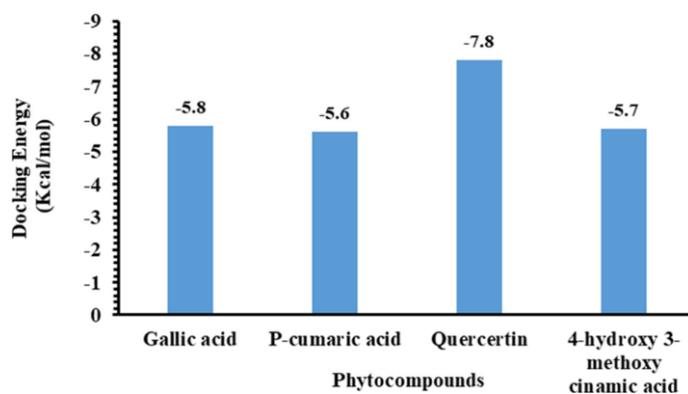
**Протизапальна дія кверцетину, диклофенаку та композиції кверцетину з диклофенаком (визначення за ступенем зменшення запалення стопи у щурів, n=200) [45].**

Речовина	Доза, мг/кг	Карагенін	Гістамін	Серотонін	Зимозан	Простагландин E2
Кверцетин	11,2	15,8	17,9	12,4	19,6	7,7
Диклофенак	7,0	52,2	21,8	25,9	10,1	34,0
Композиція	18,2	61,7	32,3	27,0	24,4	31,9

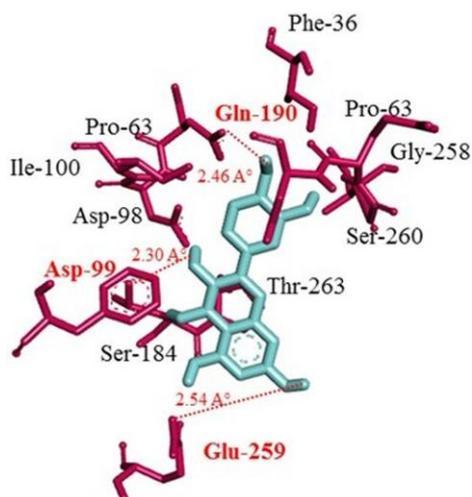
Сучасна стратегія *in silico* моделювання передбачає використання алгоритмів молекулярного докінгу для прогнозування потенційної фармакологічної активності біоактивних сполук. Перший підхід базується на вивченні міжмолекулярних взаємодій однієї (або кількох) сполук з однією мішенню – білком, ферментом або рецептором [48].

Так, на прикладі докінгу кверцетину (КВ) із ВАХ-білком (The Vcl-2-associated X protein, апоптоз-регулятор, PDB ID: 1F16), встановлено, що кверцетин демонструє нижчу енергію зв'язування, ніж інші фенольні сполуки, такі як галова кислота чи р-кумаринова кислота, що вказує на вищу спорідненість до мішені (рис. 1.3) [49]. Взаємодія комплексу «кверцетин–ВАХ» стабілізується трьома водневими зв'язками, які утворюються з амінокислотними залишками *Gln190* (2,46 Å), *Asp99* (2,30 Å) та *Glu259*

(2,54 Å) (рис. 1.4) [50]. Такий результат свідчить про потенційну антиапоптотичну або апоптоз-модулюючу дію кверцетину.

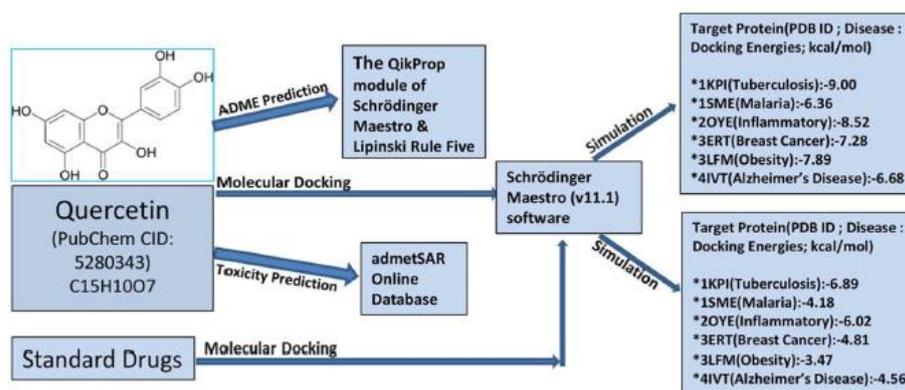


**Рис. 1.3** Енергії докінгу кверцетину та фенольних сполук [11].



**Рис. 1.4** Комплекс кверцетину з ВАХ протеїном за результатами докінгових досліджень [10].

Другий підхід до молекулярного докінгу має більш системний характер і передбачає порівняння взаємодій однієї цільової молекули з низкою фармакологічно релевантних мішеней. У цьому контексті моделюється ефективність ліганду (наприклад, кверцетину) щодо ряду білків-мішеней із залученням референсних лікарських засобів, що дозволяє визначити потенційний вектор його фармакологічної дії (рис. 1.5) [51].



**Рис. 1.5** Дизайн *in silico* дослідження потенційного терапевтичного потенціалу кверцетину [10].

Цей алгоритм було застосовано для вивчення взаємодії кверцетину з білками-мішенями запального каскаду, зокрема – індукцибельною NO-синтазою (iNOS, PDB ID: 4NOS). Результати показали, що хоча кверцетин зв'язується з iNOS, докінг-параметри (rerank score, docking score) для нього поступаються аналогам із модифікованою структурою дифенілпропану (С6–С3–С6), які мають покращені енергетичні показники водневого зв'язування та загальної ліганд-білкової взаємодії [51]. Це вказує на можливість подальшої структурної оптимізації кверцетину або створення похідних із більш вираженим інгібувальним ефектом щодо iNOS.

Незважаючи на широке коло біологічних мішеней, з якими здатен взаємодіяти кверцетин, у контексті запальних патологій, зокрема гострого респіраторного дистрес-синдрому (ГРДС), особливу увагу заслуговують *in silico* дослідження взаємодії цієї сполуки з циклооксигеназами (ЦОГ-1 та ЦОГ-2) – ключовими ферментами у синтезі простагландинів [52]. Саме ці ферменти є типовими мішенями для класичних нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП), таких як ацетилсаліцилова кислота (аспірин) і селективні інгібітори ЦОГ-2, зокрема цекококсиб [54].

Моделювання молекулярного докінгу дало змогу встановити, що кверцетин, подібно до зазначених НПЗП, формує комплекси з активними центрами ЦОГ-2. Основними типами взаємодій є гідрофобні контакти та

водневі зв'язки з амінокислотними залишками, такими як *Tyr385*, *Ser530*, *Arg120* та *His90*. Порівняльний аналіз енергетичних характеристик цих взаємодій виявив, що енергія зв'язування кверцетину з ЦОГ-2 наближається до (-9,0) ккал/моль, що можна порівняти з афінністю целекоксибу (~ -10,0 ккал/моль) [55, 56].

У таблицях 1.2 та 1.3 наведено порівняльні *in silico* дані для кверцетину, аспірину та целекоксибу щодо взаємодії з ЦОГ-2. Такі дані є цінним аргументом на користь можливої здатності кверцетину селективно модулювати активність цього ферменту, що пояснює його протизапальний ефект на молекулярному рівні.

Таблиця 1.2.

**Міжмолекулярні зв'язки кверцетину та аспірину в сайті зв'язування ЦОГ-1 [10].**

Протеїн (PDB ID)	Ліганд	Водневий зв'язок		Гідрофобна взаємодія	
		АК	віддаль, Å	АК	віддаль, Å
2OYE	Кверцетин	MET-522	3,53	TYR-385	2,39
		SER-530	3,88	GLY-526	4,57
		ASP-351	4,44	ALA-527	3,61
		GLU-353	5,04	ILE-523	5,37
		-	-	VAL-349	5,89
		-	-	LEU-352	4,92
		-	-	THR-347	4,85
		-	-	LEU-346	5,97
2OYE	Аспірин	-	-	TYR-385	7,81
		-	-	GLY-526	4,78
		-	-	ALA-527	4,20

Примітка. *TYR*-Tyrosine, *HIS* – Histidine, *GLY* – Glycine, *ARG* – Arginine, *ASP* – Aspartic Acid, *THR* – Threonine, *SER* – Serine, *ILE* – Iso-leucine, *LEU* – Leucine, *GLU* – Glutamic Acid, *ALA* – Alanine, *MET* – Methionine, *GLN* – Glutamine, *VAL* – Valine, *PRO* – Proline, *TRP* – Tryptophan, *PHE* – Phenylalanine.

Таблиця 1.3.

**Типи та енергія міжмолекулярної взаємодії амінокислотних залишків протеїну ЦОГ-2 із кверцетином та целекоксибом [57].**

Ліганд	Енергія зв'язку, ккал/моль	Водневий зв'язок (АК залишок)	Гідрофобна взаємодія (АК залишок)			Пі-катіон
			пі-алкіл	пі-пі	пі-сигма	
Целекоксиб	-9,35	Q192, R120, L531, S530	V523, A527, L352, F198	-	V349, Y348	-
Кверцетин	-8,94	R513, R120, Q192	V523, V349, L352	-	-V523, A527	-

Проте слід враховувати, що фізико-хімічні властивості кверцетину, зокрема його низька водорозчинність, низька біодоступність і можливість агрегації в біологічному середовищі, можуть істотно впливати на реальну клінічну реалізацію ефектів, які спостерігаються у віртуальних моделях [58]. Тому докінг-результати, хоч і важливі для гіпотезогенезу, повинні супроводжуватись фармакокінетичним аналізом і фармакологічними *in vivo* дослідженнями.

Реалізація фармакологічних проявів КВ стикається із суттєвими обмеженнями, головним з яких є його низька розчинність у воді та гідрофобність молекули, що, у свою чергу, обумовлює дуже низьку біодоступність препарату при пероральному застосуванні – менше 5% [59, 60]. У Доклінічних і клінічних дослідженнях про демонстрували значну варіабельність абсорбції кверцетину в залежності від форми введення, ступеня агрегації в середовищі та індивідуальних особливостей пацієнта [7]. Особливої ваги ця проблема набуває в умовах гострих критичних станів, таких як ГРДС, коли порушення комплаєнсу пацієнта або неможливість

перорального прийому препаратів повністю виключає використання кверцетину в індивідуальній формі.

У зв'язку з цим, сучасна парадигма його використання зміщується в бік транспортних форм – за наративом «Drug Delivery Systems» (DDS), які дозволяють подолати фармакокінетичні бар'єри й забезпечити адекватний терапевтичний рівень речовини в плазмі крові та тканинах-мішенях [61]. Зокрема, до таких DDS відносять наночастинки, ліпосомальні форми, мікроемульсії, солюбілізуючі комплекси тощо (табл. 1.4).

Таблиця 1.4.

### Порівняльна основних форм відомих кверцетину в системах транспорту

Форма DDS	Переваги	Недоліки / обмеження	Біодоступність	Застосування	Приклади препаратів / продуктів
Класичні пероральні форми (таблетки)	Простота виробництва, зручність прийому	Дуже низька розчинність	<5%	Біодобавки	<i>Now® Quercetin, Solgar Quercetin Complex</i>
Ліпосомальні форми	Покращена стабільність, проникнення в клітини	Висока вартість, нестабільність при зберіганні	>70%	Кардіопротекторна, імуномодулююча, протизапальна дії	<i>Ліпофлавонокардіо, LipoNaturals Quercetin, Quicksilver Scientific®</i>
Наночастинки (полімерні, металеві)	Цілеспрямована доставка, підвищення розчинності	Потенційна токсичність носіїв, складність синтезу	10–30%	Протипухлинна, антивірусна дія	<i>NanoQuercetin</i> (на стадії дослідження)
Мікроемульсії / наноемульсії	Висока розчинність, швидке вивільнення	Нестабільність, потреба в емульгаторах	>25%	Гострі запальні стани	<i>NovaSOL® Quercetin, Quercefit®</i>
Композиції з циклодекстрином, ПВП	Покращена розчинність, стабільність	Обмежене навантаження, потенційна алергенність	~10–40%	Пероральне або ін'єкційне застосування	<i>Корвімін, Cavacurmin®, Quercetin-β-cyclodextrin complex</i>
Ін'єкційні водні композиції з ексципієнтами	Потенційне парентеральне застосування	Високий вміст ексципієнтів, нестабільність	>50%	Дослідження <i>in vivo</i>	<i>Кверцетин+ Трилон</i> (експериментальні зразки)

Описано, композиції кверцетину на основі суміші натрію тетраборату з трилоном Б, до складу яких також входять ароматизатори, стабілізатори рН, барвники та інші ексципієнти [62]. Однак ці форми мають суттєві обмеження,

зокрема – високий вміст різних хімічних речовин, що ускладнює їхню токсикологічну оцінку, а також нестабільність системи, яка погіршує відтворюваність дозування і підвищує ризик побічних ефектів [63].

Успішна клінічна імплементація кверцетину вимагає оптимізації транспортних форм, у першу чергу – стабільних, біосумісних і низькотоксичних DDS, здатних забезпечити необхідний терапевтичний рівень речовини.

Одним із найбільш досліджених підходів до підвищення біодоступності кверцетину є створення ліпідних транспортних систем, зокрема на основі фосфоліпідів [64, 65, 66]. Окрему групу становлять ліпідні композиції з так званими «сурогатними сурфактантами», які містять штучні комбінації ПАР (поверхнево-активних речовин) і сорбентів.

Попри фармакотехнологічні переваги (покращена розчинність, пролонгована дія), зазначені системи мають ряд критичних недоліків. Насамперед – хімічна неоднорідність і складність складу, що часто порушує принцип Окама у фармацевтичній розробці (необхідність мінімізації кількості компонентів задля уникнення потенційних небажаних взаємодій) [67]. Це ускладнює стабілізацію фазової структури, що є критичним для забезпечення однорідності дозування та відтворюваності ефекту. Крім того, наявність синтетичних та нефізіологічних добавок унеможлиблює використання таких форм у парентеральних шляхах введення через ризик токсичності та імуногенності [67].

У результаті, жодна з досі відомих фосфоліпідних композицій кверцетину не була зареєстрована як лікарський засіб, не продемонструвавши достатньо високих показників фармакокінетичної ефективності, безпеки та стабільності.

Варто також згадати перспективний напрям – комплекси кверцетину з есенціальними металами, насамперед цинком, міддю та залізом, де флавоноїд виконує роль іонофора, сприяючи транспорту металу через біологічні мембрани [69]. Такий підхід не лише покращує розчинність кверцетину, а й

потенційно підсилює його протизапальний ефект за рахунок синергії з іонами  $Zn^{2+}$ . Наприклад, у дослідженнях *in vitro* встановлено, що кверцетин- $Zn$  комплекс має здатність проникати через модельну ліпосомну мембрану, імітуючи клітинну стінку, що відкриває перспективи для створення ефективних засобів доставки [70].

Ось приклади *in silico* моделей взаємодії кверцетину з металами, зокрема з цинком, залізом і міддю. Вони демонструють, як поліфенольні ліганди, такі як кверцетин, формують комплекси з метал-іонами, що може покращити проникність, стабільність і біологічну активність сполуки.

Кверцетин-цинк комплекс (Quercetin- $Zn^{2+}$ ). Модель: докінг симуляція передбачає координацію  $Zn^{2+}$  через дві гідроксильні групи (в положеннях 3-ОН та 4'-ОН) флавоноїдного скелета. Геометрія комплексу: октаедрична або тетраедрична, в залежності від умов симуляції. Тип взаємодій: координаційні зв'язки, водневі зв'язки,  $\pi$ -метал взаємодії. Результат: комплекс підвищує ліпофільність і проникність через ліпідні мембрани (віртуальна модель фосфоліпідної бішару) [69, 70].

Кверцетин-залізо комплекс (Quercetin- $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ ). Модель:  $Fe^{3+}$  координується із катехольним фрагментом (дві сусідні ОН-групи) кільця В. Симуляції показують високу стабільність комплексу при рН (6-7). Такий комплекс потенційно блокує Fenton-реакцію (пригнічення утворення  $\bullet$ ОН-радикалів), діючи як антиоксидант [69, 70].

Кверцетин-мідь комплекс (Quercetin- $Cu^{2+}$ ). Модель: координація за ОН-групами в положеннях С3/С5 або С3'/С4'. Комплекс має планарну структуру, що дозволяє йому ефективно взаємодіяти з білками, наприклад, з DPPH або iNOS (*in silico*-мішень). Результати *in silico*: енергія зв'язування з iNOS:  $\sim (-7,2)$  ккал/моль; висока спорідненість до активного центру ферменту в порівнянні з кверцетином без металу [69, 70].

Проте, попри фундаментальні дослідження з моделювання та біофізичної характеристики, жоден із кверцетин-метал-комплексів не отримав регуляторного схвалення як фармакологічно ідентифікований

лікарський засіб. Це визначає потребу подальших досліджень, спрямованих на експериментальну перевірку протизапальної дії та токсикокінетичних характеристик таких систем, зокрема у контексті ГРДС та інших гострих запальних синдромів.

Серед альтернативних підходів до подолання обмеженої біодоступності кверцетину важливе місце займає створення транспортних комплексів з водорозчинними полімерними носіями, зокрема полівінілпіролідом (ПВП), також відомим як повідон. Система кверцетин–повідон реалізує комбінований механізм взаємодії як за рахунок вторинних хімічних зв'язків, так і завдяки сорбційним та розчинювальним властивостям полімеру [71, 71].

На основі системи кверцетин-ПВП створено препарат «Корвітин», зареєстрований в Україні для парентерального застосування, призначений для використання в кардіо- та нейропротекторній терапії, включаючи ішемічний інсульт, інфаркт міокарда, ішемію мозку тощо.

Іншим значним напрямом сучасної фармакології є використання ліпосомальних систем транспорту ліків. Ці платформи дозволяють інкапсулювати гідрофобні сполуки, такі як кверцетин, у фосфоліпідну оболонку, що імітує клітинну мембрану, забезпечуючи захист, стабільність та спрямовану доставку [73].

На глобальному ринку відомо понад 70 ліцензованих ліпосомальних препаратів, серед яких – вакцини Pfizer-BioNTech і Moderna проти COVID-19, а також ліпосомальні формули флавоноїдів, включно з кверцетином [74]. Однією з найбільш відомих реалізованих форм є препарат «Ліпофлавіон», створений на основі кверцетину, інкапсульованого у фосфатидилхолінові ліпосоми [75].

«Ліпофлавіон» застосовується у кардіології як кардіопротектор при гострих ішемічних подіях, у онкологічній клініці для зменшення токсичності хіміотерапії, зокрема при кардіоміопатіях, індукованих антрациклінами, а також у офтальмології – у вигляді очних крапель для лікування кератитів, травм і опіків рогівки [76, 77].

Попри визнане клінічне значення препаратів «Ліпофлавіон» та «Корвітин», відсутня інформація щодо їх ефективності при лікуванні гострого респіраторного дистрес-синдрому (ГРДС), а також результати досліджень їхньої протизапальної активності залежно від шляху введення (інгаляційного, внутрішньовенного, внутрішньом'язового чи іншого). Ця інформаційна лакуна не знецінює вже наявну фармакотерапевтичну ефективність обох препаратів, але вказує на неосвоєний потенціал застосування кверцетин-вмісних систем у лікуванні ГРДС [78, 78].

Зважаючи на відомі механізми патогенезу ГРДС – надлишкову продукцію цитокінів, підвищену проникність легеневого ендотелію, гіперкоагуляцію – фармакологічна дія кверцетину, зокрема антитромботична, антиоксидантна та антицитокінова, може виявитися високоефективною [77]. Проте, щоб обґрунтувати застосування Ліпофлавіону чи Корвітину при ГРДС, необхідне цілеспрямоване доклінічне та клінічне дослідження, що охоплює різні шляхи доставки, токсикологічний профіль і протизапальну дію при ушкодженні легеневої тканини.

Першим кроком у цьому напрямку могло б стати експериментальне моделювання ГРДС на тваринах з подальшим порівнянням ефектів різних форм доставки кверцетину (включно з Ліпофлавіоном та Корвітином). Наприклад, інгаляційний шлях введення, який дозволяє досягати високих локальних концентрацій у легенях, виглядає перспективним з огляду на швидкість ефекту та мінімізацію системних побічних дій [77].

У фармакотерапевтичному контексті розширення показань для відомих лікарських засобів є важливою тенденцією сучасної фармації, зокрема коли йдеться про біофлавоноїди природного походження, безпека яких вже доведена. У цьому світлі, орієнтація на використання Ліпофлавіону та Корвітину для терапії ГРДС може не лише заповнити існуючу прогалину, а й розкрити нові аспекти лікувального потенціалу кверцетину [80].

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У другому розділі дисертаційної роботи систематизовано матеріали та методичні підходи, використані під час виконання експериментальних досліджень. Наведено обґрунтування вибору лабораторних тварин, описано принципи їх рандомізації та формування експериментальних і контрольних груп. Охарактеризовано застосовані експериментальні моделі патологічних станів, а також детально викладено методики підготовки гомогенатів легень і серця, проведення молекулярного докінгу, морфологічного аналізу тканин, ексудативних, гематологічних та біохімічних досліджень. Окремий підрозділ присвячено фармакологічним засобам, що використовувалися у моделях експериментального гострого респіраторного дистрес-синдрому та ексудативного запалення, а також методам статистичної обробки отриманих результатів.

#### 2.1 Матеріали досліджень

##### 2.1.1 Тест-система

Експериментальні дослідження виконано із використанням білих мишей лінії Balb/c віком 8–10 тижнів із масою тіла 25–30 г, а також білих нелінійних мишей аналогічного віку з масою тіла 18–22 г. Усі тварини були отримані з експериментально-біологічної клініки (віварію) ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».

Після завершення семиденного карантинного періоду тварин дослідних і контрольних груп розподіляли за допомогою методу випадкових чисел. Для індивідуальної ідентифікації кожній тварині наносили кольорові мітки.

Умови утримання відповідали стандартним вимогам: температурний режим підтримували в межах (20-24) °С, відносну вологість – на рівні (30-70) %, режим освітлення становив 12 годин світла та 12 годин темряви.

Мишей утримували в індивідуальних пластмасових клітках із необмеженим доступом до стандартного корму та питної води. Як підстилковий матеріал використовували попередньо автоклавовану стружку вільхи (*Alnus glutinosa*).

Дослідження *in vivo* проведено на 645 білих нелінійних та 100 лінійних (Balb/c) мишах обох статей, вирощених у віварії ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». Усі експериментальні процедури здійснювали з дотриманням положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в наукових цілях, а також вимог чинного законодавства України щодо гуманного поводження з тваринами. Етичність проведення досліджень підтверджена висновком комісії з біоетики ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (протокол № 01/10/25 від 30.10.2025 р.).

### **2.1.2 Тест-зразки (досліджувані препарати)**

У роботі використано два тест-зразки лікарських засобів на основі кверцетину.

Тест-зразок № 1 – препарат Ліпофлавон (серія 11301321, АТ «Фармстандарт-Біолік»), що являє собою ліофілізований порошок. До складу препарату входять лецитин-стандарт (у перерахунку на лецитин) у кількості 550 мг та кверцетин (у перерахунку на суху речовину) – 15 мг; допоміжною речовиною є лактози моногідрат. Препарат зберігали при температурі від (-20,0) °С до (-10,0) °С.

Тест-зразок № 2 – препарат Корвітин (серія 0540123, НВЦ «Борщагівський ХФЗ»), представлений у вигляді ліофілізованого порошку. Його склад включає кверцетин у дозі 500 мг (у перерахунку на суху речовину), повідон – 450 мг та гідроксид натрію як допоміжну речовину. Умови зберігання – температура не вище 25 °С.

В якості препарату порівняння застосовували Диклоберл № 75 (серія 3150А, А. Menarini Manufacturing Logistics and Services S.r.l.), розчин для ін'єкцій, що містить 25 мг/мл диклофенаку натрію та допоміжні речовини

(пропіленгліколь, спирт бензиловий, ацетилцистеїн, маніт (Е 421), натрію гідроксид, вода для ін'єкцій). Температурний режим зберігання препарату знаходився в межах до 30 °С.

Як розчинник застосовували 0,9 % розчин натрію хлориду (серія 150121, ТОВ «Новофарм-Біосинтез»), призначений для інфузій, який зберігали при температурі не вище 30 °С.

### **2.1.3 Приготування робочих зразків для введення тваринам**

Для отримання ліпосомальної форми кверцетину (Ліпофлавон) до флакону з ліофілізованим препаратом додавали 9 мл фізіологічного розчину та інтенсивно струщували протягом 2 хвилин до формування однорідної емульсії. Надалі 4,5 мл цієї емульсії змішували з 5,5 мл фізіологічного розчину та перемішували протягом 2 хвилин, у результаті чого отримували вихідну емульсію № 1.

Вихідна емульсія № 1 характеризувалася концентрацією кверцетину 0,75 мг/мл та фосфоліпідів 27,5 мг/мл. Її зберігали при температурі (2–8) °С, термін придатності становив 10 діб.

Для інгаляційного введення готували робочий зразок шляхом додавання 5,8 мл розчинника до 1 мл вихідної емульсії № 1 до кінцевого об'єму 6,8 мл, після чого суміш ретельно перемішували. Отриману емульсію (1 мл) додатково розводили фізіологічним розчином до 5 мл, переносили до камери небулайзера та проводили одну інгаляцію до повного використання препарату. Введена доза становила 0,11 мг кверцетину та 4,04 мг фосфоліпідів на одну мишу.

Для внутрішньовенного ін'єкційного введення використовували 0,1 мл вихідної емульсії № 1 на одну ін'єкцію, що відповідало дозі 0,075 мг кверцетину та 2,75 мг фосфоліпідів на тварину.

Ліпосомальну композицію кверцетину з цинком готували аналогічно: до флакону з ліпосомальним кверцетином додавали 9 мл фізіологічного розчину та перемішували протягом 2 хвилин. До 4,5 мл отриманої емульсії додавали

суміш 5,0 мл розчинника та 0,5 мл розчину хлориду цинку у фізіологічному розчині з концентрацією 0,05 моль/л. За потреби рН коригували до значення близько 6 шляхом додавання 1 % розчину  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Таким чином отримували вихідну емульсію № 2.

Вихідна емульсія № 2 містила кверцетин у концентрації 0,75 мг/мл ( $2,5 \times 10^{-3}$  моль/л), фосфоліпіди – 27,5 мг/мл та іони  $\text{Zn}^{2+}$  – 0,16 мг/мл ( $2,5 \times 10^{-3}$  моль/л). Емульсію зберігали при температурі (2-8) °C не більше 10 діб.

Для внутрішньовенного введення застосовували 0,1 мл вихідної емульсії № 2 на одну ін'єкцію. Введена доза становила 0,075 мг кверцетину, 0,16 мг іонів цинку та 2,75 мг фосфоліпідів на одну мишу. Усі робочі зразки готували безпосередньо перед використанням.

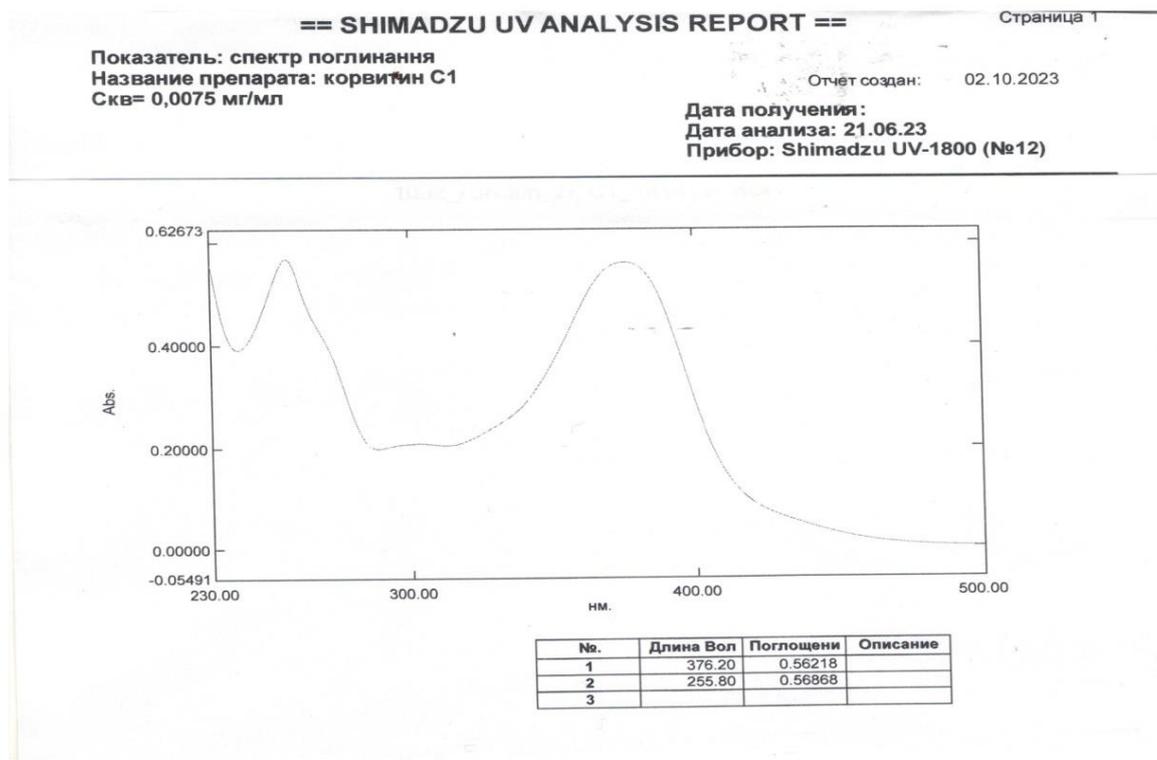
Ідентифікацію та кількісне визначення кверцетину у тест-зразках № 1 і № 2, а також підтвердження його включення до ліпосомальної форми Ліпофлавона проводили з використанням незалежних фізико-хімічних методів. Зокрема, застосовували спектрофотометричний аналіз за характерними максимумами поглинання у діапазонах (255–259) нм, (373–377) нм та плечем при 300 нм, а також за показником оптичної густини при довжині хвилі ( $256 \pm 2$ ) нм у спиртовому розчині зразка порівняно зі стандартом кверцетину.

Крім того, використовували метод рідинної хроматографії на колонці Supelco Si з аналізом хроматограм емульсії до та після гель-фільтрації на Sephadex G-25 із контролем виходу ліпосом за поглинанням при 540 нм. Для калібрування застосовували площі піків стандартних зразків, що дозволяло оцінити ступінь включення кверцетину до ліпосом.

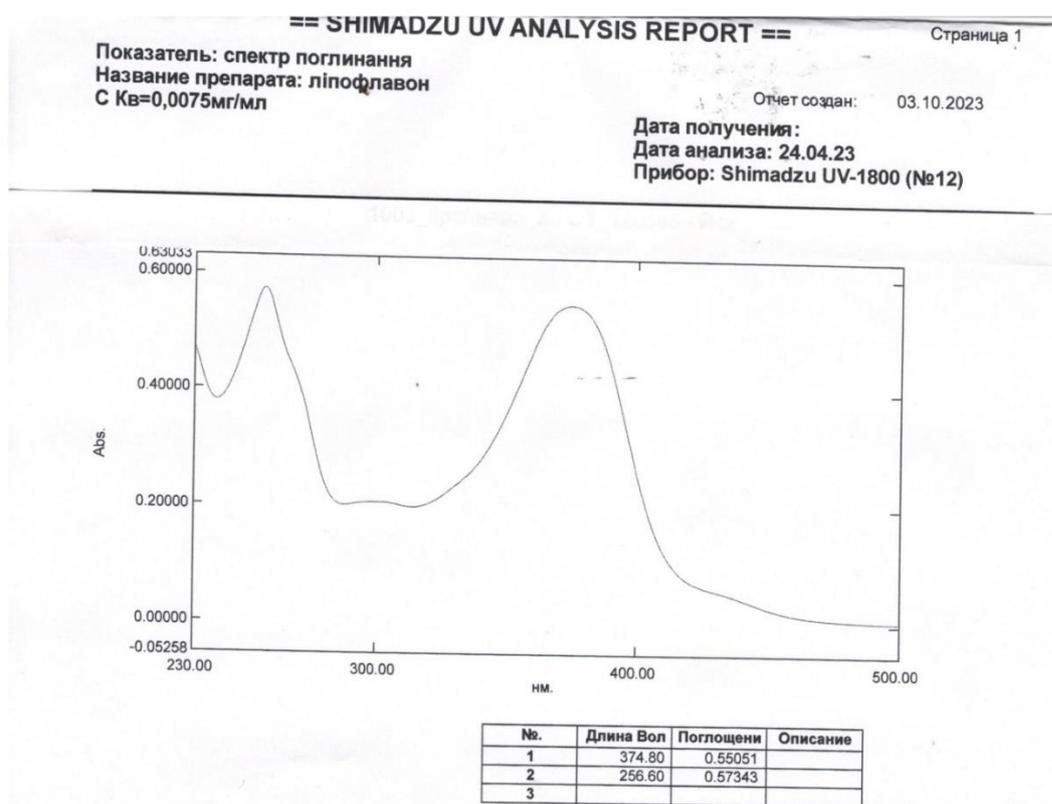
Розмір та розподіл ліпосом у тест-зразках визначали методом лазерної дифракції з використанням аналізатора Malvern Zetasizer Nano ZS.

Отримані результати фізико-хімічних досліджень засвідчили збереження нативної структури кверцетину у складі тест-зразків та його ефективне включення до ліпосомальної матриці Ліпофлавона. Характеристичні спектри

поглинання кверцетину в препаратах Корвітин і Ліпофлавон наведені на рис. 2.1 та 2.2 відповідно.



**Рис. 2.1** Спектр поглинання препарату Корвітин.



**Рис. 2.2** Спектр поглинання препарату Ліпофлавон.

В усіх лікувальних схемах тест-зразки вводили у вигляді емульсій на стерильному 0,9 % розчині натрію хлориду. Розрахунок введеної дози (мг/кг маси тіла) здійснювали за вмістом кверцетину з урахуванням його кількості у флаконі відповідного препарату (Ліпофлавіон, Корвітин).

## **2.2 Методи дослідження**

Дисертаційна робота виконана у відділі медичної хімії ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».

### **2.2.1 Молекулярний докінг**

Дослідження в галузі молекулярного моделювання проводили поетапно та включали оптимізацію геометрії досліджуваних сполук із використанням алгоритму Парра-Паризера-Попла до досягнення граничного значення градієнта 0,1 ккал/моль/град. Подальшим етапом був відбір макромолекулярних мішеней ЦОГ-1 та ЦОГ-2 із бази даних білкових структур, а також підготовка файлів оптимізованих лігандів і макромолекул для проведення докінг-аналізу в програмному середовищі AutoDock Vina. Для кожної досліджуваної молекули здійснювали пошук найбільш енергетично вигідного варіанта її розташування в активному центрі відповідного ізоферменту ЦОГ з подальшим аналізом і візуалізацією отриманих результатів [81, 82, 83, 84, 85].

За підсумками докінгу виконували двовимірну та тривимірну візуалізацію комплексів із застосуванням програмного забезпечення LigPlot+ (версія 1.4), що дозволяло ідентифікувати потенційні типи міжмолекулярних взаємодій ліганду з амінокислотним оточенням сайту зв'язування у форматі схематичного 2D-зображення [86]. Для первинної оцінки результатів молекулярного докінгу як референтні об'єкти було обрано комплекси ЦОГ з нестероїдними протизапальними препаратами та з арахідоновою кислотою. Інформацію щодо комплексів ЦОГ-1 з відомими лікарськими засобами отримували з відповідних структурних файлів [81].

### 2.2.2 Дослідження протизапальної активності

Протизапальну дію систем транспорту кверцетину оцінювали в моделях загальної антиексудативної активності [87, 88, 89]. Антиексудативний ефект досліджуваних форм визначали на моделях карагенінового, гістамінового, серотонінового та формалінового набряку. Характеристика лабораторних тварин, залучених до досліджень, наведена у відповідному підрозділі 2.1.

Карагеніновий набряк індукували шляхом субплантарного введення в задню лапку миші 0,05 мл 1 % водного розчину карагеніну, при цьому оцінювання антиексудативної дії здійснювали через 3 години. Для моделювання гістамінового набряку використовували 0,1 % розчин гістаміну гідрохлориду з реєстрацією результатів через 1 годину. Серотоніновий набряк відтворювали шляхом введення 0,01 % розчину серотоніну з оцінкою ефекту через 2 години. Формаліновий набряк викликали введенням 0,05 мл 2 % водного розчину формаліну, а результати фіксували через 4 години.

У всіх терапевтичних схемах Ліпофлавіон або Корвітин вводили одноразово внутрішньовенно за 15 хв до індукції ексудативного запалення у вигляді емульсії на стерильному 0,9 % розчині натрію хлориду. Розрахунок введеної дози (мг/кг маси тіла) здійснювали з урахуванням вмісту кверцетину у відповідному флаконі препарату. Як препарат порівняння застосовували диклофенак натрію (Диклоберл № 75), дозування якого визначали за вмістом диклофенаку натрію (3,8 мг/кг) [87].

Після завершення експозиції з флогогенним агентом тварин виводили з експерименту шляхом мортифікації передозуванням ефірного наркозу. На рівні тазостегнових суглобів проводили ампутацію набряклої та інтактною задніх лапок із подальшим зважуванням на торсійних вагах і визначенням різниці маси.

Протизапальну ефективність досліджуваних сполук оцінювали за ступенем зменшення набряку порівняно з контрольною групою та виражали у відсотках пригнічення ексудативної реакції.

Антиексудативну активність (А) розраховували за формулою:

$$A = \frac{M_{нд} - M_{зд}}{M_{нк} - M_{зк}} * 100\% - 100\%, \quad (1)$$

де А – антиексудативна активність;

$M_{нд}$  – маса набряклої стопи у досліді;

$M_{зд}$  – маса здорової стопи у досліді;

$M_{нк}$  – маса набряклої стопи у контролі;

$M_{зк}$  – маса здорової стопи у контролі.

### 2.2.3 Експериментальні моделі ГРДС

Ефективність ліпосомальної форми кверцетину (Ліпофлавіон) та її комбінації з іонами цинку при ГРДС вивчали із застосуванням двох моделей: фатального ГРДС, індукованого LPS, та ГРДС, спричиненого кислотною аспірацією (НСІ-модель) [90, 91, 92, 93].

Упродовж 6 діб після індукції патології та початку лікування реєстрували виживаність тварин, а також проводили оцінку клінічного стану, включно з поведінковими реакціями, руховою активністю, координацією, наявністю судом, м'язовим тонусом, реакціями на сенсорні подразники, параметрами дихання, станом шкірно-волоссяного покриву та положенням хвоста. Огляд здійснювали двічі на добу шляхом утримання тварин на відкритій поверхні. Після завершення курсу терапії визначали гематологічні показники та проводили морфологічний аналіз стану легенів та серця.

#### 2.2.3.1 Моделювання ГРДС кислотною аспірацією (НСІ модель).

Перед процедурою кислотної аспірації тварин витримували на нічному голодуванні з вільним доступом до води. Для індукції ушкодження легень мишей анестезували внутрішньовенним введенням пропофолу (0,1 мл 1 % розчину на мишу), після чого виконували інтратрахеальну інстиляцію 0,1 N розчину соляної кислоти (рН 1,5) [90, 91, 92, 94]. У «хибно оперованій» контрольній групі замість НСІ вводили стерильний фізіологічний розчин.

Тварин розподіляли на дев'ять експериментальних груп ( $n = 5$ ):

1. Інтактні тварини – контроль;
2. «Хибно оперовані» тварини (аспірація фізіологічним розчином) – контроль;
3. Тварини із модельованою кислотною аспірацією – патологія;
4. Тварини із кислотною аспірацією та інгаляційним введенням ліпосомальної форма КВ (Ліпофлавіон) – лікування;
5. Тварини із кислотною аспірацією та ін'єкційним внутрішньовенним введенням ліпосомальної форма КВ (Ліпофлавіон) – лікування;
6. Тварини із кислотною аспірацією та комбінованим інгаляційним та ін'єкційним введенням ліпосомальної форма КВ (Ліпофлавіон) – лікування;
7. Тварини із кислотною аспірацією та інгаляційним введенням кверцетину на матриці повідойоду (Корвітин) – лікування;
8. Тварини із кислотною аспірацією та ін'єкційним внутрішньовенним введенням кверцетину на матриці повідойоду (Корвітин) – лікування;
9. Тварини із кислотною аспірацією та комбінованим інгаляційним та ін'єкційним внутрішньовенним введенням ліпосомальної комбінації кверцетину з цинком (Ліпофлавіон з цинком) – лікування.

Першу інгаляцію здійснювали через 2 години після індукції HCl-моделі, наступні – один раз на добу протягом 5 днів. Першу внутрішньовенну ін'єкцію вводили до моделювання патології, подальші – щодобово з інтервалом 24 години впродовж 5 днів.

**2.2.3.2 Модель фатального ГРДС (LPS модель).** За умов загального наркозу (1 % пропофол, 0,1 мл/миша, внутрішньовенно) тваринам інтратрахеально вводили суміш липополісахариду *E. coli* (150 мкг/миша), мурамілпептиду (50 мкг/миша) та ад'юванту Фрейнда (10 мкл/миша) (суміш далі – LPS) [91, 92, 93, 94].

Було сформовано чотири групи (n = 10):

1. Інтактні тварини – контроль;
2. Тварини з модельованим LPS аспірацією – патологія;
3. Тварини з модельованим LPS аспірацією і сумісного інгаляційного та ін'єкційного введення ліпосомальної форми КВ (Ліпофлавон) – лікування;
4. Тварини з модельованим LPS аспірацією і сумісного інгаляційного та ін'єкційного введення ліпосомальної комбінації кверцетину з цинком (Ліпофлавон з цинком) – лікування.

Ін'єкцію тест-зразків проводили безпосередньо перед моделюванням, першу інгаляцію – через 2 години після індукції патології, надалі інгаляції повторювали щоденно протягом 6 діб.

## **2.2.4 Гематологічні та імуноферментні методи дослідження**

**2.2.4.1 Гематологічне дослідження** здійснювали через 24 години після останнього введення препарату. Забір крові проводили під загальним наркозом (1 % пропофол) із орбітального венозного синусу в пробірки з К<sub>3</sub>-ЕДТА [95]. Загальний аналіз виконували на автоматичному гемоаналізаторі Mythic 22 (Orphée SA) з визначенням стандартних показників клітинного складу крові.

Реактиви: Трансферний розчин Mythic 22 HM22-001-1 (Orphee); лізуючий реагент Mythic 22 OnlyOne HM22-002-1 (Orphee); розчинник для Mythic 22 HM22-003-1 (Orphee); промивний розчин Mythic 22 HM18-011-025 (Orphee).

Дослідження проводили при консультативній допомозі канд. біол. наук, завідуючої лабораторії онкофармакології Т. А. Карацуби. Визначення гематологічних показників – у відділі токсикології ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».

**2.2.4.2 Визначення концентрацій цитокінів (Імуноферментний аналіз).** Рівні IL-4, IL-6, IL-10 та TNF- $\alpha$  у сироватці крові визначали методом

твердофазного ELISA із застосуванням біотин-стрептавідинової системи детекції з підвищеною чутливістю. Для аналізу використовували комерційні набори Arigo Biolaboratories Corporation (Taiwan) згідно з протоколами виробника.

Метод ґрунтувався на принципі «сендвіч»-імуноаналізу з використанням двох мишачих моноклональних антитіл до різних епітопів цитокіну, одне з яких іммобілізоване на планшеті, а друге – біотинільоване. Детекцію здійснювали за допомогою кон'югату стрептавідину з пероксидазою хрому з подальшою спектрофотометричною реєстрацією на мікропланшетному аналізаторі Adsorbance Microplate Reader Elx808 (BioTeK, USA) при 450 нм. Концентрації обчислювали за калібрувальними кривими з використанням програмного забезпечення arigo GainData® [96].

**2.2.4.3 Визначення С-реактивного білка.** Вміст С-реактивного білка в сироватці крові визначали напівкількісним латекс-аглютинаційним методом із використанням діагностичного набору «СРБ-латекс-тест» (ТОВ «Лабораторія Гранум», Україна) відповідно до інструкції виробника.

### **2.2.5 Патоморфологічні дослідження**

Патоморфологічне дослідження виконували через 24 год після останнього введення тест-зразка. Евтаназію тварин проводили під легким ефірним наркозом після нічного голодування. Легені фіксували в 10 % нейтральному формаліні, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації та заливали в парафін (стандартна гістологічна методика). Із парафінових блоків готували зрізи товщиною 5 мкм, які забарвлювали гематоксиліном та еозином, трихромом і пікриновою кислотою – сіріусом червоним.

Мікроскопічний аналіз проводили при збільшенні  $\times 100$ ,  $\times 200$  та  $\times 400$  з морфометричною оцінкою. Визначали ознаки ексудативної, проліферативної та фіброзної фаз гострого пошкодження легень (ГПЛ/ГРДС). Частку ураженої площі легеневої тканини оцінювали планіметричним методом.

Напівкількісну оцінку легеневого фіброзу здійснювали за модифікованою шкалою Ashcroft [97].

Кількісне визначення інтерстиційного фіброзу проводили методом цифрової морфометрії з використанням програми ImageJ 1.54 шляхом обчислення відсотка сіріус-позитивного забарвлення інтерстицію (співвідношення червоних пікселів до загальної кількості пікселів у виділеній ділянці без великих судин і бронхів). Аналіз здійснювали на цифрових мікрофотографіях ушкоджених ділянок легеневої паренхіми при збільшенні  $\times 400$  з використанням автоматизованого алгоритму обробки зображень.

Дослідження морфології внутрішніх органів (легені та серце) виконували при консультативній допомозі д-р мед. наук С. П. Луговського та канд. мед. наук В. Н. Непомнящего. Підготовка зразків, гістологічна оцінка та їх фотографування здійснювали у відділі токсикології ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».

### **2.2.6 Модель гострого радіаційного синдрому**

Моделювання гострого радіаційного синдрому (ГРС) [98] здійснювали шляхом короткочасного тотального рентгенівського опромінювання на лінійному прискорювачі CLINAC (6 MeV) (Varian Medical System Inc., США) у поглинених дозах 5,5 і 7,0 Гр. У дослідженні використано нелінійних білих щурів-самок масою тіла (180 – 200) г, які перебували в стандартних умовах віварію на стандартному раціоні. Тварин опромінювали у пластиковому боксі розміром (15 × 15 × 7,5) см з отворами для вентиляції при кімнатній температурі. Відстань «джерело – об'єкт» дорівнювала 100 см, потужність дози у центрі боксу становила 0,76 Гр/хв, ефективна енергія  $E_{ef} = 6,0$  MeV. Потужність експозиційної дози відкалібрована за допомогою універсального дозиметра UNIDOS у комплекті з циліндричною іонізаційною камерою TW 30001-2127. Похибка вимірювання експозиційної дози випромінювання складала  $\pm 4$  %. Тварин контрольної групи піддавали псевдо опроміненню.

У дослідженні як тест-зразок системи транспорту кверцетину використано препарат «Ліпофлавіон» (ЛФ). В лікувальних схемах тест-зразок вводили тваринам у вигляді емульсії у стерильному 0,9% розчині натрію хлориду. Емульсію тест-зразку вводили тваринам у хвостову вену в дозах (мг/мл), що розраховані за вмістом кверцетину.

Експериментальних тварин рандомізовано розподіляли в контрольних і дослідних групах, відповідно по 30 та 40 особин:

- група I: контроль – опромінення у дозі 5,5 Гр + ін'єкції по 200 мкл фізіологічного розчину (O<sub>5,5 Гр</sub>);

- група II: O<sub>5,5 Гр</sub> + ін'єкції по 200 мкл емульсії ЛФКв (1,5 мг/мл) (ЛФ + O<sub>5,5 Гр</sub>);

- група III: контроль – опромінення у дозі 7,0 Гр + ін'єкції по 200 мкл фізіологічного розчину (O<sub>7,0 Гр</sub>);

- група IV: O<sub>7,0 Гр</sub> + ін'єкції по 200 мкл емульсії ЛФ (1,5 мг/мл) (ЛФ + O<sub>7,0 Гр</sub>).

- групу біологічного контролю становили інтактні тварини.

У дослідженнях використано схему профілактично-лікувального уведення емульсії ЛФ за 24 год до опромінення та два рази на тиждень протягом наступних 6 тижнів після опромінення. Тварини контрольних груп отримували ін'єкції фізіологічного розчину за аналогічною схемою.

Оцінку ступеня тяжкості віддалених радіаційних ускладнень у легенях виживших тварин у динаміці експерименту проводили за даними морфометричних і морфологічних досліджень. Матеріал для досліджень збирали відповідно через 30, 90 та 180 днів після опромінення.

Морфологічні дослідження проводили за уніфікованою методикою після фіксації тканини легень у 10 % розчині формальдегіду з подальшим забарвленням зрізів гематоксилін-еозином. Препарати фотографували за допомогою електронного окуляра MD 130 Electronic Eyepiece (Taiwan) на мікроскопі «AxioLab» тип 94D 2601 (Німеччина) при збільшенні  $\times 500$  (масляна імерсія).

Визначення сумарного колагену (СК) у легеневій тканині проводили після прямого кислотного гідролізу тканини методом окиснювання гідроксипроліну в реакції з хлораміном Т із застосуванням тест-стандарту гідроксипроліну (Reanal, Угорщина).

Радіологічний експеримент проведено в умовах ДУ «Інститут медичної радіології та онкології ім. С.П. Григор'єва НАМН України» (Харків) згідно Договору про наукове співробітництво. Дослідження виконували при консультативній допомозі д-р біол. наук Н.Є. Узленкової.

### **2.2.6 Модель кислотного опіку центральної зони рогівки**

Оцінка протизапальної та регенеруючої дії ліпосомальної форми кверцетину за кислотного опіку ока, що супроводжує гостру кислотну аспірацію. Дослідження проведено на статевозрілих кролях породи Шиншила обох статей масою тіла (2,5–3,5) кг, які перебували на стандартному раціоні в умовах віварію (температура в межах (20–25) °С, вологість не більше 50 %, природній світловий режим «день-ніч», утримання в індивідуальних клітках).

Кислотний опік центральної зони рогівки II-го ступеня викликали під місцевою анестезією (0,4 % інокаїн) аплікацією диска фільтрувального паперу  $d=6$  мм, змоченого 3 % розчином оцтової кислоти, з експозицією 5 с. Після формування кислотного опіку порожнину ока промивали 0,9 % розчином NaCl упродовж 15 хв. В обох моделях після утворення опіку для запобігання інфікування ранову поверхню обробляли одноразово 0,3 % розчином гентаміцину.

У лікувальних схемах використано тест-зразок препарату ЛФ у вигляді емульсії, що створена додаванням у флакон 1,5 мл стерильного 0,9% розчину натрію хлориду.

Тварин рандомно поділяли на експериментальні групи ( $n = 7$ ):

- I група – опікова патологія, щоденні інстиляції 0,9 % розчину NaCl (контроль);

- II група – опікова патологія, субтенонові ін'єкції емульсії ЛФ по 1 мл кожні 5 діб;
- III група – опікова патологія, щоденні інстиляції емульсії ЛФ по 2 краплі тричі на день.

Загальна тривалість лікування становила до 25 днів, починаючи із наступного дня після опіку.

Стан ока тварин після відтворення моделі опіку та в процесі лікування оцінювали за наступними показниками: вираженість запальної реакції за шкалою Дрейза [99], площа ерозованої зони та інтенсивність помутніння рогівки, термін повної епітелізації рогівки. Оцінку стану очей проводили біомікроскопічно та за бокового фокального освітлення на щілинній лампі ЩЛ-2Б. Площу деепіталізованої зони рогівки визначали після інстиляції 1 % розчину флуоресцеїну натрію шляхом фотореєстрації за програмою Multispec [100]. Для електронно-мікроскопічного дослідження тканину фіксували у 2,5 % розчині глютаральдегіду на фосфатному буфері рН 7,4 з додатковою фіксацією 1-м % розчином осмієвої кислоти. Зразки зневоднювали в спиртах висхідної концентрації з наступною полімеризацією в суміші епон-аралдит та вивчали в електронному мікроскопі ПЕМ-100-01.

Офтальмологічний експеримент проведено в умовах ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України» згідно Договору про наукове співробітництво. Дослідження виконували при консультативній допомозі д. мед. н., проф., член-кор. НАМН України Пасечнікової Н.В. та к. біол. н. Фесюнової Г.С.

### **2.2.7 Статистична обробка експериментальних даних**

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням програм Excel (Microsoft Corp., США), Origin Pro 2023b та онлайн-калькулятору (Statistic Kingdom). Перевірку на нормальність розподілу експериментальних даних здійснювали із застосуванням критерію Шапіро-Уїлка. У випадку нормального розподілу результати подано у

вигляді середнього значення  $\pm$  стандартної похибки середнього ( $M \pm m$ ), тоді як при відхиленні від нормальності – як медіану з інтерквартильним розмахом [Me (25%; 75%)]. Для множинних порівнянь при нормальному розподілі використовували дисперсійний аналіз (ANOVA), при розподілі, відмінному від нормального, застосовували ранговий критерій Краскела-Уолліса. Для аналізу закономірностей зв'язку між окремими показниками проведено кореляційний аналіз за допомогою коефіцієнта лінійної кореляції. При статистичному аналізі даних гострого радіаційного синдрому для порівняння різниці серед груп використовували непараметричний тест Манна-Уїтні ( $p_{\text{Манна-Уїтні}}$ ) і точний метод Фішера ( $p_{\text{ТМФ}}$ ) за допомогою пакета програм Statistica, v.5.0 та Biostatistica, v.4.03. Вірогідними вважалися відмінності між групами при рівні значущості  $p < 0,05$  [101].

### 2.3 Створення ліпосомальної композиції кверцетину з цинком

Представлено інформацію про створення нової системи транспорту кверцетину – оригінальної ліпосомальної композиції кверцетину з іонами цинку. Доцільність розробки такої системи пов'язана зі прогнозом потенціювання есенціальним біометалом біологічної активності ліпосомальної форми флавоноїду.

Композиції з біометалами можна віднести до транспортних форм природних поліфенолів, в яких останнім відведено роль іонофора. Так, *in vitro* показано, що комплексоутворення КВ із катіоном цинку сприяє проходженню компонентів крізь модельну клітинну мембрану, що імітована ліпосоною. Можлива транспортна роль системи КВ із цинком доповнює відомості про фармакологічну дію комплексу КВ-Zn *per se* [69] (протекторний ефект при оксидативному стресі та протизапальний ефект) та про фізіологічний статус цього біометалу [70].

Наведено алгоритм одержання композиції, що містить КВ, цинк, фосфатиділхолін і лактоза, а також результати ідентифікації компонентів і

підтвердження ліпосомальної природи продукту, придатного для біомедичного застосування.

Кверцетин і фосфатиділхолін розчиняли окремо в етиловому спирті з подальшим поєднанням одержаних розчинів. Суміш розчинів переносять до ротаційного випаровувача та видаляють розчинник до отримання тонкої плівки, по закінченні висушування якої у випаровувач пропускають інертний газ. Плівку знімають зі стінок колби випаровувача за допомогою розчину лактози у фосфатному буфері рН (6,7-7,1) при перемішуванні. До отриманої однорідної суспензії додають розчин цинку хлориду у фосфатному буфері рН 6,7, перемішують та піддають диспергуванню у гомогенізаторі високого тиску з контролем розміру ліпосом. Після гомогенізації до емульсії додають розчин лактози у фосфатному буфері. Отриману однорідну емульсію фільтрують крізь мембрану із діаметром пор 0,22 мкм та дозовано розливають у скляні флакони.

Зміни компонентного складу композиції за прикладами (1-5) відображено у табл. 2.1).

Таблиця 2.1.

### Склад компонентів для отримання композиції

Компоненти, що використані	№ прикладу композиції				
	1	2	3	4	5
1	2	3	4	5	6
КВ:					
- маса, г	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
- об'єм розчину, мл	125	125	125	125	125
ФХ:					
- маса, г	42,0	42,0	42,0	42,0	42,0
- об'єм розчину, мл	150	150	150	150	150

Кінець табл. 2.1

1	2	3	4	5	6
Лактоза: Перед диспергуванням: - маса, г - об'єм розчину, мл Після диспергування: - маса, г - об'єм розчину, мл					
	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
	1400	1370	1410	1430	1300
	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
	50	50	50	50	50
Цинку хлорид, $ZnCl_2$ : - маса, г - об'єм розчину, мл у т.ч.: іон $Zn^{2+}$ , г іон $Cl^-$ , г	0,545 50 0,262 0,283	1,090 80 0,523 0,567	0,273 40 0,131 0,141	0,136 20 0,066 0,070	2,180 150 1,046 1,134

Склад та фармацевтичну якість створеної ліпосомальної композиції встановлено за результатами якісної та кількісної ідентифікації компонентів (КВ, ФХ, лактоза, цинк) та підтвердження ліпосомального статусу із застосуванням низки незалежних фізико-хімічних методів (табл. 2.2).

Таблиця 2.2.

**Ідентифікація ліпосомальної композиції, що заявляється, та композиції-прототипу, за даними фізико-хімічних аналізів**

Показник	Композиція за № прикладу				
	1	2	3	4	5
1	2	3	4	5	6
Якісна ідентифікація компонентів:					
КВ	+	+	+	+	+
ФХ	+	+	+	+	+
Лактоза	+	+	+	+	+
Цинк	+	+	+	+	+

Кінець табл. 2.2.

1	2	3	4	5	6
Кількісний вміст компонента в емульсії, мг/мл: КВ ( $\pm 0,02$ ) ФХ ( $\pm 0,15$ ) Лактоза ( $\pm 0,2$ ) Цинк ( $\pm 0,002$ )	0,75 27,50 40,9 0,16	0,75 27,50 40,9 0,33	0,75 27,50 40,9 0,08	0,75 27,50 40,9 0,04	0,75 27,50 40,9 0,32
Масове співвідношення компонентів у композиції (ум.од): КВ:ФХ:Лактоза: Цинк	1:36,7:54,5 :0,21	1:36,7:54,5: 0,43	1:36,7:54,5: 0,11	1:36,7:54,5: 0,06	1:36,7:54,5: 0,89
Співвідношення ФХ:КВ:Цинк у ліпосомах до/після гель-фільтрації (мас.ч.)	1:0,027: 0,006/ 1:0,027: 0,006	1:0,027: 0,012/ 1:0,028: 0,006	1:0,027: 0,003/ 1:0,027: 0,003	1:0,027: 0,0002/ 1:0,028: 0,0002	1:0,027: 0,024/ 1:0,028: 0,023
Включення до ліпосом (% до уведеного): КВ Цинк	100 100	100 100	100 100	100 100	100 99
Розмір ліпосом нм ( $\pm 5$ ) / % ліпосом відповідного розміру	180/100	190/95 170/5	185/90 170/10	190/85 170/15	188/80 155/5 125/15
Індекс окислення ФХ (ум.од.)	0,20	0,22	0,21	0,20	0,25
pH емульсії	7,0	7,1	7,0	6,9	7,0

Примітка. (+) – ідентифікація позитивна.

За результатами фізико-хімічних аналізів підтверджено індивідуальність та склад заявленої композиції як ліпосомального продукту, що містить КВ, цинк, ФХ та лактозу а саме:

- позитивна ідентифікація КВ, ФХ, лактози та цинку, що відповідає такій стандартам, засвідчує збереження нативності природи компонентів у складі композиції;

- спектрофотометричний профіль композиції КВ-Zn при довжинах хвиль ( $325 \pm 2$ ) нм і ( $455 \pm 2$ ) нм за батохромного зсуву хвилі поглинання стандартного зразку кверцетину;

- достовірно встановлений кількісний вміст компонентів визначає масове співвідношення КВ : ФХ : лактоза : цинк у складі композиції, що становить 1:36,7:54,5:(0,06-0,89);

- стабільність ліпосом в емульсії композиції із розміром  $(180 \pm 5)$  нм за практичної монодисперсності супроводжується низьким індексом окислення ФХ;

- ФХ, КВ та цинк за даними гель-фільтрації кількісно включені до ліпосом у складі композиції;

- значення рН емульсії, відповідає фізіологічним показникам.

Узагальнений аналіз характеристик за прикладами (1-5) підтверджує склад та ліпосомальну природу композицій. Лише для композиції за прикладами 4 і 5 спостерігаються незначні коливання окремих показників (дисперсність розміру ліпосом, індекс окислення ФХ). Слід окремо вказати на притаманне тільки композиції за прикладом 5 явище утворення в емульсії легкого осаду. Загалом, такі відхилення не знижують фармацевтичну якість продуктів, хоча можуть впливати на їх стабільність при цільовому використанні та зберіганні.

Оптимальна фармацевтична якість та потенційна відповідність парентеральному введенню притаманна ліпосомальній композиції за прикладами (1-3) із масовим співвідношенням КВ : ФХ : лактоза : цинк 1:36,7:54,5:0,11-0,43. Для фармакологічних досліджень напрацьовано та застосовано ліпосомальну композицію КВ-цинк, створену за прикладом 1, причому дози тест-зразків розраховано за вмістом КВ.

Створена ліпосомальна композиція КВ : ФХ : лактоза : цинк є об'єктом інтелектуальної власності (US Patent No. 18399141) та запропонована для способу лікування ГРДС.

## РОЗДІЛ 3

### ДОКІНГ-АНАЛІЗ *IN SILICO* ЗВ'ЯЗКІВ ТА МОЛЕКУЛЯРНИХ МІШЕНЕЙ КВЕРЦЕТИНУ, ЩО ВИЗНАЧАЮТЬ ПРОТИЗАПАЛЬНУ ДІЮ

Підтвердження фізико-хімічними аналізами індивідуальності та нативності природи КВ у Ліпофавоні та Корвітині дозволяє залучити результати молекулярного докінгу особливостей природи зв'язку і амінокислотного оточення в комплексах кверцетину в активних сайтах протизапальних ензимів до трактовки особливостей протизапальної дії обраних систем транспорту КВ.

Виходячи із будови молекули кверцетину, його вплив на специфічні сайти ферментів та регуляцію їх активності може бути наслідком його здатності до утворення хелатів із певними металами. На користь цієї думки свідчать, зокрема, дані про інгібування флавоноїдами групи матричних металопротеїназ, зокрема, циклооксигенази, ліпоксигенази, індукованої синтази оксиду азоту, лейкотрієн *A4* гідролази.

#### 3.1 Циклооксигенеза (ЦОГ) та кверцетин

Характеристики зв'язування кверцетину з мішенями ЦОГ-1 та ЦОГ-2 та особливості його амінокислотного оточення в активних сайтах були встановлені за *in silico* алгоритмом оцінювання результатів докінгових досліджень, раніше запропонованим авторами для віртуальних комплексів різних НПЗП з циклооксигеназами (табл. 3.1).

Таблиця 3.1.

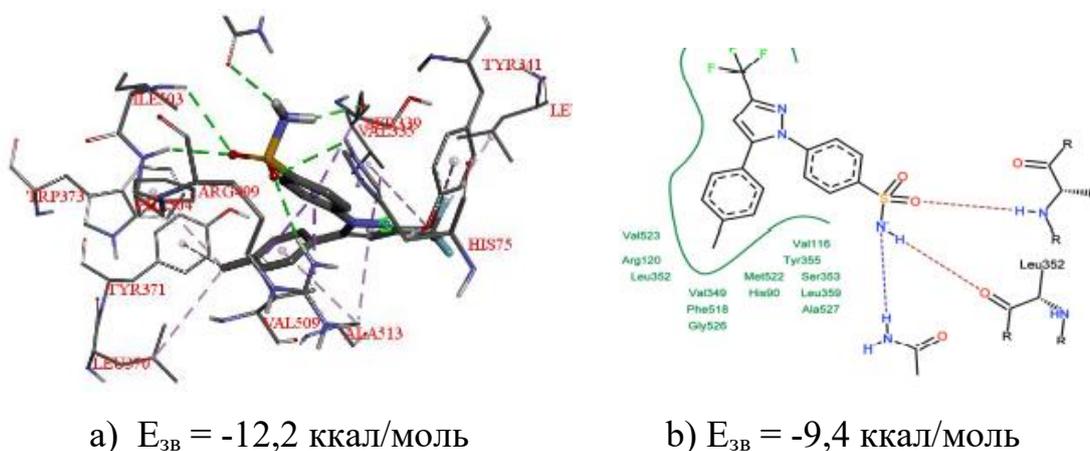
**Вільна енергія зв'язування та амінокислотне оточення кверцетину в сайті зв'язування ЦОГ-1 (порівняльний аналіз) [102]**

Ліганд та мішень (шифр) ( $E_{\text{док}}$ , ккал/моль)	Амінокислотне оточення кверцетину (в радіусі 4 Å)
Кверцетин та ЦОГ-1 (2OYE) (-8,5)	<i>THR347, ASP351, LEU352, TYR385, MET522, ILE523, GLY526, ALA527, SER530</i> залишки водневих зв'язків: <i>MET522</i> (3.53 Å), <i>SER530</i> (3.88 Å), <i>ASP351</i> (4.44 Å)
Диклофенак натрій та ЦОГ-1 (3N8y) (-8,8)	<i>PHE205, VAL344, TYR348, VAL349, LEU352, SER353, TYR355, PHE381, LEU384, TYR385, TRP387, PHE518, MET522, ILE523, GLY526, ALA527, SER530, LEU531, LEU534</i>
Мофезолак та ЦОГ-1 (5WBE), (-8,3)	<i>HIS90, LEU93, VAL116, ARG120, GLN192, VAL349, LEU352, SER353, TYR355, LEU359, LEU384, TYR385, TRP387, SER516, ILE517, PHE518, MET522, ILE523, GLY526, ALA527, SER530, LEU531</i>
Целекоксиб та ЦОГ-1 (3KK6)	<i>HIS90, VAL116, ARG120, GLN192, VAL349, LEU352, SER353, TYR355, LEU359, PHE381, LEU384, TYR385, TRP387, ILE517, PHE518, MET522, ILE523, SER516, GLY526, ALA527, SER530, LEU531</i>

Для віртуального комплексу кверцетину з ЦОГ-1 в оточенні ліганду (молекули кверцетину) в активному сайті зв'язування виявлені характерні ознаки, зокрема, важливі залишки амінокислот, такі як *TYR385*, *ILE523*. Аналогічно, в оточенні лігандів (мофезолак, диклофенак) в активному сайті зв'язування ЦОГ-1 залишки амінокислот *ARG120*, *TYR385*, *ILE523* характеризують положення ліганду в ніші протеїну, що важливе для блокування входження арахідонової кислоти до каталітичного сайту зв'язування, перешкоджаючи її взаємодії з *TYR385*. Показано також, що енергія зв'язку протеїну ЦОГ-1 з кверцетином співставима з аналогічними характеристиками інших лігандів – молекул Диклофенаку та Целекоксибу, відповідно.

За критеріями оцінювання, опрацьованими на прикладах комплексів НПЗП з циклооксигеназами (зокрема, Целекоксибу з ЦОГ-2) за результатами

докінгових досліджень були охарактеризовані деякі особливості комплексу кверцетину з ЦОГ-2, в тому числі і характер амінокислотного оточення в активному сайті (рис. 3.1, табл. 3.2).



**Рис. 3.1** Комплекс Целекоксибу з ЦОГ-2.

Таблиця 3.2.

**Вільна енергія зв'язування та амінокислотне оточення КВ в сайті зв'язування ЦОГ-2 (порівняльний аналіз)**

Ліганд та мішень (шифр) ( $E_{\text{док}}$ , ккал/моль)	Амінокислотне оточення кверцетину (в радіусі 4 Å)
1	2
Кверцетин та ЦОГ-2 (-8,9)	<i>ARG120, GLN192, VAL349, VAL523, LEU532, ALA513, ALA527.</i> залишки водневих зв'язків: <i>ARG120, GLN192, ALA513,</i>
Кверцетин-3-метиловий етер (-8,3) [103]	<i>HIS90, VAL349, LEU352, VAL523, ALA527, SER530</i> залишки водневих зв'язків: <i>HIS90, SER530.</i>
Целекоксиб та ЦОГ-2 (-9,4)	<i>ARG120, GLN192, PHE198, TYR348, VAL349, LEU352, VAL523, ALA527, SER530, LEU531,</i> залишки водневих зв'язків: <i>ARG120, GLN192, SER530, LEU531.</i>

Кінець табл. 3.2.

1	2
Celecoxib та ЦОГ-2 (3LN1) (PDB)	<p><i>HIS75, ARG106, GLN178, VAL335, LEU338, SER339, TYR341, LEU345, LEU370, TRP373, ARG499, ALA502, ILE503, PHE504, MET508, VAL509, GLY512, ALA513, SER516, LEU517.</i></p> <p>залишки водневих зв'язків:  <i>SER339 (2,96 Å), GLN178 (3,08 Å), LEU338 (2,71 Å), Arg499 (3,34 Å).</i></p>
Целекоксиб та ЦОГ-2 (3LN1) (model 1) (-11,8)	<p><i>HIS75, ARG106, GLN178, VAL335, LEU338, SER339, TYR341, LEU345, LEU370, TRP373, ARG499, ALA502, ILE503, PHE504, MET508, VAL509, ALA513, GLY512, SER516, LEU517</i></p>
Целекоксиб та ЦОГ-2 (3LN1) (model 2) (-11,9)	<p><i>HIS75, VAL102, ARG106, GLN178, VAL335, LEU338, SER339, TYR341, LEU345, TYR371, ARG499, ALA502, ILE503, PHE504, VAL509, ALA513, SER516, LEU517</i></p>
Целекоксиб та ЦОГ-2 (-12,2) [104]	<p><i>HIS75, VAL335, LEU338, LEU370, TYR371, TRP373, ARG499, ILE503, PHE504, VAL509, ALA513</i></p>

Здійснено докінг та проведено порівняльний аналіз взаємодії молекули кверцетину з потенційними біомішенями протизапальної дії – циклооксигеназами (ЦОГ-1 та ЦОГ-2) та Mitogen Activated Protein Kinases – MSX2, NOXA10, NOXA5 та MAPK14 [84]. У таблиці 3.3 наведено порівняння енергій зв'язку кверцетину з біомішенями протизапальної дії.

За отриманими результатами визначено MAPK14 як конкурентоздатну потенціальну мішень протизапальної дії кверцетину.

Таблиця 3.3.

**Енергії зв'язку кверцетину з біомішенями протизапальної дії.**

Кверцетин та протизапальні протеїни			
рецептор	енергія зв'язку, ккал/моль	рецептор	енергія зв'язку, ккал/моль
MSX2	-7,9	МАРК14	-9,7
НОХА10	-7,8	ЦОГ-1	-8,5
НОХА5	-7,6	ЦОГ-2	-8,9

Примітка. Msx2 – Homeodomain interpretation calculate that controls hardening calvarial bone of the creating skull. This recommends Msx2 suppresses transcription via protein-protein cooperation with components of the transcriptional machinery;

НОХА10 – Homeo protein HOX-A10 is a human protein which is encoded by HOX-A10 quality and they are found in groups as A, B, C and D on four separate chromosomes<sup>25</sup>;

НОХА5 – Is a human protein encoded by HOXA5 quality and found as clusters named A, B, C and D on four separate chromosomes. Methylation of this quality up regulates the tumour silencer P53 and assumes an essential job in tumorigenesis;

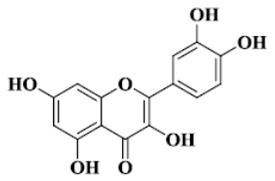
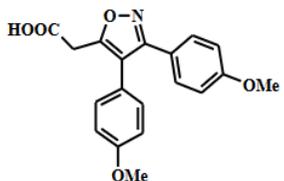
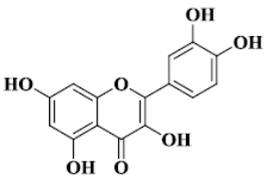
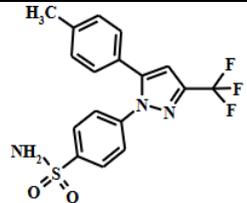
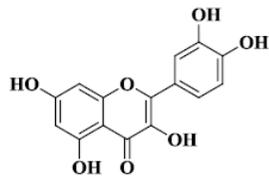
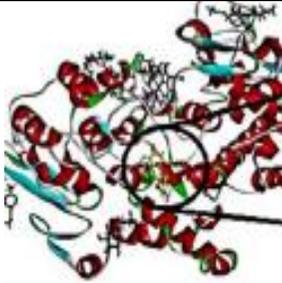
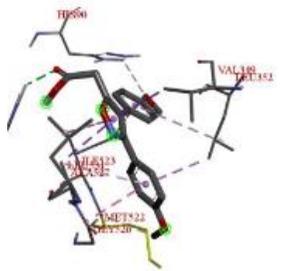
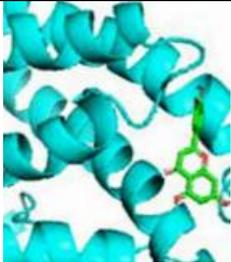
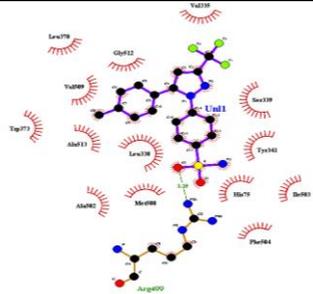
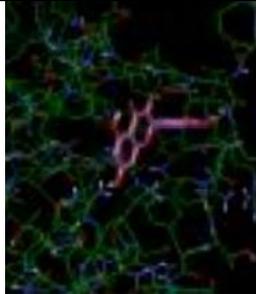
МАРК14 – Mitogen Activated Protein Kinase 14 likewise called as P38 – which encodes MAPK 14 quality and it is also called pressure initiated serine/threonine explicit kinases (SAPKs). They are recognized in actuated safe cells macrophages with a fundamental job in incendiary cytokine enlistment (Tumour Necrosis Factor alpha).

Загалом, проведені *in silico* дослідження взаємодії кверцетину з потенційними біомішенями протизапальної дії (ЦОГ-1, ЦОГ-2 та МАРК14) показали співставні результати (табл. 3.3). Зокрема, у механізмі протизапальної дії кверцетину не виявлено значних переваг циклооксигеназ у порівнянні з протизапальним протеїном МАРК14. Встановлено відносний рейтинг протизапальних протеїнів за величинами зростання енергій їх зв'язування з КВ: ЦОГ-1, ЦОГ-2, МАРК14.

Узагальнені результати порівняння взаємодії кверцетину та деяких НПЗЗ з потенційними біомішенями протизапальної дії наведені у табл. 3.4. Важливо зазначити, що підтвердження за даними фізико-хімічних аналізів індивідуальності та нативності природи КВ у тест-зразках принципово дозволяє залучити результати докінгу молекулярних взаємодій кверцетину з протизапальними ензимами до трактовки особливостей протизапальної дії Ліпофавона і Корвітина.

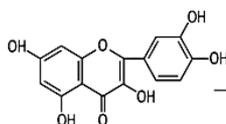
Таблиця 3.4.

**Узагальнені результати дослідження взаємодії кверцетину з потенційними біомішенями  
протизапальної дії**

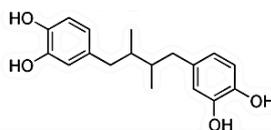
				
Кверцетин	Мофезолак	Кверцетин	Целекоксиб	Кверцетин
				
Кверцетин та ЦОГ-1	Мофезолак та ЦОГ-1	Кверцетин та ЦОГ-2	Целекоксиб та ЦОГ-2	Кверцетин та MAPK14
-8,5 ккал/моль (2OYE)	-8,3 ккал/моль (5WBE) -7,4 ккал/моль (3N8Y)	(-8,9) [103]	-11,9 ккал/моль (3LN1) -9,4 ккал/моль [103]	-9,7 ккал/моль [105]
THR-347, ASP-351, LEU-352, TYR-385, MET-522, ILE-523, GLY-526, ALA-527, SER-530 залишки водневих зв'язків: MET-522 (3.53 Å), SER-530 (3.88 Å), ASP-351 (4.44 Å)	HIS90, LEU93, VAL116, ARG120, GLN192, VAL349, LEU352, SER353, TYR355, LEU359, LEU384, TYR385, TRP387, SER516, ILE517, PHE518, MET522, ILE523, GLY526, ALA527, SER530, LEU531 (5WBE); MET113, VAL116, PHE205, TYR348, VAL349, LEU352, TYR355, LEU359, LEU384, TYR385, TRP387, PHE518, MET522, ILE523, GLY526, ALA527, SER530, LEU531 (3N8Y)	ARG120, GLN192, VAL349, VAL523, LEU532, ALA513, ALA-527. залишки водневих зв'язків: ARG 120, GLN 192, ALA 513.	HIS75, VAL 102, ARG106, GLN178, VAL335, LEU338, SER339, TYR341, LEU345, TYR371, ARG499, ALA502, ILE503, PHE504, VAL509, ALA513, SER516, LEU517 (3LN1)  ARG120, GLN192, PHE198, TYR348, VAL349, LEU-352, VAL523, ALA-527, SER-530, LEU531, залишки водневих зв'язків: ARG120, GLN192, SER-530, LEU531 [58]	ОТОЧЕННЯ АМІНОКИСЛОТНИМИ ЗАЛИШКАМИ НЕ ДОСЛІДЖЕНО

### 3.2 Ліпоксигеназа (5-*LOX*) та кверцетин

Ліпоксигеназа (5-ЛОГ) відіграє важливу роль у синтезі лейкотрієнів (*LT*), які можуть викликати деякі гострі та хронічні запальні захворювання людини, такі як астма, ревматоїдний артрит, запальні захворювання кишківника, псоріаз, дерматит, нефрит, атеросклероз і рак. Тому інгібування арахідонат-5-ліпоксигенази (ALOX5) може бути потенційним підходом до лікування різних запальних захворювань через вплив на синтез лейкотрієнів ліпоксигеназного ланцюга перетворень арахідонової кислоти (AA). В цьому плані привертають увагу речовини природного походження, серед яких кверцетин заслуговує на увагу, зокрема, за величиною  $IC_{50}$  [106].

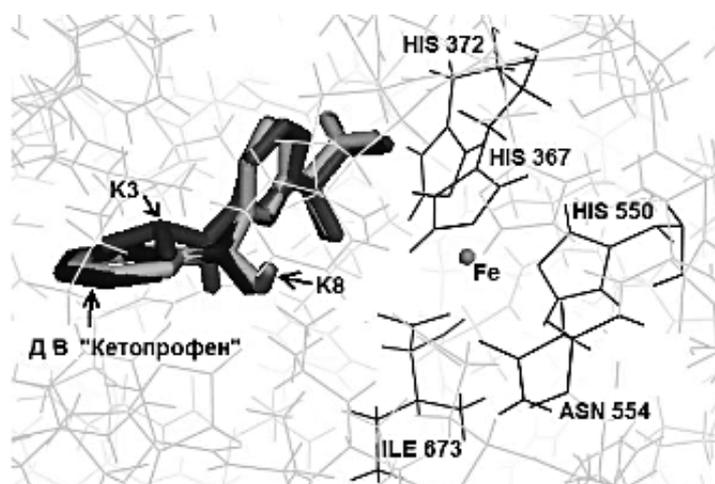


Кверцетин (5- *LOX*:  $IC_{50}$  6,6 мкМ)



Природний декатехол - NDGA (5-*LOX*:  $IC_{50}$  8,8 мкМ)

Візуалізація активного центру макромолекули 5-ЛОГ, що містить негемовий йон Fe (з умовним зарядом 2+), координаційно-зв'язаний з трьома полярними гістидиновими фрагментами *HIS372*, *HIS550*, *HIS367*, карбонільною групою аспарагіна *ASN554*, карбоксильною групою С-термінального ізолейцина *ILE673* та молекулою води  $H_2O$  (рис. 3.3). Ліганди при їх взаємодії з активним центром заміщують молекулу води  $H_2O$ . Результати докінгу кетопрофену та лігандів К3 та К8 в активний центр 5-ЛОГ представлені на рисунку 3.3 [107]. Важливо, що Кетопрофен, як молекула порівняння, характеризується високим рівнем інгібіції 5-ЛОГ ( $IC_{50} \leq 1$  мкМ/л).



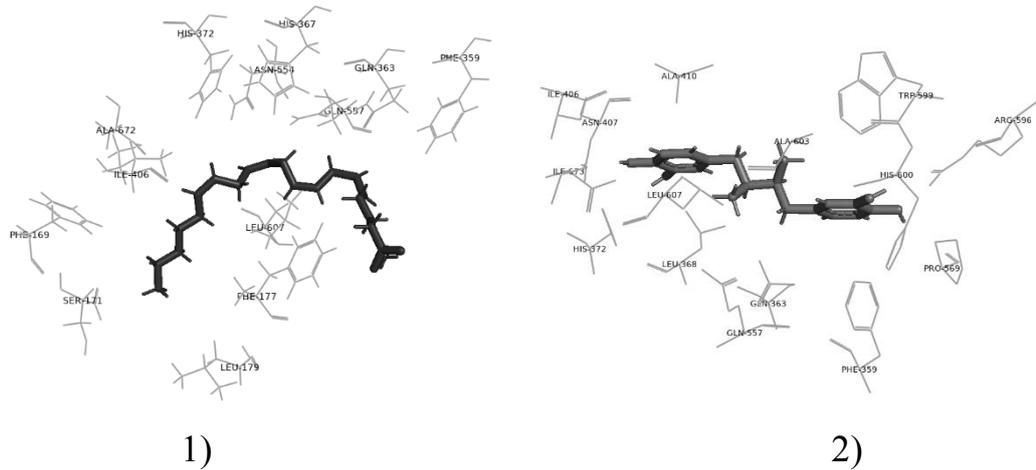
**Рис. 3.3** Візуалізація активного центру макромолекули 5-ЛОГ та результати докінгу кетопрофену та лігандів К3 та К8 в активний центр 5-ЛОГ

Проведено порівняльний аналіз характеристик комплексів у сайті 5-ліпоксигенази, зокрема, для сполук АА, NDGA та кверцетину (табл. 3.5, рис. 3.4, 3.5). Молекулярний докінг кверцетина у ліпоксигеназу потребує подальших досліджень, про що свідчить порівняльний аналіз характеристик комплексу кверцетина у сайті ліпоксигенази з характеристиками комплексів сполук порівняння (АА, NDGA, кетопрофен) у активному сайті зв'язування.

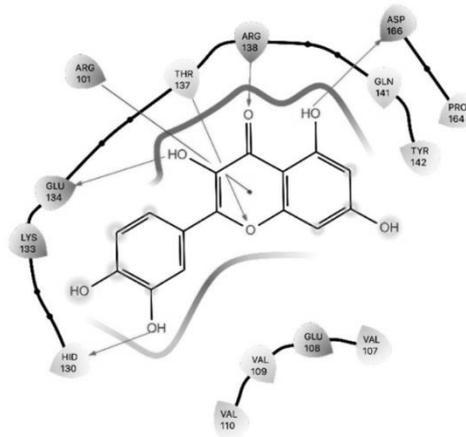
Таблиця 3.5.

**Порівняльний аналіз характеристик комплексів арахідонової кислоти (АА) та стандартного інгібітора NDGA у сайті 5-ліпоксигенази**

Сполука (pdb)	Езв. (ккал/моль)	Залишки амінокислот
АА (3V99)	-7,6	<i>PHE169, SER171, PHE177, LEU179, PHE359, GLN363, HIS367, HIS372, ILE406, ASN554, PHE555, GLN557, LEU607, ALA672</i>
NDGA (6N2W)	-7,2	<i>PHE359, GLN363, LEU368, HIS372, ILE406, ASN407, ALA410, GLN557, PRO569, ARG596, TRP599, HIS600, ALA603, LEU607, ILE673</i>



**Рис. 3.4** Молекули Арахідонової кислоти (1) та сполука NDGA (2) у активному сайті зв'язування ALOX5



**Рис. 3.5** Молекула КВ у сайті зв'язування ALOX5  
(Езв = (-5,94) ккал/моль) [108].

### 3.3 Розробка складу ліпосомальної композиції кверцетину з цинком

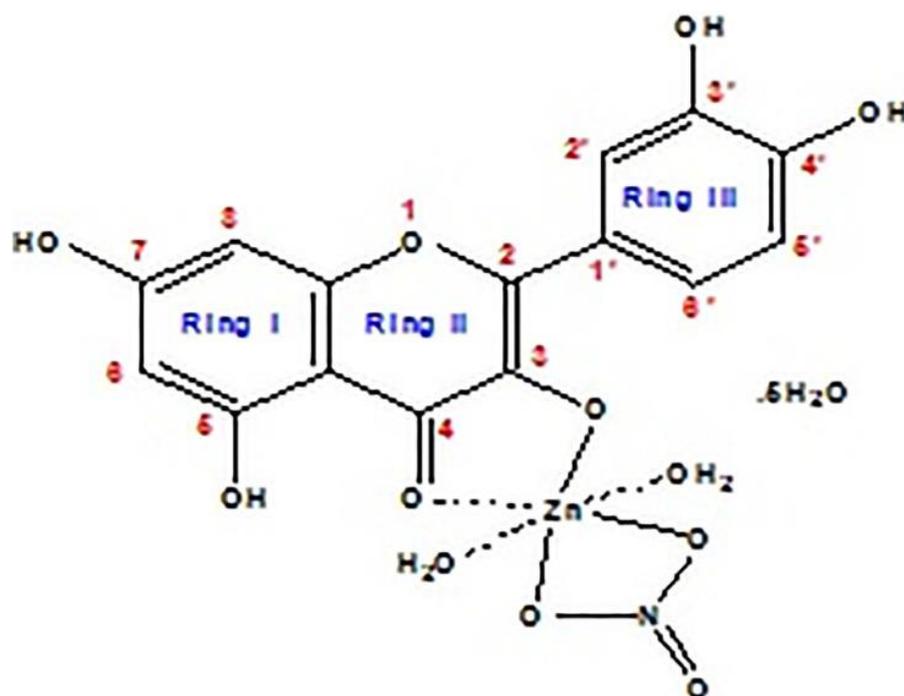
Виконання завдань дисертаційної роботи передбачає розробку нової ліпосомальної композиції кверцетину з оптимізованою фармакологічною активністю з урахуванням особливостей міжмолекулярних взаємодій та природи зв'язків, що реалізуються поліфенолами відповідно до їх базової структури, яка наведена у розділі 1 (рис. 1.1).

У контексті протизапальної специфіки важливими видаються визначені *in silico* через процедуру молекулярного докінгу особливості міжмолекулярних взаємодій кверцетину із специфічними мішенями – циклооксигеназами у

порівнянні, наприклад, з аспірином або целекоксибом (розділ 1, табл. 1.2 та 1.3). Так, оточення молекул кверцетину та препаратів порівняння в сайті зв'язування відповідного рецептору характеризується водневими та гідрофобними зв'язками [10, 106].

Для кверцетину та целекоксибу оцінено енергію водневих та гідрофобних зв'язків з амінокислотними залишками протеїну ЦОГ-2 за (розділ 1, табл. 1.3) [107]. «Гідрофобно-водневі» взаємодії з активними центрами циклооксигеназ з енергією зв'язування порядку (-9) кКал/моль можна віднести до важливих факторів протизапальної активності кверцетину. Разом з тим, поліфенольна будова молекули визначає здатність кверцетину до утворення і полярних зв'язків, що здатні модифікувати його біологічні прояви. Реалізація таких зв'язків відбувається за донорно-акцепторної взаємодії внаслідок контакту кверцетину з іонами перехідних d-металів, де КВ діє як бідентатний ліганд через карбонільний кисень C(4)- та C(3)-ОН сайтів (рис. 3.6) [108].

У контексті дослідження, що виконується, обґрунтовану увагу викликає кон'югація кверцетину з есенціальним цинком з утворенням біологічно активного комплексу, зокрема із протизапальними проявами (рис. 3.6) [109, 110, 111, 112].



**Рис. 3.6** Схема зв'язків у кон'югаті кверцетину з цинком. Рисунок зроблений авторкою.

Слід зазначити, що утворення комплексу КВ-Zn через сайти C-3 O<sup>-</sup> та CO-4 O<sup>-</sup> не заважає просторовим контактам кверцетину з активними центрами циклооксигеназ як важливого сегменту протизапального механізму, оскільки ефективний радіус катіону цинку 0,8 Å суттєво менший за відстані «гідрофобно-водневих» зв'язків кверцетину (табл. 3.6). При цьому комплексоутворенню відведено транспортну функцію, згідно якої флавоноїд виконує роль іонофора, що у складі комплексу з катіоном есенціального металу транспортується крізь клітинну мембрану [110]. *In vitro* показано, зокрема, що комплексоутворення із катіоном цинку сприяє проходженню КВ крізь клітинну мембрану, яка імітована моношаровою ліпосою [113]. Контакт системи КВ-Zn з ліпідними компонентами ліпосомальної мембрани у процесі транспортування сприяє підвищенню біодоступності кверцетину, але досі відсутня інформація про ідентифіковані власне ліпосомальні композиції КВ з цинком, які б мали прогноз фармакологічної трансляції.

Зазначене вище визначило доцільність орієнтації роботи на створення ліпосомальної композиції КВ із високою фармацевтичною якістю, яка за різних способів введення до організму проявляє фармакологічну активність при аспіраційному ГРДС та має протизапальну дію.

З урахуванням результатів проведеного молекулярного докінгу та їх теоретичного узагальнення у третьому розділі сформульовано такі проміжні висновки:

1. Встановлено, що кверцетин утворює комплекси з ЦОГ-1 та ЦОГ-2 (-8,5 та -8,9 ккал/моль відповідно), а характер його амінокислотного оточення в активних сайтах є подібним до такого для референтних НПЗП, що свідчить про можливість конкурентного інгібування циклооксигеназ.
2. Показано, що серед досліджених протизапальних мішеней найвищу афінність кверцетин проявляє до МАРК14 (-9,7 ккал/моль), що дозволяє розглядати р38 МАРК як одну з імовірних ключових ланок реалізації його протизапальної дії. Загалом механізм дії має мультитаргетний характер.

3. Взаємодія кверцетину з 5-ЛОГ характеризується меншою енергією зв'язування (-5,94 ккал/моль) порівняно зі стандартними інгібіторами, що вказує на допоміжну роль ліпоксигеназного шляху в його фармакологічних ефектах.
4. Поліфенольна структура кверцетину зумовлює формування водневих, гідрофобних та  $\pi$ -взаємодій з амінокислотними залишками білків-мішеней, а також здатність до комплексоутворення з іонами перехідних металів.
5. Обґрунтовано доцільність створення ліпосомальної композиції кверцетину з цинком, оскільки утворення комплексу KB-Zn не порушує його ключових взаємодій з активними центрами ферментів і потенційно може підвищувати біодоступність та ефективність протизапальної дії.

## РОЗДІЛ 4

### **ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЕФЕКТІВ КВЕРЦЕТИНУ В СИСТЕМАХ ТРАНСПОРТУ ПРИ ЕКСУДАТИВНОМУ ЗАПАЛЕННІ**

У четвертому розділі дисертаційної роботи наведено результати експериментального дослідження протизапальних властивостей кверцетину в різних системах доставки за умов розвитку ексудативного запалення. Актуальність такого підходу зумовлена поліфакторністю запальної реакції, участю різних медіаторів та фазністю її перебігу, що потребує комплексної фармакологічної оцінки досліджуваних препаратів.

З метою всебічної характеристики антиексудативної дії кверцетину застосовано низку класичних моделей гострого запалення, які відрізняються механізмами ініціації та провідними патогенетичними ланками. Це дало змогу проаналізувати фармакодинамічні особливості ліпосомальної форми кверцетину (Ліпофлавіон), препарату кверцетину в матриці повідона (Корвітин), а також оцінити вплив лікарської форми на реалізацію протизапального ефекту.

Окрему увагу у розділі приділено обґрунтуванню створення та експериментальній оцінці оригінальної ліпосомальної композиції кверцетину з цинком, розробленої з урахуванням фізико-хімічних властивостей активних компонентів та необхідності підвищення їх біодоступності. Такий дизайн дослідження дозволив зіставити ефективність різних систем доставки кверцетину та визначити перспективність нової ліпосомальної композиції для подальшого доклінічного вивчення.

#### **4.1 Антиексудативна дія Ліпофлавіону та Корвітину**

Антиексудативну активність ліпосомальної форми кверцетину (Ліпофлавіону) при парентеральному введенні оцінювали в моделі карагенінового набряку, яка характеризує циклооксигеназно-опосередкований

механізм розвитку запалення [87, 88, 89]. Як показано в таблиці 4.1, внутрішньовенне введення Ліпофлаону через 3 години після індукції запального процесу призводило до достовірного зменшення вираженості набряку при поступовому збільшенні дози тест-зразку від 3,8 до 15,2 мг/кг (за вмістом КВ).

Таблиця 4.1.

**Антиексудативна активність Ліпофлаону при внутрішньовенному введенні на моделі карагенінового набряку (n=5).**

Тест-зразок, спосіб уведення	Доза, мг/кг*	Величина набряку в контролі: у.о., $M \pm m$	Величина набряку в досліді: у.о., $M \pm m$	Відсоток інгібіції набряку, %
Ліпофлаон, в/в	3,8	71,14 $\pm$ 17,17	49,00 $\pm$ 11,36	-37,09
Ліпофлаон, в/в	7,6	71,14 $\pm$ 17,17	30,44 $\pm$ 18,42	-57,21 <sup>#</sup>
Ліпофлаон, в/в	15,2	71,14 $\pm$ 17,17	26,02 $\pm$ 17,17	-63,43 <sup>#</sup>
Диклоберл, в/о	3,8	85,00 $\pm$ 3,65	54,49 $\pm$ 3,01	-35,89 <sup>#</sup>

Примітка. \* – доза за кверцетином, # –  $p < 0,05$ .

Так, при дозі 3,8 мг/кг (за вмістом кверцетину) інгібіція набряку становила 37,09 %, тоді як збільшення дози до 7,6 мг/кг супроводжувалося посиленням антиексудативного ефекту до 57,21 % ( $p < 0,05$ ). Максимальне пригнічення ексудації було зафіксовано при дозі 15,2 мг/кг і досягало 63,43 %, що свідчить про чітку лінійну залежність «доза–ефект» (табл. 4.1). За цими показниками Ліпофлаон не поступався препарату порівняння – диклофенаку натрію (Диклоберл), введеному у дозі 3,8 мг/кг.

У моделі гістамінового набряку, що відображає ранню фазу запальної реакції, Ліпофлаон проявляв антиексудативну активність у межах (27,61–32,73) % залежно від дози (табл. 4.2). При цьому різниця між середньою та максимальною дозами була незначною, що свідчить про досягнення фармакологічного плато на ранніх етапах ексудації [47, 89, 114].

Таблиця 4.2.

**Антиексудативна активність Ліпофлакону при внутрішньовенному введенні на моделі гістамінового набряку (n=5)**

Тест-зразок, спосіб уведення	Доза, мг/кг	Величина набряку в контролі: мг, M±m	Величина набряку в досліді: мг, M±m	Відсоток інгібіції набряку, %
Ліпофлакон, в/в	3,8*	48,46±3,56	35,08±6,0	-27,61
Ліпофлакон, в/в	7,6*	48,46±3,56	32,7±1,26	-32,52 <sup>#</sup>
Ліпофлакон, в/в	15,2*	48,46±3,56	32,6±2,01	-32,73 <sup>#</sup>
Диклоберл, в/о	3,8	48,46±3,56	31,7±3,83	-30,85 <sup>#</sup>

Примітка. \* – доза за кверцетином;

# – p < 0,05 по відношенню до контролю.

Аналіз результатів у серотоніновій моделі показав, що при дозі 3,8 мг/кг інгібіція набряку становила 17,95 %, тоді як підвищення дози до 7,6 мг/кг супроводжувалося зростанням ефекту до 32,0 % (p<0,05). Подальше збільшення дози до 15,2 мг/кг не призводило до потенціювання протизапальної дії (інгібіція 23,13 %), що вказує на нелінійний характер дозозалежності в цій моделі (табл. 4.3).

Таблиця 4.3.

**Антиексудативна активність Ліпофлакону при внутрішньовенному введенні на моделі серотонінового набряку (n=5)**

Тест-зразок, спосіб уведення	Доза, мг/кг	Величина набряку в контролі: мг, M±m	Величина набряку в досліді: мг, M±m	Відсоток інгібіції набряку, %
Ліпофлакон, в/в	3,8*	76,44±2,6	62,72±6,99	-17,95
Ліпофлакон, в/в	7,6*	76,44±2,6	51,98±4,01	-32,00 <sup>#</sup>
Ліпофлакон, в/в	15,2*	76,44±2,6	58,76±6,2	-23,13 <sup>#</sup>
Диклоберл, в/о	3,8	76,44±2,6	54,5±2,95	-28,65 <sup>#</sup>

Примітка. \* – доза за кверцетином;

# – p < 0,05 по відношенню до контролю.

У моделі формалінового набряку, яка характеризує пізню фазу ексудативного запалення [47], Ліпофлавіон викликав пригнічення набряку на (15,35–19,02) %, причому зростання ефекту при підвищенні дози не мало пропорційного характеру (табл. 4.4). Незважаючи на це, антиексудативна активність ЛФ залишалася порівнянною з ефектом диклофенаку натрію (Диклоберл).

Таблиця 4.4.

**Антиексудативна активність Ліпофлавіону при одноразовому внутрішньовенному введенні на моделі формалінового набряку (n=5)**

Тест-зразок, спосіб уведення	Доза, мг/кг	Величина набряку в контролі: мг, M±m	Величина набряку в досліді: мг, M±m	Відсоток інгібіції набряку, %
Ліпофлавіон, в/в	3,8*	77,42±2,9	65,53±5,75	-15,35
Ліпофлавіон, в/в	7,6*	77,42±2,9	63,99±5,6	-17,34
Ліпофлавіон, в/в	15,2*	77,42±2,9	62,69±6,49	-19,02 <sup>#</sup>
Диклоберл, в/о	3,8	77,42±2,9	60,18±8,05	-22,26 <sup>#</sup>

Примітка. \* – доза за кверцетином;

# – p < 0,05 по відношенню до контролю.

Дослідження протизапальної дії Корвітину показало, що препарат проявляє антиексудативний ефект у різних моделях експериментального запалення, однак його вираженість суттєво поступаються ліпосомальній формі кверцетину (табл. 4.5).

У моделі карагенінового набряку (табл. 4.5) Корвітин у дозі 3,8 мг/кг практично не впливав на рівень ексудації (інгібіція 0,93 %). Збільшення дози до 7,6 та 15,2 мг/кг призводило до підвищення антиексудативної активності до 37,75 % та 45,11 % відповідно, однак навіть за максимального дозування ефект поступався дії Ліпофлавіону при аналогічних дозах.

Таблиця 4.5.

**Антиексудативна активність Корвітину при одноразовому внутрішньовенному введенні на моделі карагенінового набряку (n=5)**

Тест-зразок, спосіб уведення	Доза, мг/кг*	Величина набряку в контролі: у.о., М±m	Величина набряку в досліді: у.о., М±m	Відсоток інгібіції набряку, %
Корвітин, в/в	3,8	72,74±2,63	72,06±3,03	-0,93
Корвітин, в/в	7,6	72,74±2,63	45,28±3,07	-37,75 <sup>1</sup>
Корвітин, в/в	15,2	72,74±5,46	39,92±3,71	-45,11 <sup>1</sup>
Диклоберл, в/о	3,8	85,00±3,65	54,49±3,01	-35,89 <sup>#</sup>

Примітка. \* – доза за кверцетином;

# – p < 0,05 по відношенню до контролю.

У моделі гістамінового набряку Корвітин проявляв більш виражену активність: інгібіція набряку становила 27,94 % при дозі 3,8 мг/кг та 31,45 % при 7,6 мг/кг (p < 0,05). Проте підвищення дози до 15,2 мг/кг супроводжувалося зниженням ефекту до 26,95 %, що свідчить про нестійку дозозалежність (табл. 4.6).

Таблиця 4.6.

**Антиексудативна активність Корвітину при одноразовому внутрішньовенному введенні на моделі гістамінового набряку (n=5).**

Тест-зразок, спосіб уведення	Доза, мг/кг	Величина набряку в контролі: мг, М±m	Величина набряку в досліді: мг, М±m	Відсоток інгібіції набряку, %
Корвітин, в/в	3,8*	48,46±3,56	34,92±2,1	-27,94 <sup>#</sup>
Корвітин, в/в	7,6*	48,46±3,56	33,22±4,88	-31,45 <sup>#</sup>
Корвітин, в/в	15,2*	48,46±3,56	35,4±2,96	-26,95 <sup>#</sup>
Диклоберл, в/о	3,8	48,46±3,56	31,7±3,83	-30,85 <sup>#</sup>

Примітка. \* – доза за кверцетином;

# – p < 0,05 по відношенню до контролю.

У серотоніновій моделі Корвітин у мінімальній дозі не лише не пригнічував ексудацію, а й незначно потенціював набряк (+4,06 %). Антиексудативна дія на рівні (19,52–20,43) % реєструвалася лише при дозах 7,6 та 15,2 мг/кг і не зростала при їх подальшому збільшенні (табл. 4.7).

Таблиця 4.7.

**Антиексудативна активність Корвітину при одноразовому внутрішньовенному введенні на моделі серотонінового набряку (n=5)**

Тест-зразок, спосіб уведення	Доза, мг/кг	Величина набряку в контролі: мг, M±m	Величина набряку в досліді: мг, M±m	Відсоток інгібіції набряку, %
Корвітин, в/в	3,8*	76,44±2,6	79,54±7,6	4,06
Корвітин, в/в	7,6*	76,44±2,6	60,82±7,04	-20,43
Корвітин, в/в	15,2*	76,44±2,6	61,52±4,66	-19,52 <sup>#</sup>
Диклоберл, в/о	3,8	76,44±2,6	54,5±2,95	-28,65 <sup>#</sup>

Примітка. \* – доза за кверцетином;

# – p < 0,05 по відношенню до контролю.

За умов формалінового запалення Корвітин виявляв найменшу протизапальну активність: інгібіція набряку перебувала в межах (6,48–9,42) % та практично не залежала від дози (табл. 4.8), що більш ніж удвічі поступалося показникам, отриманим для Ліпофлавоу (табл. 4.4).

Таблиця 4.8.

**Антиексудативна активність Корвітину при одноразовому внутрішньовенному введенні на моделі формалінового набряку (n=5).**

Тест-зразок, спосіб уведення	Доза, мг/кг	Величина набряку в контролі: мг, M±m	Величина набряку в досліді: мг, M±m	Відсоток інгібіції набряку, %
Корвітин, в/в	3,8*	77,42±2,9	72,4±3,64	-6,48
Корвітин, в/в	7,6*	77,42±2,9	70,56±4,12	-8,86
Корвітин, в/в	15,2*	77,42±2,9	70,12±4,98	-9,42
Диклоберл, в/о	3,8	77,42±2,9	60,18±8,05	-22,26 <sup>#</sup>

Примітка. \* – доза за кверцетином;

# – p < 0,05 по відношенню до контролю.

## 4.2 Оцінка антиексудативної дії оригінальної ліпосомальної композиції кверцетину з цинком

Результати порівняльного аналізу ефективності досліджуваних систем доставки кверцетину стали підґрунтям для створення ліпосомальної композиції кверцетину з цинком, яка характеризується високою фармацевтичною якістю та придатністю до парентерального введення [116]. Необхідність створення такої композиції зумовлена низькою біодоступністю кверцетину, його обмеженою розчинністю у водних середовищах та доцільністю потенціювання біологічної активності флавоноїду за рахунок комплексоутворення з цинком.

Обраний підхід ґрунтується на використанні фосфатиділхоліну як мембраноутворювального компонента з додаванням лактози як стабілізатора, що в сукупності забезпечує формування ліпосом із контрольованими розмірами, стабільними фізико-хімічними параметрами та показниками, придатними для подальшого біомедичного застосування. У межах розділу наведено алгоритм одержання композиції, варіанти її складу, а також результати ідентифікації компонентів і підтвердження ліпосомальної природи продукту.

Поставлене завдання реалізовано шляхом створення оригінальної ліпосомальної композиції, до складу якої входять фосфатиділхолін, кверцетин, хлорид цинку та лактоза. Розробка композиції здійснювалася за поетапним технологічним алгоритмом, що забезпечує формування стабільної ліпосомальної емульсії з високим ступенем включення активних компонентів (Див. розділ 2.3).

Протизапальну активність нової композиції оцінювали в моделі карагенінового ексудативного запалення. Як наведено в таблиці 4.9, внутрішньовенне введення ліпосомальної композиції KB-Zn забезпечувало пригнічення набряку на (38,0–55,0) % залежно від складу та дози препарату. При дозі 3,8 мг/кг інгібіція ексудації становила (43,6–55,0) %, а при підвищенні дози до 5,7 мг/кг досягала 68,4 %, що достовірно перевищувало ефект базового

ліпосомального препарату (Ліпофлакону), для якого аналогічний показник становив 37,09 %.

Таблиця 4.9.

**Фармакологічна активність ліпосомальної композиції  
КВ-Zn в моделі ексудативного запалення**

Ліпосомальна композиція за прикладом № *	Величина набряку в моделі запалення, ум.од.		Протизапальна дія – інгібіція набряку **, %
	Контроль – без лікування	Вплив ліпосомальн. композиції	
1	68,1 ± 0,3	38,4 ± 0,3	-43,6
2: у дозі (за вмістом КВ):			
- 3,8 мг/кг	72,0 ± 0,4	31,4 ± 0,4	-55,0
- 5,7 мг/кг	70,5 ± 0,3	22,1 ± 0,5	-68,4
3	72,0 ± 0,3	41,0 ± 0,2	-43,0
4	79,1 ± 0,4	47,6 ± 0,3	-39,9
5	69,2 ± 0,5	32,4 ± 0,5	-54,7
Ліпофлакон	71,14±17,17	49,00±11,36	-37,09

Примітка. \* – Внутрішньовенне введення емульсії композиції в дозі 3,8 мг/кг за вмістом КВ;

\*\* – Протизапальну дію визначено за % інгібіції набряку порівняно з контролем без лікування.

Таким чином, ліпосомальна композиція кверцетину з цинком демонструє виражену та дозозалежну антиексудативну дію, яка за окремими показниками перевищує ефективність референтних форм кверцетину, що підтверджує доцільність подальшого доклінічного вивчення даної системи доставки [47, 116].

На підставі отриманих експериментальних даних у четвертому розділі дисертаційної роботи сформульовано такі проміжні висновки:

1. Встановлено, що ліпосомальна форма кверцетину (Ліпофлакон) проявляє виражену антиексудативну активність у моделі карагенінового набряку з чіткою залежністю «доза-ефект» (до 63,43 % інгібіції), не поступаючись диклофенаку натрію. Це свідчить про ефективне пригнічення циклооксигеназно-опосередкованої фази запалення.

2. У моделях гістамінового та серотонінового набряку Ліпофлавіон забезпечував помірне зменшення ексудації (до 32–33 %), причому для гістамін-індукованої реакції характерним було досягнення фармакологічного плато, а для серотонінової – нелінійна дозозалежність.
3. У моделі формалінового запалення ліпосомальний кверцетин знижував набряк у межах (15–19) %, що підтверджує його вплив і на пізню фазу ексудативного процесу, хоча без чіткої пропорційності підвищенню дози.
4. Препарат кверцетину в матриці повідона (Корвітин) виявляв антиексудативну активність у всіх досліджених моделях, однак її вираженість були нижчими порівняно з ліпосомальною формою. У ряді моделей відзначалася відсутність чіткої дозозалежності або мінімальний ефект при низьких дозах.
5. Порівняльний аналіз засвідчив переваги ліпосомальної системи доставки кверцетину щодо сили та відтворюваності протизапальної дії, що вказує на суттєвий вплив лікарської форми на реалізацію фармакологічного ефекту.
6. Оригінальна ліпосомальна композиція кверцетину з цинком продемонструвала виражену антиексудативну активність у моделі карагенінового запалення (до 68,4 % інгібіції набряку), перевищуючи базову ліпосомальну форму при співставних дозах. Отримані результати обґрунтовують доцільність подальшого доклінічного дослідження цієї системи транспорту як перспективного протизапального засобу.

## РОЗДІЛ 5

### ВИЗНАЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ DRUG DELIVERY SYSTEMS КВЕРЦЕТИНУ ПРИ ГРДС

Розділ дисертаційної роботи присвячений експериментальному дослідженню ефективності систем доставки кверцетину за умов гострого респіраторного дистрес-синдрому. З метою комплексної оцінки фармакологічного потенціалу ліпосомальних і комплексних форм кверцетину було використано два патогенетично відмінні підходи до моделювання ГРДС. Перший ґрунтувався на відтворенні прямого ушкодження легеневої тканини шляхом кислотної аспірації (НСІ), що дозволяє відтворити ексудативно-запальну фазу гострого ушкодження легенів. Другий підхід передбачав індукцію фатального варіанта ГРДС за допомогою ліпополісахариду, який моделює системну запальну відповідь з високим рівнем летальності.

Застосування двох експериментальних моделей дало змогу оцінити вплив систем транспорту кверцетину на виживаність тварин, динаміку маси тіла, клінічні прояви патології, гематологічні показники та морфофункціональний стан легенів і серця. Такий дизайн дослідження дозволив порівняти ефективність різних шляхів введення препаратів і визначити переваги ліпосомальних композицій кверцетину, зокрема у поєднанні з цинком, за різних механізмів розвитку гострого ушкодження легеневої тканини.

#### **5.1 Ефективність кверцетину у системах транспорту при аспіраційному ГРДС за різних парентеральних способів уведення**

Моделювання гострого респіраторного дистрес-синдрому у мишей шляхом однократного інтратрахеального введення 0,1 М розчину НСІ у дозі 2,0 мкл/г дозволяє отримати пряме гостре пошкодження легенів (ГПЛ) та прослідкувати гістологічні зміни від ранніх – ексудативних до пізніх – фіброзних [117, 118].

Ефекти обраних систем транспорту КВ відстежували протягом 6, 14 та 30 діб після індукції ГРДС. У таблицях 5.1 і 5.2 наведено оцінку фармакологічної активності Ліпофлавона та Корвітина за показниками динаміки виживаності та маси тіла тварин, що вижили.

Жодна з інтактних тварин не загинула в період спостережень. Стан та активність тварин були у межах фізіологічної норми при позитивній динаміці маси тіла. Хибно оперовані тварини характеризувались відносним зниженням рухової активності, споживання їжі та ваги тіла, але на 5 добу стан цих тварин відновлювався.

У моделі кислотної аспірації реєстрували загибель тварин вже протягом перших двох діб (1/5 та 2/5 у першу та другу добу, відповідно) (табл. 5.1). На 6 день спостереження виживаність становила 40 % популяції. Патологія супроводжувалась зниженням рухової, активності, загальмованістю, птозом. Тварини перебували у неприродній позі. Дихальний цикл та глибина дихання були порушені. Споживання їжі та води було суттєво знижено, що супроводжувалось зниженням ваги тіла тварин (табл. 5.2). Певне покращення стану мишей спостерігалось на 5 добу після моделювання патології, але відновлення клінічного стану тварин не спостерігали.

Інгаляційне, внутрішньовенне та комбіноване (внутрішньовенне та інгаляційне) застосування Ліпофлавоно повністю запобігало загибелі тварин. Протягом двох діб після моделювання патології покращувалась рухова активність та координація рухів, тонус мускулатури та дихання тварин.

Внутрішньовенне введення та інгаляційне застосування Корвітину зменшувало загибель тварин: 1/5 та 2/5, відповідно. При цьому протягом двох діб зберігалось зниження рухової активності мишей, з порушенням координації рухів, птозом, зниженням тону мускулатури та кінцівок та ускладненням дихання. Стан виживши тварин покращувався протягом (3-6-14-30) доби спостереження.

Таблиця 5.1.

**Вплив тест-зразків на виживаність мишей при ГРДС у моделі  
кислотної аспірації (n=5)**

Група тварин	Вихідне	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	6 день	14 день	30 день
Інтактні миші	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Хибно оперовані миші	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Патологія	5/5	4/5	3/5	3/5	3/5	3/5	2/5	2/5	2/5
Патологія +ЛФ (інгаляція)	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Патологія +ЛФ (ін'єкція)	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5	4/5
Патологія +ЛФ (ін'єкція та інгаляція)	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Патологія +Корвітин (інгаляція)	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5	3/5	3/5
Патологія +Корвітин (ін'єкція)	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5	4/5
Патологія +ліпосомальна композиція кверцетину з Zn <sup>2+</sup> (інгаляція)	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

Фармакологічну активність обох тест-систем транспорту КВ у НСІ моделі ГРДС характеризує також позитивний вплив на динаміку маси тіла, що наприкінці періоду спостереження переважала вихідні значення (за зниження споживання їжі та води як частини патологічної клінічної картини) (табл. 5.2).

Визначення впливу систем транспорту кверцетину на гематологічні показники крові перевіряли на препараті Ліпофлавон.

Гематологічні показники периферичної крові білих нелінійних мишей на 6-ту добу після індукції гострого респіраторного дистрес-синдрому засвідчили формування системної запальної відповіді різного ступеня вираженості залежно від застосованої drug delivery systems кверцетину. Виявлені зміни охоплювали як лейкоцитарну формулу, так і еритроцитарну та тромбоцитарну ланки гемопоезу, що узгоджується з сучасними уявленнями про поліорганний характер ГРДС та його системні наслідки [2].

У тварин групи патологія на 6-ту добу спостереження відмічали тенденцію до помірного лейкоцитозу з коливанням загальної кількості лейкоцитів у межах  $(6,9-8,9) \times 10^9/\text{л}$ . Для цієї групи було характерне зниження відносного вмісту лімфоцитів на тлі підвищення частки нейтрофілів та моноцитів, що відображає перехід запального процесу у фазу активної клітинної відповіді. Подібний зсув лейкоформули є типовим для експериментальних моделей ГРДС і свідчить про інтенсивну активацію вродженого імунітету та міграцію нейтрофілів у легеневу тканину.

У групи, яка отримували Ліпофлавіон інгаляційно відзначали збереження високого відсотка лімфоцитів (понад 91 %) при одночасному зниженні відносного та абсолютного вмісту нейтрофілів і моноцитів. Такі зміни можуть свідчити про послаблення системної запальної реакції та зменшення інтенсивності нейтрофільного компонента, що є важливим з огляду на роль нейтрофілів у розвитку альвеолярного ушкодження при ГРДС.

А коли тваринам вводили Ліпофлавіон ін'єкційно лейкоцитарна формула характеризувалася більш вираженим нейтрофільно-моноцитарним зсувом порівняно з інгаляційним шляхом введення. Підвищення частки нейтрофілів (до 11 %) та моноцитів (до 14,8 %) на тлі зниження лімфоцитів може свідчити про менш ефективний контроль системного запалення при парентеральному введенні препарату.

Найбільш збалансовані показники лейкоцитарної формули були зафіксовані у групі, що отримувала інгаляційно оригінальну ліпосомальну композицію кверцтину з цинком. Для цієї групи було характерне збереження високого відсотка лімфоцитів, помірні значення нейтрофілів та мінімальні коливання абсолютних показників лейкоцитів. Виявлений ефект може бути пов'язаний із мембраностабілізуючими та антиоксидантними властивостями флавоноїдів у поєднанні з імуномодулюючою роллю цинку, що підтверджується даними літератури [119].

Показники ложно-оперованих та інтактних тварин залишалися у межах фізіологічної норми, без ознак вираженого запального зсуву, що підтверджує адекватність моделі [95].

Еритроцитарна ланка крові у тварин із модельованим ГРДС (група – патологія) відмічали тенденцію до зниження кількості еритроцитів і рівня гемоглобіну порівняно з інтактним контролем, що може бути наслідком гіпоксичного ураження, порушень мікроциркуляції та активації оксидативного стресу. Зміни показників гематокриту та індексів еритроцитів (MCV, MCH, MCHC) мали помірний характер і не виходили за межі адаптаційних реакцій.

У групах, які отримували Ліпофлавіон, особливо при інгаляційному введенні та у комбінації з цинком, показники еритроцитарної ланки були більш стабільними та наближеними до інтактних значень. Це може свідчити про опосередкований цитопротекторний ефект досліджуваних сполук та зменшення ступеня гіпоксичного навантаження.

Тромбоцитарні показники для тварин контрольної патологічної групи було характерне підвищення кількості тромбоцитів та зміни тромбоцитарних індексів (PDW, PLCR), що відображає активацію гемостатичної системи та ризик мікротромбоутворення – одного з ключових патогенетичних механізмів ГРДС.

Застосування Ліпофлавіону, особливо у складі інгаляційної комбінації з цинком, супроводжувалося більш помірними значеннями PLT, PDW і PLCR, що може свідчити про зниження активації тромбоцитів та покращення реологічних властивостей крові.

Отримані результати свідчать, що на 6-ту добу розвитку експериментального ГРДС у білих нелінійних мишей формуються типові гематологічні ознаки системного запалення, гіпоксії та активації гемостазу. Інгаляційне застосування Ліпофлавіону, особливо у поєднанні з цинком, сприяє нормалізації лейкоцитарної формули, стабілізації еритроцитарних показників та зменшенню тромбоцитарної активації, що вказує на потенційно вищу ефективність такого підходу порівняно з ін'єкційним введенням препарату.

Таблиця 5.2.

**Динаміка маси тіла тварин при моделюванні ГРДС, у моделі  
кислотної аспірації, г ( $M \pm m$ , n=5)**

Група тварин	Вихідна маса	3 день	6 день	14 день	30 день
Інтактні	25,4±1,1	26,1±1,8	26,6±0,4	27,3±0,7	26,97±0,9
Хибно оперовані	29,7±0,8	28,1±2,3	28,4±3,4	28,9±1,4	29,2±0,7
Патологія	29,4±0,9	25,7±3,5	26,3±4,6	25,96±0,5	26,8±0,7
Патологія + Корвітин (інгаляція)	30,1±2,9	28,5±3,3	29,2±3,4	29,9±2,3	30,9±1,2
Патологія + Корвітин (ін'єкція)	28,8±0,7	26,2±1,9	27,1±2,2	27,8±0,2	29,1±0,3
Патологія + ЛФ (інгаляція)	29,5±1,2	28,0±1,3	29,5±1,3	30,5±1,6	33,7±0,9
Патологія+ЛФ (ін'єкція)	26,7±0,4	26,4±0,9	27,0±0,7	25,7±0,8	25,8±1,1
Патологія + ЛФ (інгаляція та ін'єкція)	23,0±0,8	24,7±0,9	25,9±0,7	25,7±0,98	25,9±1,3
Патологія + ліпосомальна композиція кверцетину з Zn <sup>2+</sup> (інгаляція)	25,0±0,8	23,7±0,5	24,9±1,2	25,7±0,4	25,8±0,67

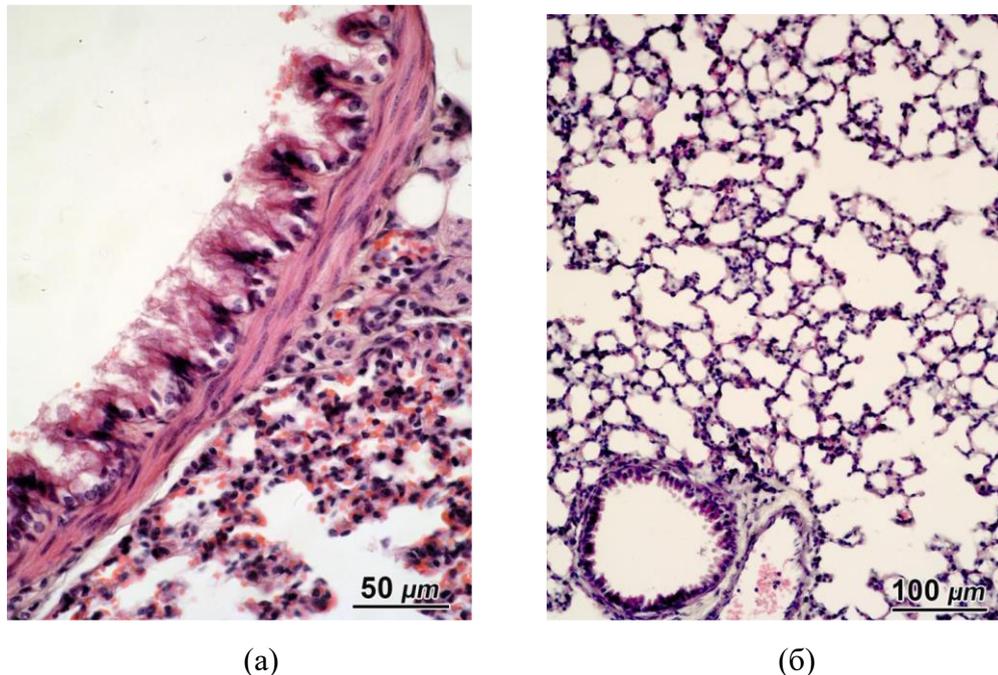
Зазначимо, що відповідно до задачі до слідження фармакологічна активність Ліпофлавона та Корвітина за впливом на виживаність і динаміку маси тварин підтверджена при лікуванні ГРДС за всіх застосованих схем уведення, причому на прикладі Ліпофлавона показано, що порівняно вищий ефект досягнуто за суміщення внутрішньовенного та інгаляційного застосування продукту.

Внаслідок відтворення HCl моделі верифіковані характерні морфологічні ознаки ГРДС як тяжкого запального ураження легенів та візуалізовано підтвердження фармакотерапевтичного ефекту систем транспорту КВ композицій щодо впливу на гістоморфологічні прояви ГРДС [118].

Результати мікроскопічних досліджень легенів мишей інтактною групи виявили звичайну для здорового органу гістологічну будову. У великих бронхах спостерігали добре розвинуту волокнисто-м'язово-хрящову оболонку. Поверхня слизової оболонки бронхів вистелена шаром багаторядного циліндричного війчастого епітелію (рис. 5.1 а). У легеновому інтерстиції по периферії бронхів

розташовувалися кровоносні судини, артерії і вени з характерною будовою їх стінок.

Легенева паренхіма представлена легневими часточками та ацинусами, утворених респіраторними і термінальними бронхіолами, альвеолярними ходами, мішечками, комірками (рис. 5.1 б). У перегородках розташовані кровоносні та лімфатичні капіляри, утворені суцільним шаром сплющеної форми ендотеліоцитів, а також поодинокі лімфоцити й макрофагоцити.

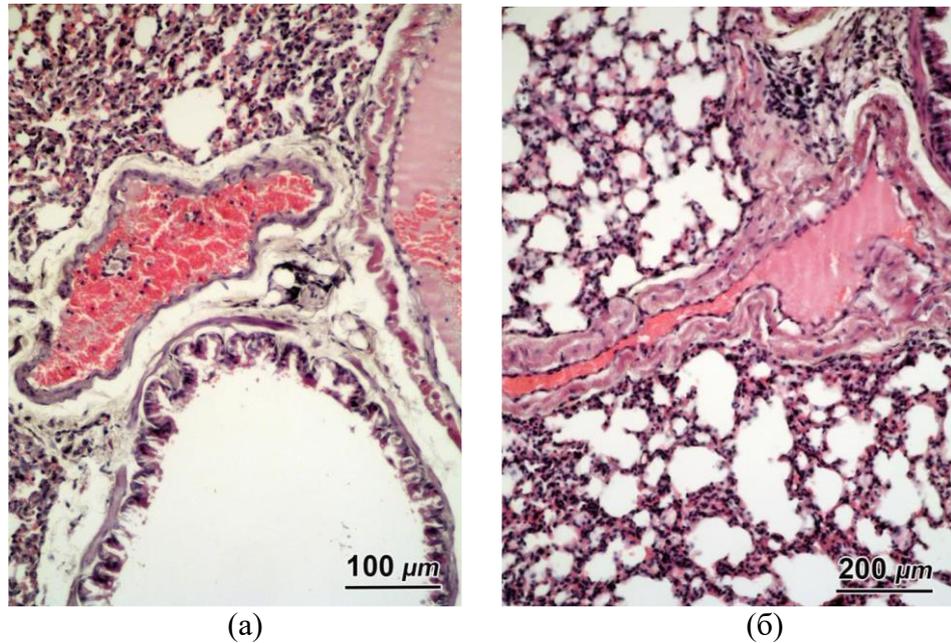


**Рис. 5.1** Легені мишей інтактної групи (контроль). Мікрофотографія.

Примітка. (а) – Поздовжні складки слизової оболонки бронху великого калібру, яка вистелена шаром багаторядного циліндричного в'їчастого епітелію. (б) – Вена та легенева паренхіма звичайної гістологічної будови.

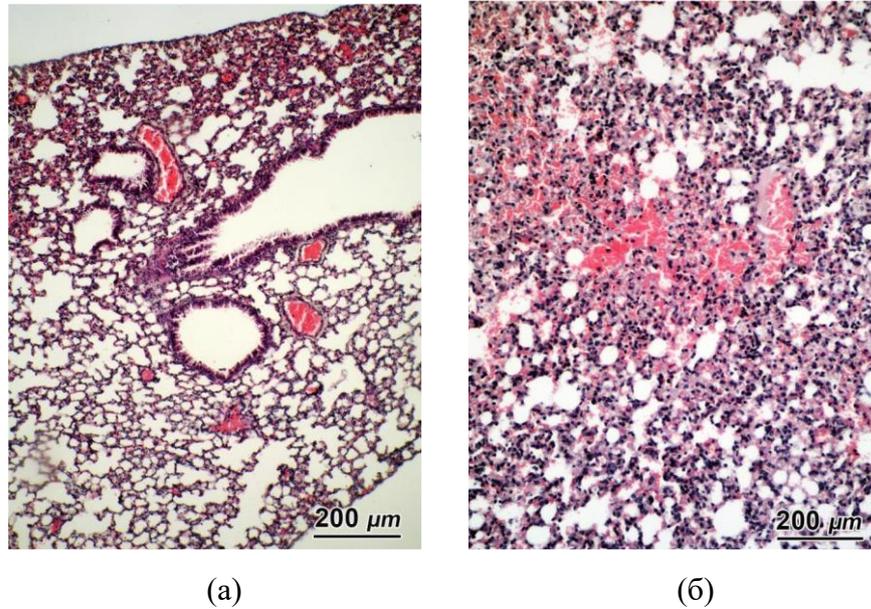
При мікроскопічному дослідженні легенів хибно-оперованих тварин переважно спостерігали звичайну для органу гістологічну будову. Разом із цим, в окремих часточках органу виявлено помірний набряк сполучної тканини, зокрема в центральних ділянках легенів по периферії бронхів і кровоносних судин великого калібру та лімфатичних судин (рис. 5.2 а). В артеріях виявляли ознаки нерівномірного скорочення гладком'язових волокон (рис. 5.2 б). На

периферії легневих часточок тварин часто виявляли розширені та повнокровні просвіти дрібних артерій, вен і капілярів, а іноді – дрібні вогнища крововиливу (рис. 5.3 а, б). При цьому потовщувалися перегородки легневих комірок за рахунок їх набряку та інфільтрації лімфоцитами (рис. 5.3 а).



**Рис. 5.2** Легені хибно оперованих мишей. Мікрофотографія.

Примітка. (а) – Перибронхіальний і периваскулярний набряк сполучної тканини. Звивистий контур стінки повнокровної вени, збережена структура СО бронха великого калібру. (б) – Чергування ділянок артерії з паретично розширеними та спазматично звуженими просвітами. Дрібні вогнища підендотеліального набряку, набряк гладком'язових волокон та їх нерівномірне скорочення. Хвилястоподібна форм гладком'язових волокон.



**Рис. 5.3** Гістологічні зміни в легенях хибно-оперованих мишей.

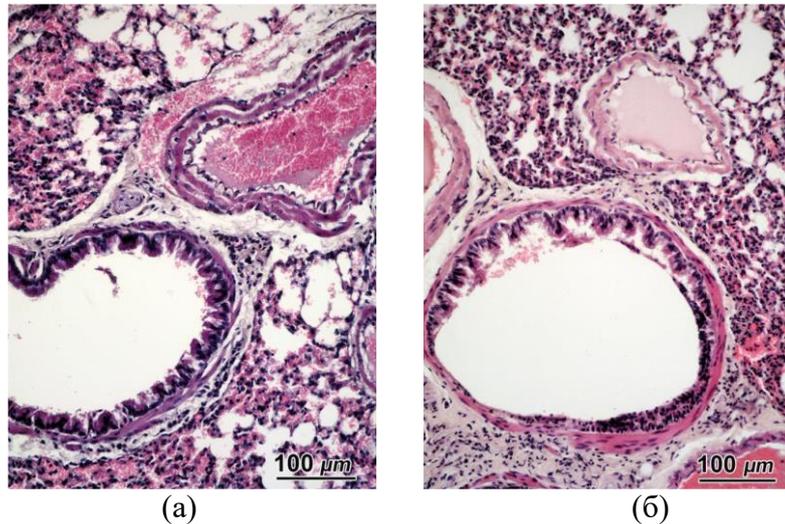
Мікрофотографія.

Примітка. (а) – Розширені та повнокровні капіляри на периферії легені. Потовщені перегородки легневих комірок за рахунок їх набряку та інфільтрації лімфоцитами. (б) – Повнокров'я капілярів і вогнище крововиливу.

Виявлені в легенях хибно оперованих тварин зміни вказують на помірні порушення кровообігу, що слід оцінювати як очікувану реакцію на хірургічне втручання (без впливу аспірації). Встановлені наслідки такої реакції слід врахувати при аналізі гістологічних змін легень тварин з модельованим ГРДС та після лікування.

При мікроскопічному дослідженні легенів тварин в аспіраційній НСІ моделі ГРДС на тлі переважно звичайної для органу гістологічної будови центральних ділянок органу виявлено набряк перибронхіальної та периваскулярної сполучної тканини з її інфільтрацією лімфоцитами (рис. 5.4 а, б). У слизовій оболонці бронхів виявлено дистрофічні зміни епітелію з вогнищами гіперплазії та метаплазії (рис. 5.4 б). Просвіти розташованих у центральній зоні легенів артерій і вен повнокровні. Інтима їх стінки тонка, утворена шаром ендотеліоцитів із поширеними дрібними вогнищами підендотеліального набряку. В артеріях відмічали нерівномірне потовщення та

виражену гофрованість внутрішньої еластичної мембрани, а в медії артерій та вен – набряк гладком'язових волокон і розширення просторів між ними (рис. 5.5 а). По периферії судин і бронхів – дрібні вогнища лімфоцитарної інфільтрації.



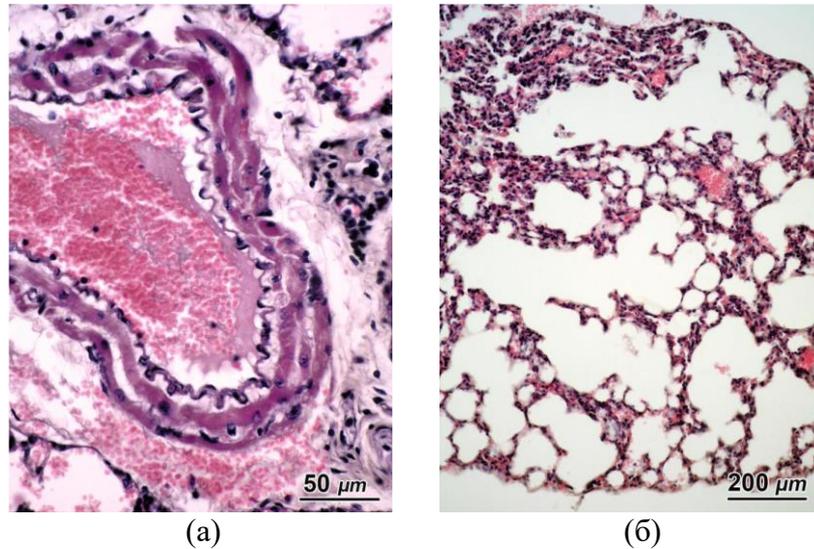
**Рис. 5.4** Легені мишей в аспіраційній HCl моделі – стан сполучної тканини та слизової оболонки бронха. Мікрофотографія.

Примітка. (а) – Набряк перибронхіальної та периваскулярної сполучної тканини з інфільтрацією лімфоцитами. (б) – Вогнище гіперплазії та метаплазії епітелію слизової оболонки бронха.

На периферії легенів часто спостерігали ділянки повнокров'я капілярів, потовщення коміркових перетинок, а також дрібні вогнища крововиливів і накопичення в просвітах альвеолярних мішечків ексудату, представленого багатою на білок ацидофільною рідиною. В окремих ділянках легеневої паренхіми - дрібні вогнища емфіземи (рис. 5.5 б).

Таким чином, розвиток ГРДС у HCl моделі проявляється у легенях і бронхах морфологічними ознаками, характерними для запалення: виражене повнокров'я легенів з альтерацією стінки судин, запальні зміни легеневої інтерстицію та паренхіми (у т.ч. у вигляді гнійного бронхіту з формуванням абсцедуючої пневмонії), прояви бронхіоліту і вентиляційно-перфузійних

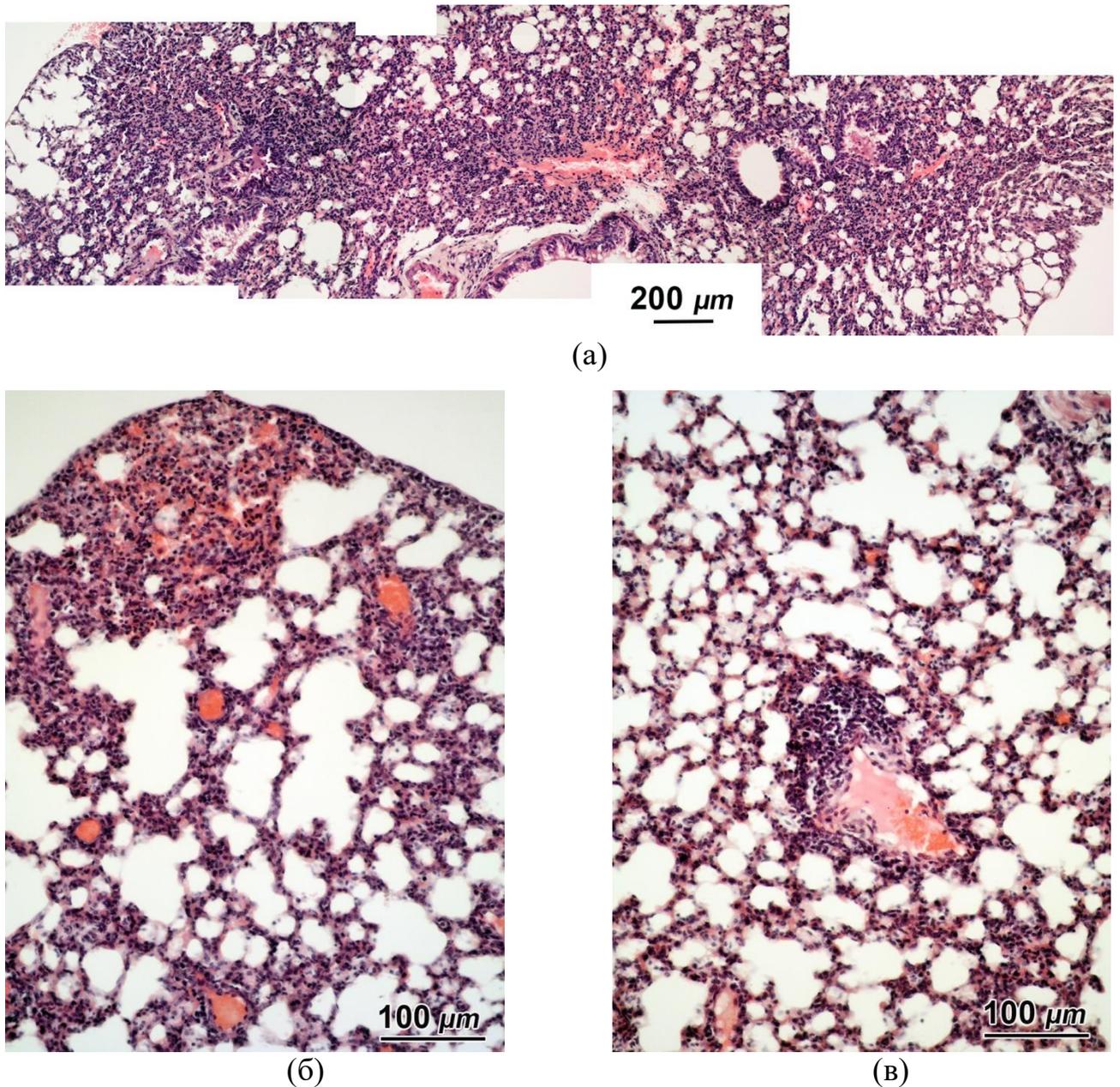
порушень, дифузний пневмофіброз і вогнища ателектазу легеневої паренхіми в периферичних ділянках. Виявлені морфологічні зміни є свідченням глибокого ушкодження структури органу внаслідок гострого інтратрахеального впливу хімічного чинника (HCl) та практично відсутні у хибно оперованих тварин.



**Рис. 5.5** Легені мишей в аспіраційній HCl моделі. Мікрофотографія.

Примітка. (а) – Підендотеліальний набряк в інтимі артерії, нерівномірне потовщення та гофрованість її внутрішньої еластичної мембрани, набряк гладком'язових волокон і розширення просторів між ними. (б) – Вогнище емфіземи на периферії легеневої часточки.

Фармакологічна активність досліджених транспортних систем КВ проявляється лікувально-профілактичним впливом на морфологію уражених при ГРДС таргетних органів (рис. 5.6 – 5.11). Фактори позитивних проявів ефекту Ліпофлавона та Кверцетина принципово співпадають, але є найочевиднішими за сумісного інгаляційного та ін'єкційного введення Ліпофлавона, що забезпечує, як було показано, 100 % виживаність, відновлення клінічного стану та нормалізацію динаміки маси тіла тварин (табл. 5.1 та 5.2).

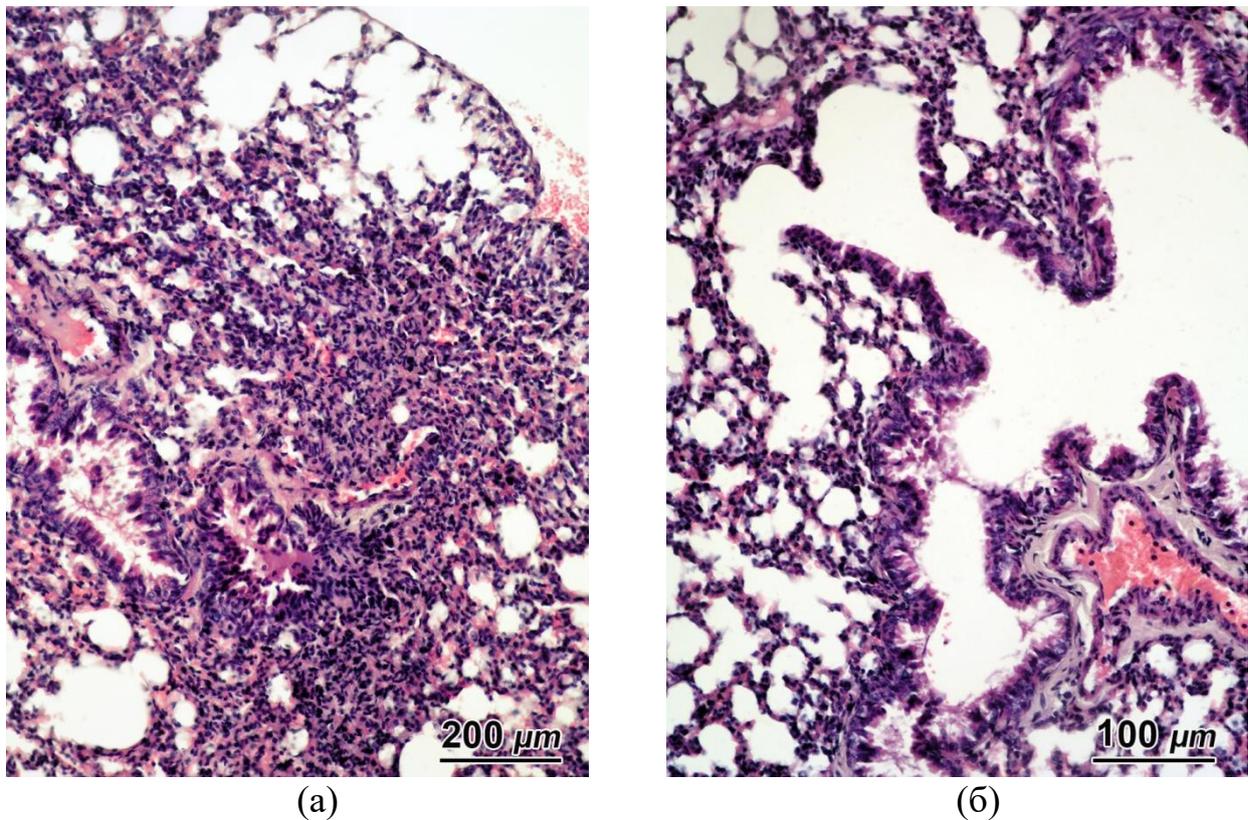


**Рис. 5.6** Внутрішньовенне введення **Ліпофлаво**на. Аспіраційна HCl-модель ГРДС. Мікрофотографія.

Примітка. (а) – Помірне повнокров'я вен й капілярів у різних ділянках легень, дрібні мононуклеарні інфільтрати інтерстицію та легеневої паренхіми. Панорамне мікрофото (б, в) – збільшені фрагменти.

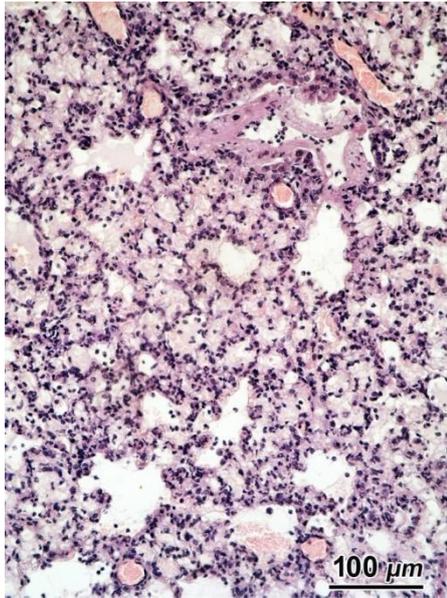
Лікувальний ефект Ліпофлаво

запальних змін легеневого інтерстицію та паренхіми з інфільтрацією **мононуклеарними клітинами**; відсутністю абсцесів і абсцедуючої пневмонії; лише **дрібними вогнищами емфіземи та мононуклеарної інфільтрації**. Зокрема, інгаляційне введення Ліпофлавона захищає термінальні бронхіоли та альвеоли структур респіраторного відділку, попереджаючи розвиток вентиляційно-перфузійних порушень як механізму розвитку ГРДС.

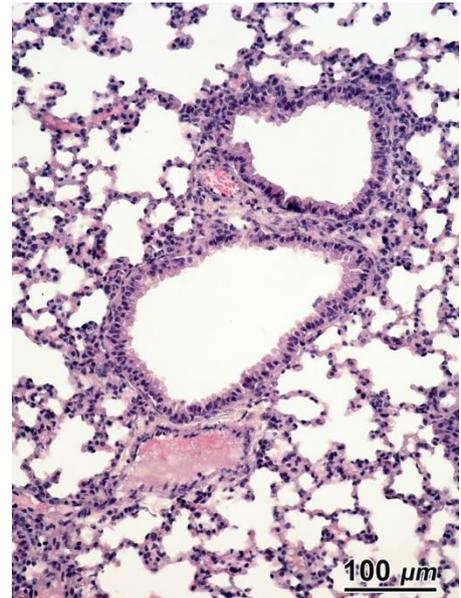


**Рис. 5.7** Інгаляційне введення Ліпофлавона. Аспіраційна НСІ модель ГРДС. Мікрофотографія.

Примітка. (а) – часткова інфільтрація легеневого інтерстицію мононуклеарними клітинами; (б) – розширення просвітів дрібних бронхів і формування бронхоектазів.



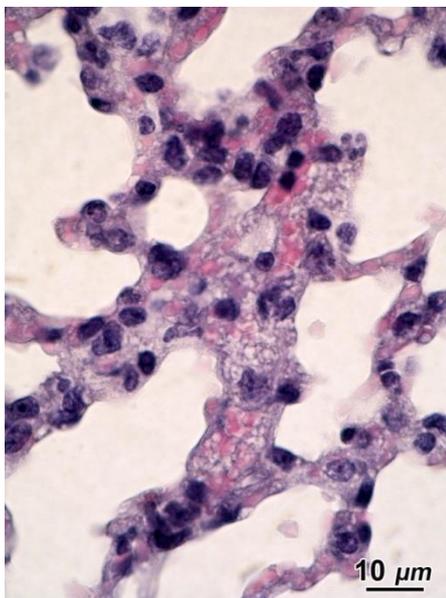
(a)



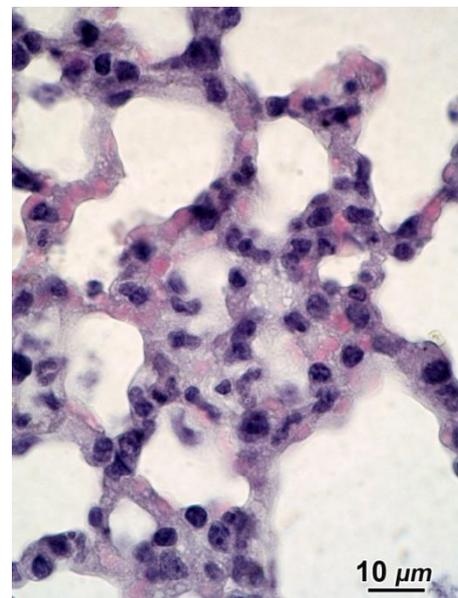
(б)

**Рис. 5.8** Сумісне внутрішньовенне та інгаляційне введення **Ліпофлавона**. Аспіраційна НСІ модель ГРДС. Мікрофотографія.

Примітка. (а) – помірний набряк та інфільтрація міжальвеолярних перегородок лімфоцитами і макрофагоцитами; (б) – дрібні вогнища лімфоцитарної інфільтрації по периферії бронхів із розширеними просвітами та судин з помірним кровонаповненням.



(a)

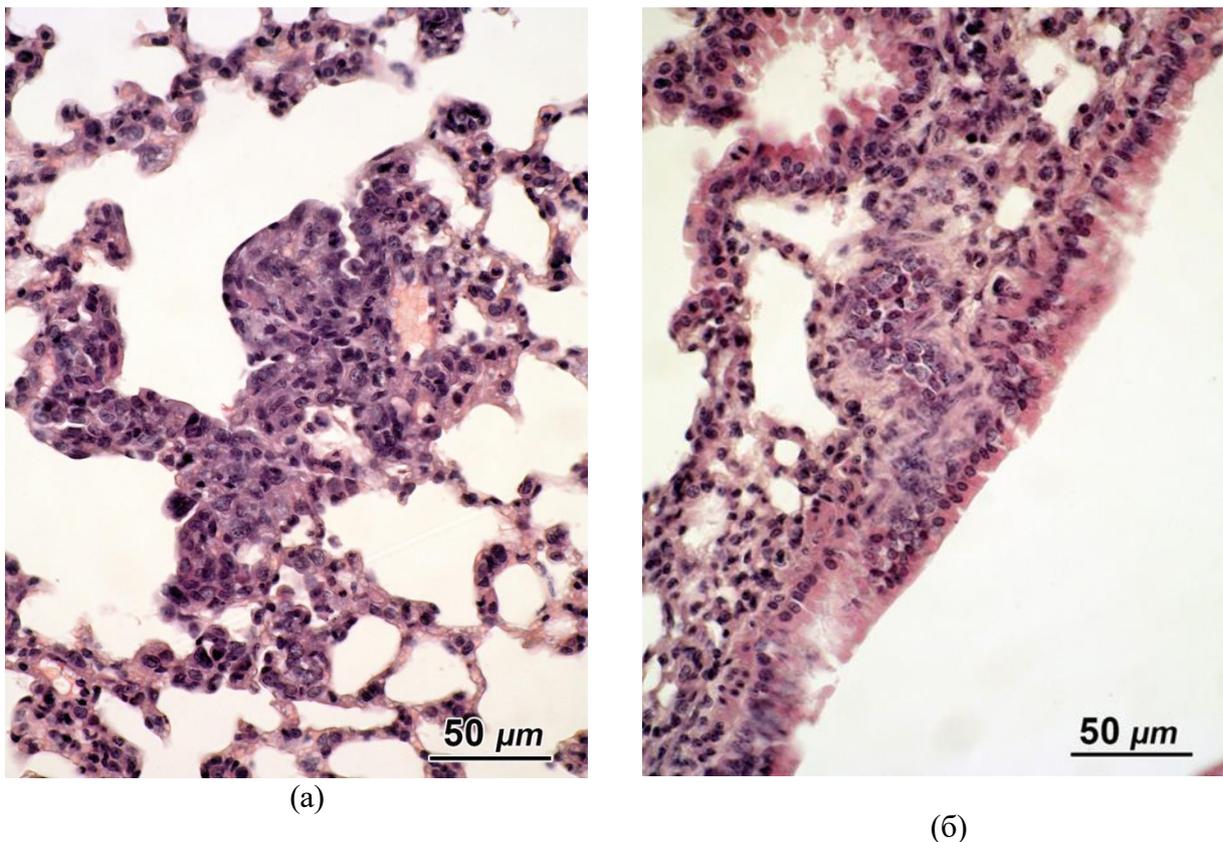


(б)

**Рис. 5.9** Сумісне внутрішньовенне та інгаляційне введення **Ліпофлавона**. Аспіраційна НСІ модель ГРДС. Мікрофотографія.

Примітка. (а) – помірна інфільтрація міжальвеолярних перегородок у легенях лімфоцитами і макрофагоцитами; (б) – вакуолізація цитоплазми.

Активність Корвітина щодо відновлення морфологічної структури уражених органів близька до Ліпофлавону за проявами, але поступається за рівнем впливу (рисунки 5.10 і 5.11): не зникає осередкова лімфоцитарна інфільтрація по периферії бронхів та помірно заповнених кров'ю судин, яка супроводжується вакуолізацією цитоплазми в альвеолах макрофагоцитів.

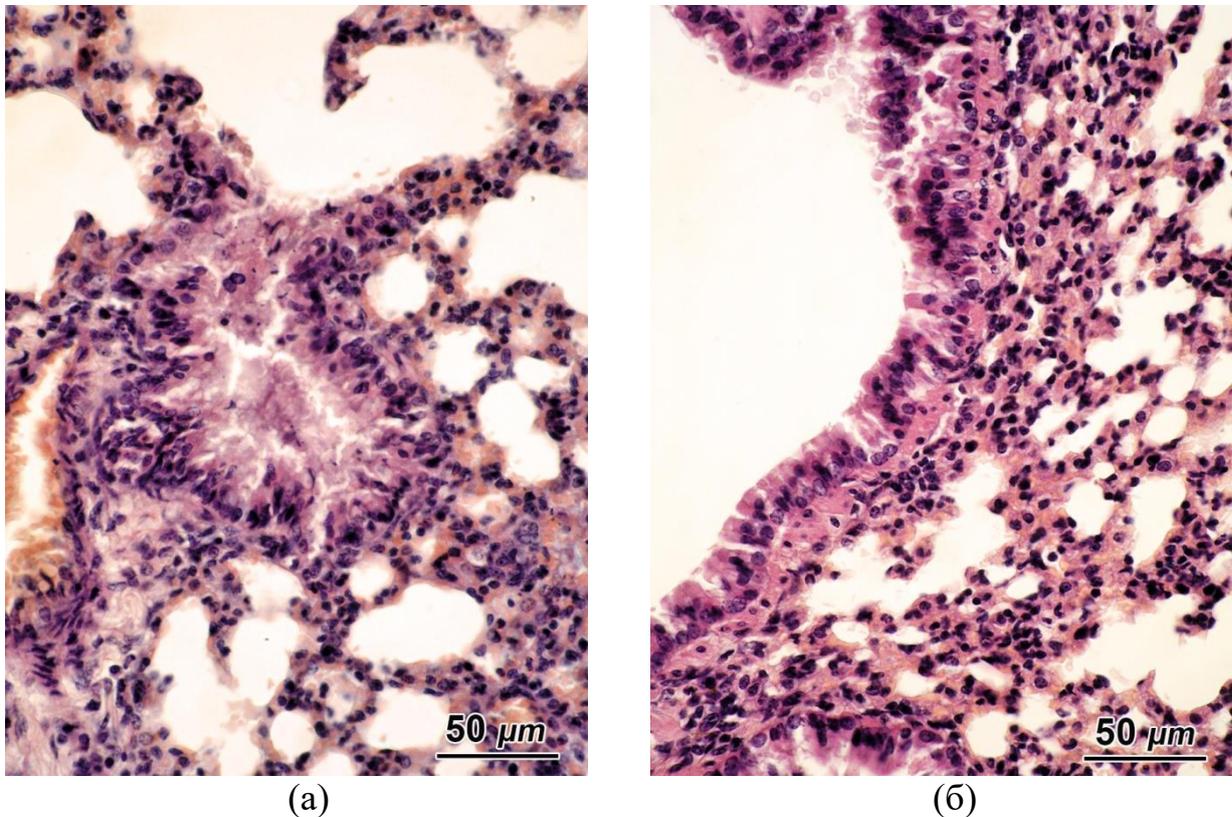


**Рис. 5.10** Внутрішньовенне введення Корвітина. Аспіраційна HCl-модель ГРДС. Мікрофотографія.

Примітка. (а) – інфільтрація стінок термінальних бронхіол, альвеолярних ходів і мішечків мононуклеарними клітинами; (б) – запальні зміни епітелію слизової бронха.

Характерно, що за інгаляційного введення Корвітина зберігалось притаманне HCl моделі аспіраційного ураження стоншення стінок бронхів дрібного калібру і дистрофічні зміни в'їчастого епітелію слизової оболонки, а також гіперплазія та гіпертрофія мукоцитів, внаслідок чого в просвітах бронхів

спостерігали скупчення муцину (слизу) разом із дистрофічно зміненими клітинами бронхіолярного епітелію (рис. 5.11).



**Рис. 5.11** Інгаляційне введення Корвітина. Аспіраційна НСІ модель ГРДС. Мікрофотографія.

Примітка. (а) – дистрофічні зміни епітелію бронха дрібного калібру, заповнення просвіту бронха муцином і злущеними клітинами; (б) – дистрофія епітелію слизової оболонки бронху великого калібру.

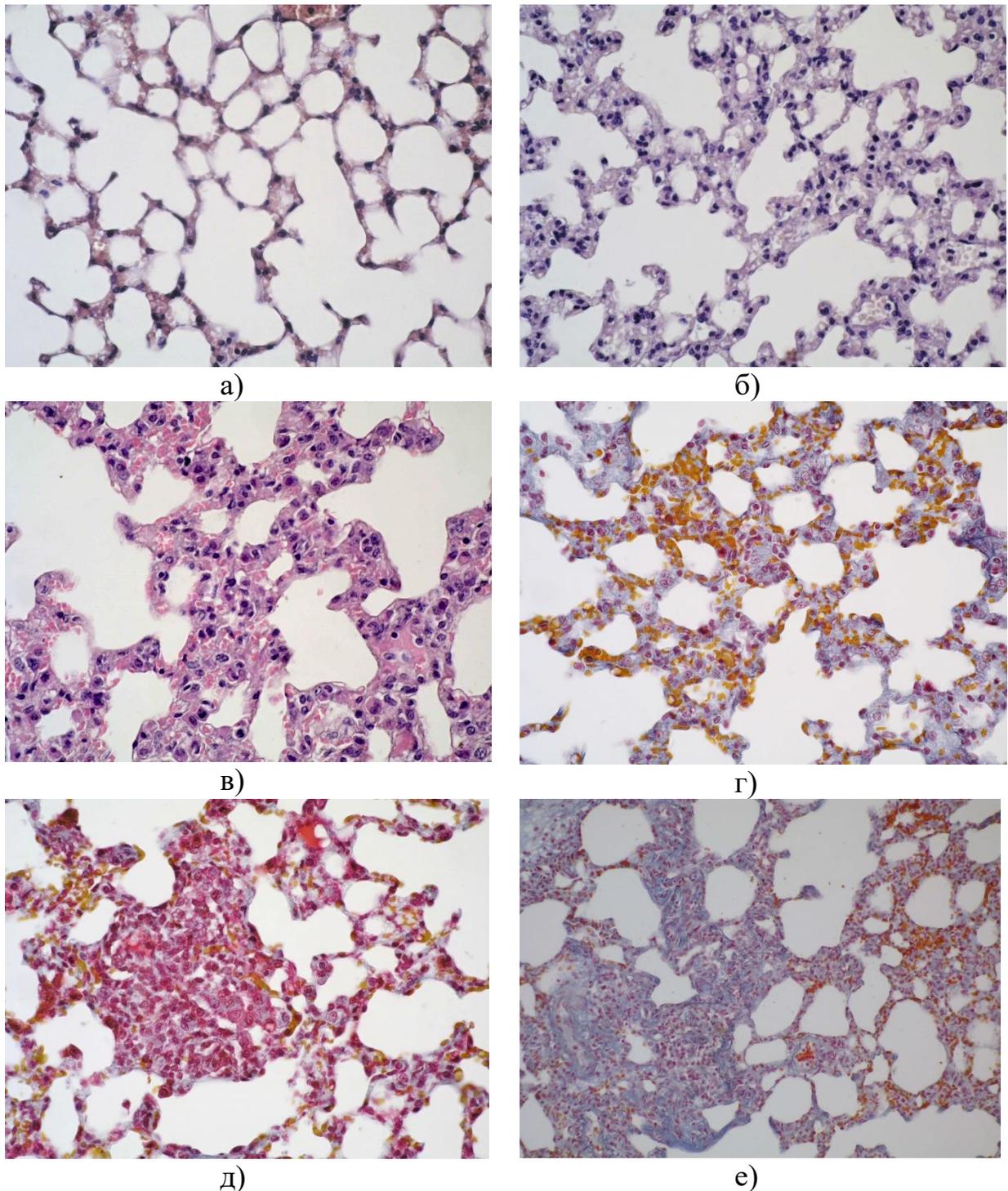
Таке своєрідне часткове «консервування» ураження бронхів внаслідок кислотної аспірації за інгаляційного застосування Корвітина може бути пов'язане з присутністю повідона – носія КВ, що має екзогенну природу. Протягом інгаляції комплексу КВ-повідон після десорбції КВ, який справляє цільову фармакологічну дію, не виключена можливість накопичення матриці повідона у таргетному органі. Прогнозне застереження щодо цього обумовлене описаними випадками побічного впливу інгаляційного введення повідону

(можливість розвитку легеневого інтерстиціального фіброзу, ретикулоцитозу, лейкоцитозу тощо) [120].

**При цьому виявлене зменшення запальної інфільтрації легенів мононуклеарними клітинами та** нівелювання дистрофії бронхіального епітелію **за інгаляційного введення Ліпофлавона після** ушкодження кислотним фактором **свідчить** про доцільність саме інгаляційного застосування ліпосомальної системи транспорту КВ, у т.ч. завдяки можливого внеску безпосереднього «протиопікового» впливу ліпосом із сурфактантоподібним фосфоліпідним компонентом на регенерацію слизової оболонки бронхів.

Гістологічні зміни в легенях мишей на 14 та 30 добу після індукованого НСІ гострого пошкодження легенів (контрольна патологія) характеризувались наявністю переважно хронічних змін легеневої паренхіми: мультифокальних ділянок зі звуженням або нерівномірністю просвіту альвеол, стовщенням альвеолярних стінок, часто з незначною мононуклеарною інфільтрацією, гіперплазією альвеолоцитів II типу з різною мірою виразності запальною інфільтрацією в альвеолах, фіброзними змінами інтерстицію альвеолярних стінок, поодинокими дрібними нодулярними утвореннями, а також злитими полями фіброзу (рис. 5.12).

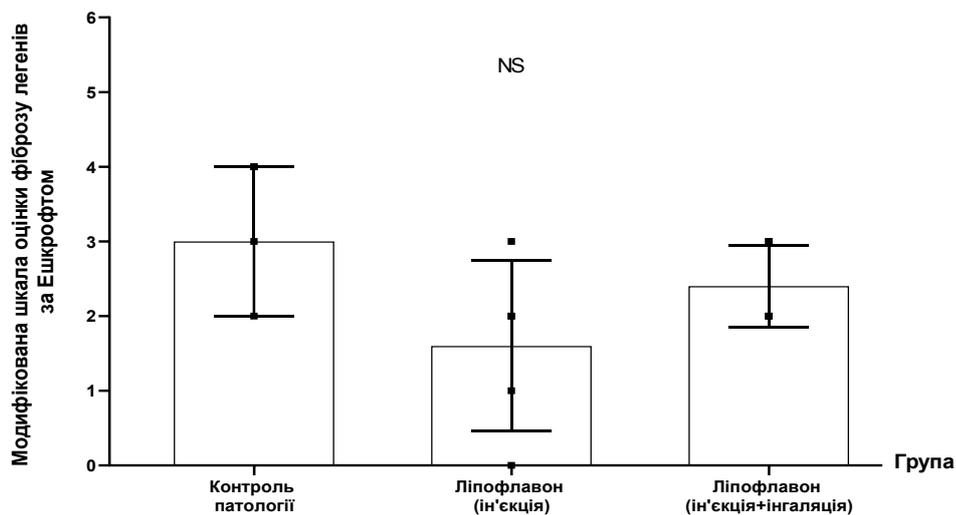
При цьому основною відмінністю хронічних змін легенів на 14 добу спостереження була наявність окремих ознак репарації, зокрема гіперплазії альвеолоцитів II типу поряд з початковими ознаками організації та фіброзними змінами інтерстицію альвеолярних стінок (рис. 5.12 б-г). Натомість, хронічні зміни легенів на 30 добу спостереження характеризувались виразнішою фібротизацією, включаючи фіброз інтерстицію, поодинокі нодулярні утворення та злиті поля фіброзу з порушенням нормальної гістоархітекtonіки ацинусів (рис. 5.12 д, е).



**Рис. 5.12** Гістологічні зміни в легенях мишей на 14 та 30 добу після індукованого НСІ гострого пошкодження легенів (контрольна патологія) у порівнянні з інтактним контролем: а) – інтактний контроль, х100; б) – нерівномірність просвіту альвеол, стовщення альвеолярних стінок, 14 доба, х100; в) – стовщення альвеолярних стінок з помірною мононуклеарною інфільтрацією та гіперплазією альвеолоцитів II типу, 14 доба, х400; г) – фіброзні зміни інтерстицію альвеолярних стінок, 14 доба, х400; д) – невелике нодулярне утворення, 30 доба, х200; е) – злиті фіброзні поля, 30 доба, х100. Забарвлення гематоксиліном-еозином (а-в) і трихромом (г-е).

З метою стандартизованої напівкількісної оцінки віддалених наслідків гострого легеневого пошкодження з розвитком легеневого фіброзу у тварин досліджуваних груп використовували модифіковану шкалу Ешкрофта.

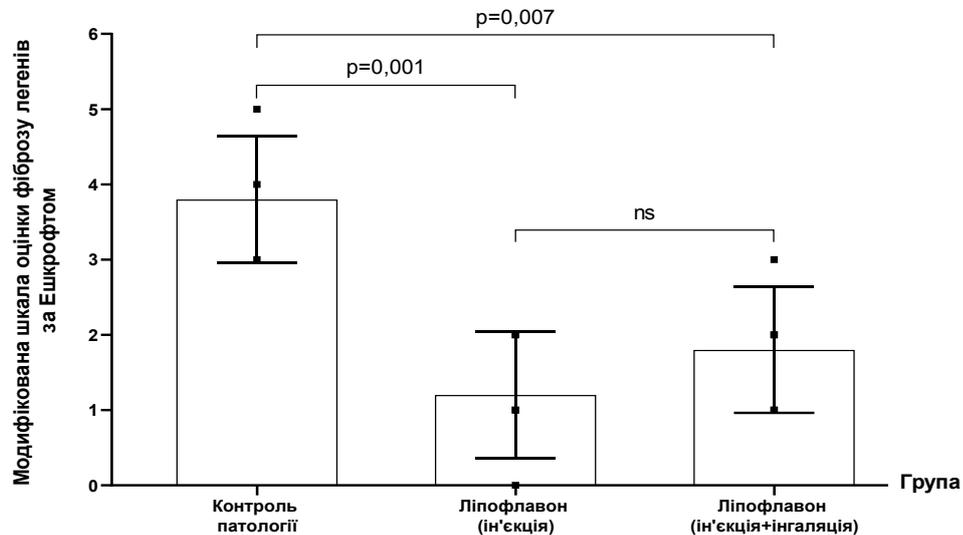
Так на 14 добу спостереження максимальна оцінка легеневого фіброзу не перевищила 4 бали з 8 можливих у групі контролю патології, де середній бал складав  $(3,0 \pm 1,0)$  проти  $(1,6 \pm 1,1)$  і  $(2,4 \pm 0,6)$  у групах лікування з ін'єкційним і комбінованим способом уведення Ліпофлавону відповідно, а максимальна оцінка фіброзу серед тварин цих груп не перевищувала 3 бали. При цьому різниця між середніми виявилась статистично незначущою (рис. 5.13).



**Рис. 5.13** Напівкількісна оцінка легеневого фіброзу за модифікованою шкалою Ешкрофта у мишей досліджуваних груп, 14 доба  
( $m \pm SD$ ,  $n = 5$  тварин у групах. ANOVA:  $F(2, 12) = 2,85$ ,  $p = 0,097$ )

Натомість, на 30 добу спостереження різниця показників була виразнішою і середній бал у групі контролю патології склав  $3,8 \pm 0,84$  (максимальна оцінка 5 балів) проти  $1,2 \pm 0,84$  і  $1,8 \pm 0,44$  бали у групах лікування з ін'єкційним і комбінованим способом уведення Ліпофлавону відповідно. Однофакторний дисперсійний аналіз виявив статистично значущу різницю між групами, а за

критерієм Тьюкі показано відмінність між групами контрольної патології і лікування незалежно від способу введення препарату (рис. 5.14).

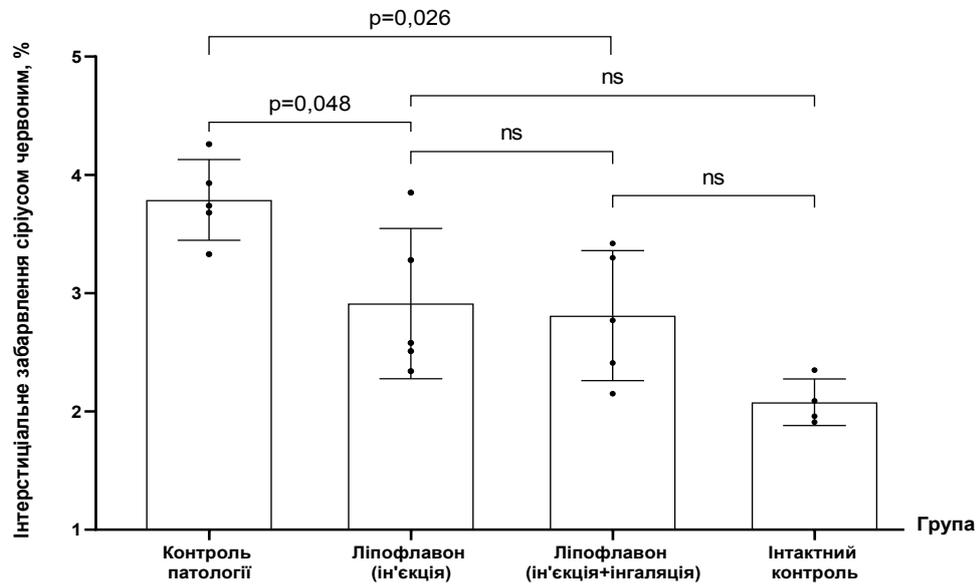


**Рис. 5.14** Напівкількісна оцінка легеневого фіброзу за модифікованою шкалою Ешкрофта у мишей досліджуваних груп, 30 доба (m ± SD, n = 5 тварин у групах. ANOVA:  $F(2, 12) = 13,24$ ,  $p = 0,0009$ )

Поряд із напівкількісною оцінкою легеневого фіброзу за модифікованою шкалою Ешкрофта, нами також була проведена і його кількісна оцінка. Для цього на цифрових мікрофотографіях препаратів легенів забарвлених пікросіріусом за допомогою програми з відкритим кодом Image J 1.54 (National Institutes of Health, США) шляхом визначення оптичної щільності сіріус-позитивного забарвлення кількісно оцінювався рівень інтерстиціального фіброзу легенів.

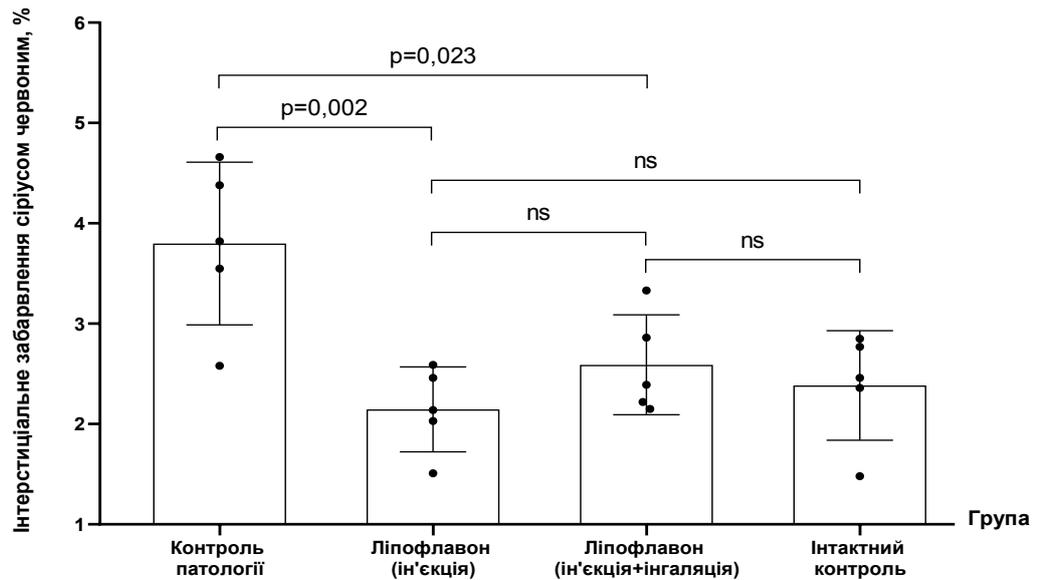
На рисунках 5.15 і 5.16 показані результати статистично значущого зменшення рівня інтерстиціального фіброзу на 14 і 30 добу спостереження серед тварин у групах лікування з ін'єкційним і комбінованим способом уведення Ліпофлавіону незалежно від способу введення препарату. Середні показники оптичної щільності сіріус-позитивного забарвлення у цих групах на 14 добу склали ( $2,9 \pm 0,64$ ) і ( $2,8 \pm 0,55$ ) % відповідно проти ( $3,8 \pm 0,34$ ) % у

групі контролю патології та значимо не перевищували середній показник у групі інтактного контролю –  $(2,1 \pm 0,20) \%$  (рис. 5.15).



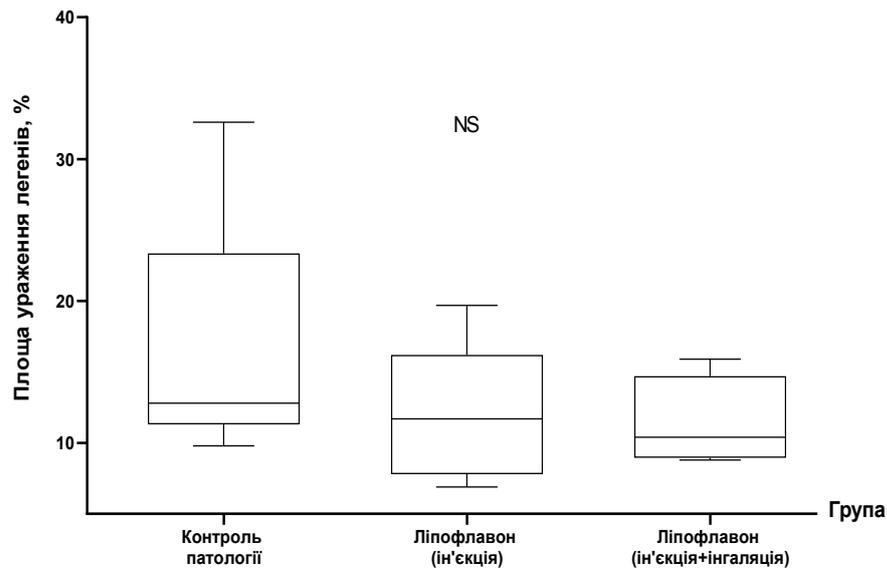
**Рис. 5.15** Рівень інтерстиціального фіброзу легенів за оптичною щільністю при забарвленні пікросіріусом у мишей досліджуваних груп, 14 доба ( $m \pm SD$ ,  $n = 4-5$  тварин у групі. ANOVA:  $F(3, 15) = 9,77$ ,  $p = 0,0008$ )

На 30 добу спостереження середні показники оптичної щільності сіріус-позитивного забарвлення серед тварин у групах лікування з ін'єкційним і комбінованим способом уведення Ліпофлаону були подібні до таких на 14 добу і складали  $(2,1 \pm 0,42)$  і  $(2,6 \pm 0,50) \%$  відповідно проти  $(3,8 \pm 0,81) \%$  у групі контролю патології та значимо не відрізнялись від середнього показника у групі інтактного контролю –  $(2,4 \pm 0,55) \%$  (рис. 5.16).

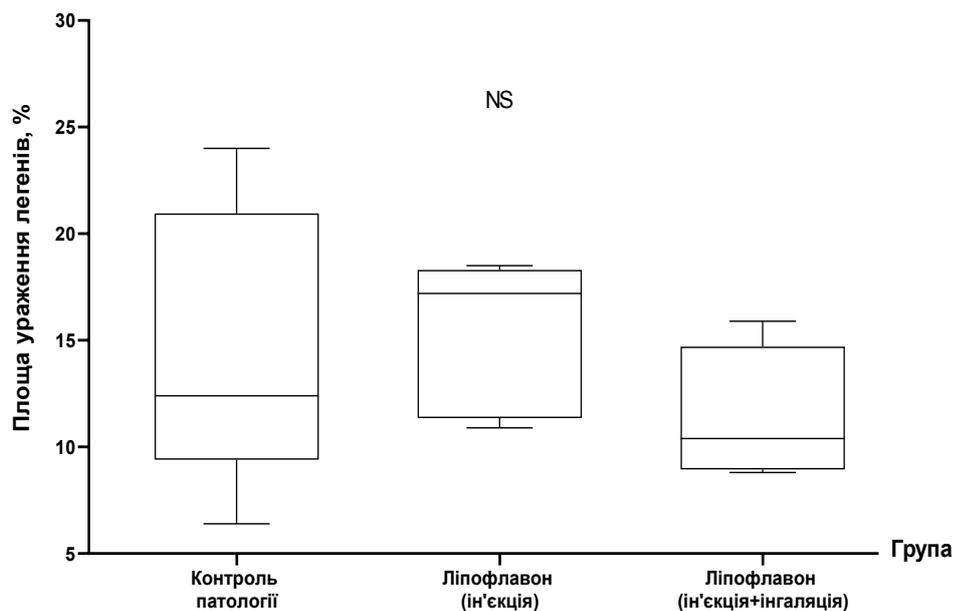


**Рис. 5.16** Рівень інтерстиціального фіброзу легенів за оптичною щільністю при забарвленні пікросіріусом у мишей досліджуваних груп, 30 доба ( $m \pm SD$ ,  $n = 5$  тварин у групах. ANOVA:  $F(3, 16) = 7,83$ ,  $p = 0,0019$ )

З використанням планіметричного методу на отриманих гістологічних препаратах тварин досліджуваних груп визначали частку ураженої площі легенів на 14 і 30 добу, яка серед усіх піддослідних тварин коливалась від 6,9% до 37,5% з медіаною від 10,4% [9,0; 14,7] до 12,8% [11,3; 23,4] без статично значущої різниці показників поміж групами як на 14 ( $H(2)=1,94$ ,  $p=0,40$ ), так і на 30 ( $H(2)=2,34$ ,  $p=0,33$ ) добу спостереження (рис. 5.17 і 5.18).



**Рис. 5.17** Площа ураження легенів у мишей досліджуваних груп, 14 доба (Me, IQ; n = 5 тварин у групах. Тест Крассела-Уолліса:  $H(2) = 1,94$ ,  $p = 0,40$ )



**Рис. 5.18** Площа ураження легенів у мишей досліджуваних груп, 30 доба (Me, IQ; n = 5 тварин у групах. Тест Крассела-Уолліса:  $H(2) = 2,34$ ,  $p = 0,33$ )

Таким чином, результати патоморфологічного дослідження легенів мишей на 14 та 30 добу після індукованого НСІ гострого пошкодження легенів та його фармакологічної корекції показали зменшення виразності інтерстиціального

фіброзу серед тварин у групах лікування з ін'єкційним (за кількісною оцінкою на 26 і 45 % відповідно) і комбінованим (на 24 і 32 % відповідно) способами введення Ліпофлавону незалежно від способу введення препарату.

## **5.2 Ефективність кверцетину у системах транспорту при «фатальному» LPS-ГРДС**

З метою всебічної оцінки фармакологічних ефектів систем доставки кверцетину за умов гострого респіраторного дистрес-синдрому було використано другий експериментальний підхід. Перший передбачав відтворення ГРДС шляхом кислотної аспірації (HCl) [90, 118], тоді як другий ґрунтувався на індукції фатального варіанта синдрому за допомогою ліпополісахариду (LPS) [93, 121]. Такий дизайн дослідження дав змогу проаналізувати ефективність досліджуваних препаратів при різних патогенетичних механізмах ушкодження легеневої тканини.

Моніторинг виживаності експериментальних тварин здійснювали протягом шести діб, починаючи з моменту моделювання фатального ГРДС. У групі патологічного контролю летальність уже в першу добу досягала 50%, а в подальшому, з другої по шосту добу спостереження, зростала до 90%.

На фоні змодельованої патології застосування обох тестованих зразків супроводжувалося статистично значущим підвищенням рівня виживаності (табл. 5.3). Зокрема, при введенні ліпосомальної форми кверцетину (Ліпофлавон) частка тварин, що вижили, становила 90% у першу добу та 60% на шосту добу експерименту. Поєднане застосування Ліпофлавону з цинком продемонструвало більш виражений протективний ефект: повна виживаність у першу добу після індукції моделі, стабільні показники на рівні 90% упродовж 2–4 діб і збереження 70% тварин живими на шосту добу спостереження.

Таблиця 5.3.

**Вживаність тварин при моделюванні фатального LPS-ГРДС і внутрішньовенному введенні Ліпофлакону та комбінації Ліпофлакону з цинком (n=10)**

Група тварин	Кількість тварин (виживших/вихідних) на день спостереження:					
	1	2	3	4	5	6
Інтактні миші	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
Модель ГРДС	5/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10
Модель ГРДС: ЛФ (інгаляція+ін'єкція)	9/10	8/10	7/10	7/10	7/10	6/10
Модель ГРДС: ліпосомальна композиція кверцетину з Zn (інгаляція+ін'єкція)	10/10	9/10	9/10	9/10	8/10	7/10

Перебіг LPS-індукованого фатального ГРДС супроводжувався вираженими клінічними порушеннями, зокрема різким пригніченням рухової активності, загальною загальмованістю, птозом, дихальною недостатністю та судомними явищами. У тварин, що виживали, зазначені симптоми мали тенденцію до посилення в динаміці експерименту. Також реєструвалась неприродна поза тіла, значне зменшення споживання корму та води, що асоціювалося зі зниженням маси тіла (табл. 5.4).

Таблиця 5.4.

**Динаміка маси тіла (г) тварин при моделюванні фатального LPS-ГРДС і внутрішньовенному введенні Ліпофлакону та комбінації Ліпофлакону з цинком ( $M \pm m$ , n=10)**

Група тварин	Маса тіла (г) на день спостереження:		
	вихідне значення	3 день	6 день
Інтактні миші	22,3±2,1	24,0±2,2	24,9±1,6
Модель ГРДС	20,6±1,7	18,4±2,4	17,8±2,3
Модель ГРДС: ЛФ (інгаляція+ін'єкція)	19,7±1,1	18,8±1,2	19,0±1,8
Модель ГРДС: ліпосомальна композиція кверцетину з Zn (інгаляція+ін'єкція)	21,5±1,3	20,3±1,0	21,0±2,0

За умов внутрішньовенного введення як ліпосомальної форми кверцетину, так і її поєднання з цинком у тварин, що вижили, відзначалося виражене зменшення інтенсивності патологічних клінічних проявів. Зокрема, спостерігалось відновлення спонтанної рухової активності та координації, нормалізація м'язового тону та дихальної функції, при цьому судомні явища не реєструвалися. Динаміка маси тіла мала позитивний характер. На шосту добу експерименту комбіноване застосування Ліпофлакону з цинком забезпечувало більш повне покращення загального стану тварин із тенденцією до відновлення вихідних показників маси тіла (табл. 5.4).

Оцінку гематологічних параметрів після введення Ліпофлакону та його композиції з Zn проводили через 24 години після завершення курсу введення досліджуваних зразків [121].

У тварин із LPS-індукованим ГРДС у групі патологічного контролю виявлялися зміни клітинного складу крові, що проявлялися відхиленням кількості лімфоцитів, нейтрофілів, еозинофілів і базофілів у межах до 10% від умовних фізіологічних значень для даного виду. Водночас більш значущі порушення, які сягали 25%, стосувалися підвищення загального числа лейкоцитів і тромбоцитів, що узгоджується з розвитком системної запальної відповіді та формуванням легеневої гіпертензії.

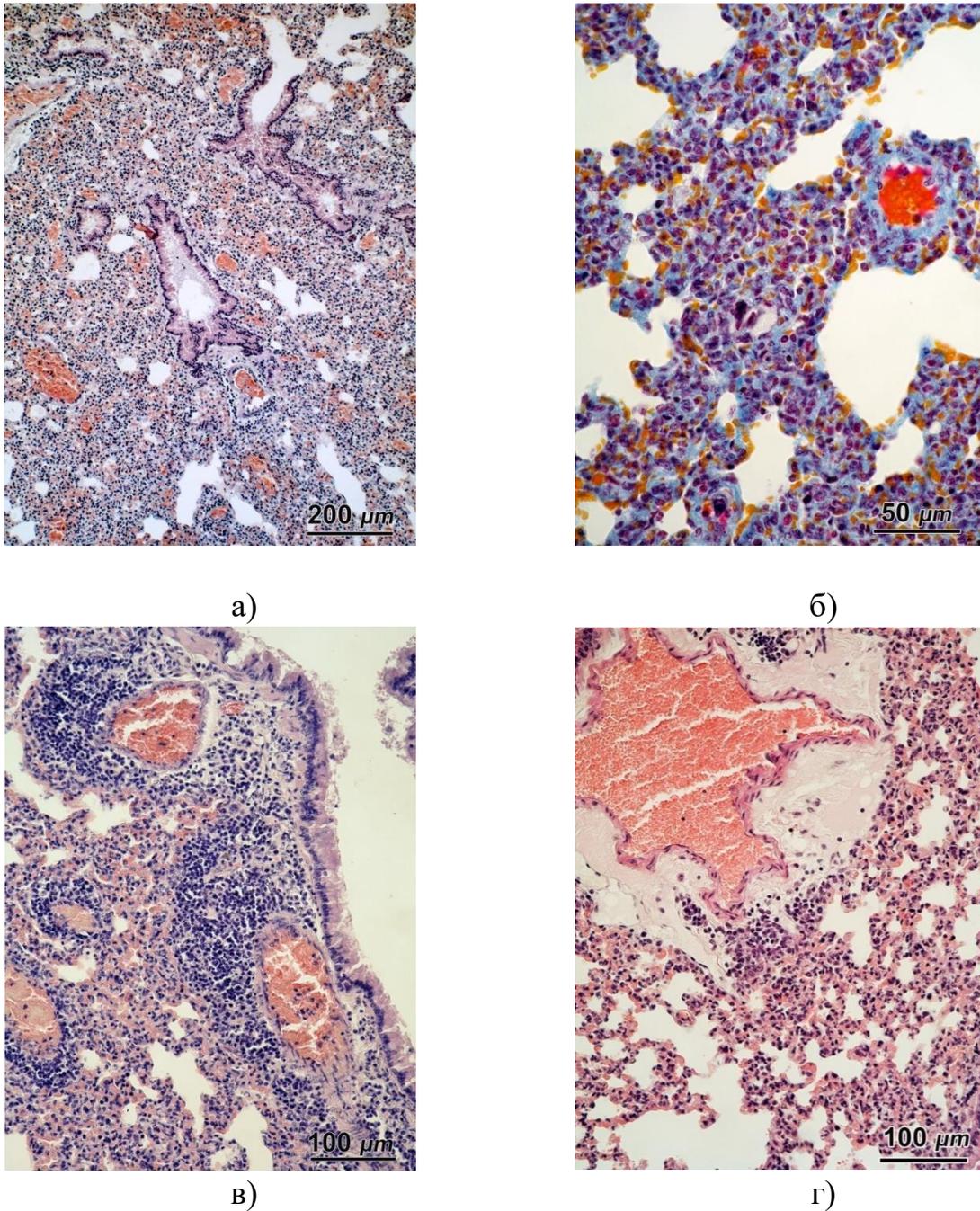
На тлі застосування як Ліпофлакону, так і його комбінації з цинком, на шосту добу спостереження більшість гематологічних показників відповідали нормальним значенням або перебували в межах фізіологічних коливань. Зокрема, зафіксовано зменшення характерного для моделі патології лейкоцитозу (не більше ніж до 12%), тоді як кількість тромбоцитів наближалася до рівня, притаманного інтактним тваринам.

У межах LPS-моделі гострого респіраторного дистрес-синдрому також проведено морфологічну оцінку стану легенів і серця експериментальних тварин, яким вводили Ліпофлакон або його композицію з цинком.

При гістологічному дослідженні легеневої тканини тварин інтактної контрольної групи виявлено збережену архітекtonіку органа, характерну для фізіологічного стану (рис. 5.1).

З метою верифікації адекватності LPS-індукованої моделі гострого респіраторного дистрес-синдрому, а також з урахуванням високого рівня летальності тварин, що реєструвався вже з першої доби після індукції патології, до морфологічного аналізу було залучено як зразки органів, отримані після загибелі тварин, так і тканини експериментальних тварин, які зберегли життєздатність до шостої доби спостереження.

Під час гістологічного дослідження посмертного матеріалу встановлено наявність ознак гострого ушкодження легеневої тканини (рис. 5.19 а, б). У структурі міжальвеолярних перегородок виявлялися поодинокі дрібні осередки стромальних крововиливів, а також явища діapedезу еритроцитів. Уздовж венозних судин різного калібру, зокрема розташованих у перибронхіальних зонах, формувалися вогнища периваскулярного набряку, які поширювалися вглиб периваскулярної та перибронхіальної сполучної тканини (рис. 5.19 в). При цьому контури кровоносних судин нерідко мали звивисту конфігурацію, що свідчило про розвиток дистонічних змін судинної стінки (рис. 5.19 г).

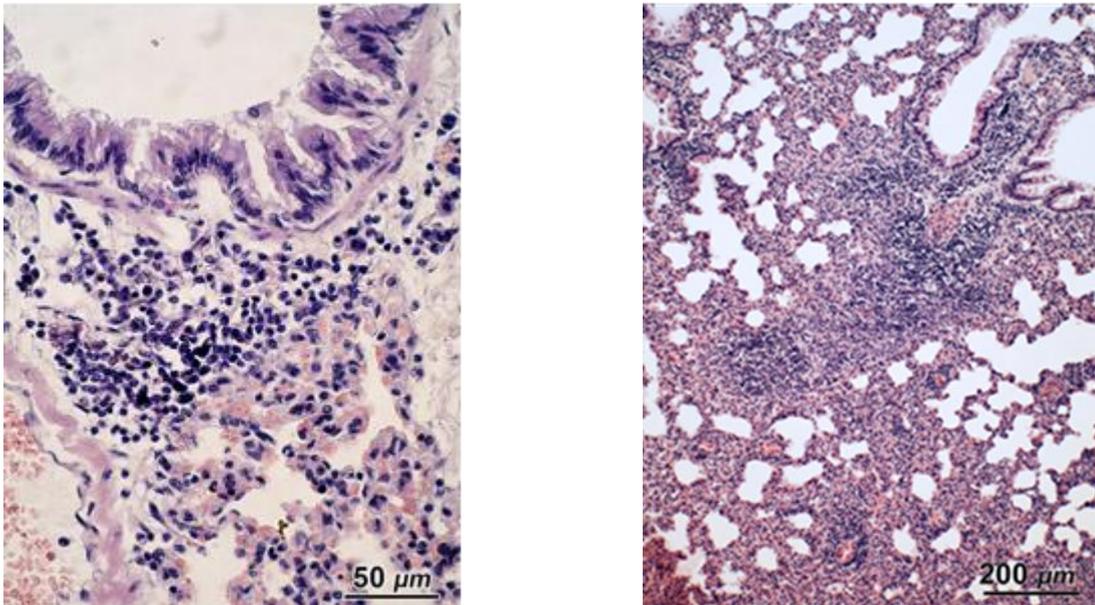


**Рис. 5.19** Миші, що загинули на 1-у добу: Гостре пошкодження легенів.  
Мікрофотографія.

Примітка. а) – розширення просвітів і повнокров'я капілярів та вен дрібного калібру; б) – стромальні крововиливи і діapedез еритроцитів у просвіт альвеол, набряк і лімфоцита на інфільтрація між альвеолярних перегородок; в) – периваскулярні вогнища лімфоцитарної інфільтрації; г) – периваскулярний набряк і вогнище запальної лімфоцитарної інфільтрації.

У бронхах різного калібру (великого, середнього та дрібного) реєструвалися ознаки запального ураження слизової оболонки, на фоні якого

формувалися дистрофічні зміни епітеліального шару. У перибронхіальних ділянках нерідко виявлялися локальні осередки лімфолейкоцитарної інфільтрації, що свідчило про розвиток інтерстиціального запального процесу з переважною перибронхіальною та перибронхіолярною локалізацією, характерного для пневмонічних змін (рис. 5.20 а, б).



а)

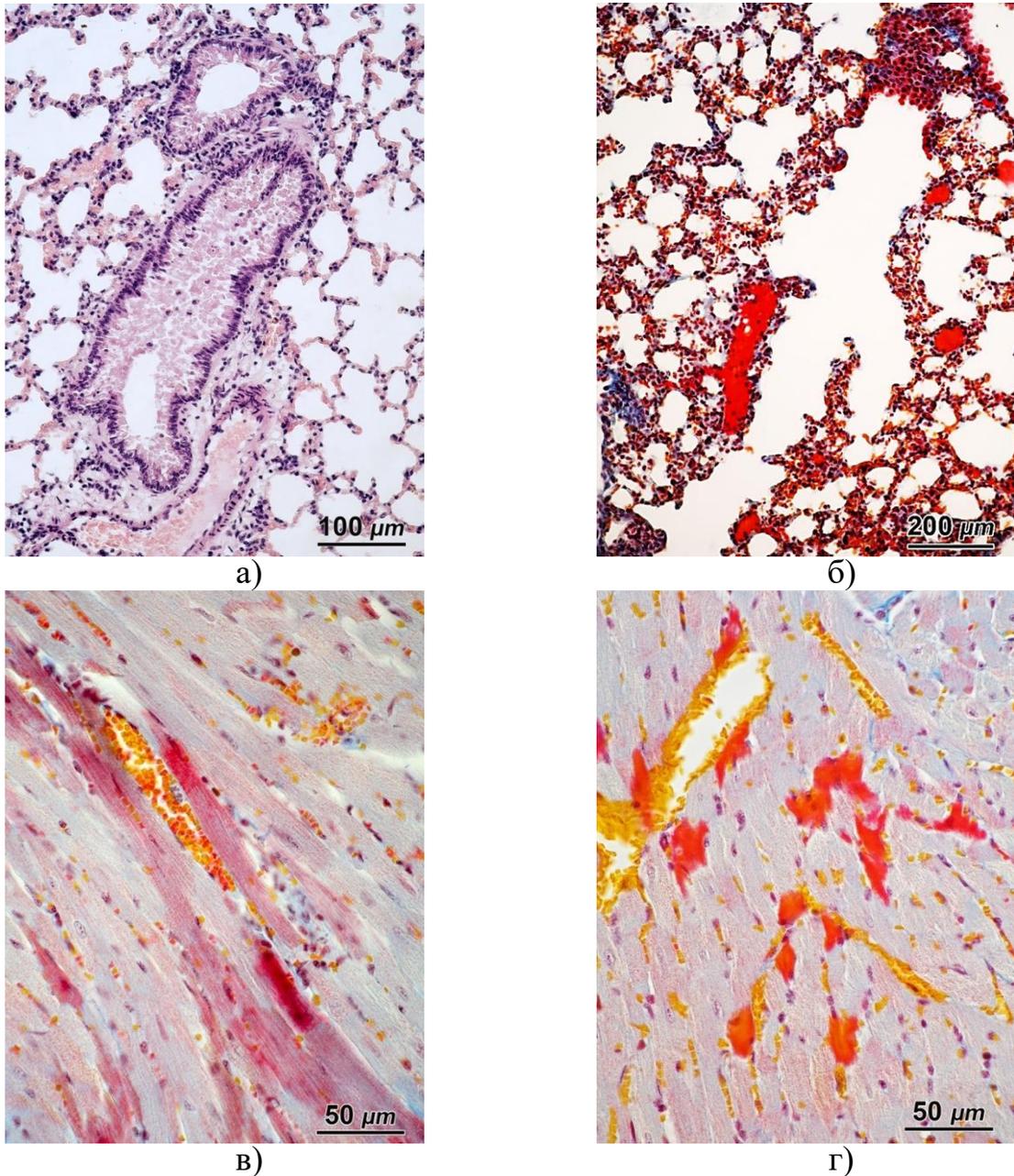
б)

**Рис. 5.20** Миші, що загинули на 1-у добу: Запальні зміни бронхів і легеневої паренхіми. Мікрофотографія.

Примітка. а) – дистрофія епітелію слизової оболонки на тлі запальних змін стінки бронхів; б) – вогнища дифузної інтерстиціальної перибронхіальної та перибронхіолярної пневмонії.

Варто відзначити, що в периферичних відділах легеневої тканини поряд із запальними й дистрофічними порушеннями у стінках дрібних бронхів і бронхіол нерідко фіксувалося звуження або повна облітерація їх просвітів, зумовлена різко вираженим набряком слизової оболонки (рис. 5.21 а). Унаслідок цього в легенях формувалися зони ателектазів і дистелектазів, які поєднувалися зі значним дилатаційним розширенням термінальних і респіраторних бронхіол, альвеолярних ходів (рис. 5.21 б). Сукупність

зазначених морфологічних змін свідчить про порушення вентиляційно-перфузійних співвідношень, що виникають на тлі гострих зрушень у системі легеневої гемодинаміки.

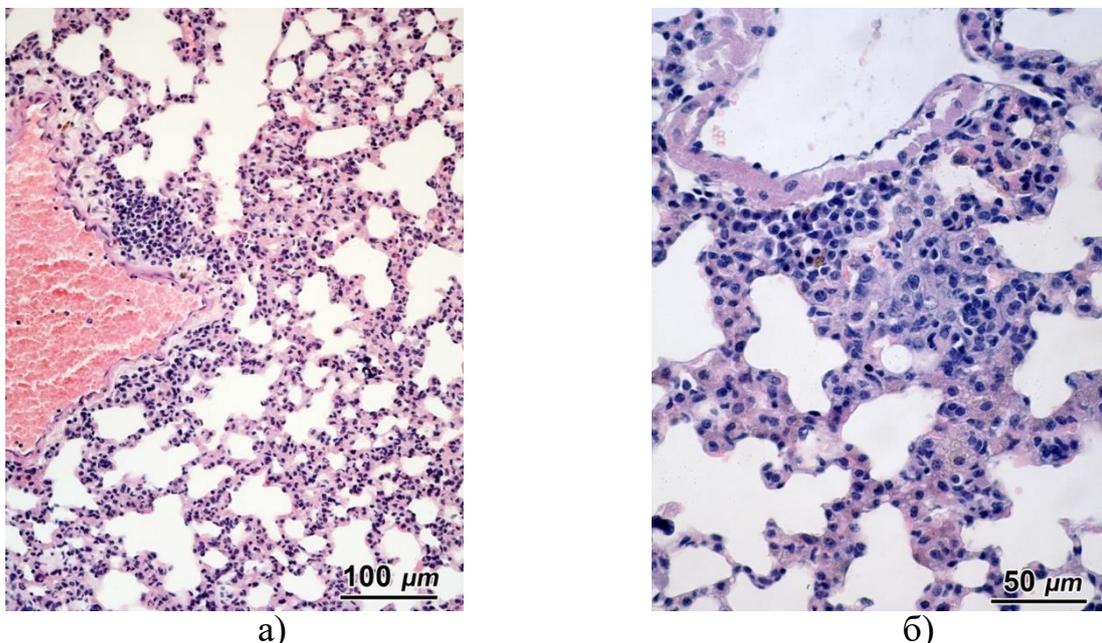


**Рис. 5.21** Миші, що загинули на 1-у добу: Гістологічні зміни в легенях (а, б) і міокарді (в, г). Мікрофотографія.

Примітка. а) – обструкція просвіту дрібного бронху; б) – розширенням просвітів респіраторних бронхіол і альвеолярних ходів; в, г) – повнокров'я міокарду і виражена дистрофія кардіоміоцитів.

Під час гістологічного аналізу міокарда мишей, які загинули впродовж першої доби після індукції експериментальної моделі, виявляли різко виражене повнокров'я серцевого м'яза, а також глибокі дистрофічні зміни кардіоміоцитів. Останні проявлялися контрактурними ушкодженнями, хвилеподібною деформацією клітин і вираженою білковою дистрофією, зумовленою фрагментацією та лізисом міофібрил. Зазначені процеси визначали інтенсивне однорідне червоне забарвлення цитоплазми кардіоміоцитів при фарбуванні за методом MSB (рис. 5.21 в, г).

У тварин, які зберегли життєздатність до шостої доби експерименту, гістоморфологічний аналіз легеневої тканини виявив мозаїчний характер судинного повнокров'я. Це проявлялося чергуванням у межах різних часточок легені венозних судин із переповненими кров'ю просвітами та ділянок із їх частковим або повним спустошенням (рис. 5.22 а, б). Уздовж судинної стінки в таких зонах нерідко формувалися локальні осередки запальної клітинної інфільтрації (рис. 5.22 а, б).

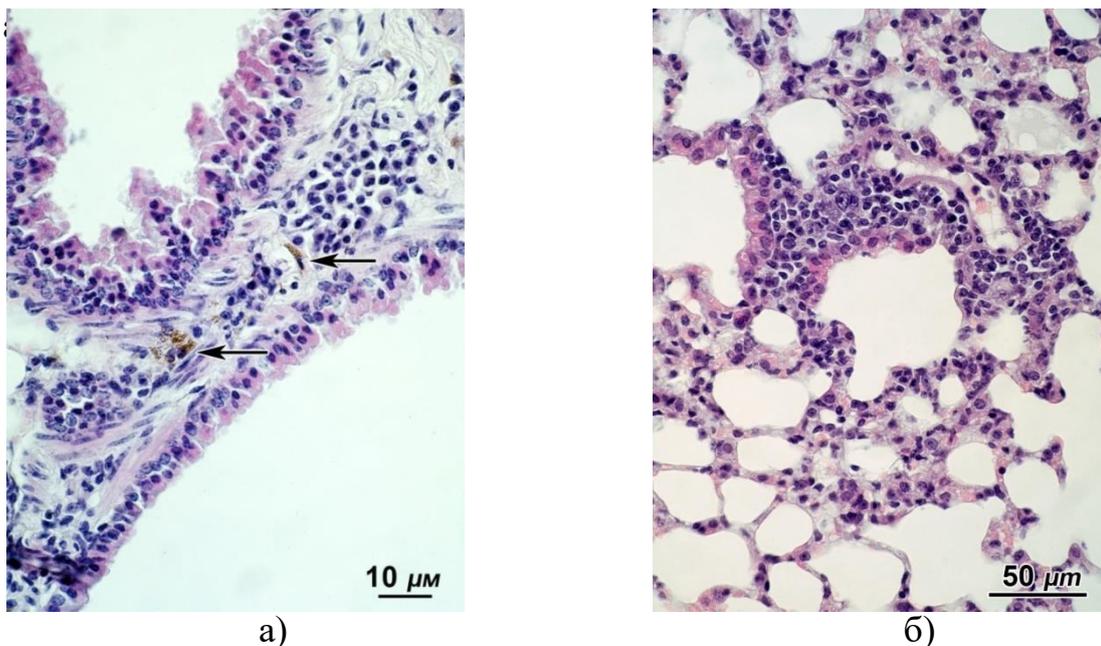


**Рис. 5.22** Миші, що вижили на 6-у добу (легені). Мікрофотографія.

Примітка. Вена великого калібру, просвіт якої заповнений кров'ю (а) та вена середнього калібру із запусілим просвітом (б). По периферії вен великого і середнього калібру розташовані дрібні вогнища запальної інфільтрації, що складаються переважно із лімфоцитів і макрофагоцитів.

У складі запальних інфільтратів, окрім лімфоцитів і макрофагів, у поодиноких випадках виявлялися плазматичні клітини та/або поліморфноядерні лейкоцити, що свідчило про збереження активності запального процесу на пізніх етапах перебігу експериментальної патології.

У легеневій тканині відзначали часте розширення просвітів бронхів як великого, так і дрібного калібру, при цьому слизова оболонка характеризувалася поєднанням запальних і дистрофічних порушень (рис. 5.23 а). У перибронхіальних зонах регулярно виявлялися локальні осередки лімфоцитарної та/або лімфомакрофагальної інфільтрації (рис. 5.23 а, б), тоді як у прилеглий перибронхіальній і периваскулярній сполучній тканині спостерігалася виражена проліферація фібробластів.

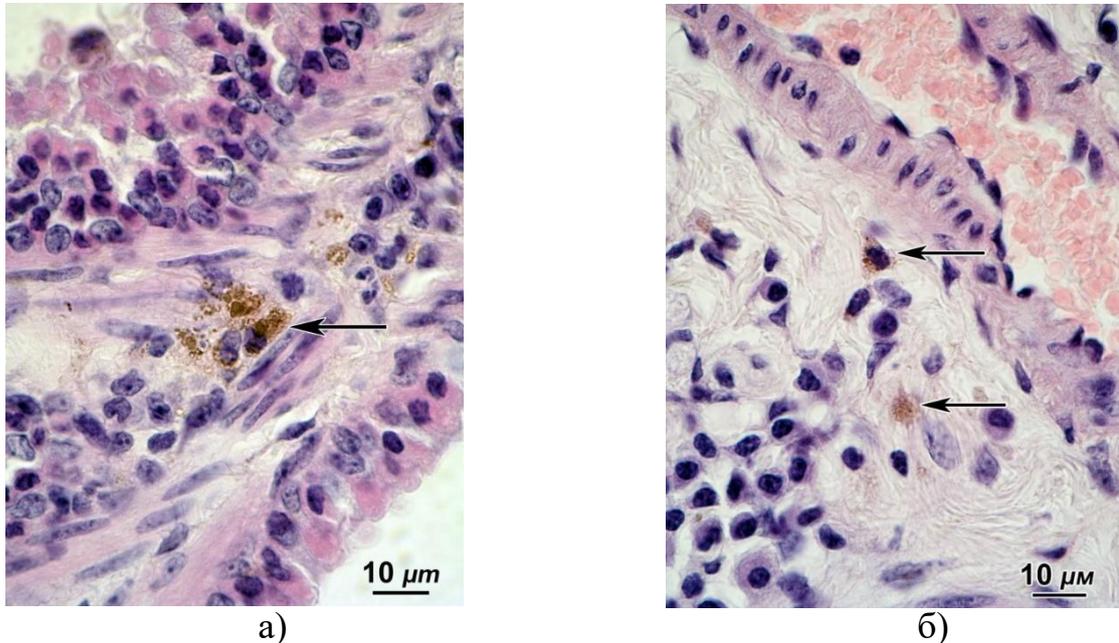


**Рис. 5.23** Миші, що вижили на 6-у добу (легені). Мікрофотографія.

Примітка. Запальні та дистрофічні зміни слизової оболонки бронхів великого (а) і дрібного калібру (б). Вогнища запальної лімфомакрофагальної інфільтрації по периферії бронхів великого (а) і дрібного калібру (б). Макрофагоцити з цитоплазматичними включеннями гранул ліпофусцину в перибронхіальній сполучній тканині (←).

Слід окремо зазначити, що в перибронхіальній і периваскулярній стромі нерідко ідентифікувалися макрофаги з наявністю в цитоплазмі дрібнодисперсних включень ліпофусцину (рис. 5.24 а, б). Накопичення такого

пігменту є морфологічною ознакою підвищеної функціональної активності цих клітин, залучених до процесів фагоцитозу, внутрішньоклітинної деградації та елімінації продуктів метаболізму, що формуються в умовах ушкодження тканин.



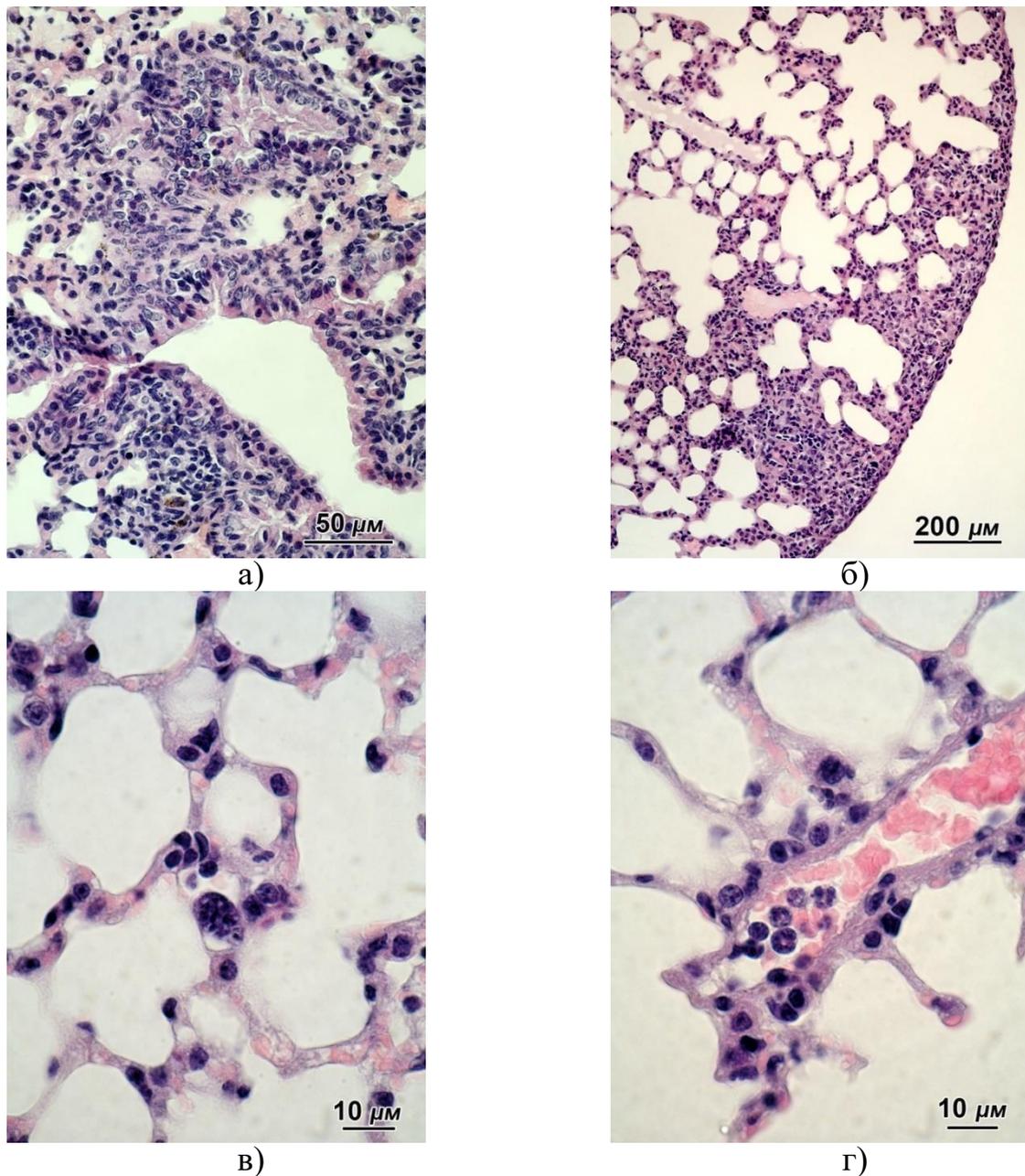
**Рис. 5.24** Миші, що вижили на 6-у добу (легені). Мікрофотографія.

Примітка. Поодинокі та зібрані у невеликі групи макрофагоцити з дрібними цитоплазматичними включеннями гранул ліпофусцину(←), які розташовані поміж пучків набряклих колагенових волокон і фібробластів уперибронхіальній (а) і периваскулярній (б) сполучній тканині легенів.

У легеневій тканині ідентифікували бронхи малого калібру зі значно редукованими просвітами, що було зумовлено набряковими та запальними змінами слизової оболонки і власної пластинки. У багатьох випадках просвіт таких бронхів містив слизовий детрит і десквамовані епітеліальні клітини, що призводило до їх часткової або повної obturaції (рис. 5.25 а). Наслідком зазначених змін було формування вентиляційно-перфузійних розладів, які морфологічно проявлялися розвитком зон ателектазу та дистелектазу (рис. 5.25 б).

За цих умов відзначалося істотне стоншення міжальвеолярних перегородок і альвеолярних стінок (рис. 5.25 в), а також виражене капілярне

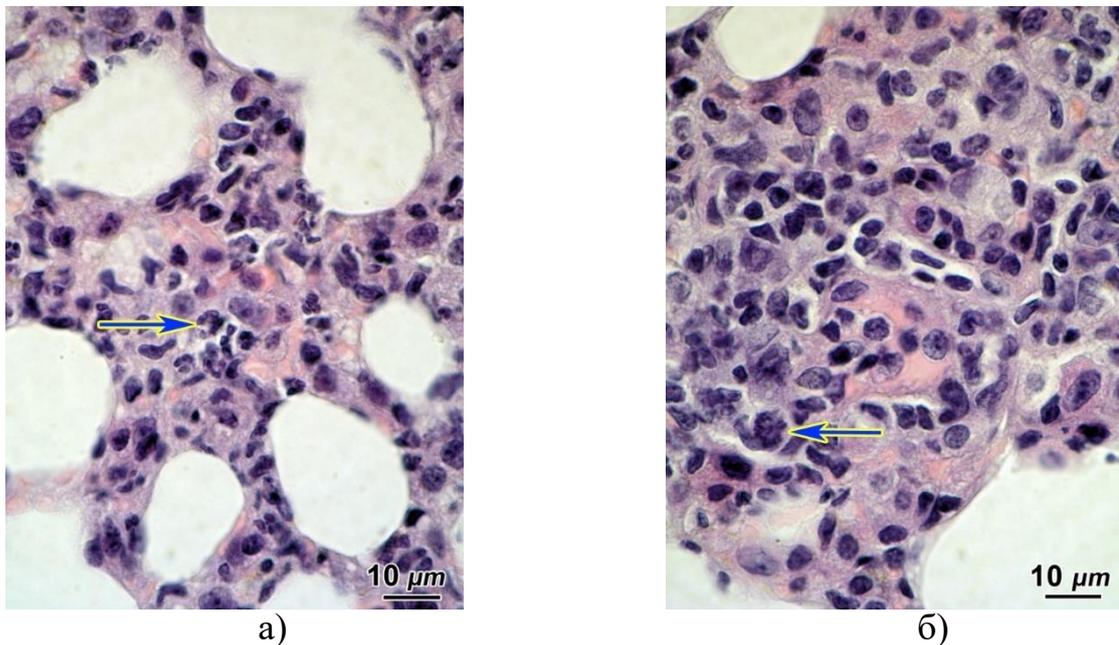
повнокров'я. У просвітах мікросудин реєструвалися явища стазу формених елементів крові та агрегації еритроцитів за типом сладж-феномена (рис. 5.25 г).



**Рис. 5.25** Миші, що вижили на 7-у добу: Вентиляційно-перфузійні порушення в легенях. Мікрофотографія.

Примітка. а) – запальні зміни в стінках дрібних бронхів і обтурація їх просвіту слизом і злущеними клітинами; б) – ділянки ателектазу і дистелектазу; в) – значне потоншення міжальвеолярних перегородок; г) – повнокров'я капіляра, стаз формених елементів крові зі сладжем еритроцитів.

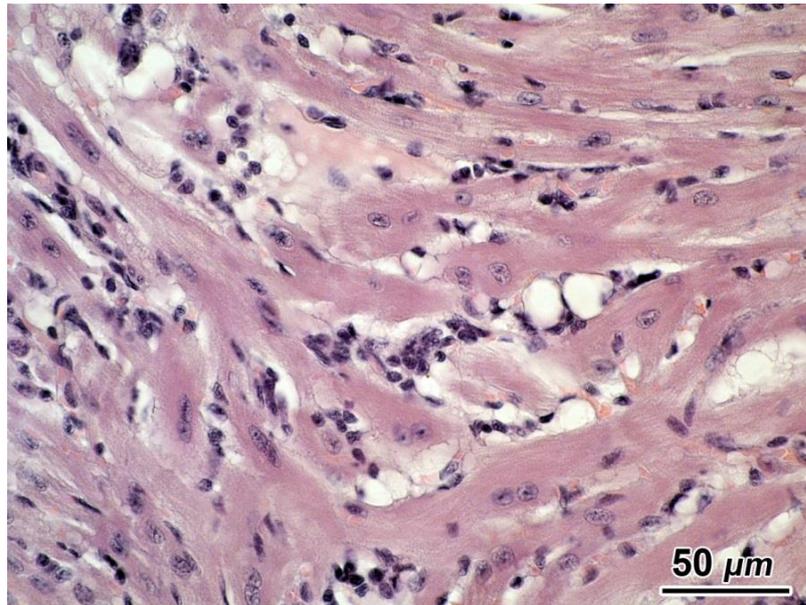
У центральних відділах легеневої тканини вздовж капілярного русла нерідко формувалися локальні осередки клітинної інфільтрації, представлені лейкоцитами, лімфоцитами та макрофагами (рис. 5.26 а). У складі таких інфільтратів виявлялися поодинокі гістіоцити та фібробласти. Посилення проліферативної активності останніх, що підтверджувалося наявністю мітотичних фігур (рис. 5.26 б), свідчило про перехід запального процесу в продуктивну фазу та активацію репаративних механізмів у легеневій тканині.



**Рис. 5.26** Миші, що вижили на 6-у добу (легені). Мікрофотографія.

Примітка. Запальні зміни в стінках альвеол: а) – поодинокі поліморфноядерні лейкоцити в запальному інфільтраті (→); б) – лімфоцити, макрофагоцити, гістіоцити та фібробласти в запальному інфільтраті. Мітоз фібробласта (←).

Під час гістологічного аналізу тканини міокарда у мишей, які залишилися живими на сьому добу після початку експерименту, виявлено помірно виражене кровонаповнення судин. Зазначені зміни поєднувалися з наявністю помірного набряку, а також клітинною інфільтрацією периваскулярних ділянок сполучної тканини, представленою переважно лімфоцитами та макрофагами (рис. 5.27).



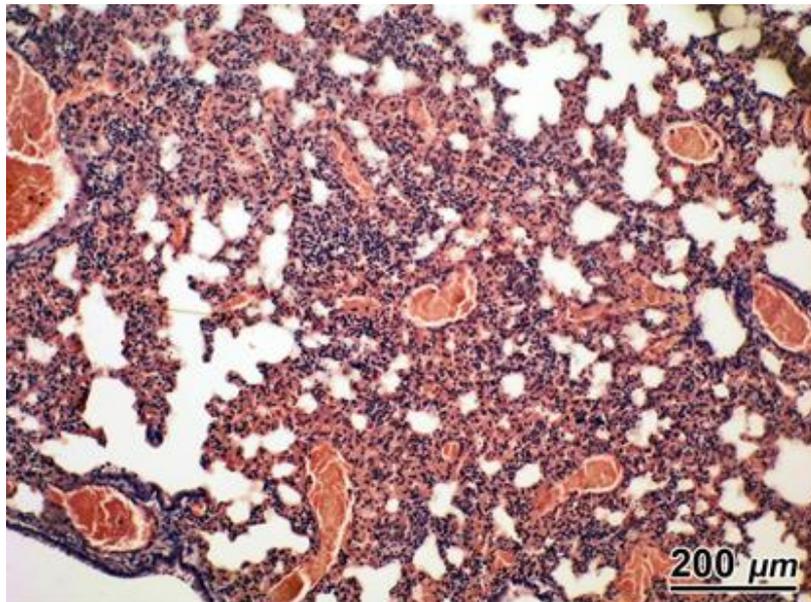
**Рис. 5.27** Миші, що вижили на 7-у добу (міокард): Помірно-виражена інфільтрація периваскулярної сполучної тканини лімфоцитами і макрофагоцитами. Дистрофічні зміни кардіоміоцитів. Мікрофотографія.

Отже, індукція LPS-моделі супроводжується достовірним формуванням інтенсивної судинної відповіді в легеневій тканині. Це підтверджується значним кровонаповненням капілярів міжальвеолярних перегородок, наявністю поодиноких осередків стромальних крововиливів і виходом еритроцитів у просвіт альвеол за механізмом діapedезу. Поряд із цим відмічається повнокров'я вен дрібного та середнього діаметра, що поєднується з локальним периваскулярним набряком і мононуклеарною запальною інфільтрацією, яка поширюється на інтерстицій легенів. У судинах великого калібру з ознаками застійного повнокров'я виявляються ушкодження всіх структурних компонентів судинної стінки, зокрема дистрофія ендотеліального шару, осередковий підендотеліальний набряк, часткова деструкція базальної мембрани, а також дегенеративні зміни елементів внутрішньої оболонки, включно з гладком'язовими клітинами.

Гістологічне дослідження засвідчило розвиток гострих розладів легеневого кровообігу в поєднанні з інтерстиціальною клітинною інфільтрацією, що є морфологічним підтвердженням дифузного альвеолярного

ушкодження. Крім того, виявлено запально-дистрофічні ураження бронхіального дерева, формування бронхіоліту та порушення вентиляційно-перфузійних співвідношень, представлені зонами ателектазів і дистелектазів, що відповідає типовим гістоморфологічним критеріям ГРДС. Аналогічні зміни, встановлені в міокарді, відображають системний характер запальної відповіді в організмі тварин за умов моделювання фатального перебігу ГРДС.

Морфологічні прояви ГРДС у мишей, які загинули протягом першої–другої доби експерименту (рис. 5.19–5.21), у подальшому зазнавали прогресивного та летального посилення. Це проявлялося стрімким розвитком інтерстиціальної геморагічної пневмонії на тлі різко вираженого венозного застою в легенях і грубих вентиляційно-перфузійних порушень (рис. 5.28), що зумовило загибель 90 % тварин на шосту добу після відтворення LPS-моделі (табл. 5.3).

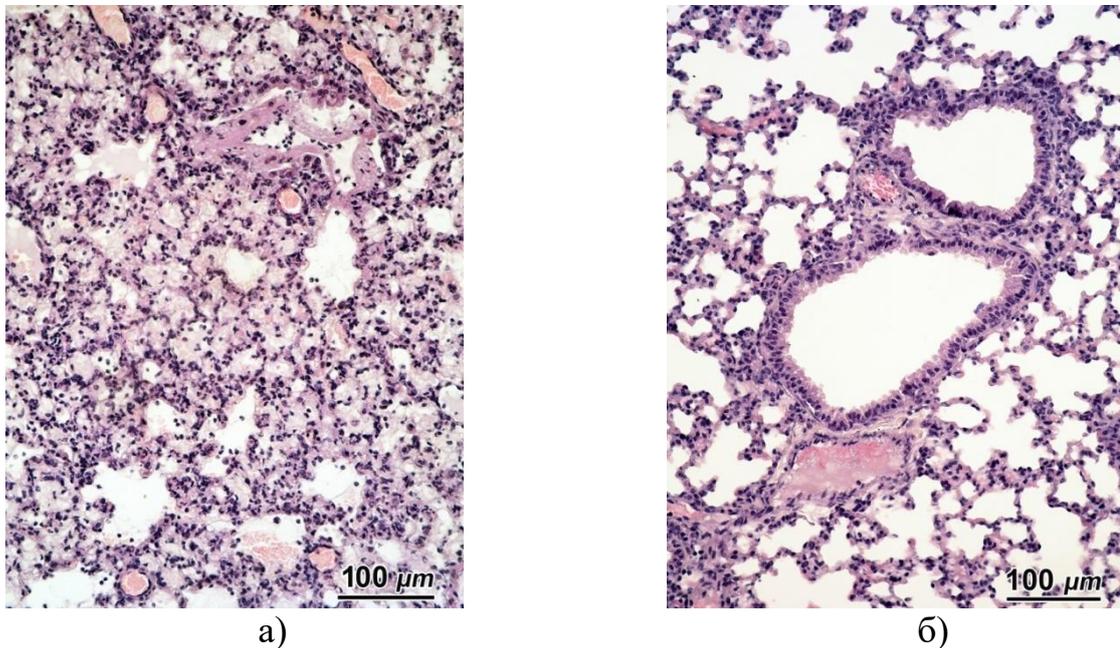


**Рис. 5.28** Миші, що загинули на 6 добу: Інтерстиціальна геморагічна пневмонія. Різко виражене венозне повнокров'я легенів та вентиляційно-перфузійні порушення. Мікрофотографія.

За умов експериментального моделювання фатального перебігу ГРДС гістологічний аналіз засвідчив наявність вираженого терапевтичного ефекту

при застосуванні Ліпофлавона, а також його поєднання з цинком. Характер морфологічних змін у легенях був загалом подібним для обох досліджуваних варіантів лікування, однак ступінь їхньої корекції виявився більш суттєвим у разі використання комбінованого препарату, що узгоджується з показниками виживаності експериментальних тварин (табл. 5.3).

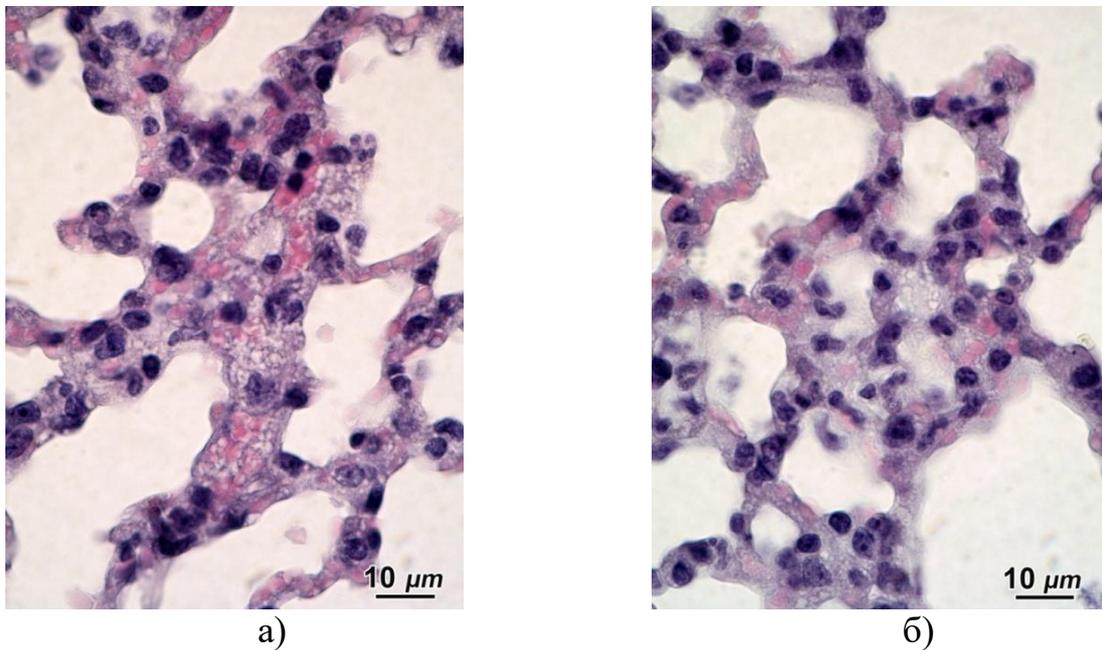
Зокрема, при реалізації ін'єкційно-інгаляційної схеми введення комбінації Ліпофлавона з цинком (одна ін'єкція та шість інгаляцій) у легеневій тканині відзначалося лише помірне венозне кровонаповнення. На цьому тлі реєструвалися незначно виражені набрякові зміни та помірна клітинна інфільтрація міжальвеолярних перегородок, представлена переважно лімфоцитами й макрофагами (рис. 5.29 а). Поодинокі дрібні інфільтративні скупчення з домінуванням лімфоцитарних клітин виявлялися лише у перибронхіальних ділянках та поблизу судин із помірним кровонаповненням (рис. 5.29 б).



**Рис. 5.29** Лікування комбінацією Ліпофлавона з цинком. Миші, що вижили на 6 добу. Мікрофотографія.

Примітка. Помірний набряк та інфільтрація між альвеолярних перегородок лімфоцитами і макрофагоцитами (а). Дрібні вогнища лімфоцитарної інфільтрації по периферії бронхів із розширеними просвітами та судин з помірним кровонаповненням (б).

Аналіз ультраструктурної організації міжальвеолярних перегородок показав, що помірно виражена лімфоцитарна інфільтрація в окремих випадках поєднувалася з появою вакуолей у цитоплазмі макрофагів, локалізованих як у стінках альвеол, так і в їх просвітах (рис. 5.30 а, б). Ймовірно, зазначені зміни зумовлені фагоцитарним захопленням фосфоліпідних компонентів мембран ліпосом Ліпофлавона клітинами макрофагального ряду за механізмом злиття мембран (fusion) у процесі щоденного інгаляційного впливу після індукції LPS-асоційованого ГРДС.

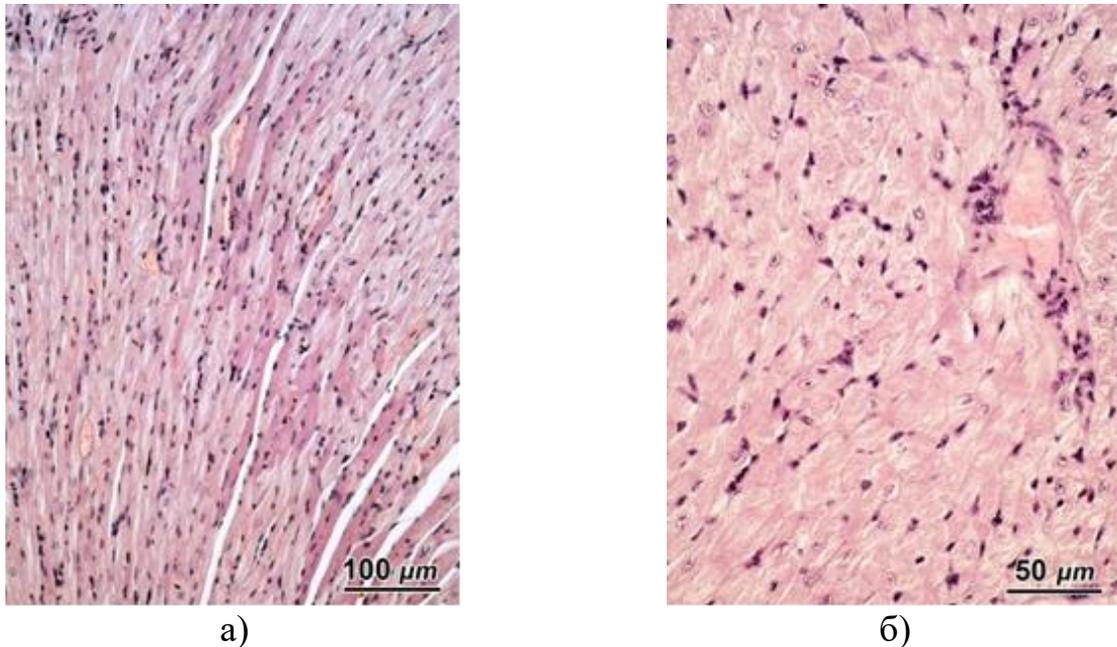


**Рис. 5.30** Лікування комбінацією Ліпофлавона з цинком. Миші, що вижили на 6 добу. Мікрофотографія.

Примітка. Зміни міжальвеолярних перегородок в легенях (а). Помірна інфільтрація міжальвеолярних перегородок лімфоцитами і макрофагоцитами із вираженою вакуолізацією цитоплазми (б).

Під час гістологічного аналізу тканини лівого шлуночка серця в окремих спостереженнях виявлялося лише незначне капілярне кровонаповнення, яке поєднувалося з помірною клітинною інфільтрацією периваскулярного інтерстицію, представленою лімфоцитарними та макрофагальними елементами (рис. 5.31 а). Водночас реєструвалися слабо виражені дистрофічні зміни

поодиноких кардіоміоцитів, що, ймовірно, відображає тривалу відповідь міокарда на дію компонентів LPS упродовж періоду спостереження (рис. 5.31 б).



**Рис. 5.31** Лікування комбінацією Ліпофлавона з цинком. Миші, що вижили на 6 добу. Мікрофотографія.

Примітка. Зміни у міокарді лівого шлуночка серця: а) – помірне повнокров'я капілярів та інфільтрація периваскулярної сполучної тканини лімфоцитами і макрофагоцитами; б) – помірна периваскулярна інфільтрація макрофагоцитами без виражених ознак дистрофії у поодиноких кардіоміоцитах.

У цілому результати гістоморфологічного аналізу свідчать про виражений лікувально-профілактичний потенціал поєданого застосування Ліпофлавона з цинком за умов LPS-індукованого ГРДС. У легеневій тканині це реалізується насамперед через підвищення стійкості капілярної стінки та судин середнього і великого діаметра, а також через збереження структурної цілісності слизової оболонки бронхів різного калібру. Особливої ваги набуває захист елементів респіраторного відділу – термінальних бронхіол, альвеолярних ходів і власне альвеол, що обмежує формування вентиляційно-перфузійного дисбалансу як провідного патогенетичного механізму розвитку ГРДС.

Індукована ліпополісахаридом модель фатального перебігу ГРДС відтворює системну запальну реакцію організму, яка супроводжується тяжкими мікроциркуляторними розладами, формуванням дифузного альвеолярного ушкодження та вираженими проявами інтоксикації. Для цієї моделі характерними є високий рівень летальності, значне погіршення загального стану тварин, зниження рухової активності, порушення дихальної функції та поява судомних реакцій. Морфологічні дослідження підтвердили наявність глибоких ушкоджень легенів і міокарда, що вказує на генералізований характер запального процесу.

Профілактично-лікувальне застосування ліпосомальної форми кверцетину, особливо у поєднанні з іонами цинку ( $Zn^{2+}$ ), супроводжувалося вираженим протекторним ефектом. Саме комбінований варіант продемонстрував найвищу ефективність, забезпечуючи виживаність тварин у межах 70-90 %, тоді як у групі контрольної патології цей показник становив лише 10-50 %. Отримані результати узгоджуються з гістологічними ознаками збереження архітекtonіки респіраторного відділу легень – термінальних бронхіол, альвеолярних ходів та альвеол, що свідчить про пригнічення розвитку вентиляційно-перфузійних порушень, ключових у патогенезі ГРДС.

На мікроскопічному рівні в легенях після комбінованого ін'єкційно-інгаляційного введення фіксувалися лише помірно виражені явища венозного застою та набряку, тоді як клітинна інфільтрація міжальвеолярних перегородок була мінімальною. Поодинокі випадки вакуолізації цитоплазми альвеолярних макрофагів можуть бути зумовлені захопленням фосфоліпідних компонентів мембран ліпосом Ліпофлавона шляхом мембранного злиття (*fusion*).

Кардіопротекторна дія комбінованого препарату проявлялася зменшенням капілярного повнокров'я у лівому шлуночку серця та мінімізацією дистрофічних змін кардіоміоцитів, що вказує на відновлення структурної організації міокарда й ослаблення запальної реакції.

Таким чином, терапевтичний ефект поєднання Ліпофлавона з цинком у моделі фатального ГРДС, імовірно, зумовлений сукупною антиоксидантною,

протизапальною та мембраностабілізуючою дією обох компонентів, а також потенційним синергічним впливом іонів  $Zn^{2+}$ , залучених до регуляції клітинної відповіді на запальний стрес і підтримання функціональної стабільності судинного ендотелію. Комбінований шлях введення забезпечує як системну, так і локальну дію, що сприяє прискоренню репаративних процесів у пошкодженій легеневій тканині.

### **5.3 Оцінка впливу кверцетину в системах транспорту на медіатори запалення при ГРДС**

Індукція моделі ГРДС супроводжується ураженням легеневої паренхіми що, власне, характеризується пошкодженням епітелію альвеол та руйнування альвеолярного-капілярного бар'єру. Наслідком подібних пошкоджень є вивільнення DAMPs (damage-associated molecular patterns), що ініціюють запуск вродженої імунної відповіді, залучаючи моноцити, макрофаги та нейтрофіли у вогнища запалення, що синтезують цитокіни та інші медіатори запалення [122, 123, 124, 125, 126, 127, 128]. Наступне вивільнення IL-4, IL-6, IL-10 та TNF- $\alpha$  має різний вплив на імунну відповідь.

Хоча наразі варіанти лікування ГРДС є обмеженими, деякі сполуки природного походження, зокрема сполуки класу терпеноїдів, флавоноїдів та їх похідних – мають здатність зменшувати руйнівні наслідки цього захворювання, що проявляється у зменшенні прозапальної реакції, спричиненої надмірною активністю імунних клітин у легеневій тканині [129].

Різні дослідження повідомляли, що кверцетин, який є низькотоксичною флавоноїдною сполукою, має значні перспективи у терапії гострих захворювань легень, зокрема – при ГРДС, оскільки сприяє полегшенню їх перебігу, зменшуючи ступінь ураження легень, демонструючи антифібротичні властивості, а також впливає на продукцію прозапальних цитокінів, та сигнальні шляхи, які ними опосередковані [129, 130].

До того ж, кверцетин демонструє потужні противірусні властивості, що полягає у його здатності пригнічувати розвиток вірусної інфекції на початковій стадії, взаємодіяти з ферментами, які є ключовими для реплікації вірусів, та зменшувати запальні процеси, викликані інфекцією [131]. Також було показано, що поєднання його з деякими іншими противірусними препаратами – дає синергічний ефект [131, 132], сприяючи виживаності та полегшенню симптомів у пацієнтів, зокрема із COVID-19 [129, 131] і при цьому – здатен активувати захисні механізми, зменшуючи тяжкість перебігу в пацієнтів із сепсис-опосередкованим ГРДС, шляхом впливу на різні сигнальні шляхи, що регулюють запалення, зокрема на NF-κB-каскад [133].

Слід зазначити, що невисока біодоступність кверцетину спонукає до пошуку спеціальних систем для його транспорту, до яких можна віднести комплекси з есенціальними металами (цинком, міддю, залізом та ін.), в яких флавоноїду відведено роль іонофора [134, 135]. *In vitro* показано, зокрема, що комплексоутворення із катіоном цинку сприяє проходженню кверцетину крізь модельну клітинну мембрану, яка імітована моношаровою ліпосоною [136]. Транспортна роль системи у вигляді комплексу кверцетин-Zn безсумнівно розширює розуміння важливого фізіологічного статусу цього біометалу [137, 138], хоча й досі немає інформації про фармакологічно ідентифіковані системи кверцетину з цинком, що б мали прогноз клінічної трансляції.

Крім того, повідомлялось також і про противірусну активність йонів  $Zn^{2+}$ , що проявляється у здатності перешкоджати реплікації РНК-вірусів, впливаючи на активність їх ферментів [139].

Наступним етапом нашого дослідження було дослідження біохімічних показників крові мишей. Як вже згадувалось раніше, центральна роль у модуляції тяжкості перебігу ГРДС належить цитокінам [140].

З огляду на такі дані, було використано описану в розділі 2 методику твердофазного сендвіч-ІФА методу, щоб проаналізувати зразки крові мишей та кількісно визначити концентрацію деяких цитокінів у мишей з контрольною патологією, які не отримували лікування тестовими препаратами, а також

порівняти із групами, що пройшли курси лікування за зазначеними вище схемами.

Ми визначали концентрацію цитокінів ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10 та TNF-а (табл. 5.5) з метою оцінити ступінь перебігу запального процесу та, відповідно, складність перебігу захворювання у різних групах дослідних тварин.

Таблиця 5.5.

**Вплив профілактично-лікувального введення ліпосомальної форми кверцетину на рівень цитокінів у тварин після моделювання ГРДС в моделі кислотної аспірації ( $M \pm m$  або  $[Me (25\%; 75\%)]$ ,  $n = 5$ )**

Група (шлях введення)	ІЛ-4, пг/мл	ІЛ-6, пг/мл	ІЛ-10, пг/мл	TNF-а, пг/мл
Група 1 – Патологія	320,76 ± 15,22	737,18 ± 38,45	85,74 (81,55; 112,85)	169,82 ± 22,57
Група 2 – Патологія + ЛФ (ін'єкція)	377,31 ± 17,97	781,18 ± 20,08	109,16 (97,72; 127,34)	178,44 ± 11,42
Група 3 – Патологія + ЛФ (ін'єкція та інгаляція)	371,99 ± 26,86	787,12 ± 71,57	117,66 ± 32,04	191,53 ± 64,07
Група 4 – Патологія + ліпосомальна композиція кверцетину з $Zn^{2+}$ (ін'єкція)	357,58 (347,53; 369,53)	804,08 ± 35,82	109,15 (105,32; 121,45)	132,05 (127,46; 144,97)
Група 5 – Патологія + ліпосомальна композиція кверцетину з $Zn^{2+}$ (ін'єкція та інгаляція)	353,11 ± 32,5	691,41 ± 12,48	87,91 ± 10,68	169,66 ± 51,4

ІЛ-4 є відомим імуномодуляторним цитокіном, що може впливати на Th1- і Th17-запалення, хоча теж може запускати потенційно шкідливу Th2-відповідь [126].

Деякі дослідження пропонують ІЛ-4 як терапевтичну мішень для лікування деяких хвороб дихальних шляхів (наприклад, астми), однак для деяких інших патологічних станів, зокрема при фіброзі – ефективність даної стратегії викликає сумніви [125, 141].

За отриманими результатами рівні ІЛ-4 у груп, які отримували лікування ЛФ, трохи менше у групах, що отримували ліпосомальну композицію кверцетину з  $Zn^{2+}$  – були підвищені порівняно з контролем, що не викликає подиву, оскільки було показано, що підвищення рівня ІЛ-4 та відповідно посилення його сигналізації через рецептор ІЛ-4R – обмежує виживання нейтрофілів у дихальних шляхах, та як наслідок – сприяє полегшеному перебігу ГРДС [126].

Щодо ІЛ-6, відомого потужного прозапального цитокіну, що надмірне підвищення кількості цього цитокіну – може призводити, власне, до посилення хронічного запалення, хоча його роль залежить від сигнального каскаду: саме транс-сигналізація через sІЛ-6R сприяє розвитку запального процесу, у той час як класична сигналізація через mІЛ-6R вважається протизапальною. І хоча більшість дослідників, особливо ті, що вивчають перебіг патологічних станів, спричинених SARS-CoV-2 (серед яких особливе місце займає виникнення ГРДС) – розглядають ІЛ-6 як терапевтичну мішень, слід враховувати, що блокада ІЛ-6 впливає також на протизапальний сигнальний шлях, тому більш перспективним видається таргетний вплив на сигнальні білки, що залучаються через sІЛ-6R [142].

Попри деяке підвищення рівнів ІЛ-6, порівняно із контролем, у мишей із груп 2, 3, та 4, які отримували лікування – показники маси тіла та загальний стан значно покращились порівняно із контролем. Однак ймовірно, це може бути однією із причин раптової смертності у 2-й групі. Таке припущення корелює з даними про те, що підвищений рівень ІЛ-6 у пацієнтів з ГРДС асоціюється із підвищенням ризику смерті [127].

Хоча інші дослідження продемонстрували, що кверцетин здатен знижувати високі рівні ІЛ-6, причому у дозозалежний спосіб [133]. Подібне було зафіксовано у групі 5, де дійсно було суттєве зниження рівнів ІЛ-6 у порівнянні з контролем. Так і з іншими трьома групами, що у сукупності з найкращою здатністю до набору ваги у мишей цієї групи – може вказувати на згасання гострої фази перебігу захворювання.

На сьогоднішній день IL-10, відомий своєю потужною протизапальною активністю, зокрема має здатність зменшувати надмірну активність IL-6. Це дозволяє розглядати IL-10 як один із компонентів терапії при ГРДС, як наслідку вірусної інфекції, оскільки було доведено його роль, як одного з ключових регуляторів перебігу захворювання у дорослих, що дозволяє знизити смертність та важкість перебігу синдрому. Зокрема, були охарактеризовані його антифібротичні властивості, що проявляються у протидії таким профібротичним цитокінам, як TGF- $\beta$  та відповідно – сприяють уповільненню розвитку легеневого фіброзу [128].

Однак, гіпотетично, значне збільшення концентрації IL-10 у важких пацієнтів може також провокувати виникнення «цитокіновому шторму», виступаючи вже не як регулятор, що інгібує запальну реакцію, а як прозапальний агент, що провокує вивільнення інших прозапальних цитокінів [143].

Було продемонстровано незначне підвищення концентрації IL-10 у дослідних групах, що лікували за відповідними схемами. Таке підвищення може ефективно стимулювати імунну систему, що допомагатиме організму краще витримувати перебіг захворювання [128], й може також бути спричинене підвищеними рівнями IL-6 у мишей цих груп.

Це має особливе значення у контексті того, що зависока концентрація даного інтерлейкіну може мати зворотній вплив [143]. Лише у 5-й групі рівні IL-10 були на рівні із контрольними, що знову-таки може бути додатковим свідченням того, що у цій групі перебіг запального процесу був зменшеним не лише у порівнянні із контрольною групою, а і у порівнянні із іншими групами, що отримували лікування за відповідними схемами.

Фактор некрозу пухлин  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) є одним із ключових медіаторів гострої запальної реакції і відіграє центральну роль у розвитку системного запалення та цитокинового каскаду. Зокрема, TNF- $\alpha$  є одним з ранніх прозапальних цитокінів, що індукують вивільнення інших медіаторів, таких як IL-1 $\beta$  та IL-6, тим самим сприяючи ескалації запальної відповіді та формуванню важкого перебігу інфекційних і неінфекційних станів, включно з гострим респіраторним

дистрес-синдромом (ГРДС) [143, 145]. Саме тому TNF- $\alpha$  розглядається як потенційна терапевтична мішень при гіперзапальних станах, оскільки його надмірна активність асоціюється з розвитком «цитокінового шторму» та ушкодженням тканин, передусім легеневої паренхіми [143].

Згідно з отриманими результатами, рівні TNF- $\alpha$  у всіх експериментальних групах не продемонстрували статистично значущих відмінностей. Аналіз нормальності розподілу даних (тест Шапіро–Уїлка) та однорідності дисперсій (тест Левена) підтвердив коректність подальшого застосування однофакторного ANOVA, яке показало відсутність достовірної різниці між групами ( $p > 0,05$ ). Додатковий пост-хок аналіз Tukey HSD також не виявив значущих парних відмінностей.

Попри певні коливання середніх значень між групами, загальна динаміка не демонструє чітко виражених підвищень чи знижень TNF- $\alpha$ , які можна було б пов'язати з використаними схемами лікування. Такий результат може свідчити про те, що відповідні терапевтичні втручання або не спричиняли істотного впливу на каскад TNF- $\alpha$ -залежного запалення, або ж інтенсивність запальної реакції у мишей залишалася в межах відносно стабільної фізіологічної відповіді незалежно від експериментальних умов.

Відсутність значущих змін TNF- $\alpha$  особливо важлива з огляду на його роль у розвитку тяжких ускладнень, зокрема прогресуванні легеневого ушкодження та фіброзу [143]. Зниження або відсутність додаткової активації TNF- $\alpha$  може вказувати на менш агресивний перебіг запального процесу або ефективно втримання рівня прозапальних цитокінів у контрольованому діапазоні. З іншого боку, враховуючи критичну роль TNF- $\alpha$  у запуску цитокінового шторму, його відсутність значущого підвищення може свідчити про те, що жодна з досліджуваних схем лікування не сприяла розвитку надмірної системної запальної відповіді [145].

Загалом отримані дані дозволяють припустити, що TNF- $\alpha$  у даному експерименті не був ключовим фактором диференціації перебігу запального процесу між групами, а запальна відповідь могла регулюватися переважно іншими цитокінами або сигнальними шляхами.

Таким чином, було встановлено вплив досліджуваних препаратів за різних шляхів введення на біохімічні показники крові, а саме: Ліпофлавіон та ліпосомальна композиція кверцетину із йонами  $Zn^{2+}$  може, в залежності від шляху введення – по-різному модулювати рівень цитокінів IL-4, IL-6, IL-10 та TNF- $\alpha$ .

C-реактивний білок (C-reactive protein, CRP) – це гострофазовий білок, який синтезується переважно в печінці у відповідь на підвищення рівня прозапальних цитокінів (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ). Він виступає одним з найчутливіших маркерів системного запалення, тканинного ушкодження та посиленої продукції медіаторів запальної реакції [146, 147, 148].

У мишей концентрація CRP у нормі є дуже низькою (часто <1-2 мг/л) і різко зростає після дії запальних стимулів (табл. 5.6).

*Таблиця 5.6.*

**Вплив профілактично-лікувального введення ліпосомальної форми кверцетину на рівень С-реактивного білку в тварин після моделювання ГРДС в моделі кислотної аспірації (n = 5)**

Група (шлях введення)	Напівкількісні показники CRP
Група 1 – Інтактний контроль	6 мг/л
Група 2 – Патологія	96 мг/л
Група 3 – Патологія + ЛФ (ін'єкція)	24 мг/л
Група 4 – Патологія + ЛФ (ін'єкція та інгаляція)	12 мг/л
Група 5 – Патологія + ліпосомальна композиція кверцетину з $Zn^{2+}$ (ін'єкція)	12 мг/л
Група 6 – Патологія + ліпосомальна композиція кверцетину з $Zn^{2+}$ (ін'єкція та інгаляція)	6 мг/л

У таблиці 5.6 наведено напівкількісні показники С-реактивного білка (CRP) у плазмі мишей після моделювання ГРДС в моделі кислотної аспірації (n = 5). В контрольній патологічній групі середній рівень CRP становив 96 мг/л. Профілактично-лікувальне введення ліпосомальної форми кверцетину (ЛФ) значно знизило рівень CRP: при парентеральному введенні (група 2) – до

24 мг/л, при комбінованому введенні (група 3) – до 12 мг/л. Застосування ліпосомальної композиції кверцетину з Zn призвело до ще більш вираженого зниження CRP: при ін'єкційному застосуванні (група 4) – 12 мг/л, а при комбінації ін'єкції та інгаляції (група 5) – 6 мг/л, що відповідає рівню інтактного контролю. Ці дані свідчать про чітку залежність протизапальної дії від комбінації форми препарату та шляху введення – найбільш виражений ефект досягнуто при поєднанні ліпосомальної доставки, системного та локального (інгаляційного) введення, а також при поєднанні з іонами цинку.

Зниження рівня CRP після введення кверцетину узгоджується з великою групою експериментальних досліджень, які показують, що кверцетин в ліпосомах чинить протизапальну дію в легенях за рахунок інгібування NF- $\kappa$ B, NLRP3-запалювальної каскади та концентрацій прозапальних цитокінів (зокрема IL-6) – основного індуктора синтезу CRP у печінці; таким чином спостережуване падіння CRP має цілком обґрунтоване механістичне підґрунтя [149]. Додавання  $Zn^{2+}$  може посилювати протизапальні та імуномодулювальні властивості комплексу (за рахунок синергетичного впливу на цитокінову відповідь та антиоксидантні механізми), що також відображено в дослідженнях, присвячених комплексам кверцетин-цинк при моделюванні «цитокінового шторму» [149].

Оскільки CRP – чутливий маркер системного запалення і корелює з тяжкістю легеневого ушкодження, приведені зниження його рівня свідчать про суттєве ослаблення системної запальної відповіді та потенційну профілактично-лікувальну дію ліпосомальних форм кверцетину, особливо при комбінації системного та локального введення і при поєднанні з  $Zn^{2+}$ . Це узгоджується з опублікованими моделями гострого пошкодження легень, де застосування кверцетину знижувало гематологічні та гістологічні маркери запалення й покращувало морфологію легеневої тканини [151].

Отримані дані демонструють виразний протизапальний ефект ліпосомальної форми кверцетину у моделі кислотно-аспіраційного ГРДС, що проявляється суттєвим зниженням рівня С-реактивного білка у плазмі крові.

Застосування препарату у вигляді ін'єкцій сприяло зменшенню концентрації CRP у 4 рази порівняно з патологічним контролем, тоді як поєднання системного та інгаляційного введення підсилювало цей ефект удвічі. Додавання іонів  $Zn^{2+}$  до ліпосомальних форм кверцетину посилювало протекторну дію, а комбінований шлях введення забезпечував нормалізацію CRP до рівня інтактних тварин. Таким чином, синергія ліпосомальної доставки кверцетину та цинку разом із комбінованим шляхом введення демонструє найбільшу здатність до обмеження системної запальної відповіді та може розглядатися як перспективний підхід у профілактиці й терапії гострого респіраторного дистрес-синдрому.

На підставі результатів експериментального дослідження ефективності систем доставки кверцетину при різних моделях гострого респіраторного дистрес-синдрому сформульовано такі проміжні висновки:

1. У моделі аспіраційного ушкодження легенів (НСІ-індукований ГРДС) встановлено, що ліпосомальна форма кверцетину (Ліпофлавіон) достовірно підвищує виживаність тварин, покращує клінічний стан та сприяє стабілізації динаміки маси тіла. Найбільш виражений ефект досягався за поєднання внутрішньовенного та інгаляційного шляхів введення.
2. Застосування Ліпофлавіону позитивно впливало на гематологічні показники периферичної крові на 6-ту добу розвитку ГРДС: відзначено зменшення нейтрофільно-моноцитарного зсуву, збереження відносної частки лімфоцитів, стабілізацію еритроцитарних показників та зниження ознак тромбоцитарної активації. Найбільш збалансовані зміни зафіксовано при інгаляційному введенні, особливо у комбінації з цинком.
3. Морфологічне дослідження легеневої тканини у НСІ-моделі підтвердило формування типових ознак гострого запального ушкодження з елементами альтерації, ексудації та подальших фібротичних змін. Ліпосомальні системи транспорту кверцетину зменшували вираженість перибронхіального та периваскулярного набряку, клітинної інфільтрації,

ушкодження епітелію бронхів і ступінь інтерстиціального фіброзу у віддалені терміни спостереження.

4. Порівняльний аналіз показав, що Корвітин виявляє протективні властивості, однак поступається ліпосомальній формі за ступенем нормалізації гістоструктури легенів і стабілізації клініко-гематологічних показників, особливо при інгаляційному застосуванні.

5. У моделі фатального LPS-індукованого ГРДС внутрішньовенне введення Ліпофлакону суттєво знижувало летальність упродовж шести діб спостереження. Ліпосомальна композиція кверцетину з цинком забезпечувала більш виражений протективний ефект, що проявлявся вищими показниками виживаності та кращою динамікою маси тіла порівняно з монотерапією.

6. За умов LPS-індукованого системного запалення застосування ліпосомальної форми кверцетину, особливо у поєднанні з цинком, сприяло зменшенню тяжкості клінічних проявів інтоксикації, відновленню рухової активності та нормалізації загального стану тварин, що свідчить про системний протизапальний і органопротекторний потенціал досліджуваних композицій.

7. Узагальнення отриманих результатів підтверджує, що ефективність кверцетину при ГРДС суттєво залежить від лікарської форми та шляху введення. Ліпосомальна система доставки, зокрема в комбінації з цинком, демонструє найбільш виражений терапевтичний ефект як при прямому токсичному ушкодженні легенів, так і при системній запальній відповіді.

## РОЗДІЛ 6

### **ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНА ДІЯ КВЕРЦЕТИНУ В СИСТЕМАХ ТРАНСПОРТУ (ЛІПОФЛАВОН) ЗА РОЗВИТКУ ФІБРОЗУ ЛЕГЕНЬ ТА НАСЛІДКІВ ОПІКОВИХ УРАЖЕНЬ ОКА**

У шостому розділі дисертаційної роботи наведено результати експериментальних досліджень, спрямованих на оцінку лікувально-профілактичної ефективності кверцетину в ліпосомальній системі транспорту (Ліпофлавон) за умов розвитку віддалених ускладнень запально-деструктивних ушкоджень різної етіології. Дослідження виконано з урахуванням сучасних уявлень про ключову роль оксидативного стресу, хронічного запалення та порушень репаративних процесів у формуванні фібротичних змін і вторинних уражень органів-мішеней.

Логіка побудови розділу ґрунтується на аналізі ефективності Ліпофлакону в умовах двох патогенетично відмінних, проте взаємопов'язаних моделей: радіаційно індукованого фіброзу легень як віддаленого наслідку гострого системного ушкодження та кислотного опіку рогівки як прикладу локального хімічного ураження з вираженим запально-деструктивним компонентом. Такий підхід дозволив комплексно оцінити потенціал ліпосомальної форми кверцетину щодо модифікації перебігу хронічних і гострих патологічних процесів, що супроводжуються структурною перебудовою тканин.

Фіброз легень належить до прогресуючих патологічних станів, що можуть формуватися під впливом різноманітних ушкоджувальних чинників, зокрема іонізуючого випромінювання, гострого респіраторного дистрес-синдрому, а також хронічних інтерстиціальних запальних процесів нез'ясованої етіології, включаючи ідіопатичний легеневий фіброз [187]. Незважаючи на різноманіття пускових механізмів, ключову роль у розвитку фіброзування відіграє запальна складова, яка супроводжується інтенсивною генерацією високоактивних форм кисню, активацією Toll-подібних рецепторів і залученням клітин запалення [188].

У зв'язку з цим сучасні підходи до профілактики та лікування легеневого фіброзу переважно базуються на поєднанні протизапальної фармакотерапії з підтримувальними симптоматичними заходами. Отримані в попередніх розділах експериментальні дані щодо вираженої протизапальної активності та лікувального ефекту ліпосомальної форми кверцетину при гострому респіраторному дистрес-синдромі за різних шляхів уведення дозволили прогнозувати його потенційний вплив на процеси фіброзоутворення в легенях.

З метою підтвердження цього припущення у даній роботі вперше обґрунтовано антифібротичну дію Ліпофлакону з використанням верифікованої моделі гострого радіаційного синдрому, яка розглядається як «проксі»-модель з огляду на раніше встановлену радіозахисну активність препарату [113]. Оцінювання антифібротичного ефекту ліпосомального кверцетину проводили на підставі аналізу його лікувально-профілактичного впливу при радіаційно індукованому фіброзі легень у динаміці експерименту з тотальним опроміненням тварин.

Показано, що гостре тотальне опромінення тварин у групах I (5,5 Гр) та III (7,0 Гр) зумовлює формування у легеневої тканині фіброзних змін різного ступеня вираженості у віддалені строки після опромінення, динамічні характеристики яких наведено в таблиці 6.1.

Таблиця 6.1.

**Вплив профілактично-лікувального введення ліпосомальної форми кверцетину (Ліпофлавіон) на ступінь тяжкості проявів фіброзу легень тварин після тотального опромінення**

Термін після опромінення	Група тварин в експерименті з опроміненням	n <sub>1</sub>	Кількість тварин у групі із стадією фіброзу, n <sub>2</sub>					
			I стадія (0-0,5 бали)	II стадія				III стадія (5-6 бали)
				0,5-1 бали	1-2 бали	2-3 бали	3-4 бали	
n <sub>2</sub> (%)								
30 днів	I (O <sub>5,5</sub> Гр)	26	6 (23,1)	18 (69,2)	2 (7,7)	-	-	-
	III (O <sub>7,0</sub> Гр)	22	4 (18,1)	14 (63,6)	4 (18,1)	-	-	-
	II (ЛФ+O <sub>5,5</sub> Гр)	30	26 (86,7)*	4 (13,32)*	-	-	-	-
	IV (ЛФ+O <sub>7,0</sub> Гр)	26	18 (69,2)*	8 (30,7)*	-	-	-	-
90 днів	I (O <sub>5,5</sub> Гр)	22	6 (27,3)	4 (19,2)	12 (54,5)	-	-	-
	III (O <sub>7,0</sub> Гр)	18	4 (22,2)	8 (44,4)	4 (22,2)	2 (11,1)	-	-
	II (ЛФ+O <sub>5,5</sub> Гр)	24	18 (75,0)*	2 (8,3)	2 (8,3)*	-	-	-
	IV (ЛФ+O <sub>7,0</sub> Гр)	18	12 (66,7)*	4 (22,2)	2 (11,1)*	-	-	-
180 днів	I (O <sub>5,5</sub> Гр)	18	6 (33,3)	8 (44,4)	2 (28,5)	2 (11,1)	-	-
	III (O <sub>7,0</sub> Гр)	14	4 (28,5)	-	4 (28,5)	2 (14,3)	2 (14,3)	2 (14,3)
	II (ЛФ+O <sub>5,5</sub> Гр)	22	12 (54,5)	4 (18,2)	4 (18,2)	2 (9,1)	-	-
	IV (ЛФ+O <sub>7,0</sub> Гр)	18	8 (44,4)	4 (22,2)	2 (11,1)	2 (11,1)	2 (11,1)	-

Примітка. n<sub>1</sub> – кількість тварин у групі, що вижили після опромінення, на термін спостереження;

n<sub>2</sub> – кількість тварин у групі із певною стадією фіброзу на термін спостереження;

% - співвідношення n<sub>2</sub>/n<sub>1</sub> x 100;

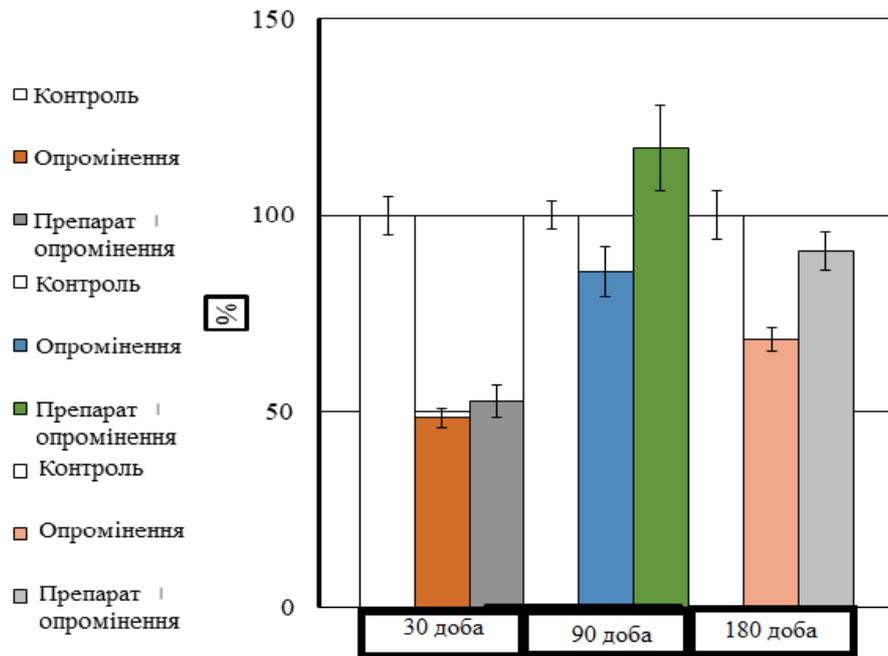
\* – вірогідно менше при p < 0,05 порівняно з опроміненням.

На 30-ту добу після опромінення частота виникнення фіброзних змін та їх ступінь, визначені за кількістю тварин із відповідними морфологічними проявами, не мали статистично значущих відмінностей між обома варіантами дозового навантаження. Водночас у віддалені строки спостереження (90 і 180 діб) більш тяжкі ушкодження легеневої тканини достовірно частіше реєструвалися у тварин, опромінених у дозі 7,0 Гр. Виявлена дозозалежність мала пролонгований характер: на третьому місяці експерименту частота та вираженість фіброзу II стадії за дії дози 7,0 Гр у два рази перевищували

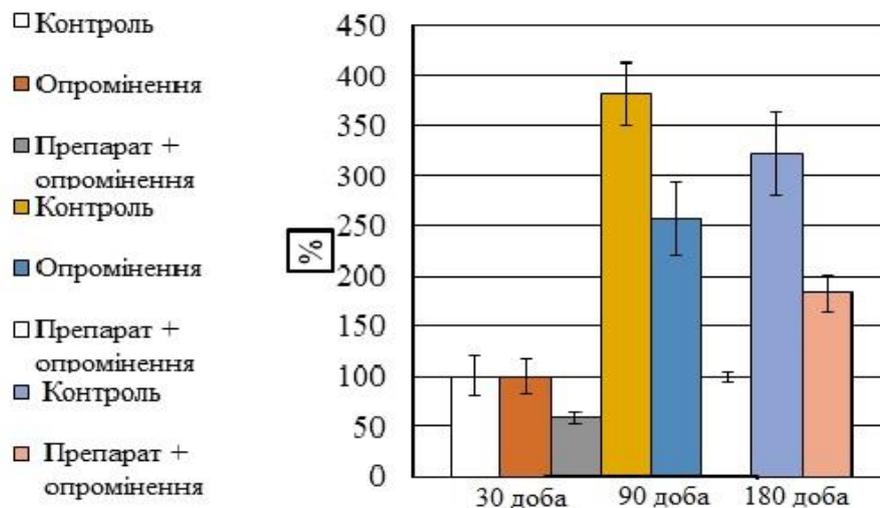
відповідні показники для дози 5,5 Гр, тоді як на шостому місяці спостереження у цій групі формувалися прояви фіброзу III стадії (табл. 6.1).

Застосування ліпосомальної форми кверцетину відповідно до розробленої профілактично-лікувальної схеми супроводжувалося гальмуванням та зниженням інтенсивності фіброзоутворення у легенях опромінених тварин. Так, частота сформованих фіброзних змін у легенях через 30 і 90 днів після опромінення обома дозами зменшувалася у 3,8 та 2,9 раза відповідно. Через шість місяців після опромінення у дозі 7,0 Гр у пролікованих тварин переважали фіброзні зміни I стадії, тоді як ознаки фіброзу III стадії не виявлялися (табл. 6.1).

Динамічне морфометричне дослідження засвідчило прогресуюче погіршення показників стану альвеолярного апарату та наростання фіброзних розростань у легенях опромінених тварин, причому зазначені зміни були більш вираженими за дії дози 7,0 Гр. Формування та стабілізація радіаційно індукованого фіброзу характеризувалися зменшенням площі альвеол у 1,1 та 1,3 раза і одночасним збільшенням площі сполучнотканинних розростань у (3,8–3,3) раза наприкінці третього та шостого місяців спостереження відповідно (рис. 6.1 а, б).



а



б

**Рис. 6.1** Вплив профілактично-лікувального введення ліпосомальної форми кверцетину (ЛФ) на морфометричні прояви фіброзу легень після тотального опромінення тварин у дозі 7,0 Гр (ум.од; % від контролю) у динаміці спостереження.

Примітка. а – площа альвеол;

б – площа фіброзних розростань.

Порівняльний аналіз засвідчив наявність вираженого профілактично-лікувального ефекту ліпосомальної форми кверцетину відносно формування фіброзних змін у легенях, порівняно з тваринами, які зазнали лише опромінення. Це проявлялося збільшенням функціональної поверхні альвеол у 1,4 та 1,3 раза (рис. 6.1 а) і зменшенням загальної площі сполучнотканинних новоутворень у легеневій тканині у 1,5 та 1,7 раза на третьому і шостому місяцях спостереження відповідно (рис. 6.1 б). Водночас встановлено, що ЛФ здатна практично нівелювати вплив опромінення на зміну площі альвеол респіраторного відділу легень, стабілізуючи цей показник на рівні біологічного контролю.

Результати морфометричного аналізу корелювали з даними визначення вмісту сумарного колагену у сполучнотканинному матриксі легенів. Незалежно від величини променевого навантаження, опромінення супроводжувалося підвищенням рівня колагену, що посилювалося з перебігом часу. Профілактично-лікувальне введення ЛФ виявилось чинником цілеспрямованої регуляції цього показника, з достовірним ефектом у віддалені строки після опромінення (табл. 6.2).

Таблиця 6.2.

**Вплив профілактично-лікувального введення ліпосомальної форми кверцетину (Ліпофлавіон) на вміст сумарного колагену у легенях щурів після тотального опромінення**

Термін після опромінення	Група тварин	Кількість тварин, n	Сумарний колаген (мкмоль гідроксипроліну/г тканини) $\bar{x} \pm S\bar{x}$	p	p <sub>1</sub>
1	2	3	4	5	6
30 днів	Біологічний контроль	9	47,4 ± 3,0	-	-
	I (O <sub>5,5</sub> Гр)	10	51,3 ± 3,7	0,343	-
	III (O <sub>7,0</sub> Гр)	10	55,4 ± 3,6	0,125	-
	II (ЛФ+O <sub>5,5</sub> Гр)	10	49,6 ± 3,2	0,427	0,257
	IV (ЛФ+O <sub>7,0</sub> Гр)	10	51,2 ± 3,7	0,421	0,329

Кінець табл. 6.2

1	2	3	4	5	6
90 днів	Біологічний контроль	8	58,7 ± 3,9	-	-
	I (O <sub>5,5</sub> Гр)	10	69,6 ± 3,6	0,061	-
	III (O <sub>7,0</sub> Гр)	10	77,4 ± 4,3 *	0,051	-
	II (ЛФ+O <sub>5,5</sub> Гр)	10	57,2 ± 4,1	0,123	0,344
	IV (ЛФ+O <sub>7,0</sub> Гр)	10	61,7 ± 4,0	0,129	0,275
180 днів	Біологічний контроль	9	60,2 ± 3,9	-	-
	I (O <sub>5,5</sub> Гр)	10	75,1 ± 4,5 *	0,049	-
	III (O <sub>7,0</sub> Гр)	10	88,7 ± 4,6 *	0,034	-
	II (ЛФ+O <sub>5,5</sub> Гр)	10	60,2 ± 3,8 **	0,525	0,031
	IV (ЛФ+O <sub>7,0</sub> Гр)	10	65,8 ± 3,9 **	0,349	0,015

Примітка. n – кількість тварин у групі, що вижили після опромінення, на термін проведення експерименту;

p – при порівнянні з біологічним контролем;

p1 – при порівнянні з опроміненням.

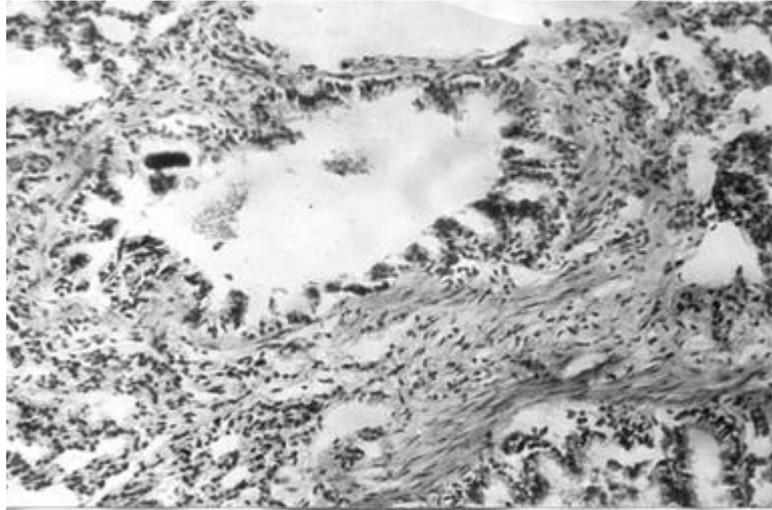
На третьому місяці спостереження дія препарату проявлялася зниженням вмісту колагену у 1,2 раза порівняно з тваринами, опроміненими у дозі 5,5 Гр, та стабілізацією його рівня в межах біологічного контролю. Через шість місяців після опромінення у дозах 5,5 і 7,0 Гр застосування ЛФ забезпечувало достовірне зменшення вмісту колагену у сполучнотканинному матриксі легенів у 1,4 та 1,3 раза відповідно.

Характер впливу ліпосомальної форми кверцетину на морфологічну організацію легеневої тканини опромінених і пролікованих тварин відповідав антифібротичним ефектам, встановленим за результатами морфометрії та біохімічного аналізу колагену.

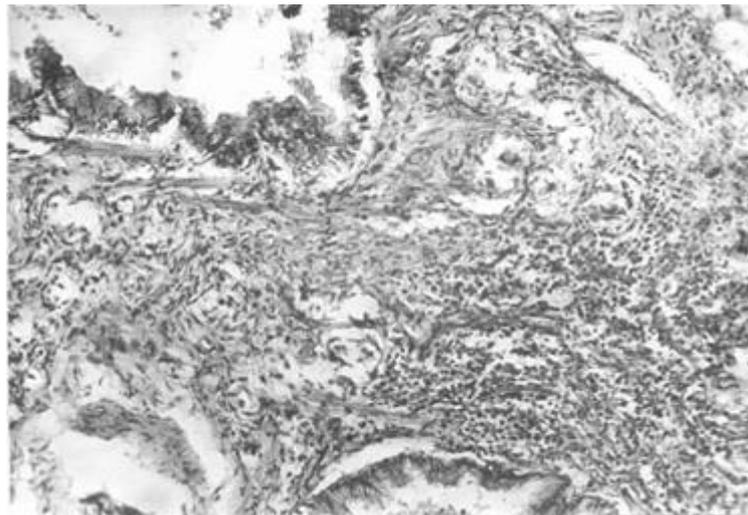
Через один місяць після опромінення у дозі 7,0 Гр у легенях відзначали поєднання реактивних запальних змін із формуванням пучкових сполучнотканинних структур, які поступово заміщувалися фіброзними осередками. На 90-ту добу експерименту виявлялися значні ділянки фіброзної

тканини з хаотично орієнтованими фібробластичними тяжами, локалізованими переважно міжальвеолярно та перибронхіально (рис. 6.2). Через шість місяців після опромінення у легеневій тканині реєстрували великоосередкові дистрофічні зміни респіраторних структур: у центральних відділах міжальвеолярних перегородок визначалися волокнисті оксифільні прошарки, які в перибронхіальних зонах переходили у широкі поля фіброзних волокон із яскраво базофільними ядрами. Подекуди виявлялися поодинокі дрібні капіляри на тлі переважно облітерованих товстостінних артеріол (рис. 6.3). За опромінення у дозі 5,5 Гр розвиток фіброзних змін мав аналогічну спрямованість, проте загалом характеризувався меншою інтенсивністю порівняно з дозою 7,0 Гр.

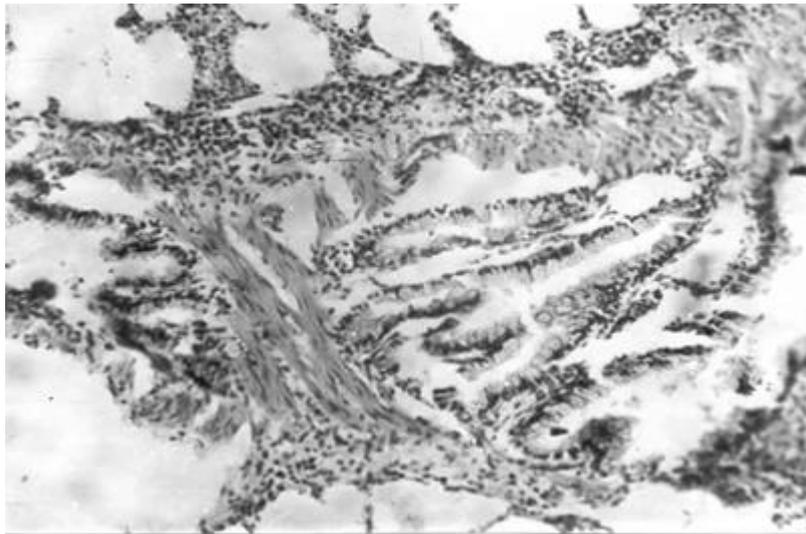
Протифібротична ефективність ліпосомальної форми кверцетину, застосованої за профілактично-лікувальною схемою на тлі опромінення у дозі 7,0 Гр, проявлялася у збереженні морфологічної цілісності специфічних структур респіраторного відділу легень. У віддалені строки спостереження переважали відносно інтактні паренхіматозні структури з помірно розвиненою капілярною мережею, на тлі дещо зменшених альвеол і потовщених альвеолярних перегородок; фіброзні прошарки у міжальвеолярних перегородках виявлялися лише в окремих осередках (рис. 6.4 та 6.5). Через шість місяців після опромінення та лікування вузькі зони фіброзних розростань перибронхіальної і периваскулярної локалізації не перевищували (10–15) % площі легень, що узгоджується з результатами морфометричної оцінки стадій фіброзу (табл. 6.1).



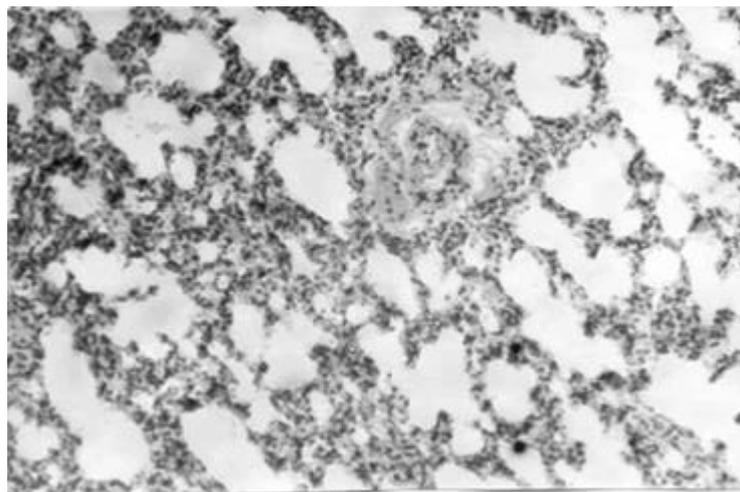
**Рис. 6.2** Легені щурів через 3 місяці після опромінення у дозі 7,0 Гр.  
Подовжньо і хаотично орієнтовані крупноволокнисті сполучнотканинні тяжі.  
Гематоксилін-еозин, х 500.



**Рис. 6.3** Легені щурів через 3 місяці після опромінення у дозі 7,0 Гр.  
Широкі поля фіброзних волокон. Гематоксилін-еозин, х 500.



**Рис. 6.4** Легені щурів, які одержували ЛФ, через 3 місяці після опромінення у дозі 7,0 Гр. Вузькі фіброзні тяжі серед клітинних утворень. Гематоксилін-еозин, х 500.



**Рис. 6.5** Легені щурів, які одержували ЛФ, через 3 місяці після опромінення у дозі 7,0 Гр. Мережа зменшених альвеол серед розширених альвеолярних перегородок. Гематоксилін-еозин, х 500.

Таким чином, уперше отримано дані щодо наявності радіозахисних властивостей у спектрі фармакологічної активності кверцетину в ліпосомальній системі транспорту (Ліпофлавіон) та його ефективності у профілактиці й пом'якшенні радіаційно індукованих фіброзів, етіологічно наближених до віддалених фібротичних наслідків гострого респіраторного дистрес-синдрому.

Морфологічними дослідженнями встановлено, що застосування Ліпофлавону у профілактично-лікувальному режимі супроводжується відсутністю гострих запальних реакцій, нормалізацією рівня сумарного колагену у сполучнотканинному матриксі легенів до показників біологічного контролю, гальмуванням формування та вираженості фіброзних змін (на рівні II стадії) і сприяє збереженню паренхіматозних структур легень через 3 і 6 місяців після гострого опромінення.

Аспіраційні події, зумовлені потраплянням агресивних рідин у дихальні шляхи, відомі своєю високою небезпекою не лише для респіраторної системи, а й для суміжних органів та тканин. Доведено, що внаслідок таких ушкоджень досить часто формуються тяжкі ускладнення з боку органу зору, які проявляються у вигляді поєднаних опікових і запальних уражень рогівки та кон'юнктиви [189, 190]. Патогенетично це пов'язано з розвитком інтенсивної місцевої запальної реакції, що супроводжується вивільненням цитокінів, активацією нейтрофілів, підвищенням оксидативного стресу та прогресуючим пошкодженням епітелію рогівки [190].

У сучасній офтальмології все більше уваги приділяється пошуку терапевтичних стратегій, здатних не лише зменшувати запальну відповідь, але й стимулювати процеси регенерації пошкоджених структур ока. До оптимальних підходів належать застосування засобів, які мають виражений протизапальний ефект у поєднанні з антиоксидантними та цитопротекторними властивостями [189, 191]. Особливу увагу приділяють також формам лікарських засобів, придатним для періокулярного введення, оскільки такий спосіб забезпечує більш глибоке проникнення активних речовин до строми рогівки та інших відділів переднього сегмента ока [190].

Серед них важливе місце посідає ліпосомальна форма кверцетину (Ліпофлавіон) – природного флавоноїду з відомими антиоксидантними, протизапальними та антиапоптозними властивостями [155, 156]. Попередні експериментальні дослідження, та отримані нами дані, продемонстрували його здатність зменшувати інтенсивність запальної інфільтрації, пригнічувати надмірне утворення активних форм кисню та сприяти регенерації епітелію рогівки [191, 192].

У цьому контексті було проведено оцінку терапевтичного ефекту інстиляцій та субтенонального введення Ліпофлакону при моделюванні експериментального кислотного опіку рогівки у кролів, що може супроводжувати гостру кислотну аспірацію.

Вже у першу добу після відтворення кислотного опіку та протягом 14 днів спостереження реєструвалися характерні клінічні прояви ураження: помутніння та набряк рогівки у ділянці контакту з кислотою, дифузна гіперемія, виражений набряк кон'юнктиви та надмірне сльозовиділення. Такі зміни відповідають клінічній картині опіку II ступеня тяжкості (табл. 6.3) [157].

У післяопіковому періоді не відзначалося прогресуючого поширення реактивних змін на сусідні ділянки рогівки. Ймовірно, це пов'язано з коагуляційним ефектом – локальною денатурацією білкових структур у зоні дії кислоти, яка чинить квазі-захисний вплив на глибші шари рогівки та обмежує проникнення ушкоджуючого агента [157, 158]. Чітке обмеження зони ураження лише ділянкою прямого контакту з кислотою дозволило здійснювати верифікацію ушкоджень за показниками фіксованих площ помутніння рогівки (1/4, 1/2 або понад 1/2 від загальної площі), що надало можливість стандартизованої оцінки морфологічних змін (табл. 6.3).

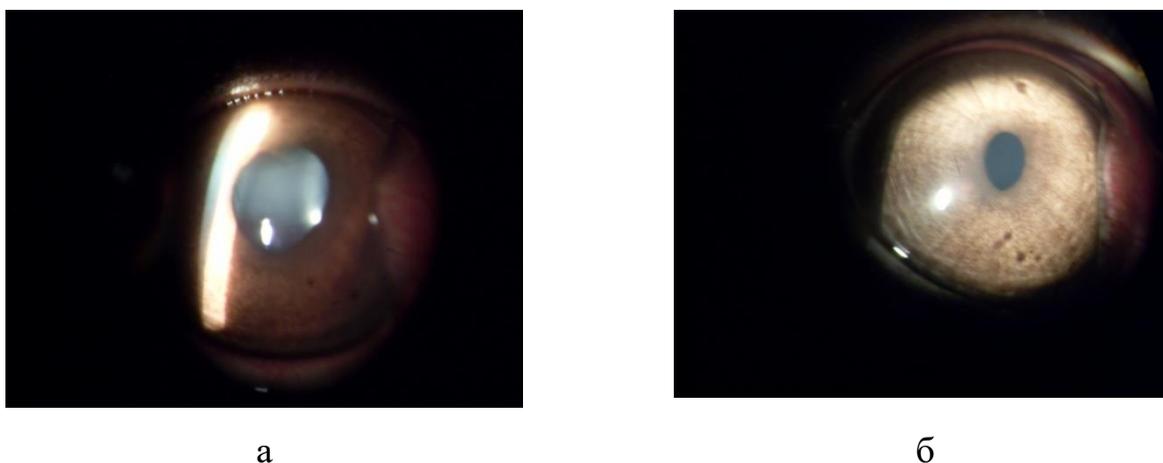
Таблиця 6.3.

**Вплив Ліпофлакону на зміни площі помутніння рогівки при кислотному опіку (n=7)**

Групи тварин	Кількість очей у групі тварин із частиною площі помутніння рогівки на термін спостереження:											
	2 доба			4 доба			6 доба			14 доба		
	1/4	1/2	>1/2	1/4	1/2	>1/2	1/4	1/2	>1/2	1/4	1/2	>1/2
Група 1 – Контроль	-	1	6	-	2	5	-	3	4	-	3	4
Група 2 – Субтенональне введення ЛФ	2	-	5	2	5	-	6	1	-	7	-	-
Група 3 – Інстиляції ЛФ	2	-	5	1	6	-	2	5	-	5	2	-

На фоні застосування ліпосомальної форми кверцетину (ЛФ) ураження рогівки характеризувалося значно швидшою позитивною динамікою, ніж у контрольній групі. Уже на 4-ту добу спостереження не виявлялися випадки помутніння, що охоплювали понад половину початкової площі опіку. Для порівняння, у контрольних тварин аналогічні ушкодження реєструвалися у 5 з 7 випадків і зберігалися у 4 з 7 до завершення 14-ї доби експерименту (табл. 6.3) [159].

Як при інстиляційному, так і при субтеноновому введенні препарату, до кінця 14-ї доби у більшості випадків відзначалося лише ніжне помутніння рогівки, обмежене чвертю площі первинного опіку. Так, після курсу інстиляцій подібна динаміка спостерігалася у 5 із 7 випадків, тоді як на фоні субтенонових ін'єкцій – у 7 із 7 тварин. При цьому морфологічна картина у групі субтенонового введення відзначалася мінімально вираженим хмароподібним помутнінням, яке було ледве помітним навіть при детальному офтальмологічному огляді (рис. 6.6) [159, 160, 161].



**Рис. 6.6** Око кроля після кислотного опіку рогівки та лікування за схемою субтенонового введення ЛФ.

Примітка. а – через 3 доби;

б – через 7 діб.

У таблиці 6.4 наведено результати оцінки сумарної запальної відповіді за тестом Дрейза, що включає сукупний бал для рогівки, райдужки та

кон'юнктиви. Аналіз показав, що регенеративні процеси у структурах переднього відділу ока після кислотного опіку супроводжувалися поступовим зниженням вираженості запальної реакції рогівки та кон'юнктиви. При цьому відзначалося прискорене зменшення таких проявів, як набряк та помутніння рогівки, а також набряк і гіперемія кон'юнктиви, що було найбільш помітним у перші 15 діб експерименту [162].

Таблиця 6.4

**Вплив ліпосомальної форми кверцетину на динаміку запальної реакції ока при кислотному опіку рогівки кролів (n=7)**

Група тварин	Структури переднього відділу ока	Сумарна запальна реакція (бали) на термін спостереження (доба)						
		Опік	2	4	6	7	10	14
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Група 1 – Контроль	рогівка	17,9±0,7	16,4± 0,7	13,6± 0,7	11,4± 0,7	6,3± 0,9	1,4± 0,3	0,7± 0,7
	райдужка	0	0	0	0	0	0	0
	кон'юнктива	8,9±0,3	8,6± 0,3	8,0± 1,1	5,7± 0,8	2,9± 0,3	2,6± 0,3	0,3± 0,2
	сума балів	26,8	25,0	21,6	17,1	9,2	4,0	1,0
Запальна реакція, %		-	6,7	19,4	36,2	65,6	85,0	96,0
Група 2 – Субтенонове введення ЛФ	рогівка	18,6±0,7	14,3± 0,7	6,4± 0,7*	1,4± 0,7*	0	0	0
	райдужка	0	0	0	0	0	0	0
	кон'юнктива	10,3±0,7	6,9± 1,1	3,1± 0,6*	1,4± 0,3*	0	0	0
	сума балів	28,9	21,2	9,5	2,8	0	0	0
	П/з ефект,%	-	26,6	67,1	90,3	100	100	100

Кінець табл. 6.4

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Група 3 – Інстиляції ЛФ	рогівка	19,3±0,7	14,3± 0,7	8,6± 0,7*	3,6± 0,7*	4,0± 1,0	0	0
	райдужка	0	0	0	0	0	0	0
	кон'юнктива	10,0±0,0	8,9± 0,3	6,6± 0,3^	3,4± 0,6^	0	0	0
	сума балів	29,3	23,2	15,2	7,0	4,0	0	0
	П/з ефект,%	-	20,8	48,1	76,1	86,3	100	100

Примітка. \* – рівень значимості відмінностей показників в порівнянні з контролем,  $p \leq 0,05$ ;

^ – рівень значимості відмінностей показників в порівнянні між групами які отримували лікування;

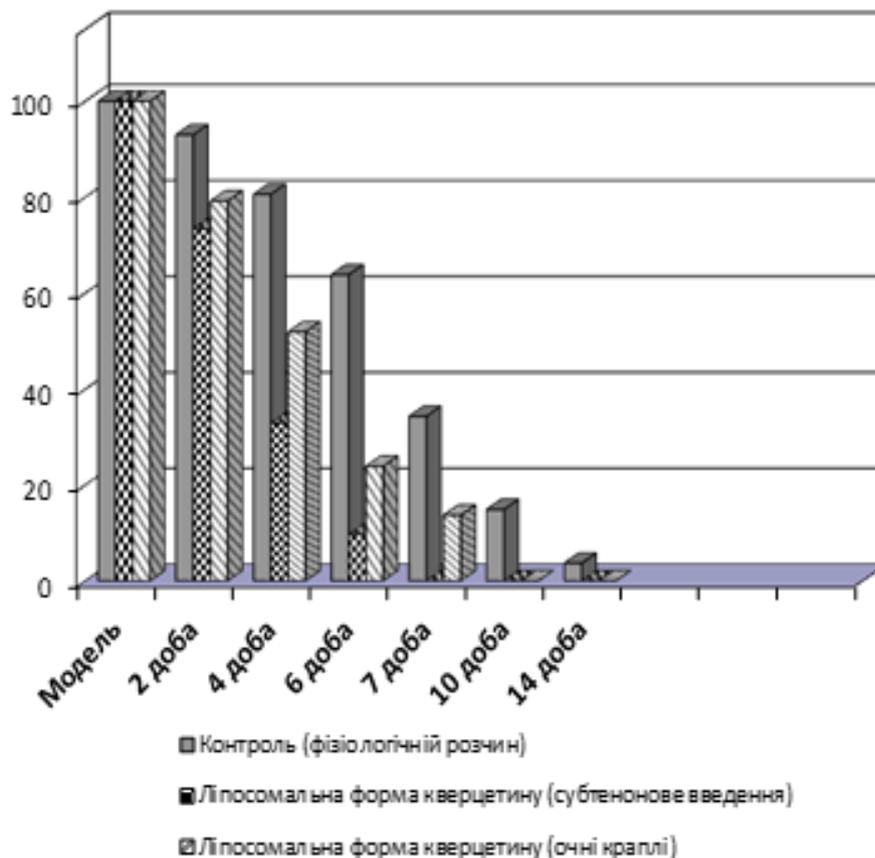
П/з – протизапальний ефект, %.

У контрольній групі тварин запальна реакція мала більш затяжний характер і зберігалася до 25 діб, причому виразність патологічних змін у кон'юнктиві була більш значною. На відміну від цього, застосування ЛФ у вигляді інстиляцій або субтенозових ін'єкцій забезпечувало істотно швидшу регресію запалення. Зокрема, на 4-ту добу після ураження інтенсивність запалення становила у середньому 15,2 бала для інстиляцій та 7,0 бала для субтенозового введення, тоді як у контрольній групі цей показник дорівнював 25 балів. На 6-ту добу значення складали відповідно 9,5 та 2,8 бала проти контрольних 25 балів. Уже на 10-ту добу в обох дослідних групах інтенсивність запалення знижувалася до 0 балів, тоді як у контролі вона ще залишалася на рівні 4,0 бала [162, 163].

Протягом усього періоду спостереження реєструвався стабільно виражений протизапальний ефект субтенозового введення, який на (15–20) % перевищував аналогічний вплив крапельної форми ЛФ. Це свідчить про перевагу періокулярного способу доставки препарату в умовах моделювання важкого кислотного опіку ока, що узгоджується з даними сучасних досліджень

щодо ефективності локальних ін'єкційних методик у терапії офтальмологічних уражень [159, 163, 164].

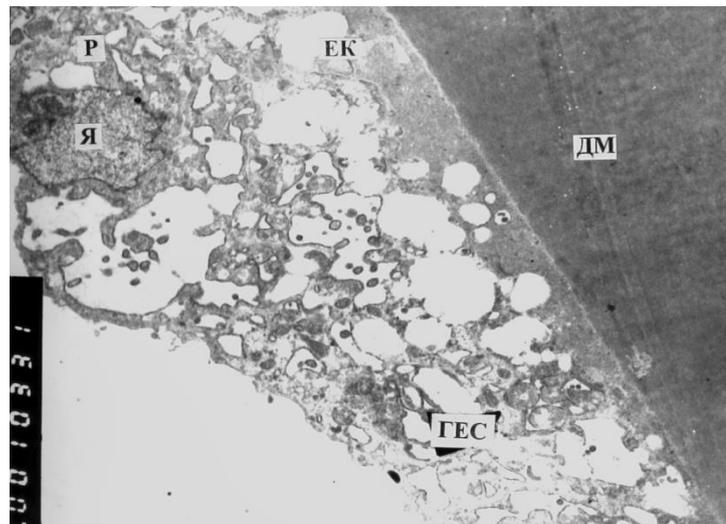
Уже з 4-ї доби вираженість запальної реакції у тварин, яким вводили препарат субтеноновим способом, суттєво знижувалася. Зокрема, сума балів у комплексі (рогівка + кон'юнктива) зменшилася на 67,1 % у порівнянні з вихідним рівнем. Отримані показники достовірно відрізнялися від контрольної групи та групи інстиляцій, що свідчить про перевагу субтенонових ін'єкцій у реалізації протизапальної дії ЛФ (рис. 6.7) [160, 201].



**Рис. 6.7** Динаміка запальної реакції структур переднього відділу ока кролів при кислотному опіку рогівки та при лікуванні ЛФ.

Додатковим підтвердженням регенеративного та протизапального ефекту ЛФ стали результати ультраструктурного аналізу стану рогівки в умовах кислотного опіку. Протягом 15 діб після моделювання ушкодження у

передньому епітелії та стромі зберігалися набряк клітин та наявність поодиноких кератоцитів із патологічними ознаками (рис. 6.8). Водночас у контрольній групі подібні зміни мали більш виражений і тривалий характер. Ендотеліальні клітини у тварин із кислотним ураженням демонстрували ознаки функціональної дестабілізації: значно розширені цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки (ГЕС), зниження кількості вільних рибосом та полісом, що свідчить про порушення білоксинтезувальної активності [202, 203].

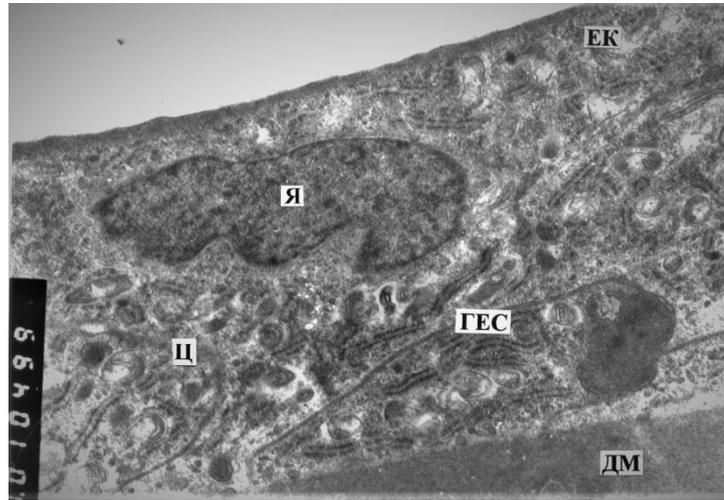


**Рис. 6.8** Ультраструктура рогівки після моделювання кислотного опіку II-го ступеня тяжкості. Виражена балонна дистрофія клітин заднього епітелію. Електронна мікрофотографія: X 10 000.

Примітка. РГ – рогівка, ДМ – десцеметова мембрана, ЕК – ендотеліальна клітина, Я – ядро, ГЕС – гранулярна ендоплазматична сітка.

Застосування ліпосомальної форми кверцетину (ЛФ), зокрема субтенонових ін'єкцій, призводить до практично повного зникнення клінічних ознак запалення та набряку ендотеліальних клітин, а також до нормалізації ультраструктури інших шарів рогівки [204, 205]. При цьому спостерігається можливе стимулювання метаболічних процесів у клітинах рогівки, що проявляється підвищенням вмісту вільних рибосом, полісом та мітохондрій [206, 207] (рис. 6.9). Такі дані свідчать про активацію білоксинтезувальних та

енергетичних механізмів у пошкоджених клітинах, що є важливим для процесів регенерації.



**Рис. 6.9** Ультраструктура рогівки після субтенозових ін'єкцій ЛФ на фоні кислотного опіку II-го ступеня тяжкості. Дистрофія клітин епітелію не спостерігається. Ендотеліальні клітини з ознаками підвищення метаболічної активності. Електронна мікрофотографія: X 8 000.

Примітка. ДМ – десцеметова мембрана, ЕК – ендотеліальна клітина рогівки, Я – ядро, Ц – цитоплазма, ГЕС – гранулярна ендоплазматична сітка.

Результати проведеного дослідження вперше продемонстрували виражені репаративні та протизапальні властивості Ліпофлавонолу – ліпосомальної форми кверцетину – у моделі кислотного опіку рогівки II-го ступеня тяжкості [194]. Було встановлено, що періодичні субтенозові ін'єкції препарату забезпечують більш високий рівень фармакотерапевтичного протиопікового ефекту порівняно з повторними щоденними інстиляціями, а також сприяють поліпшенню комплаєнсу у тварин [204, 205]. Отримані дані свідчать про перевагу періокулярного способу доставки ЛФ як перспективного методу для оптимізації лікування кислотних опіків рогівки, що включає поєднання протизапальної, антиоксидантної та репаративної дії [206].

Порівняльний аналіз динаміки протизапальної та репаративної дії ліпосомальної форми кверцетину (ЛФ) за різних шляхів введення засвідчив її

ефективність при кислотному ураженні рогівки. Встановлено, що ін'єкційне субтенонове застосування препарату за періодичною клінічною схемою (введення 1 мл емульсії кожні 5 діб) виявилось не менш конкурентоздатним, ніж щоденні інстиляції, при цьому забезпечуючи виражений лікувальний ефект [160, 164].

Особливості впливу ЛФ на відновлення структур ока та супровідні метаболічні процеси залишаються перспективною темою для подальшого поглибленого дослідження [160, 208]. Це відкриває можливості для подальшого розвитку ефективних терапевтичних стратегій у лікуванні хімічних опіків рогівки та інших деструктивно-запальних станів переднього сегмента ока.

У шостому розділі узагальнено результати експериментальної оцінки лікувально-профілактичної ефективності ліпосомальної форми кверцетину (Ліпофлавіон) за умов формування віддалених фібротичних змін легень та кислотного опіку рогівки.

1. У моделі тотального опромінення (5,5 і 7,0 Гр) підтверджено розвиток дозо- та часозалежного радіаційно індукованого фіброзу легень із прогресуючим зменшенням площі альвеол, наростанням сполучнотканинних розростань і підвищенням вмісту сумарного колагену у віддалені строки спостереження (90–180 діб).
2. Профілактично-лікувальне застосування Ліпофлавіону достовірно гальмувало формування та прогресування фіброзу: зменшувалася частота тяжких стадій ураження, обмежувався розвиток III стадії при дозі 7,0 Гр, а також знижувалася площа фіброзних розростань із одночасним збереженням функціональної поверхні альвеол.
3. Морфометричні показники узгоджувалися з біохімічними даними: введення Ліпофлавіону запобігало надмірному накопиченню колагену в легеневій тканині та у віддалені терміни забезпечувало його рівень, наблизений до біологічного контролю. Це свідчить про цілеспрямований антифібротичний ефект препарату.

4. Морфологічно встановлено, що за умов застосування ліпосомального кверцетину зберігалася структурна організація респіраторного відділу легень, зменшувалася вираженість міжальвеолярних і перибронхіальних фіброзних змін, підтримувалася капілярна мережа, що підтверджує його радіопротекторні та протекторні властивості щодо паренхіми легень.

5. У моделі кислотного опіку рогівки II ступеня Ліпофлавіон забезпечував прискорену регресію клінічних проявів ушкодження (набряк, гіперемія, помутніння), зменшення площі ураження та швидше відновлення прозорості рогівки порівняно з контролем.

6. За результатами оцінки сумарної запальної реакції (тест Дрейза) встановлено істотне скорочення тривалості та інтенсивності запалення при застосуванні препарату. Найбільш виражений ефект спостерігався при субтеноновому введенні, яке забезпечувало швидшу нормалізацію стану рогівки та кон'юнктиви порівняно з інстиляційним шляхом.

7. Ультраструктурний аналіз підтвердив цитопротекторну та репаративну дію Ліпофлавіону: зменшувалися ознаки дистрофії епітеліальних і ендотеліальних клітин, нормалізувалася організація гранулярної ендоплазматичної сітки, збільшувалася кількість рибосом і мітохондрій, що свідчить про активацію білоксинтезувальних та енергетичних процесів у клітинах рогівки.

8. Порівняльний аналіз шляхів введення показав перевагу періокулярного (субтенонового) способу доставки ліпосомальної форми кверцетину, який забезпечує більш стабільний протизапальний і репаративний ефект при меншій кратності введень.

Узагальнення отриманих результатів підтверджує, що ліпосомальна система транспорту кверцетину реалізує комплексну антиоксидантну, протизапальну, антифібротичну та цитопротекторну дію як при системному радіаційному ушкодженні, так і при локальному хімічному опіку. Це обґрунтовує перспективність Ліпофлавіону як засобу для профілактики та

лікування фібротичних і деструктивно-запальних процесів різної етіології що засвідчено у нововведенні.

## РОЗДІЛ 7

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Результати, отримані в ході дисертаційного дослідження, дозволяють системно охарактеризувати механізми реалізації протизапальної, цитопротекторної та антифібротичної дії кверцетину, а також уточнити роль систем його доставки у формуванні фармакологічного ефекту за умов гострих і віддалених ушкоджень легень та інших органів. Узагальнення даних *in silico* та експериментальних досліджень показує, що біологічна активність кверцетину реалізується одночасно на кількох взаємопов'язаних патогенетичних рівнях, причому її вираженість суттєво залежить від лікарської форми.

Результати молекулярного моделювання свідчать, що протизапальна дія кверцетину має поліфакторний характер і не зводиться до інгібування окремої мішені. Встановлено його здатність взаємодіяти з ключовими компонентами метаболізму арахідонової кислоти та сигнальними молекулами запалення, що забезпечує одночасну модифікацію декількох ланок запальної відповіді.

Зокрема, показано, що параметри зв'язування кверцетину з ЦОГ-1 і ЦОГ-2 є співставними з такими для класичних нестероїдних протизапальних засобів. При цьому взаємодія реалізується за участю амінокислотних залишків активного центру, характерних для конкурентних інгібіторів. Відсутність вираженої селективності до ізоформ ЦОГ вказує на те, що пригнічення простаноїдного шляху є лише одним із механізмів загальної протизапальної дії.

Додатково встановлено взаємодію кверцетину з MAPK14 (p38 MAPK), що має ключове значення у регуляції синтезу прозапальних цитокінів. Таким чином, вплив на MAPK-залежні сигнальні каскади доповнює модифікацію ейкозаноїдного обміну. Важливим компонентом є також взаємодія з ферментами ліпоксигеназного шляху, зокрема з лейкотрієн-А<sub>4</sub> гідролазою, що пов'язано з хелатувальними властивостями кверцетину та його здатністю координувати іон цинку.

Окрему роль відіграє вплив на індуковану синтазу оксиду азоту. Формування комплексу з гемовим кофактором iNOS свідчить про можливість регуляції NO-залежних механізмів запалення, що є важливим для розвитку системних і легеневих уражень. Сукупність цих даних створює теоретичну основу для подальшого експериментального вивчення ефективності спеціалізованих систем доставки кверцетину.

Експериментальні дослідження *in vivo* показали, що лікарська форма суттєво впливає на ступінь реалізації протизапального ефекту. Ліпосомальна форма кверцетину забезпечує більш стабільну та відтворювану антиексудативну дію, що проявляється в різних моделях гострого запалення і супроводжується чіткою залежністю «доза-ефект».

Менша ефективність Корвітину, ймовірно, пов'язана з обмеженням біодоступності активної речовини внаслідок особливостей його фармацевтичної матриці. Це знижує здатність препарату повною мірою впливати на різні медіаторні системи запалення. Отримані результати підкреслюють визначальну роль системи доставки у формуванні фармакологічної відповіді.

Подальша оптимізація складу привела до створення ліпосомальної композиції кверцетину з іонами цинку. Поєднання антиоксидантних властивостей флавоноїду з біологічною активністю іонів  $Zn^{2+}$ , а також покращення фізико-хімічних характеристик системи транспорту сприяли підвищенню антиексудативної ефективності, що обґрунтовує перспективність цієї композиції для подальших досліджень.

У моделі гострого респіраторного дистрес-синдрому встановлено, що фармакологічна дія ліпосомального кверцетину пов'язана з впливом на ключові механізми гострого запалення, включаючи системну запальну відповідь, порушення мікроциркуляції та активацію гемостазу. Ліпосомальна система транспорту забезпечує більш ефективне надходження активної речовини до уражених ділянок легеневої тканини.

Це супроводжується покращенням виживаності тварин, зменшенням проявів дихальної недостатності, стабілізацією маси тіла та нормалізацією гематологічних показників. Морфологічно відзначено зниження ексудації, клітинної інфільтрації та ушкодження альвеолярно-капілярного бар'єра. Додавання іонів цинку підсилює терапевтичний ефект, що, ймовірно, пов'язано з їх мембраностабілізуючими та імуномодулюючими властивостями.

Таким чином, використання ліпосомальних форм кверцетину є обґрунтованим підходом до корекції гострого ушкодження легень та може розглядатися як засіб профілактики тяжких ускладнень.

Подальший аналіз був спрямований на оцінку впливу препарату на віддалені наслідки запалення. Встановлено, що розвиток фіброзу є результатом тривалої активації запальних та оксидативних процесів, а також порушення регуляції позаклітинного матриксу.

Показано залежність тяжкості фіброзних змін від інтенсивності первинного ушкодження, що визначає подальший перебіг ремоделювання легеневої тканини. У віддалені терміни переважали початкові стадії фіброзу, що свідчить про тривалий характер патологічного процесу.

Застосування ліпосомального кверцетину супроводжувалося уповільненням прогресування фіброзу, зменшенням площі сполучнотканинних розростань та збереженням структури легеневої тканини. Це підтверджувалося також нормалізацією вмісту колагену, що свідчить про вплив як на морфологічному, так і на молекулярному рівнях.

Окремо досліджено вплив препарату на кислотні ушкодження рогівки. Показано, що ліпосомальний кверцетин зменшує вираженість місцевої запальної реакції, знижуючи набряк, гіперемію та помутніння.

Порівняння шляхів введення виявило переваги субтенонового застосування, яке забезпечує пролонговану дію за рахунок формування локального депо препарату. Ультраструктурні дані підтверджують відновлення функціонального стану клітин рогівки.

Отримані результати узгоджуються між собою і свідчать про те, що ефективність кверцетину визначається не лише його власними властивостями, але й характеристиками системи доставки, способом введення та умовами патологічного процесу. Це відкриває перспективи для подальших досліджень і практичного застосування.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено актуальне наукове завдання, що полягає в обґрунтуванні протизапальних, протекторних, антифібротичних і радіозахисних властивостей кверцетину у різних системах транспорту та встановленні механізмів їх дії в умовах гострого респіраторного дистрес-синдрому різного генезу.

1. На основі комплексного підходу (*in silico*, *in vitro*, *in vivo*) встановлено мультимішеневий характер протизапальної дії кверцетину. Його реалізація відбувається через інгібування ключових ланок запального каскаду: метаболізму арахідонової кислоти (ЦОГ-1 та ЦОГ-2), сигнальних шляхів MAPK14, а також зниження експресії прозапальних цитокінів (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) та ензимів iNOS і ЦОГ-2.

2. Інформаційно та експериментально підтверджено ефективність лікарських форм Ліпофлавіон (ліпосомальна форма) та Корвітин (форма на платформі повідону) як систем транспорту кверцетину. Показано, що ліпосомальна форма забезпечує підвищену біодоступність і більш повну реалізацію фармакологічного потенціалу діючої речовини, з формуванням стабільної залежності «доза-ефект».

3. Доведено виражену антиексудативну та протизапальну активність систем транспорту кверцетину в класичних моделях гострого запалення та в моделях ГРДС, індукованого соляною кислотою та ліпополісахаридом. Ліпофлавіон перевищує Корвітин за ефективністю, особливо за мінімальних доз і при комбінованому інгаляційному та парентеральному введенні, що підтверджує перспективність розширення показань до їх медичного застосування.

4. У верифікованій HCl-моделі ГРДС виявлено виражений лікувально-профілактичний ефект кверцетину у різних системах транспорту: підвищення виживаності до (80–100) %, зменшення морфологічних ознак ушкодження легеневої тканини і фібротичного ремоделювання. Показано можливість їх

фармакотерапевтичної трансляції у лікування як гострих, так і віддалених наслідків ГРДС.

5. Встановлено, що системи транспорту кверцетину модулюють цитокіновий профіль та запобігають розвитку цитокінової дисрегуляції при тяжкому перебігу ГРДС, забезпечуючи збереження структурно-функціональної цілісності легеневої тканини. Виявлено, що ліпосомальний кверцетин проявляє радіозахисні властивості, які реалізуються через підвищення виживаності, корекцію гематологічних порушень і профілактику радіаційно-індукованих ушкоджень легень.

6. Вперше доведено антифібротичну ефективність Ліпофлавону у віддалені терміни після гострого опромінення. Показано зниження частоти та ступеня фіброзу, обмеження процесу до I–II стадій, зменшення сполучнотканинних розростань, нормалізацію вмісту колагену та відновлення функціональної поверхні альвеол. Підтверджено його цілеспрямований вплив на запально-фібротичний каскад, споріднений із механізмами фіброзоутворення при ГРДС.

7. Вперше експериментально доведено ефективність ліпосомального кверцетину при кислотному ураженні рогівки, асоційованому з аспіраційним ГРДС. Продемонстровано його протизапальну та репаративну дію за інстиляційного та субтенонового введення, що розширює уявлення про органопротекторний потенціал систем транспорту кверцетину.

8. Розроблено оригінальну ліпосомальну композицію кверцетину з іонами цинку з підтвердженими фізико-хімічними характеристиками складу. В експериментальних моделях ГРДС доведено її конкурентну фармакологічну активність при різних парентеральних способах введення, що обґрунтовує застосування у новому способі лікування ГРДС. Інноваційність розробки захищена патентом США (Pat. US App. N 18399141).

9. Отримані результати свідчать про доцільність використання систем транспорту кверцетину як перспективного напрямку у лікуванні гострих і віддалених уражень, що супроводжуються запально-фібротичними змінами, та обґрунтовують необхідність подальших досліджень.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Feldman C., Shaddock E. Epidemiology of lower respiratory tract infections in adults. *Expert Rev Respir Med.* 2019. Vol. 13. N 1. P. 63–77. DOI: [10.1080/17476348.2019.1555040](https://doi.org/10.1080/17476348.2019.1555040)
2. Meyer N.J., Gattinoni L., Calfee C.S. Acute respiratory distress syndrome. *Lancet.* 2021. Vol. 398. N 10300. P. 622-637. DOI: [10.1016/S0140-6736\(21\)00439-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00439-6)
3. Meftahi G.H., Bahari Z., Jangravi Z. et al. A vicious circle between oxidative stress and cytokine storm in ARDS pathogenesis. *Ukr Biochem J.* 2021. Vol. 93. N 1. P. 18–29. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj93.01.018>
4. Empson S., Rogers A.J., Wilson J.G. COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome: One Pathogen, Multiple Phenotypes. *Crit Care Clin.* 2022. Vol. 38. N 3. P. 505-519. DOI: [10.1016/j.ccc.2022.02.001](https://doi.org/10.1016/j.ccc.2022.02.001)
5. Mahmudpour M., Roozbeh J., Keshavarz M. et al. COVID-19 cytokine storm: The anger of inflammation. *Cytokine.* 2020. Vol. 133. P. 155151. DOI: [10.1016/j.cyto.2020.155151](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155151)
6. Cichon N., Grabowska W., Gorniak L. et al. Mechanistic and Therapeutic Insights into Flavonoid-Based Inhibition of Acetylcholinesterase: Implications for Neurodegenerative Diseases. *Nutrients.* 2024. Vol. 17. N 1. P. 78. doi: [10.3390/nu17010078](https://doi.org/10.3390/nu17010078)
7. Li X., Liang W., Yu C. et al. (2022) Potential therapeutic strategies for quercetin targeting critical pathological mechanisms associated with colon adenocarcinoma and COVID-19. *Front. Pharmacol.* 2022. Vol. 13. P. 988153. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.988153>
8. Sajjan U., Hershenson M., Nanua S. et al. Quercetin inhibits rhinovirus replication *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Research.* 2012. Vol. 94. N 3. P. 258-271. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.03.005>
9. Colunga Biancatelli R.M.L., Berrill M., Catravas J.D. et al. Quercetin and Vitamin C: An Experimental, Synergistic Therapy for the Prevention and Treatment

- of SARS-CoV-2 Related Disease (COVID-19). *Front Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 1451. DOI: [10.3389/fimmu.2020.01451](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01451)
10. Hasan M.M., Khan Z., Chowdhury M.S. et al. *In silico* molecular docking and ADME/T analysis of Quercetin compound with its evaluation of broad-spectrum therapeutic potential against particular diseases. *Informatics in Medicine Unlocked.* 2022. Vol. 29. P. 100894. DOI: [10.1016/j.imu.2022.100894](https://doi.org/10.1016/j.imu.2022.100894)
11. Grasselli G., Calfee C. S., Camporota L. et al. European Society of Intensive Care Medicine Taskforce on ARDS (2023). ESICM guidelines on acute respiratory distress syndrome: definition, phenotyping and respiratory support strategies. *Intensive care medicine.* 2023. Vol. 49. N 7. P. 727–759. <https://doi.org/10.1007/s00134-023-07050-7>
12. Netea M.G., Balkwill F., Chonchol M. et al. A guiding map for inflammation. *Nat Immunol.* 2017. Vol. 18. N 8. P. 826–831. DOI: [10.1038/ni.3790](https://doi.org/10.1038/ni.3790)
13. Oronsky B., Caroen S., Reid T. What exactly is inflammation (and What Is It Not?) *Int J Mol Sci.* 2022. Vol. 23. N 23. P. 14905. <https://doi.org/10.3390/ijms232314905>
14. Hartl D., Tirouvanziam R., Laval J. et al. Innate immunity of the lung: from basic mechanisms to translational medicine. *J Innate Immun.* 2018. Vol. 10. N 5–6. P. 487–501. DOI: [10.1159/000487057](https://doi.org/10.1159/000487057)
15. WHO. The top 10 causes of death. World Health Organization. 2023. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
16. Banavasi H., Nguyen P., Osman H., Soubani A.O. Management of ARDS – What Works and What Does Not. *Am J Med Sci.* 2021. Vol. 362. N 1. P. 13–23. DOI: [10.1016/j.amjms.2020.12.019](https://doi.org/10.1016/j.amjms.2020.12.019)
17. Ramji H.F., Hafiz M., Altaq H.H., Hussain S.T., Chaudry F. Acute Respiratory Distress Syndrome; A Review of Recent Updates and a Glance into the Future. *Diagnostics (Basel).* 2023. Vol. 13. N. 9. P. 1528. doi: [10.3390/diagnostics13091528](https://doi.org/10.3390/diagnostics13091528)
18. Biuzzi C., Modica E., De Filippis N. et al. Old and New Definitions of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): An Overview of Practical Considerations

- and Clinical Implications. *Diagnostics*. (Basel). 2025. Vol. 15. N 15. P. 1930. DOI: [10.3390/diagnostics15151930](https://doi.org/10.3390/diagnostics15151930)
19. Diamond M., Peniston H.L., Sanghavi D.K. et al. Acute Respiratory Distress Syndrome. *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*. 2024. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK436002/>
20. Fan E., Beitler J.R., Brochard L. et al. COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome: is a different approach to management warranted? *Lancet Respir Med*. 2020. Vol. 8. N 8. P. 816–821. DOI: [10.1016/S2213-2600\(20\)30304-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30304-0)
21. Bellani G., Laffey J.G., Pham T. et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries. *JAMA*. 2016. Vol. 315. N 8. P. 788–800. DOI: [10.1001/jama.2016.0291](https://doi.org/10.1001/jama.2016.0291)
22. Wang Y., Han R., Ding X. et al. A 32-year trend analysis of lower respiratory infections in children under 5: insights from the global burden of disease study 2021. *Front Public Health*. 2025. Vol. 13. P. 1483179. DOI: [10.3389/fpubh.2025.1483179](https://doi.org/10.3389/fpubh.2025.1483179)
23. Wilson J.G., Calfee C.S. ARDS subphenotypes: understanding a heterogeneous syndrome. *Crit Care*. 2020. Vol. 24. N 1. P. 102. DOI: [10.1186/s13054-020-2778-x](https://doi.org/10.1186/s13054-020-2778-x)
24. Bos L.D.J., Ware L.B. ARDS: causes, pathophysiology, and phenotypes. *Lancet*. 2022. Vol. 400. N 10358. P. 1145–1156. DOI: [10.1016/S0140-6736\(22\)01485-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01485-4)
25. Matthay M.A., Arabi Y., Arroliga A.C. et al. A new global definition of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med*. 2024. Vol. 209. N 1. P. 37-47. DOI: [10.1164/rccm.202303-0558WS](https://doi.org/10.1164/rccm.202303-0558WS)
26. Sinha P., Matthay M.A., Calfee C.S. Is a “Cytokine Storm” relevant to COVID-19? *JAMA Intern Med*. 2020. Vol. 180. N 9. P. 1152–1154. DOI: [10.1001/jamainternmed.2020.3313](https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.3313)
27. Burnham E.L., Janssen W.J., Riches D.W. et al. The fibroproliferative response *Respir J*. 2014. Vol. 43. N 1. P. 276–285. DOI: [10.1183/09031936.00196412](https://doi.org/10.1183/09031936.00196412)

28. Iba T., Levy J.H., Levi M., Thachil J. Coagulopathy in COVID-19. *J Thromb Haemost.* 2020. Vol. 18. N 9. P. 2103–2109. DOI: [10.1111/jth.14975](https://doi.org/10.1111/jth.14975)
29. Klok F.A., Kruip M., van der Meer N.J.M. et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res.* 2020. Vol. 191. P. 145–147. DOI: [10.1016/j.thromres.2020.04.013](https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.04.013)
30. Grasselli G., Greco M., Zanella A. et al. Risk factors associated with mortality among patients with COVID-19 ARDS in Lombardy, Italy. *JAMA Intern Med.* 2020. Vol. 180. N 10. P.1345–1355. DOI: [10.1001/jamainternmed.2020.3539](https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.3539)
31. Ramanathan K., Antognini D. Combes A. et al. Planning and provision of ECMO services for severe ARDS during COVID-19 pandemic. *Lancet Respir Med.* 2020. Vol. 8. N 5. P. 518–526. DOI: [10.1016/S2213-2600\(20\)30121-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30121-1)
32. Jayasimhan D., Matthay M.A. Corticosteroids in adults with acute respiratory distress syndrome and severe pneumonia. *BJA Educ.* 2023. Vol. 23. N 12. P. 456-463. DOI: [10.1016/j.bjae.2023.08.005](https://doi.org/10.1016/j.bjae.2023.08.005)
33. von Knethen A., Heinicke U., Laux V. et al. Antioxidants as Therapeutic Agents in Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) Treatment-From Mice to Men. *Biomedicines.* 2022. Vol. 10. N 1. P. 98. DOI: [10.3390/biomedicines10010098](https://doi.org/10.3390/biomedicines10010098)
34. Villar J., Ferrando C., Martínez D. et al. Dexamethasone treatment for ARDS: a multicentre, randomized controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2020. Vol. 8. N 3. P. 267–276. DOI: [10.1016/S2213-2600\(19\)30417-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30417-5)
35. ARDS Definition Task Force; Ranieri V.M., Rubenfeld G.D., Thompson B.T. et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA.* 2012. Vol. 307. N 23. P. 2526-33. DOI: [10.1001/jama.2012.5669](https://doi.org/10.1001/jama.2012.5669)
36. Pushpakom S., Iorio F., Eyers P.A. et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov.* 2019. Vol. 18. N 1. P. 41–58. DOI: [10.1038/nrd.2018.168](https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168)
37. Almunashiri S. Exploring pharmacological strategies in the management of ARDS: Efficacy, limitations, and future directions. *Journal of critical care medicine (Universitatea de Medicina si Farmacie din Targu-Mures).* 2025. Vol. 11. N 3. P. 208–220. <https://doi.org/10.2478/jccm-2025-0030>

38. Hasnat H., Shompa S.A., Islam M.M. et al. Flavonoids: A treasure house of prospective pharmacological potentials. *Heliyon*. 2024. Vol. 10. N 6. P. e27533. doi: [10.1016/j.heliyon.2024.e27533](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e27533)
39. Ferreyra M.L.F., Rius S.P., Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci*. 2012. Vol. 3. P. 222. DOI: [10.3389/fpls.2012.00222](https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222)
40. Zhu X., Ding G., Ren S., Xi J., Liu K. The bioavailability, absorption, metabolism, and regulation of glucolipid metabolism disorders by quercetin and its important glycosides: A review. *Food Chem*. 2024. Vol. 458. P. 140262. DOI: [10.1016/j.foodchem.2024.140262](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140262)
41. Wang G., Wang Y., Yao L. et al. Pharmacological Activity of Quercetin: An Updated Review. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2022. Vol. 2022. P. 3997190. DOI: [10.1155/2022/3997190](https://doi.org/10.1155/2022/3997190)
42. Gupta M., Ahmad J., Sahoo M.R. et al. Quercetin as therapeutic modality for inflammatory diseases: Where we are and where to go? *Food Bioscience*. 2026. Vol. 76. P. 108149. DOI: [10.1016/j.fbio.2025.108149](https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.108149)
43. Cui S., Wu Q., Wang J. et al. Quercetin inhibits LPS-induced macrophage migration by suppressing the iNOS/FAK/paxillin pathway and modulating the cytoskeleton. *Cell adhesion & migration*. 2019. Vol. 13. N 1. P. 1–12. <https://doi.org/10.1080/19336918.2018.1486142>
44. Nguyen T.T.H., Woo H.J., Kang H.K. et al. Flavonoid-mediated inhibition of SARS coronavirus 3CL protease expressed in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*. 2012. Vol. 34. N 5. P. 831–838. DOI: [10.1007/s10529-011-0845-8](https://doi.org/10.1007/s10529-011-0845-8)
45. Mohebbi A., Eskandarzadeh M., Zangi H., Fatehi M. *In silico* study of alkaloids with quercetin nucleus for inhibition of SARS-CoV-2 protease and receptor cell protease. *PloS one*. 2024. Vol. 19. N 4. P. e0298201. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0298201>
46. Morikawa K., Nonaka M., Narahara M. et al. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sci*. 2003. Vol. 74. N 6. P. 709–721. DOI: [10.1016/j.lfs.2003.06.036](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.06.036).

47. Суворова З.С. Протизапальна активність ліпосомальної форми кверцетину. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2024. Т. 18. № 3. С. 185–190. <https://doi.org/10.33250/18.03.185>
48. Shamim S., Munawar R., Rashid Y. et al. Molecular Docking: An Insight from Drug Discovery to Drug Repurposing Approach. *Biomedical Engineering. IntechOpen*. 2024. Available at: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.1005526>
49. Sun H., Liao F., Tian Y. et al. Molecular-Scale Investigations Reveal the Effect of Natural Polyphenols on BAX/Bcl-2 Interactions. *International journal of molecular sciences*. 2024. Vol. 25. N 5. P. 2474. <https://doi.org/10.3390/ijms25052474>
50. Abd Ghani M. F., Othman R., Nordin N. Molecular Docking Study of Naturally Derived Flavonoids with Antiapoptotic BCL-2 and BCL-XL Proteins toward Ovarian Cancer Treatment. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. 2020. Vol. 12. Suppl. 2. P. S676–S680. [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_272\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_272_19)
51. Bender B.J., Gahbauer S., Lutten A. et al. Publisher Correction: A practical guide to large-scale docking. *Nat Protoc*. 2022. Vol. 17. N 1. P. 177. DOI: [10.1038/s41596-021-00650-x](https://doi.org/10.1038/s41596-021-00650-x)
52. Mohammad Ali F.J., Zare F., Sakhteman A. et al. Molecular docking studies, DFT, and ADMET calculations of some flavonoids and their characteristic structural features involved in inhibition of pro-inflammatory enzymes. *Natural product research*. 2025. Vol. 39. N 18. P. 5289–5299. DOI: [10.1080/14786419.2024.2368748](https://doi.org/10.1080/14786419.2024.2368748)
53. Warner T.D., Mitchell J.A. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J*. 2004. Vol. 18. N 7. P. 790–804. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0645rev>
54. Kurumbail R.G., Stevens A.M., Gierse J.K. et al. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*. 1996. Vol. 384. P. 644–648. DOI: [10.1038/384644a0](https://doi.org/10.1038/384644a0)
55. Manukyan A.E., Hovhannisyan A.A. The Quercetin and Quercetin Derivatives Interaction With Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2. *bioRxiv*. 2020. Available at: <https://doi.org/10.1101/2020.12.05.413088>

56. Balkrishna A., Pokhrel S., Varshney A. Comparative COX I Molecular Docking of Phyto-chemicals (Flavonoids, Alkaloids, Lignans and Terpenoids) for Anti-platelet Aggregation Dynamics. *Curr Comput Aided Drug Des.* 2021. Vol. 17. N 4. P. 571-578. DOI: [10.2174/1573409916666200630110711](https://doi.org/10.2174/1573409916666200630110711)
57. Dash R., Uddin M.M., Hosen S.M. et al. Molecular docking analysis of known flavonoids as dual COX-2 inhibitors in the context of cancer. *Bioinformation.* 2015. Vol. 11. N 12. P. 543–549. doi: [10.6026/97320630011543](https://doi.org/10.6026/97320630011543)
58. Kumar S., Pandey A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci World J.* 2013. Art. 162750. 16 p. DOI: [10.1155/2013/162750](https://doi.org/10.1155/2013/162750) .
59. Manach C., Williamson G., Morand C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. *Am J Clin Nutr.* 2005. Vol. 81. (1 Suppl) P. 230S–242S. DOI: [10.1093/ajcn/81.1.230S](https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.230S)
60. Andres S., Pevny S., Ziegenhagen R. et al. Safety aspects of the use of quercetin as a dietary supplement. *Mol Nutr Food Res.* 2018. Vol. 62. N 1. P. 1700447. DOI: [10.1002/mnfr.201700447](https://doi.org/10.1002/mnfr.201700447)
61. Mitchell M.J., Billingsley M.M., Haley R.M. et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature reviews. Drug discovery.* 2021. Vol. 20. N 2. P. 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
62. Bakshi R., Singh D.P., Borse S.P. et al. *In vitro* and *in vivo* anticancer efficacy potential of Quercetin loaded polymeric nanoparticles. *Biomed Pharmacother.* 2018. Vol. 106. P. 1513-1526. DOI: [10.1016/j.biopha.2018.07.106](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.106)
63. Bai C., Hu X., Lu S. et al. Recent advances and application challenges of quercetin-loaded delivery systems: from material selection to bioavailability. *Journal of Future Foods.* 2025. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2025.01.014>.
64. Tomou E. M., Papakyriakopoulou P., Saitani E. M. et al. Recent Advances in Nanoformulations for Quercetin Delivery. *Pharmaceutics.* 2023. Vol. 15. N 6. P. 1656. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061656>
65. Hädrich G., Monteiro S.O., Rodrigues M.R. et al. Lipid-based nanocarrier for quercetin delivery: system characterization and molecular interactions studies. *Drug*

- Dev Ind Pharm.* 2016. Vol. 42. N 7. P. 1165-1173.  
DOI: [10.3109/03639045.2015.1118491](https://doi.org/10.3109/03639045.2015.1118491)
66. Riva A., Ronchi M., Petrangolini G. et al. Improved Oral Absorption of Quercetin from Quercetin Phytosome®, a New Delivery System Based on Food Grade Lecithin. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*. 2019. Vol. 44. N 2. P. 169–177. <https://doi.org/10.1007/s13318-018-0517-3>
67. Gross F. Occam's Razor in Molecular and Systems Biology. *Philosophy of Science*. 2019. Vol. 86. N 5. P. 1134-1145. DOI: <https://doi.org/10.1086/705474>
68. Drescher S., van Hoogevest P. The Phospholipid Research Center: Current Research in Phospholipids and Their Use in Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2020. Vol. 12. N 12. P. 1235. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121235>
69. Li Y., Yao S., Chen Y. et al. Synthesis and characterization of zinc ion-integrated quercetin delivery system using areca nut seeds nanocellulose. *LWT*. 2023. Vol. 192. P. 115673. DOI: [10.1016/j.lwt.2023.115673](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115673)
70. Aggarwal D., Chaudhary M., Mandotra S. K. et al. Anti-inflammatory potential of quercetin: From chemistry and mechanistic insight to nanoformulations. *Current research in pharmacology and drug discovery*. 2025. Vol. 8. P. 100217. <https://doi.org/10.1016/j.crphar.2025.100217>
71. Kurniawan M.F., Setyawan D., Hariyadi D.M. Quercetin in Drug Carriers: Polymer Composite, Physical Characteristics, and In vitro Study. *Science and Technology Indonesia*. 2024. Vol. 9. N 2. P. 380–412. <https://doi.org/10.26554/sti.2024.9.2.380-412>
72. Ковалевська І. В. Визначення фізико-хімічних характеристик кверцетину. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2014. № 1. С. 6–8. URL: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/apfimtntp\\_2014\\_1\\_5](http://nbuv.gov.ua/UJRN/apfimtntp_2014_1_5).
73. Yu Y., Qiu L. Nanotherapy therapy for acute respiratory distress syndrome: a review. *Front. Med.* 2024. Vol. 11. P. 1492007. <https://doi.org/10.3389/fmed.2024.1492007>

74. Sercombe L., Veerati T., Moheimani F. et al. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Front. Pharmacol.* 2015. Vol. 6. P. 286. DOI: [10.3389/fphar.2015.00286](https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286)
75. Chen J.Y., Hu R.Y., Chou H.C. Quercetin-induced cardioprotection against doxorubicin cytotoxicity. *J. Biomed. Sci.* 2013. Vol. 20. N 1. P. 95. DOI: [10.1186/1423-0127-20-95](https://doi.org/10.1186/1423-0127-20-95)
76. D'Angelo A., Giannaccare G., Lixi F. et al. Polyphenols and Eye Health: A Narrative Review of the Literature on the Therapeutic Effects for Ocular Diseases. *Nutrients.* 2026. Vol. 18. N 1. P. 69. <https://doi.org/10.3390/nu18010069>
77. Halevas E.G., Avgoulas D.I., Katsipis G., Pantazaki A.A. Flavonoid-liposomes formulations: physico-chemical characteristics, biological activities and therapeutic applications. *Eur. J. Med. Chem. Rep.* 2022. Vol. 5. P. 100059. <https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2022.100059>
78. Di Petrillo A., Orrù G., Fais A., Fantini M.C. Quercetin and its derivatives as antiviral potentials: A comprehensive review. *Phytother Res.* 2022. Vol. 36. N 1. P. 266-278. doi: [10.1002/ptr.7309](https://doi.org/10.1002/ptr.7309)
79. Wang Y., Zhang D., Du G. et al. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet.* 2020. Vol. 395. N 10236. P. 1569–1578. DOI: [10.1016/S0140-6736\(20\)31022-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31022-9)
80. Alharbi H.O.A., Alshebremi M., Babiker A.Y., Rahmani A.H. The role of quercetin, a flavonoid, in the management of pathogenesis through regulation of oxidative stress, inflammation, and biological activities. *Biomolecules.* 2025. Vol. 15. N 1. P. 151. DOI: [10.3390/biom15010151](https://doi.org/10.3390/biom15010151)
81. Protein Data Bank (PDB). Банк даних тривимірних структур білків та нуклеїнових кислот. Available at: <https://www.rcsb.org>
82. Open Babel 2.4.0. Вільна хімічна експертна система для перетворення форматів файлів. Available at: <https://sourceforge.net/p/openbabel/news/2016/09/open-babel-240-released/>
83. AutoDockTools 1.5.6. Програмне забезпечення для підготовки файлів до молекулярного докінгу. Available at: <http://autodock.scripps.edu>

84. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.* 2010. Vol. 31 N 2. P. 455–461. DOI: [10.1002/jcc.21334](https://doi.org/10.1002/jcc.21334)
85. AutoDock Vina version 1.1.2. Програма для проведення молекулярного докінгу та віртуального скринінгу. Available at: <http://vina.scripps.edu>
86. LigPlot+ v.1.4. Multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery. Available at: <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>
87. Доклінічні дослідження лікарських засобів : методичні рекомендації. За ред. чл.-кор. НАМН України, акад. О.В. Стефанова. Київ : Авіценна, 2001. 528 с.
88. Тринус Ф.П., Мохорт Н.А., Клебанов Б.М. Нестероидные противовоспалительные средства. Киев : Здоров'я, 1975. 240 с.
89. Гладких Ф.В. Нестероїдні протизапальні засоби: терапевтичні та небажані ефекти, шляхи їх оптимізації. Вінниця : Твори, 2022. 216 с. DOI:[10.46879/2022.1](https://doi.org/10.46879/2022.1)
90. Zhang Y., Wen Z., Guan L. et al. Extracellular histones play an inflammatory role in acid aspiration-induced acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology*. 2015. Vol. 122. N 1. P. 127–139. DOI: [10.1097/ALN.0000000000000429](https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000429)
91. Matute-Bello G., Frevert C.W., Martin T.R. Animal models of acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2008. Vol. 295. N 3. P. L379–L399. DOI: [10.1152/ajplung.00010.2008](https://doi.org/10.1152/ajplung.00010.2008)
92. Buras J.A., Holzmann B., Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005. Vol. 4. N 10. P. 854–865. DOI: [10.1038/nrd1854](https://doi.org/10.1038/nrd1854)
93. Guo X., Wu S., Shang J. et al. The effects of lipoic acid on respiratory diseases. *Int Immunopharmacol.* 2023. Vol. 116. P. 109713. doi: [10.1016/j.intimp.2023.109713](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.109713)
94. Flecknell P. Laboratory Animal Anaesthesia, 4th ed. London UK : Academic Press, 2015. 350 p.
95. Кожем'якін Ю.М. та ін. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. Київ : Інтерсервіс, 2017. 182 с.

96. In-house development ELISA data calculator “arigo GainData®”. Available at: <https://www.arigobio.com/elisa-analysis>
97. Hübner R.H., Gitter W., El Mokhtari N.E. et al. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *Biotechniques*. 2008. Vol. 44. N 4. P. 507-517. DOI: [10.2144/000112729](https://doi.org/10.2144/000112729)
98. Узленкова Н.Є., Григор'єва Г.С. Скоробогатова Н.Г. та ін. Радіопротекторна активність ліпосомальної композиції кверцетину при гострому радіаційному синдромі (експериментальне дослідження). *Україн. радіол. та онк. журнал*. 2024. Т. 32. № 2. С. 231–243. <https://doi.org/10.46879/ukroj.2.2024.231-243>
99. Експериментальне вивчення нешкідливості та фармакологічної активності очних лікарських засобів: методичні рекомендації ДФЦ МОЗ України. За ред. Чайка Л.А., Ципкун А.Г., Гайдамака Т.Б. та ін. Київ, 2003. 43 с.
100. Пасічнікова Н.В., Науменко В.А., Король О.Р., Задорожний О.С. Порівняльна ефективність виявлення субретинальних неоваскулярних мембран методом довгохвильової фундусграфії та флуоресцеїнової ангиографії. *Офтальмол. журнал*. 2009. Т. 1. С. 6–9.
101. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистика в науке и бизнесе. Київ : Морион, 2002. 640 с.
102. Ядловський О.Є., Суворова З.С., Бобкова Л.С., Бухтіарова Т.А. *In silico* аналіз молекулярних механізмів фармакологічної дії кверцетину. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2023. Т. 17. № 6. С. 359–375. <https://doi.org/10.33250/17.06.359>
103. Megantara S., Agung Yodha M.W., Sahidin I. et al. Pharmacophore screening and molecular docking of phytoconstituents in *Polygonum sagittatum* for cyclooxygenase-2 inhibitors discovery. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2018. Vol. 11. N 1. P. 83–88. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i1.21154>
104. Vyshnevskaya L., Severina H.I., Prokopenko Y., Shmalko A. Molecular docking investigation of anti-inflammatory herbal compounds as potential LOX-5 and COX-2

- inhibitors. *Pharmacia*. 2022. Vol. 69. N 3. P. 733–744. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.69.e89400>
105. Cheng M., Guan Y., Xin X., Yi X., Liu Y. Targeting p38 MAPK signaling pathway: quercetin as a novel therapy for TMJ synovitis. *Int. J. Mol. Med.* 2025. Vol. 57. N 1. P. 21. doi: [10.3892/ijmm.2025.5692](https://doi.org/10.3892/ijmm.2025.5692)
106. Kwon O.S., Choi J.S., Islam M.N., Kim Y.S., Kim H.P. Inhibition of 5-lipoxygenase and skin inflammation by the aerial parts of *Artemisia capillaris* and its constituents. *Arch. Pharm. Res.* 2011. Vol. 34. N 9. P. 1561–1569. DOI: [10.1007/s12272-011-0919-0](https://doi.org/10.1007/s12272-011-0919-0)
107. Бобкова Л.С., Бухтіарова Т.А., Ядловський О.Є. Раціональний дизайн у створенні потенційних нестероїдних протизапальних препаратів – інгібіторів COX і 5-LOX. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2022. Т. 19. № 4. С. 219–239. <https://doi.org/10.33250/16.04.219>
108. Olla S., Siguri C., Fais A. et al. Inhibitory effect of quercetin on oxidative endogenous enzymes: a focus on putative binding modes. *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24. N 20. P. 15391. DOI: [10.3390/ijms242015391](https://doi.org/10.3390/ijms242015391)
109. Singh S.P., Konwar B.K. Molecular docking studies of quercetin and its analogues against human inducible nitric oxide synthase. *SpringerPlus*. 2012. Vol. 1. N 1. P. 69. DOI: [10.1186/2193-1801-1-69](https://doi.org/10.1186/2193-1801-1-69)
110. Thunnissen M.M., Nordlund P., Haeggström J.Z. Crystal structure of human leukotriene A4 hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. *Nat. Struct. Biol.* 2001. Vol. 8. N 2. P. 131–135. DOI: [10.1038/84117](https://doi.org/10.1038/84117).
111. Audat S. A., Al-Shar'i N. A., Al-Oudat B. A. et al. Identification of human leukotriene A4 hydrolase inhibitors using structure-based pharmacophore modeling and molecular docking. *Molecules*. 2020. Vol. 25. N 12. P. 2871. DOI: [10.3390/molecules25122871](https://doi.org/10.3390/molecules25122871)
112. Davies D.R., Mamat B., Magnusson O.T. et al. Discovery of Leukotriene A4 Hydrolase Inhibitors Using Metabolomics Biased Fragment Crystallography. *J. Med. Chem.* 2009. Vol. 52. N 15. P. 4694–4715. <https://doi.org/10.1021/jm900259h>

113. Bhatt L., Roinestad K., Van T., Springman E. Recent advances in clinical development of leukotriene B4 pathway drugs. *Semin. Immunol.* 2017. Vol. 33. P. 65–73. DOI: [10.1016/j.smim.2017.08.007](https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.08.007)
114. Appiah-Kubi P., Soliman M. Hybrid Receptor-Bound/MM-GBSA-Per-residue Energy-Based Pharmacophore Modelling: Enhanced Approach for Identification of Selective LTA<sub>4</sub>H Inhibitors as Potential Anti-inflammatory Drugs. *Cell Biochem Biophys.* 2017. Vol. 75. N 1. P. 35-48. DOI: [10.1007/s12013-016-0772-3](https://doi.org/10.1007/s12013-016-0772-3)
115. Молодан Ю.О., Ларіонов В.Б., Борисюк І.Ю., Макаренко О.А. Тваринні моделі *in vivo* для скринінгу потенційних протизапальних та знеболювальних засобів (огляд літератури). *Вісник Одеського національного університету. Біологія.* 2023. Т. 28. № 2(53). С. 113–127. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.2\(53\).293327](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.2(53).293327)
116. Pat. US App. N 18399141. IPC A61K 31/685, A61K 9/00, A61K 9/107, A61K 9/127, A61K 31/353, A61K 31/7016. Pharmacologicall active liposomal composition. Comprising quercetin and zinc front page image. Inventors: G. Grygorieva, N. Konakhovich, Y. Krasnopolski, O. Pylypenko, V. Prokhorov, Z. Suvorova, O. Yadlovski Applicants Consortium “Ukrindustri” State Institution Institute of Pharmacology and Toxicology of National Academy Medical Sciences of Ukraine. Application Date 28.12.2023 Priority date 14.092023 UA.
117. Marinova M., Solopov P., Dimitropoulou C. et al. Acute exposure of mice to hydrochloric acid leads to chronic lung injury and pulmonary fibrosis. *Inhalation Toxicology.* 2019. Vol. 31. N 4. P. 147–160. DOI: [10.1080/08958378.2019.1624895](https://doi.org/10.1080/08958378.2019.1624895)
118. Stepanova N.V., Suvorova Z.S., Yadlovski O.Ye., Grygorieva G.S., Konakhovich N.F. Pharmacotherapeutic effects of quercetin delivery systems in experimental ARDS induced by acid aspiration. *Modern Medical Technology.* 2025. Vol. 17. N 4. P. 314–320. <https://doi.org/10.14739/mmt.2025.4.340570>
119. Prasad A.S. Zinc is an Antioxidant and Anti-Inflammatory Agent: Its Role in Human Health. *Front Nutr.* 2014. Vol. 1. P. 14. DOI: [10.3389/fnut.2014.00014](https://doi.org/10.3389/fnut.2014.00014)
120. Pharmaceutical and medico-biological aspects of drugs. Pertsev I.M. (Ed.). *Nova Knyha*, 2007. 728 p.

121. Суворова З. С. Визначення ефективності ліпосомальних форм кверцетину в LPS-моделі гострого респіраторного дистрес-синдрому. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2025. Т. 19. № 3. С. 258–266. <https://doi.org/10.33250/19.03.258>
122. Xie R., Tan D., Liu B. et al. ARDS: from mechanistic insights to therapeutic strategies. *MedComm*. 2025. Vol. 6. N 2. P. e70074. DOI: [10.1002/mco2.70074](https://doi.org/10.1002/mco2.70074)
123. Land W.G. Role of DAMPs in respiratory virus-induced acute respiratory distress syndrome – with a preliminary reference to SARS-CoV-2 pneumonia. *Genes Immun*. 2021. Vol. 22. P. 141–160. <https://doi.org/10.1038/s41435-021-00140-w>
124. Huang X., Xiu H., Zhang S., Zhang G. The Role of Macrophages in the Pathogenesis of ALI/ARDS. *Mediators Inflamm*. 2018. Article ID 1264913. DOI: [10.1155/2018/1264913](https://doi.org/10.1155/2018/1264913)
125. McCormick S.M., Heller N.M. Commentary: IL-4 and IL-13 receptors and signaling. *Cytokine*. 2015. Vol. 75. N 1. P. 38-50. doi: [10.1016/j.cyto.2015.05.023](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.023)
126. Harris A.J., Mirchandani A.S., Lynch R.W. et al. IL4R $\alpha$  Signaling Abrogates Hypoxic Neutrophil Survival and Limits Acute Lung Injury Responses *In Vivo*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019. Vol. 200. N 2. P. 235–246. DOI: [10.1164/rccm.201808-1599OC](https://doi.org/10.1164/rccm.201808-1599OC)
127. Ganda I.J., Putri T.K.E., Rauf S. et al. IL-6 serum level, ARDS, and AKI as risk factors for the COVID-19 infection's mortality in children. *PLoS One*. 2023. Vol. 18. N 10. P. e0293639. DOI: [10.1371/journal.pone.0293639](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0293639)
128. Shih L.J., Yang C.C., Liao M.T. et al. An important call: Suggestion of using IL-10 as therapeutic agent for COVID-19 with ARDS and other complications. *Virulence*. 2023. Vol. 14. N 1. P. 2190650. DOI: [10.1080/21505594.2023.2190650](https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2190650)
129. Yin Z., Song R., Yu T. et al. Natural Compounds Regulate Macrophage Polarization and Alleviate Inflammation Against ALI/ARDS. *Biomolecules*. 2025. Vol. 15. N 2. P. 192. DOI: [10.3390/biom15020192](https://doi.org/10.3390/biom15020192)
130. Rizky W.C., Jihwaprani M.C., Mushtaq M. Protective Mechanisms of Quercetin in Various Lung-induced Injuries. *SCIREA Journal of Clinical Medicine*. 2022. Vol. 7. N 3. P. 206–223. DOI: [10.54647/cm32844](https://doi.org/10.54647/cm32844)

131. Di Petrillo A., Orrù G., Fais A., Fantini M.C. Quercetin and its derivatives as antiviral potentials: A comprehensive review. *Phytother Res.* 2022. Vol. 36. N 1. P. 266-278. doi: [10.1002/ptr.7309](https://doi.org/10.1002/ptr.7309)
132. Shohan M., Nashibi R., Mahmoudian-Sani M.R., et al. The therapeutic efficacy of quercetin in combination with antiviral drugs in hospitalized COVID-19 patients: A randomized controlled trial. *Eur J Pharmacol.* 2022. Vol. 914. P. 174615. DOI: [10.1016/j.ejphar.2021.174615](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174615)
133. Ding W., Zhang W., Chen J. et al. Protective mechanism of quercetin in alleviating sepsis-related acute respiratory distress syndrome based on network pharmacology and *in vitro* experiments. *World J Emerg Med.* 2024. Vol. 15. N 2. P. 111-120. DOI: [10.5847/wjem.j.1920-8642.2024.030](https://doi.org/10.5847/wjem.j.1920-8642.2024.030)
134. da Silva W.M.B., de Oliveira Pinheiro S., Alves D.R. et al. Synthesis of Quercetin-Metal Complexes, *In Vitro* and *In Silico* Anticholinesterase and Antioxidant Evaluation, and *In Vivo* Toxicological and Anxiolytic Activities. *Neurotox Res.* 2020. Vol. 37. N 4. P. 893-903. DOI: [10.1007/s12640-019-00142-7](https://doi.org/10.1007/s12640-019-00142-7)
135. Shastrala, K.; Kalam, S.; Damerakonda, K. et al. Synthesis, characterization, and pharmacological evaluation of some metal complexes of quercetin as P-gp inhibitors. *Future J. Pharm. Sci.* 2021. Vol. 7. P. 1–13. DOI: [10.1186/s43094-021-00252-0](https://doi.org/10.1186/s43094-021-00252-0)
136. Clergeaud G., Dabbagh-Bazarbachi H., Ortiz M. et al. A simple liposome assay for the screening of zinc ionophore activity of polyphenols. *Food Chem.* 2016. Vol. 197 (Pt A). P. 916–923. DOI: [10.1016/j.foodchem.2015.11.057](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.057)
137. Prasad A.S. Discovery of Zinc for Human Health and Biomarkers of Zinc Deficiency. *Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals.* 2017. P. 241–260. doi: [10.1016/B978-0-12-802168-2.00020-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802168-2.00020-8)
138. Uskoković-Marković S., Milenković M., Pavun L. Zinc-quercetin complex: From determination to bioactivity. *Acta Agriculturae Serbica.* 2020. Vol. 25. N 50. P. 113–120. DOI: [10.5937/AASer2050113U](https://doi.org/10.5937/AASer2050113U)
139. Ishida T. Antiviral Activities of Zn<sup>2+</sup> Ions for Viral Prevention, Replication, Capsid Protein in Intracellular Proliferation of Viruses. *World Scientific News.* 2018.

- Vol. 97. P. 28–50. Available at: <https://worldscientificnews.com/antiviral-activities-of-zn2-ions-for-viral-prevention-replication-capsid-protein-in-intracellular-proliferation-of-viruses/>
140. Zhou K., Lu J. Progress in cytokine research for ARDS: A comprehensive review. *Open Medicine*. 2024. Vol. 19. N 1. P. 20241076. <https://doi.org/10.1515/med-2024-1076>
141. May R.D., Fung M. Strategies targeting the IL-4/IL-13 axes in disease. *Cytokine*. 2015. Vol. 75. N 1. P. 89–116. DOI: [10.1016/j.cyto.2015.05.018](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.018)
142. Honore P.M., Barreto Gutierrez L., Kugener L. et al. Inhibiting IL-6 in COVID-19: we are not sure. *Crit Care*. 2020. Vol. 24. N 1. P. 463. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03177-x>
143. Lu L., Zhang H., Dauphars D.J., He Y.W. A Potential Role of Interleukin 10 in COVID-19 Pathogenesis. *Trends Immunol*. 2021. Vol. 42. N 1. P. 3-5. DOI: [10.1016/j.it.2020.10.012](https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.012)
144. Fajgenbaum D.C., June C.H. Cytokine storm. *N Engl J Med*. 2020. Vol. 383. P. 2255–2273. DOI: [10.1056/NEJMra2026131](https://doi.org/10.1056/NEJMra2026131)
145. Karki R., Kanneganti T.D. The 'cytokine storm': molecular mechanisms and therapeutic prospects. *Trends Immunol*. 2021. Vol. 42. N 8. P. 681-705. doi: [10.1016/j.it.2021.06.001](https://doi.org/10.1016/j.it.2021.06.001)
146. Pepys M.B., Hirschfield G.M. C-reactive protein: a critical update. *Journal of Clinical Investigation*. 2003. Vol. 111. N 12. P. 1805–1812. DOI: [10.1172/JCI18921](https://doi.org/10.1172/JCI18921)
147. Ngwa D.N., Pathak A., Agrawal A. IL-6 regulates induction of C-reactive protein gene expression by activating STAT3 isoforms. *Mol Immunol*. 2022. Vol. 146. P. 50-56. DOI: [10.1016/j.molimm.2022.04.003](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2022.04.003)
148. Gulhar R., Ashraf M.A., Jialal I. Physiology, acute phase reactants. In: *StatPearls. Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2025*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519570/>
149. Xu J., Li Y., Yang X. et al. Quercetin inhibited LPS-induced cytokine storm by interacting with the AKT1-FoxO1 and Keap1-Nrf2 signaling pathway in

macrophages. *Sci Rep.* 2024. Vol. 14. N 1. P. 20913. DOI: [10.1038/s41598-024-71569-y](https://doi.org/10.1038/s41598-024-71569-y)

150. Sahib H.B., Kathum O.A., Alanee R.S. et al. The Anti-Cytokine Storm Activity of Quercetin Zinc and Vitamin C Complex. *Adv Virol.* 2022. Vol. 2022. P. 1575605. DOI: [10.1155/2022/1575605](https://doi.org/10.1155/2022/1575605)

151. Deng S., Li J., Li L. et al. Quercetin alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting ferroptosis via the Sirt1/Nrf2/Gpx4 pathway. *Int J Mol Med.* 2023. Vol. 52. N 6. P. 118. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2023.5321>.

152. Alrajhi N.N. Post-COVID-19 pulmonary fibrosis: An ongoing concern. *Ann Thorac Med.* 2023. Vol. 18. N 4. P. 173-181. DOI: [10.4103/atm.atm\\_7\\_23](https://doi.org/10.4103/atm.atm_7_23)

153. Jarzebska N., Karetnikova E.S., Markov A.G. et al. Scarred Lung. An Update on Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis. *Front Med (Lausanne).* 2021. Vol. 7. P. 585756. DOI: [10.3389/fmed.2020.585756](https://doi.org/10.3389/fmed.2020.585756)

154. Кучерявенко О.О., Лисенко Л.А. Сучасні підходи до лікування хімічних опіків ока. *Офтальмологічний журнал.* 2020. Т. 5. С. 45–52.

155. Sharma N., Kaur M., Agarwal T. et al. Treatment of acute ocular chemical burns. *Surv Ophthalmol.* 2018. Vol. 63. N 2. P. 214-235. DOI: [10.1016/j.survophthal.2017.09.005](https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2017.09.005)

156. Zhao L., Wang H., Du X. The therapeutic use of quercetin in ophthalmology: recent applications. *Biomed Pharmacother.* 2021. Vol. 137. P. 111371. DOI: [10.1016/j.biopha.2021.111371](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111371)

157. Фесюнова Г.С., Молчанюк Н.І., Абрамова Г.Б. Волкова Ю.С. Ультроструктурні зміни рогівки після субтенозових ін'єкцій ліпосомального кверцетину. У: Теорія та практика сучасної морфології : матеріали Восьмої Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (м. Дніпро, 6-8 листопада 2024 року). Дніпро : ДДМУ, 2024. 157–158.

158. Dua H.S., Ting D.S.J., Al Saadi A., Said D.G. Chemical eye injury: pathophysiology, assessment and management. *Eye (Lond).* 2020. Vol. 34. N 11. P. 2001-2019. doi: [10.1038/s41433-020-1026-6](https://doi.org/10.1038/s41433-020-1026-6)

159. Singh P., Tyagi M., Kumar Y. et al. Ocular chemical injuries and their management. *Oman J Ophthalmol*. 2013. Vol. 6. N 2. P. 83-86. DOI: [10.4103/0974-620X.116624](https://doi.org/10.4103/0974-620X.116624)
160. Kim H.M., Woo S.J. Ocular Drug Delivery to the Retina: Current Innovations and Future Perspectives. *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 13. N 1. P. 108. DOI: [10.3390/pharmaceutics13010108](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010108)
161. Soleimani M., Naderan M. Management Strategies of Ocular Chemical Burns: Current Perspectives. *Clin Ophthalmol*. 2020. Vol. 14. P. 2687-2699. <https://doi.org/10.2147/OPTH.S235873>
162. Taskiran Comez A., Ozbas M. Evaluation and Management of Ocular Traumas. In *Vision Correction and Eye Surgery* : IntechOpen, 2022. Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.101776>
163. Draize J.H., Woodard G., Calvery H.O. Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1944. Vol. 82. N 3. P. 377–390.
164. Santos A., C. Altamirano-Vallejo J., Navarro-Partida J. et al. Breaking down the Barrier: Topical Liposomes as Nanocarriers for Drug Delivery into the Posterior Segment of the Eyeball. In *Role of Novel Drug Delivery Vehicles in Nanobiomedicine* : IntechOpen, 2020. Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.86601>
165. Siddharam Janti, a M Raja, Kalpana Mali. Recent Advances in the Management of Chemical Ocular Injuries. *Recent Updates in Disease and Health Research*. 2024. Vol. 8. P. 64-78. [hal-05223556](https://doi.org/10.5772/intechopen.86601)
166. Davinelli S., Ali S., Scapagnini G., Costagliola C. Effects of Flavonoid Supplementation on Common Eye Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *Frontiers in Nutrition*. 2021. Vol. 8. P. 651441. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.651441>
167. Barrientez B., Nicholas S.E., Whelchel A. et al. Corneal injury: Clinical and molecular aspects. *Exp Eye Res*. 2019. Vol. 186. P. 107709. doi: [10.1016/j.exer.2019.107709](https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107709)

168. Nishida T. Commanding roles of keratocytes in health and disease. *Cornea*. 2010. Vol. 29. Suppl. 1. P. S3-S6. DOI: [10.1097/ICO.0b013e3181f2d578](https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e3181f2d578)
169. Bairagi R.D., Reon R.R., Hasan M.M. et al. Ocular drug delivery systems based on nanotechnology: a comprehensive review for the treatment of eye diseases. *Discover Nano*. 2025. Vol. 20. N 75. <https://doi.org/10.1186/s11671-025-04234-6>
170. McKay T.B., Kivanany P.B., Nicholas S.E. et al. Quercetin Decreases Corneal Haze *In Vivo* and Influences Gene Expression of TGF-Beta Mediators *In Vitro*. *Metabolites*. 2022. Vol. 12. N. 7. P. 626. DOI: [10.3390/metabo12070626](https://doi.org/10.3390/metabo12070626)
171. Lai S., Wei Y., Wu Q. et al. Liposomes for effective drug delivery to the ocular posterior chamber. *J Nanobiotechnology*. 2019. Vol. 17. N 1. P. 64. doi: [10.1186/s12951-019-0498-7](https://doi.org/10.1186/s12951-019-0498-7)
172. Рафалюк С. Я., Гайдамака Т. Б. Ефективність біофлавоноїду кверцетину в лікуванні герпетичного кератиту у хворих із синдромом сухого ока. *Офтальмол. журн.* 2018. № 5. С. 15–19. <https://doi.org/10.31288/ofthalmolzh201851519>
173. Tafti M.F., Fayyaz Z., Aghamollaei H. et al. Drug delivery strategies to improve the treatment of corneal disorders. *Heliyon*. 2025. Vol. 11. N 2. P. e41881. DOI: [10.1016/j.heliyon.2025.e41881](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e41881)

## **ДОДАТКИ**

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Директор Навчально-наукового інституту  
хімічних технологій та інженерії НТУ «ХП»

Ігор РИЩЕНКО



30 .09.2024 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

- 1. Найменування впровадженої пропозиції:** Фармакологічно активна ліпосомальна композиція, що містить кверцетин та цинк.
- 2. Розробник пропозиції:** Державна установа «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (03057, м. Київ, вул. Антона Цедіка, 14).
- 3. Джерела інформації:**
  - 1) Заявка на Patent US App. No: 18/399.141, 25.06.2024. **A pharmacologically active liposomal composition for treating an acute respiratory distress syndrome**
  - 2) Patent No: US 12,168,018 B1 Date: 17/12/2024. **Pharmacologically active liposomal composition comprising quercetine and zinc.** G. Grygorieva, N. Konakhovich, Y. Krasnopolskyi, O. Pylypenko, V. Prokhorov, Z. Suvorova, O. Yadlovski.
- 4. Установа, в якій здійснено впровадження:** кафедра Біотехнології, біофізики та аналітичної хімії Навчально-наукового інституту хімічних технологій та інженерії.
- 5. Термін впровадження:** протягом 2024-2025 рр.
- 6. Форми впровадження:** у навчальний процес по дисциплінам «Біотехнологія виробництва готових лікарських форм» II семестр 2024 року (лекції) та II семестр 2025 року (лекції); лабораторні роботи по зазначеним дисциплінам; експериментальна наукова робота.
- 7. Результат впровадження:** впровадження пропозицій забезпечує розширення знань учасників освітнього процесу про біотехнологічні процеси на основі ліпідів і формування нових підходів до фармако-математичного прогнозування та технологічної реалізації способів створення ефективних ліпосомальних систем транспорту ліків на основі флавоноїдів та есенціальних металів.

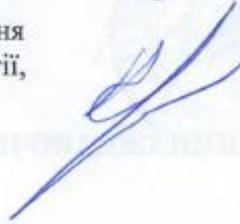
**8. Зауваження та пропозиції:** продовжити пошук та оцінку науково-практичної інформації з використання феномену впливу біометалів на фармакотерапевтичні ефекти та технологічні показники ліпідних композицій.

Завідувачка кафедри біотехнології,  
біофізики та аналітичної хімії



Ольга БЛИЗНЮК

Відповідальний за впровадження  
Професор кафедри біотехнології,  
біофізики та аналітичної хімії



Юрій КРАСНОПОЛЬСЬКИЙ



US012168018B1

(12) **United States Patent**  
Gryhorieva et al.

(10) **Patent No.:** US 12,168,018 B1  
(45) **Date of Patent:** Dec. 17, 2024

(54) **PHARMACOLOGICALLY ACTIVE LIPOSOMAL COMPOSITION COMPRISING QUERCETIN AND ZINC**

## FOREIGN PATENT DOCUMENTS

(71) Applicants: **CONSORTIUM "UKRINDUSTRY"**, Kyiv (UA); **STATE INSTITUTION INSTITUTE OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF NATIONAL ACADEMY MEDICAL SCIENCES OF UKRAINE**, Kyiv (UA)

CN	100367953	C	2/2008
CN	100367968	C	2/2008
CN	101904821	A	12/2010
CN	102058536	A	5/2011
RU	2 181 051	C1	4/2002
UA	38504	A	5/2001
UA	76393	C2	7/2006
UA	111762	C2	6/2016
WO	2011/019677	A1	2/2011

(72) Inventors: **Ganna Gryhorieva**, Kyiv (UA); **Natalia Konakhovych**, Vasylkiv (UA); **Yurii Krasnopolskyi**, Kharkov (UA); **Oleksandr Pylypenko**, Kyiv (UA); **Vitalii Prokhorov**, Kharkov (UA); **Zinaida Suvorova**, Sofiivska Borschahivka (UA); **Oleg Yadlovski**, Kyiv (UA)

## OTHER PUBLICATIONS

(73) Assignees: **CONSORTIUM "UKRINDUSTRY"**, Kyiv (UA); **STATE INSTITUTION INSTITUTE OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF NATIONAL ACADEMY MEDICAL SCIENCES OF UKRAINE**, Kyiv (UA)

Feldman, C., et al., "Epidemiology of lower respiratory tract infections in adults," *Expert Review of Respiratory Medicine*, 2019, 13(1):1-16.  
 Glezen, W.P., et al., "Epidemiology of Acute Lower Respiratory Disease in Children," *The New England Journal of Medicine*, 1973, 288(10):498-505.  
 Rom, W.N., et al., "Characterization of the Lower Respiratory Tract Inflammation of Nonsmoking Individuals with Interstitial Lung Disease Associated with Chronic Inhalation of Inorganic Dusts," *Am Rev Respir Dis*, 1987, 136:1429-1434.  
 Meyer, N.J., et al., "Acute respiratory distress syndrome," *Lancet*, 2021, 398:1-17.  
 Miller, K., "Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)." WebMD. [retrieved on Nov. 23, 2023]. Retrieved from the Internet <URL: <https://www.webmd.com/lung/ards-acute-respiratory-distress-syndrome>>, pp. 1-3.  
 Mefahi, G.H., et al., "A Vicious Circle Between Oxidative Stress and Cytokine Storm in Acute Respiratory Distress Syndrome Pathogenesis at COVID-19 Infection," *Ukr. Biochem. J.*, 2021, 93(1):18-29.

(\* ) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.

(Continued)

(21) Appl. No.: 18/399,141

(22) Filed: Dec. 28, 2023

## (30) Foreign Application Priority Data

Sep. 14, 2023 (UA) ..... 2023 04351

## (51) Int. Cl.

*A61K 31/685* (2006.01)  
*A61K 9/00* (2006.01)  
*A61K 9/107* (2006.01)  
*A61K 9/127* (2006.01)  
*A61K 31/353* (2006.01)  
*A61K 31/7016* (2006.01)  
*A61K 33/30* (2006.01)  
*A61P 11/08* (2006.01)

## (52) U.S. Cl.

CPC ..... *A61K 31/685* (2013.01); *A61K 9/0019* (2013.01); *A61K 9/0043* (2013.01); *A61K 9/107* (2013.01); *A61K 9/127* (2013.01); *A61K 31/353* (2013.01); *A61K 31/7016* (2013.01); *A61K 33/30* (2013.01); *A61P 11/08* (2018.01)

## (58) Field of Classification Search

CPC ..... A61K 31/685  
 See application file for complete search history.

## (56) References Cited

## U.S. PATENT DOCUMENTS

2017/0196808 A1\* 7/2017 Grygor'ieva ..... A61K 31/352

## (57) ABSTRACT

The invention relates to pharmaceuticals and concerns a pharmacologically active liposomal composition comprising quercetin and zinc. According to the invention, the composition further comprises zinc chloride, while including a zinc ion into liposomes, and the composition is a lyophilized powder in the following ratio of components (wt. %):

quercetin 1  
 phosphatidyl choline 36.7  
 zinc ion 0.11-0.43  
 lactose 54.51  
 remainder—water, chloride ion.

Therewith, the content of liposomes has the following ratio: phosphatidylcholine:quercetin:zinc ion—1:0.027:0.002-1:0.027:0.023.

The claimed composition possesses anti-inflammatory effect and may be used as a pharmacotherapeutic agent in acute respiratory distress syndrome in a form of emulsion for inhalation and/or injection use.

**4 Claims, 16 Drawing Sheets**

(56)

## References Cited

## OTHER PUBLICATIONS

- Mahmudpour, M., et al., "COVID-19 cytokine storm: The anger of inflammation," *Cytokine*, 2020, 133(155151):1-10.
- Empson, S., et al., "COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome: One Pathogen, Multiple Phenotypes," *Crit Care Clin*, 2022, 38:1-16.
- Lai, C., et al., "Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Facts and myths," *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2020, 53:1-10.
- Acute Respiratory Distress Syndrome, What Is Acute Respiratory Distress Syndrome? (a forum for National Heart, Lung, and Blood Institute) [online]. NIH, National Heart, Lung, and Blood Institute, Mar. 24, 2022, [retrieved on Apr. 26, 2024]. Retrieved from the Internet: <<https://www.nhlbi.nih.gov/health/ards>>, pp. 1-4.
- Nijveldt, R.J., et al., "Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications," *Am J Clin Nutr*, 2001, 74:418-425.
- Read, M.A., "Flavonoids: Naturally Occurring Anti-Inflammatory Agents," *American Journal of Pathology*, Aug. 1995, 147(2):235-237.
- Bischoff, S.C., "Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease," *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2008, 11:733-740.
- Ganesan, S., et al., "Quercetin inhibits rhinovirus replication in vitro and in vivo," *Antiviral Research*, 2012, 94:1-15.
- Biancatelli, R.M.L.C., et al., "Quercetin and Vitamin C: An Experimental, Synergistic Therapy for the Prevention and Treatment of SARS-CoV-2 Related Disease (COVID-19)," *Frontiers in Immunology*, Jun. 19, 2020, 11(1451):1-11.
- Quercetin (Quercetinum). Datasheet. [online]. Compendium, 2023 [retrieved on Nov. 24, 2023]. Retrieved from the internet: <<https://compendium.com.ua/dec/260462/>>.
- Tiwari, G., et al., "Drug delivery systems: An updated review," *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, Jan. 2012, 2(1):1-10.
- Barbosa Da Silva, W.M., et al., "Synthesis of Quercetin-Metal Complexes, In Vitro and In Silico Anticholinesterase and Antioxidant Evaluation, and In Vivo Toxicological and Anxiolytic Activities," *Neurotoxicity Research*, Dec. 18, 2019, pp. 1-11.
- Shastrala, K., et al., "Synthesis, characterization, and pharmacological evaluation of some metal complexes of quercetin as P-gp inhibitors," *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2021, 7(99):1-13.
- Clergeaud, G., et al., "A simple liposome assay for the screening of zinc ionophore activity of polyphenols," *Food Chemistry*, 2016, 197:916-923.
- Prasad, A.S., "Discovery of Zinc for Human Health and Biomarkers of Zinc Deficiency," *Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals*, 2017, pp. 1-21.
- Uskokovic-Markovic, S., et al., "Zinc-quercetin complex—from determination to bioactivity," *Acta Agriculturae Serbica*, 2020, 25(50):113-120.
- Corvitan ® (Corvitan®). Datasheet. [online]. Compendium, 2023 [retrieved on Nov. 24, 2023]. Retrieved from the internet: <<https://compendium.com.ua/dec/281727/>>.
- Pomytkin, I.A., et al., "A Model of Fatal Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome," *Journal Biomed*, 2020, 16(4):24-33 (abstract only).
- "Liposomal preparations," *The State Pharmacopoeia of Ukraine 2.0*, 2015, pp. 1-9.
- Priprem, A., et al., "Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2008, 4:1-10.
- Lipoflavon (Lipoflavon). Datasheet. [online]. Compendium, 2023 [retrieved on Nov. 24, 2023]. Retrieved from the internet: <<https://compendium.com.ua/dec/268166/>>.
- "Buffer Calculations," *The State Pharmacopoeia of Ukraine*, 2001, pp. 1-3.
- European Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Research and Other Scientific Purposes, Council of Europe, Mar. 18, 1986 [online] Retrieved from the internet: <[https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994\\_137#Text](https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_137#Text)>, pp. 1-18.
- Stefanov, O.V., "Experimental (Preclinical) Study: The "colloquial" language is used to describe the non-steroidal anti-inflammatory drugs," *Avicenna*, 2001, pp. 1-534.
- Zhang, Y., et al., "Extracellular Histones Play an Inflammatory Role in Acid Aspiration-induced Acute Respiratory Distress Syndrome," *Anesthesiology*, Jan. 2015, 122(1):127-139.

\* cited by examiner

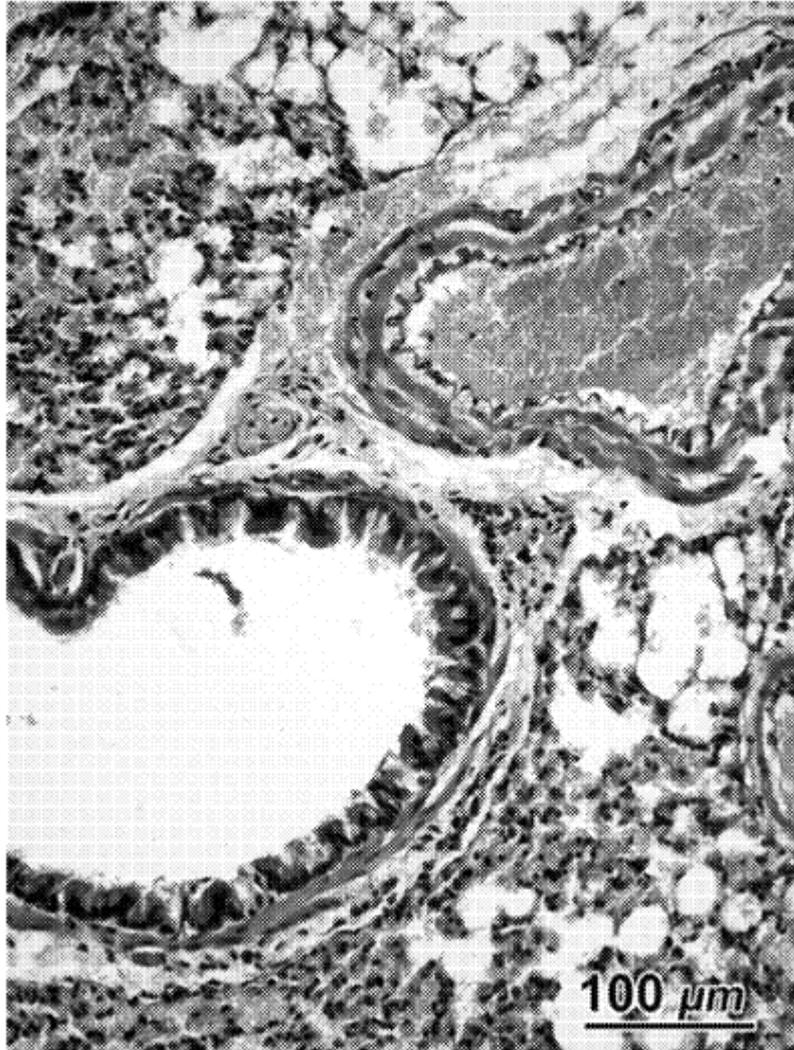


Fig. 1(a)

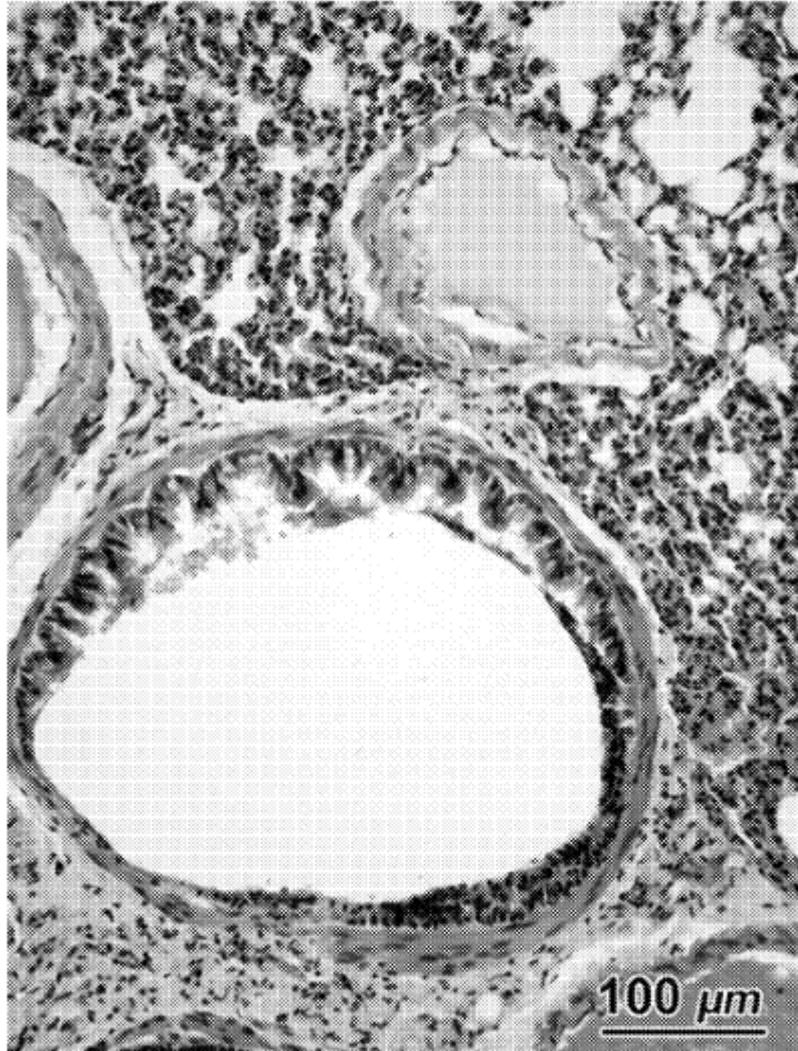


Fig. 1(b)

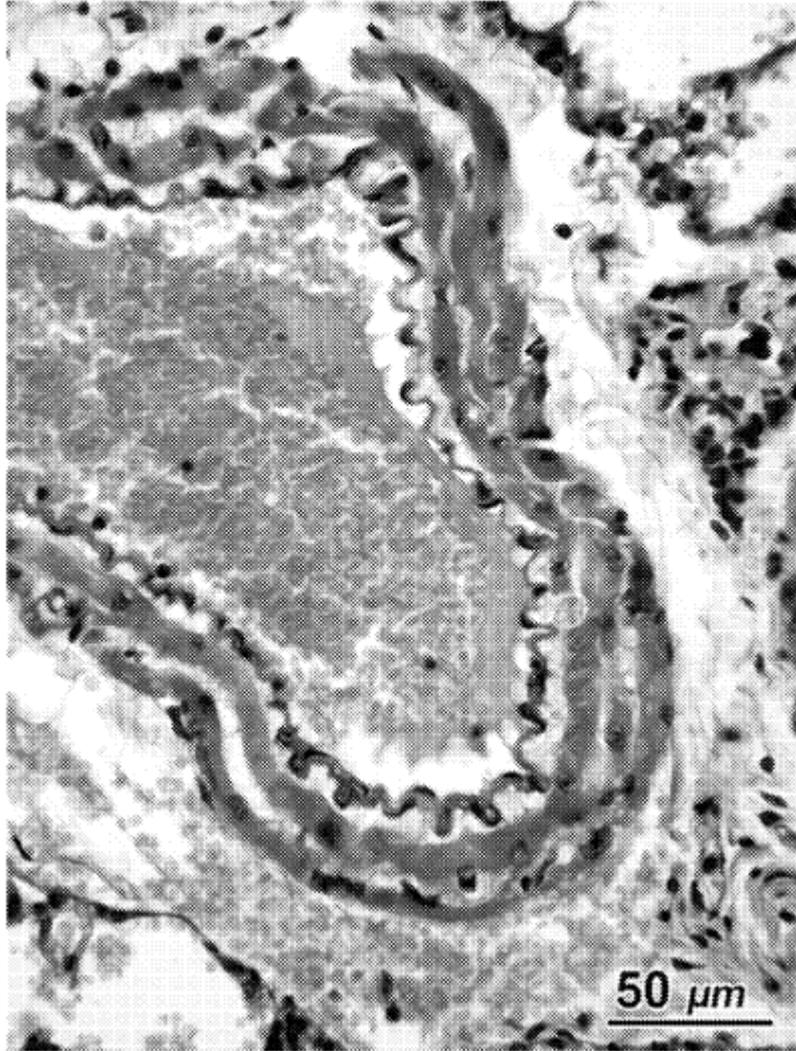


Fig. 2(a)

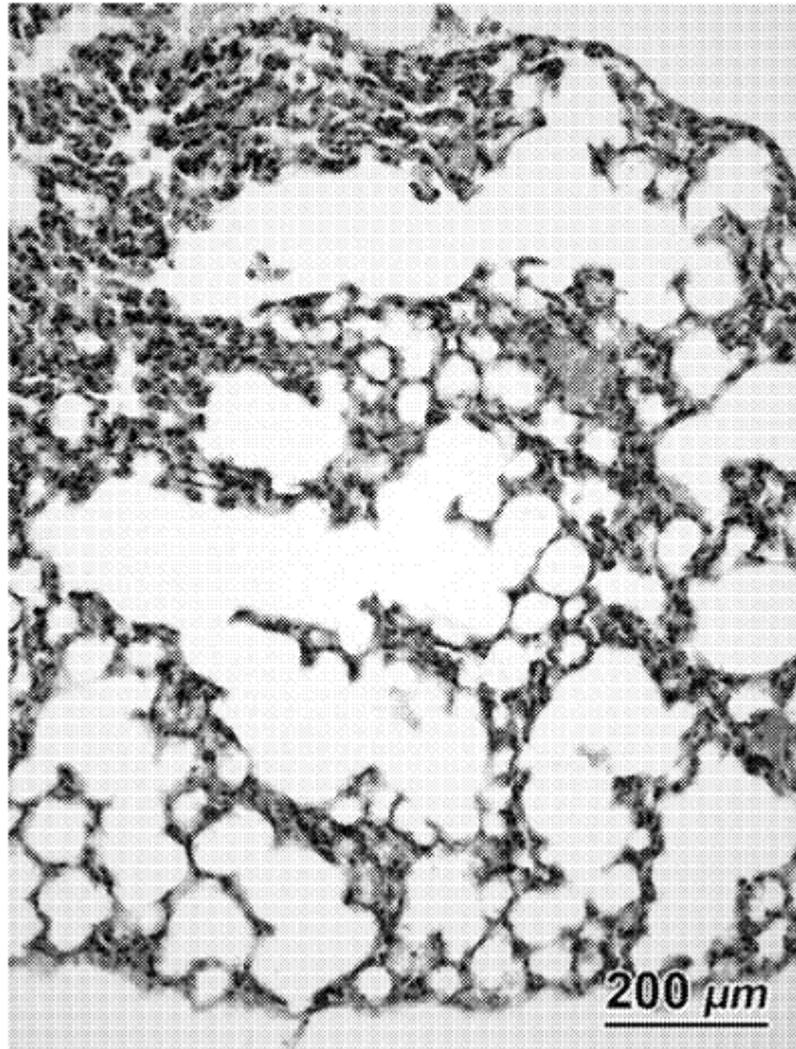


Fig. 2(b)

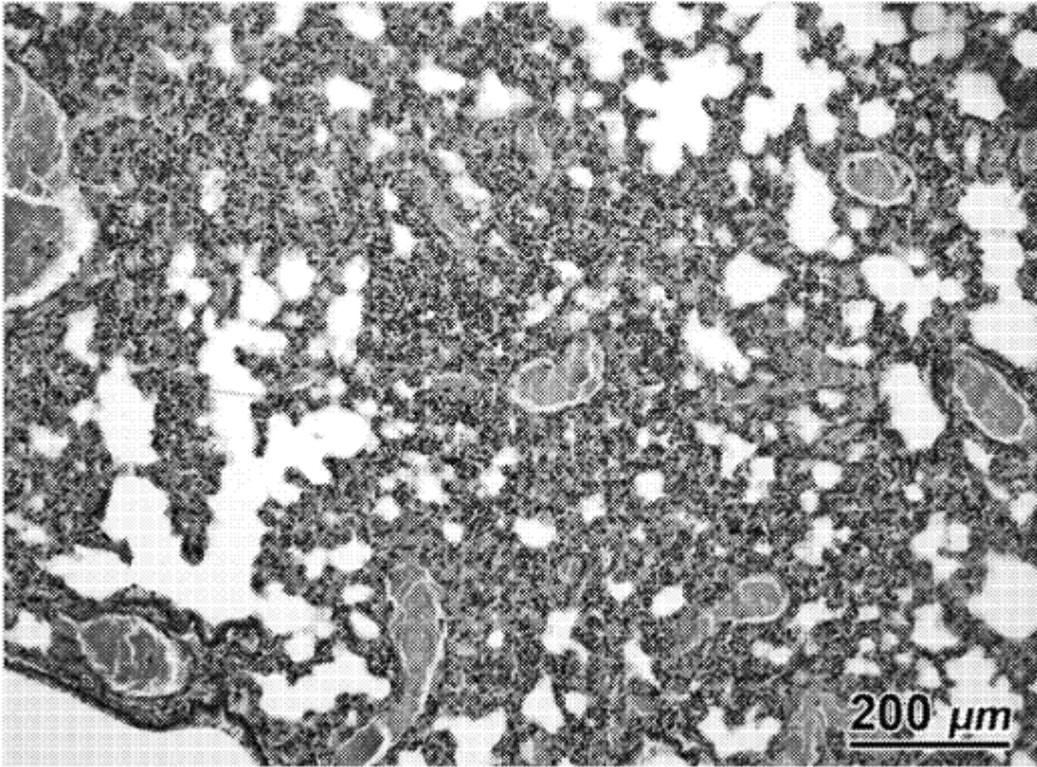


Fig. 3

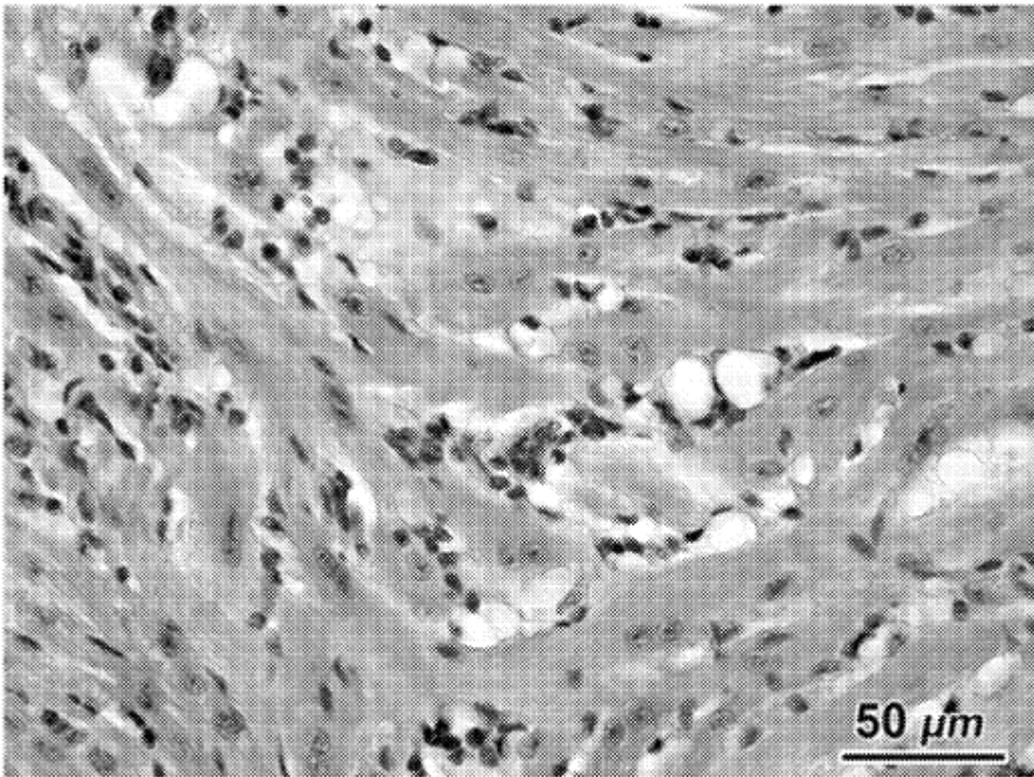


Fig. 4

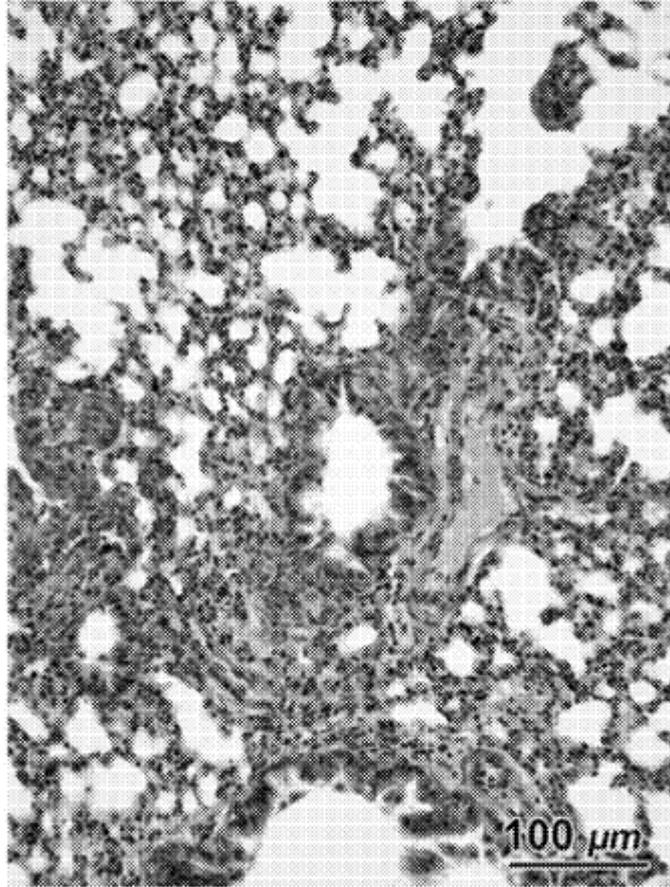


Fig. 5(a)

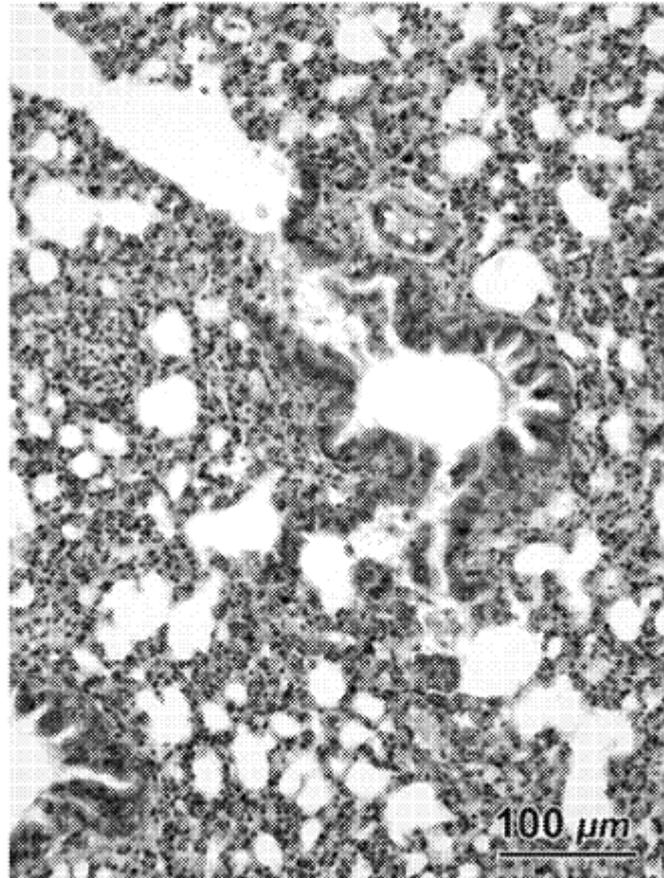


Fig. 5(b)

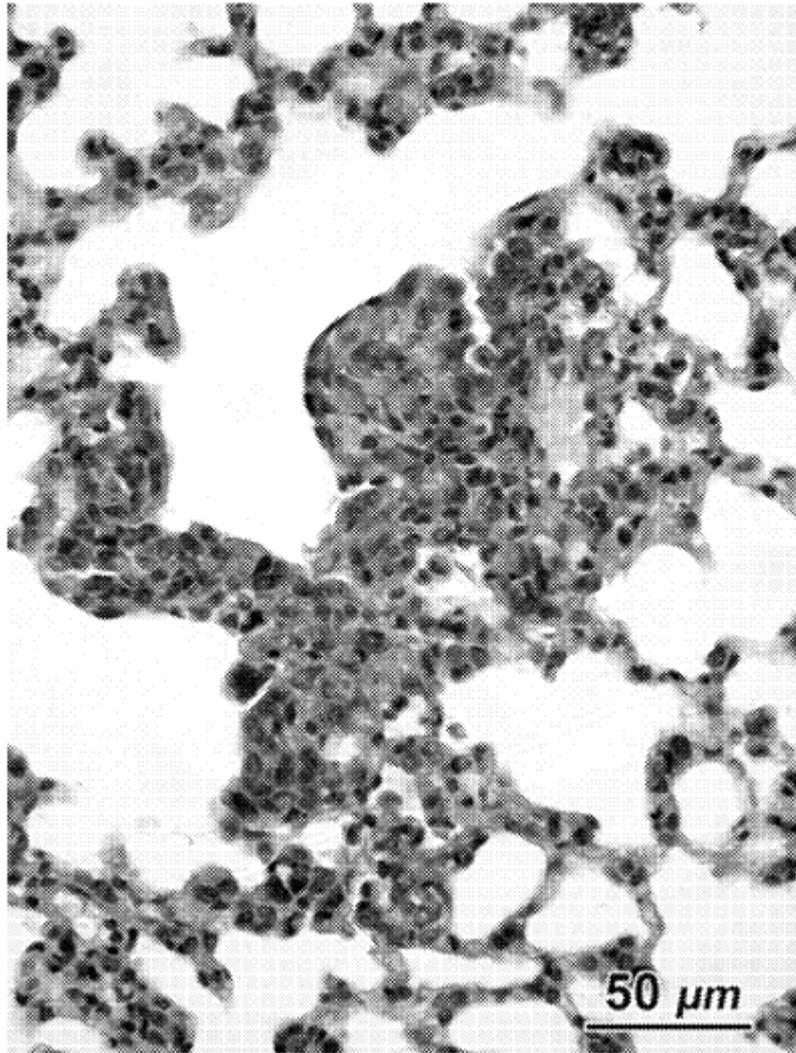


Fig. 6(a)

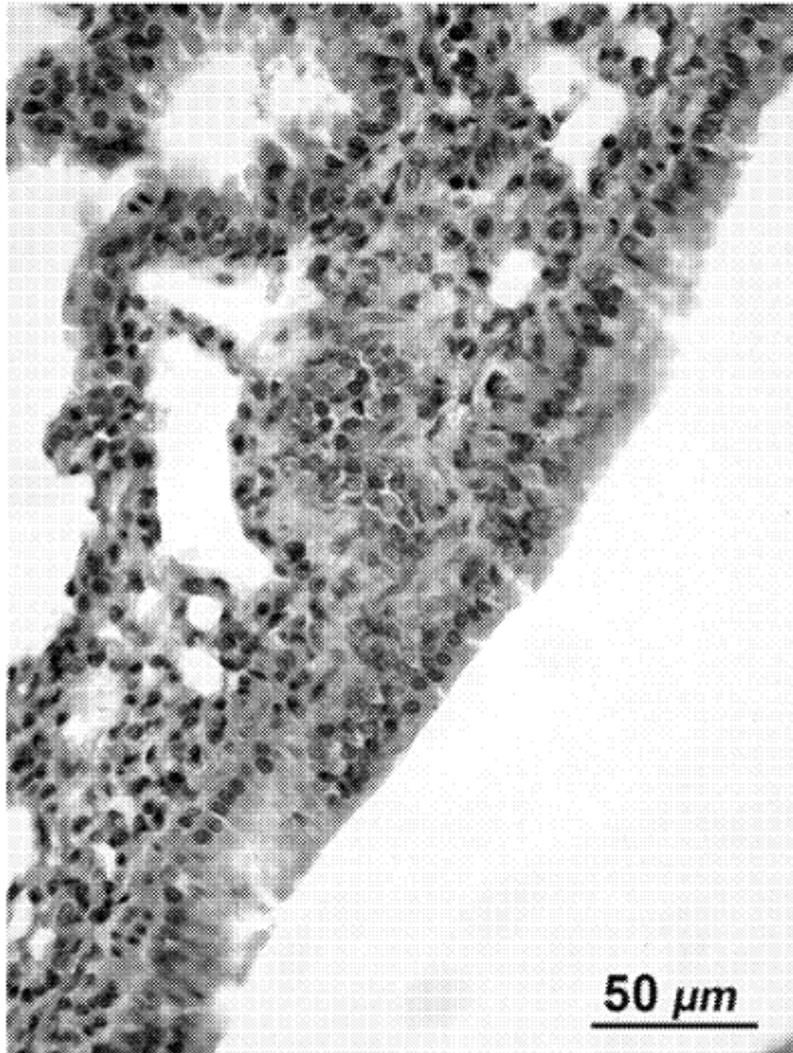


Fig. 6(b)

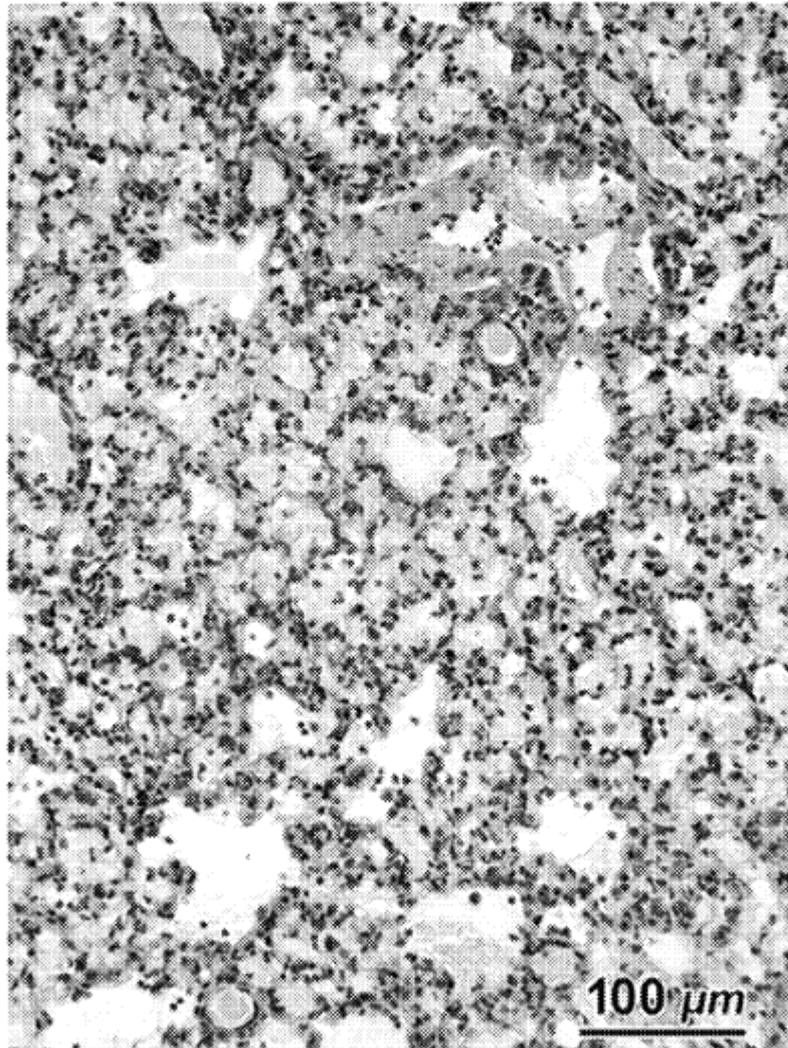


Fig. 7(a)

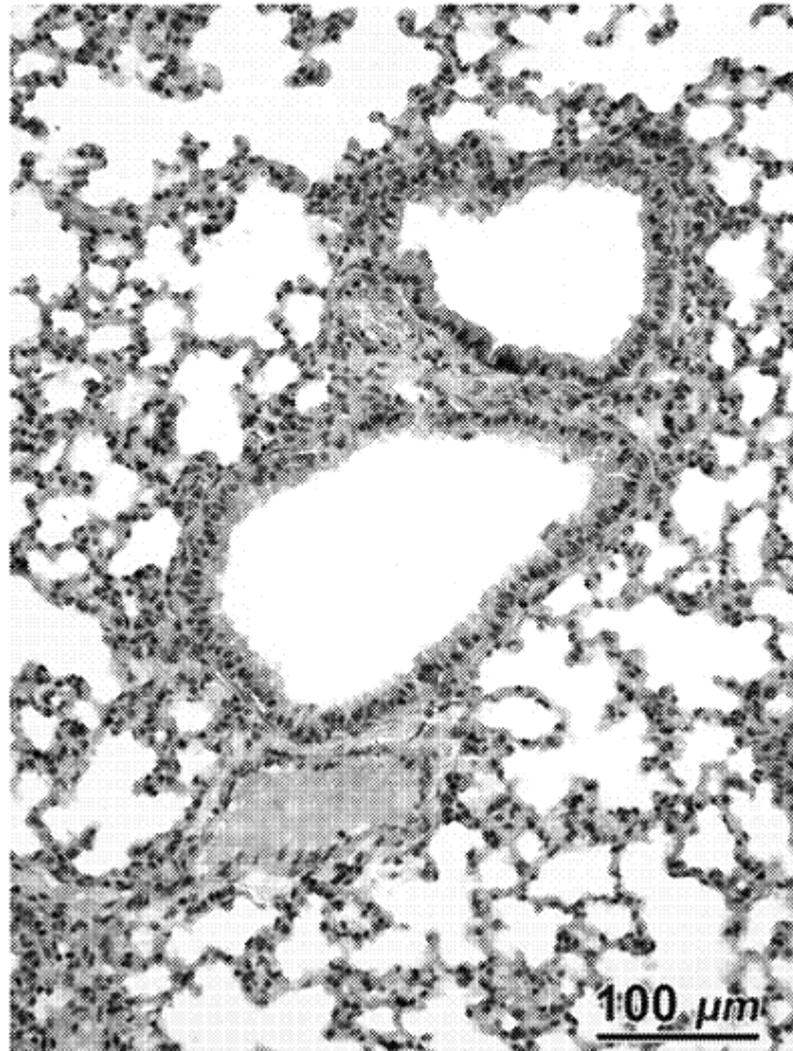


Fig. 7(b)

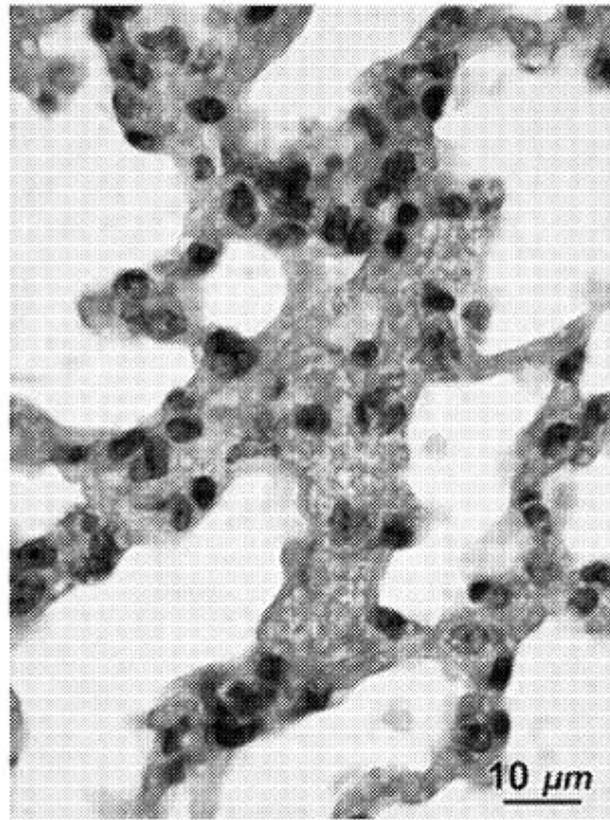


Fig. 8(a)

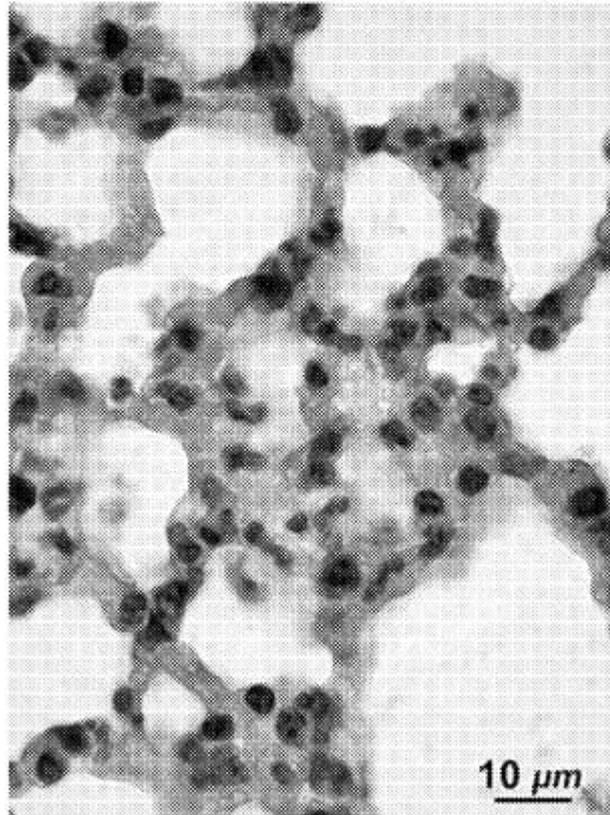


Fig. 8(b)

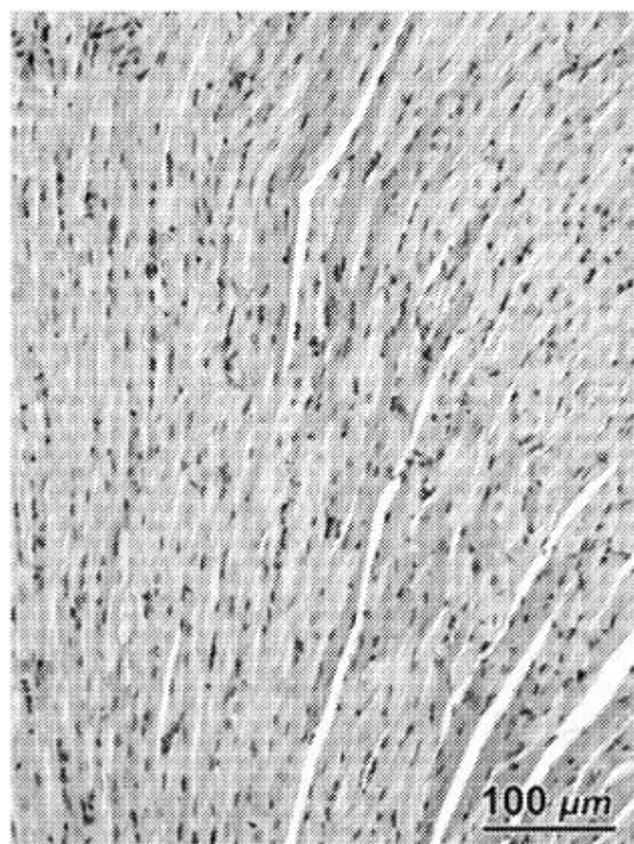


Fig. 9(a)

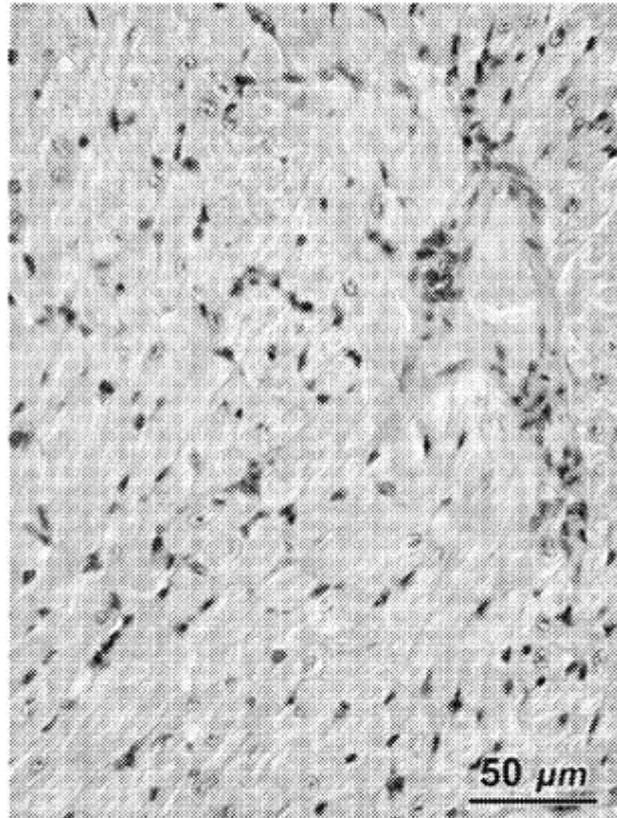


Fig. 9(b)

US 12,168,018 B1

1

**PHARMACOLOGICALLY ACTIVE  
LIPOSOMAL COMPOSITION COMPRISING  
QUERCETIN AND ZINC**

CROSS-REFERENCE TO RELATED  
APPLICATION

This application claims priority to Ukrainian Application No. a 2023 04351, filed Sep. 14, 2023, which is hereby incorporated by reference in its entirety.

The invention relates to pharmaceuticals and concerns a pharmacologically active liposomal composition comprising quercetin and zinc, has an anti-inflammatory effect and may be used as a pharmacotherapeutic agent in acute respiratory distress syndrome.

Usually, epidemiological analysis defines lower respiratory tract diseases as serious medical issues having life-threatening consequences [1-3], among which a special role is taken by a so-called "Acute respiratory distress syndrome"-ARDS. ARDS is a clinically heterogeneous syndrome that may occur in various pathological conditions (pneumonia, aspiration, injury, sepsis) in wide range of clinical manifestations [4, 5]. ARDS which is based on a diffuse inflammation of lungs with an acute respiratory failure is manifested as an acute hypoxemia and bilateral infiltrations of chest which are caused by a non-cardiogenic pulmonary edema [4]. A dangerous developmental factor of the ARDS is a non-controlled discharge of pro-inflammatory mediators which is called "cytokine storm" that results in serious damages of endothelium of capillaries and alveoli, development of pulmonary hypertension and hemorrhages [6, 7].

Heavy worldwide experience of unprecedented spread of the ARDS during the COVID-19 pandemic [8, 9] brought light on main medical challenges which are associated with this syndrome: "unacceptably high mortality and insufficient efficiency of existing pharmacotherapy" [3].

Strategy of treatment of the ARDS implies combining an artificial pulmonary ventilation and a so-called maintenance drug therapy which still has a predominantly empiric nature [3, 10]. Considering a wide variability of used drugs (agents for correcting pulmonary vasodilatation, coagulation, stabilization of epithelium, recovery of alveolar units, enhancement of clearance of liquid and acid etc.), a permanent component of the ARDS pharmacotherapy is anti-inflammatory agents of steroid and non-steroid nature. At the background of the typically serious condition of patients with ARDS, such polypragmasy has focused attention on risks of maintenance therapy as a result of known and unexpected adverse reactions of individual drugs and their mutual influence. Attempts to increase a benefit-risk balance when treating the ARDS and to reduce volumes of so-called "risky therapy" [3] actualize a demand in safe drugs having polyfunctional pharmacological effects.

Among these agents, attention is drawn to quercetin (QC) 3,3',4',5,7-pentaoxyflavone being a natural polyphenol that belongs to a subclass of flavonoids [11]. High antioxidant activity of the QC defines polyfunctionality of its pharmacotherapeutic potential: anti-inflammatory, thrombin-inhibiting, antispastic effect etc. [11-13] which is especially important in the context of activation of inflammatory cascade and blood coagulation system that is accentuated in ARDS. Considering the ARDS spread during the coronavirus disease as a result of SARS-COV-2 infection, a predicted in vitro and in silico [14, 15] anti-virus effect of the QC should be noted as well.

2

Nevertheless, the fact that the QC is almost non-soluble in physiologically adequate systems drastically restricts a range of its drugs to almost only oral forms having a low bioavailability of active substance [13,16], which a priori makes their use impossible in serious diseases with a destroyed compliance of the patients.

Expediency of pharmacotherapeutic use of polytropic properties of the QC for treatment of ARDS brings attention to its products which, as predicted, are suitable for methods for administration into a body and their combining which are alternative to the oral method. These requirements may be met by transport forms of the QC being an active ingredient in a certain vehicle, according to a modern pharmacy narrative "Drug delivery systems" [17].

Transport QC compositions are described, the compositions are in a form of a solution with polyvinylpyrrolidone or a mixture of sodium tetraborate and Trilon B or a suspension with a number of acidifiers, flavorings and colorants [20]. A common drawback of these compositions is a presence of predominant amounts of exogenous excipients and instability which deteriorates usability and safety of a potential parenteral administration.

It should be noted that among transport forms of natural polyphenols, in particular QC, compositions with essential metals (zinc, copper, iron) are considered, where the flavonoid acts as an ionophore [21,22]. It has been in vitro demonstrated that complex formation, in particular, with a zinc cation facilitates passage of QC through a model cellular membrane that is imitated by a monolayer liposome [23]. Of course, establishment of transport role for the QC-Zn complex expands the understanding of important physiological status of this biometal [24, 25], but there is still no information about pharmacologically identified systems of QC with zinc which could have a predicted clinical translation. Opportunely it should be noted that nowadays, therapeutic use of zinc compounds is restricted by oral products having a status of so-called "biological supplements".

A composition of QC in a vehicle being povidone (polyvinylpyrrolidone) in a presence of sodium hydroxide is known, the composition is in a form of a lyophilized powder for preparing a solution for injections/infusions [26]. This composition is introduced as a licensed drug "Corvitan" for a complex therapy of cardiovascular diseases and cerebral circulation disturbances. There is no information regarding suitability of the QC-povidone composition for use in ARDS. Predicted warning of such use is caused by described consequences of side effect of injection and inhalation administration of povidone as a QC matrix (possible development of pulmonary interstitial fibrosis, reticulocytosis, anemia, leukocytosis) [27, 28].

According to normative documents of regulatory authorities, innovations of modern pharmacy include drug delivery systems on a liposomal platform [29]. Developments of more than 70 worldwide licensed liposomal drugs and vaccines (including a vaccine against Covid-19 by Pfizer-BioNTech and Moderna) based on liposomal compositions also concern liposomal products comprising QC.

Liposomal compositions of QC are known which are based on the following phospholipid vehicles: phosphatidyl choline (PC) and its mixtures with phosphatidyl choline ethanolamine or phosphatidyl choline ethanolamine distearate in a presence of a number of additives (cholesterol, hydroxypropyl cyclodextrin, polyethyleneglycol, stearic acid or glycerol) [30-33]. Also, a composition of QC with "a surrogate surfactant" is described, which, in contrast to an endogenous surfactant, comprises an artificial mixture of PC

## US 12,168,018 B1

3

with variations of surfactant additives and sorbents (tween-80, deoxycholate, polyethylenized castor oil, poloxamer, methyl cellulose etc.) [34].

A common drawback of these compositions of QC with phospholipids is a presence of a large range of additives of various (sometimes incompatible) chemical nature. This factor that generally contradicts the Occam's razor ("Essences must not be multiplied"), in the context of said compositions, negatively affects the uniformity of phase condition, dispersiveness of particles and stability up to destruction of the liposomal structure. When combined with a non-physiological nature of part of components, this factor puts functionality and safety of parenteral methods of administration of these compositions in a doubt. This could explain the fact that none of the mentioned phospholipid QC products came closer to the status of the drug having a proven effect, safety and pharmaceutical quality.

Methods for preparing a QC composition in phosphatidyl choline liposomes in a form of a lyophilized powder in a presence of lactose are described [35, 36]. This composition forms the base for a licensed drug "Lipoflavone" [37]. Lipoflavone in a form of a solution for injections/infusions that is prepared from the lyophilized composition is used as a cardioprotector in cardiological (acute myocardial infarction, angina pectoris) and in oncological clinic (cardiomyopathy caused by a polychemotherapy of breast cancer). In ophthalmologic clinic, treatment effect of eye drops of Lipoflavone in keratitis, eye injuries and burns has been established.

A liposomal composition of QC and PC prepared according to Patent of Ukraine No. UA 111762 is taken as the closest prior art of the claimed subject matter of the invention being a composition that is the closest one in terms of a set of features, namely: a nature of majority of components of the composition and liposomal form of the product that comprises QC and has pharmacological activity.

The liposomal composition of QC and PC, according to the prototype, is characterized by a mass ratio of PC:QC therein (1:0.020-0.050) and parameters of the liposomal entity (sizes and fineness of dispersion of particles of liposomes, stability of the reconstituted emulsion, % of inclusion of the QC to liposomes). Lactose content of the composition is not fixed, but it may be evaluated according to quantitative parameters of the preparation process according to and upon analysis of the prototype after its reproduction in order to establish competitiveness of the claimed subject matter.

There is no information about functional correspondence of the prototype composition to the treatment of the ARDS and its suitability for inhalation administration which may be crucially important when respiratory organs are affected. Although this "information lacuna" does not compromise general pharmaceutical usage of the prototype, it is expedient for the pharmacotherapy of the ARDS to be oriented towards novel liposomal QC products having a potentially high functionality at various administration routes.

A task of the claimed invention is to provide a liposomal composition of QC having a high pharmaceutical quality which exhibits pharmacological activity at ARDS and exhibits anti-inflammatory effect at various modes of administration to the body.

## SUMMARY OF THE INVENTION

The posed task is resolved by providing a liposomal composition in a form of a lyophilized powder that comprises phosphatidyl choline, quercetin, lactose and further

4

comprises a zinc ion that is achieved by adding zinc chloride to the composition to introduce the zinc ion into the liposomes. An embodiment of the subject invention is characterized in that it has the following ratios of components (wt. %):

quercetin—1,  
phosphatidyl choline—36.7,  
zinc ion—0.11-0.43,  
lactose—54.51,

the remainder—water, chloride ion,  
wherein a ratio of mass fractions of phosphatidyl choline: quercetin:zinc ion in the liposomes is in a range from 1:0.027:0.002 to 1:0.027:0.023.

The subject invention exhibits pharmacological activity in ARDS upon intravenous and inhalation administration and possesses an anti-inflammatory effect.

## DETAILED DESCRIPTION

Examples provided hereinafter illustrate preparation of the target composition product as well as the prototype composition for comparison.

Example 1—Exemplary embodiment of the subject invention. A weighed amount 1.25 g of QC (based on 100% substance [e.g., 38.39]) is dissolved in 125 ml of ethyl alcohol while stirring. A weighed amount 42.0 g of PC (based on 100% substance [e.g., 40.41]) is dissolved in 150 ml of ethyl alcohol and added to the QC solution. A mixture of solutions is transferred to the rotary evaporator and the solvent is removed under vacuum at a temperature of 40-42° C. until a thin film is produced. After completion of a drying process, an inert gas is transmitted to a flask of an evaporator during 20 min.

The produced film is quantitatively taken off from the flask walls of the evaporator by means of 1400 ml of a lactose solution (pharmacoepial milk sugar) in the pH phosphate buffer (6.7-7.1) comprising 50.0 g of lactose under stirring during 10 min at 10 RPM until a homogeneous emulsion is produced. 50 ml of a zinc chloride solution (e.g., [43]) in a pH phosphate buffer (6.7-7.1) comprising 0.545 g of zinc chloride (based on 100% substance  $ZnCl_2$ ) or 0.262 g of zinc ion (based on  $Zn^{2+}$ ) is added to the produced mixture and stirred for 5 min at 10 RPM.

The emulsion is subjected to dispersing in a high-pressure homogenizer (e.g., M 110P Microfluidizer Processor, Microfluidics) at a temperature 38-43° C. with a stepwise pressure increase from 300 atm to 900 atm in 1-9 cycles. At the end of dispersing process, size of particles of the emulsion (e.g., Malvern Zetasizer Nano S) is not greater than 180 nm.

After homogenization, 50 ml of the lactose solution in a pH phosphate buffer (6.7-7.1) comprising 12.5 g of lactose is added to the emulsion and stirred for 5 min at 10 RPM. The produced emulsion is filtered through a membrane having a pore diameter of 0.22  $\mu m$ , subjected to sterilization filtration and poured in doses into glass bottles in aseptic conditions. The bottles with emulsion are subjected to intensive freezing and lyophilizing drying is conducted (e.g., Martin Christ-2-6-D, USA). Upon drying, the bottles with the lyophilized product are sealed under the inert gas atmosphere in aseptic conditions. The bottles with the lyophilized product are stored at a temperature of  $-(18-20)^\circ C$ .

In Examples 2-5, embodiments of the subject invention were prepared according to the description of Example 1. Changes are reflected in Table 1.

## US 12,168,018 B1

5

6

TABLE 1

Components for preparation of the claimed composition and the prototype composition						
The used components	Example No.					The prototype composition
	The claimed composition					
	1	2	3	4	5	
<b>QC:</b>						
weight, g	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
solution volume, ml	125	125	125	125	125	125
<b>PC:</b>						
weight, g	42.0	42.0	42.0	42.0	42.0	42.0
solution volume, ml	150	150	150	150	150	150
<b>Lactose:</b>						
<b>Before dispersing:</b>						
weight, g	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
solution volume, ml	1400	1370	1410	1430	1300	1450
<b>After dispersing:</b>						
weight, g	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
solution volume, ml	50	50	50	50	50	50
<b>Zinc chloride, ZnCl<sub>2</sub>:</b>						
weight, g	0.545	1.090	0.273	0.136	2.180	Absent
solution volume, ml	50	80	40	20	150	
<b>*incl.:</b>						
ion Zn <sup>2+</sup> , g	0.262	0.523	0.131	0.066	1.046	
ion Cl <sup>-</sup> , g	0.283	0.567	0.141	0.070	1.134	

\*calculated according to the formula of ZnCl<sub>2</sub> molecule (m.m. 136.28)

The target product is a lightweight amorphous light-yellow powder having a distinctive odor that is provided in the bottle.

Preparation of another embodiment of the subject invention according to is described in Example 6. Identical reagents, solvents and equipment are used both for the claimed composition and the prototype.

Example 6—The prototype composition. A weighed amount 1.25 g of QC (based on 100% substance) is dissolved in 125 ml of ethyl alcohol while stirring. A weighed amount 42.0 g of PC (based on 100% substance) is dissolved in 150 ml of ethyl alcohol and added to the QC solution. A mixture of solutions is stirred, transferred to the rotary evaporator and the solvent is removed under vacuum at a temperature of 40-42° C. until a thin film is produced. After completion of a drying process, an inert gas is transmitted to a flask of an evaporator during 20 min. The film is quantitatively taken off from the flask walls of the evaporator by means of 1450 ml of a lactose solution in the pH phosphate buffer (6.7-7.1) comprising 50.0 g of lactose under stirring during 10 min at 10 RPM until a homogeneous emulsion is produced.

The emulsion is subjected to dispersing in a high-pressure homogenizer at a temperature 38-43° C. with a stepwise pressure increase from 300 atm to 900 atm in 1-9 cycles. At the end of dispersing process, size of particles of the emulsion is not greater than 180 nm. After homogenization, 50 ml of the lactose solution in a pH phosphate buffer (6.7-7.1) comprising 12.5 g of lactose is added to the emulsion and stirred for 5 min at 10 RPM. The produced emulsion is filtered through a membrane having a pore diameter of 0.22 μm, subjected to sterilization filtration and poured in doses to glass bottles in aseptic conditions. The bottles with emulsion are subjected to intensive freezing and

lyophilizing drying is conducted. The bottles with the lyophilized product are sealed under the inert gas atmosphere in aseptic conditions.

The prototype composition is provided in the bottle in a form of a lightweight amorphous light-yellow mass having a lemon tone and a distinct odor.

During identification and establishing the formulation of the embodiments of liposomal composition and the prototype composition, they were used in a form of a lyophilized powder, as well as emulsion reconstituted from the lyophilized product in a sterile isotonic 0.9% solution of sodium chloride at a temperature of 37-40° C. which corresponds to a form of a potential pharmacotherapeutic usage.

Formulation and pharmaceutical quality of the produced embodiments of liposomal composition are established according to results of qualitative and quantitative identification of components (QC, PC, lactose, zinc) and confirmation of the liposomal status and stability using a number of independent physical and chemical methods, namely:

by a spectrophotometric method according to a characteristic absorption at wavelengths (255-259) nm and (373-377) nm and an optical density value (375±2) nm (включити (490±2) nm) of the product solution in ethyl alcohol as compared to the one of the standard quercetin sample solution (identification and quantitative determination of QC, respectively);

by an atomic adsorption spectroscopy (spectrometer Shimadzu AA-6300 having a gas-discharge lamp (current 6-10 mA) by measuring an atomic absorption of the composition after transition into a gaseous phase at 2000° C. in an air/acetylene flame at an emission wave of 213.9 nm. For calibration, zinc cyclohexane butyrate is used as a standard (identification and quantitative determination of zinc).

## US 12,168,018 B1

7

by a thin-layer chromatography method on plates Supelco Silicagel on TLC A1 according to a chromatogram of the target product solution in a mixture of chloroform, methanol and water (73:23:3 vol.) on which dots of PC are present at a level of main dots on the chromatogram of the solution of the standard PC sample (identification of PC);

by a liquid chromatography method with an evaporative light scattering detection (ELSD) on a PerfectCHrom 100 Diol column according to a chromatogram of the target product solution in the mixture of chloroform and methanol (20:80 vol.), while using, for calibration and comparison, the solutions of standard PC samples (identification and quantitative determination of PC);

by a method of iodometric chemical analysis by precipitation of the target product emulsion by means of a cuprum sulfate solution in an alkaline medium, contacting a supernatant solution with iodine and titrating a residual iodine by a sodium thiosulfate (identification and quantitative determination of lactose);

by a liquid chromatography method on a Supelco Si column having a protective cartridge according to product emulsion chromatograms before and after gel permeation chromatography on a Sephadex G-25 column with a control of liposomes discharge at an absorption at 540 nm. Peak area on a standard chromatogram

8

is used for calibration and comparison (control of introduction of components into the liposomes);

by a thin-layer chromatography method on plates Supelco Silicagel on TLC A1 according to a chromatogram of the target product solution in a mixture of methanol and water (80:20 vol.) on which dots of lipoderivatives of PC are present at a level of main dots on the chromatogram of the solution of the standard lisoPC sample (identification of PC) using water as a mobile phase (determination of PC oxidation index and liposomes stability);

by a gas chromatography method on a DB-624 column having a peak area of ethyl alcohol on a target product chromatogram having an internal standard (mixture of N,N-dimethylformamide and propanol-1) as compared to a peak on a chromatogram of a standard sample of ethyl alcohol (determination of residual organic solvent);

by a method of laser diffraction of liposomal product emulsion on a Malvern Zetasizer NanoZS device (determination of size of liposomes and their distribution according to the sizes);

determination of pH of the liposomal product emulsion (compliance with requirements of parenteral administration).

Table 2 provides results of physical and chemical analyses.

TABLE 2

Identification of the claimed liposomal composition and the prototype composition according to the data of physical and chemical analyses						
Parameter	Example No.					The prototype composition
	1	2	3	4	5	
Quantitative identification of the components:						
QC	+	+	+	+	+	+
PC	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+
Zinc	+	+	+	+	+	Absent
Quantitative content of the component in the emulsion reconstituted from the lyophilized composition bottle <sup>1)</sup> , mg/ml:						
QC ( $\pm 0.02$ )	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
PC ( $\pm 0.15$ )	27.50	27.50	27.50	27.50	27.50	27.50
Lactose ( $\pm 0.2$ )	40.9	40.9	40.9	40.9	40.9	40.9
Zinc ( $\pm 0.002$ )	0.16	0.33	0.08	0.04	0.32	Absent
Quantitative content of the components in the lyophilized composition, mg/bottle						
QC ( $\pm 0.02$ )	15.03	15.02	15.02	15.03	15.05	15.0
PC ( $\pm 0.15$ )	550.3	550.2	550.3	550.4	550.2	550.1
Lactose ( $\pm 0.2$ )	818.0	818.0	818.0	818.0	818.0	818.0
Zinc ( $\pm 0.002$ )	3.202	6.505	1.641	0.832	12.804	Absent

## US 12,168,018 B1

9

10

TABLE 2-continued

Identification of the claimed liposomal composition and the prototype composition according to the data of physical and chemical analyses						
Parameter	Example No.					
	The claimed composition					The prototype composition
	1	2	3	4	5	6
Mass ratio of the components in the lyophilized composition (c.a.) <sup>2)</sup>						
QC:PC:Lactose:Zinc	1:36.7:54.5:0.21	1:36.7:54.5:0.43	1:36.7:54.5:0.11	1:36.7:54.5:0.06	1:36.7:54.5:0.89	1:36.7:54.5 (Zn is not present)
QC:PC:Zinc ratio in the liposomes before/after gel-filtration (weight ratio)	1:0.027:0.008/ 1:0.027:0.006	1:0.027:0.012/ 1:0.028:0.006	1:0.027:0.003/ 1:0.027:0.003	1:0.027:0.0002/ 1:0.028:0.0002v	1:0.027:0.024/ 1:0.028:0.023	1:0.028:0.023
Inclusions to the liposomes (% to the already included):						
QC	100	100	100	100	100	100
Zinc	100	100	100	100	99	Absent
Size of liposomes <sup>3)</sup> , nm	180/100	190/95	185/90	190/85	188/80	185/90
(±5)% of liposomes having the corresponding size		170/5	170/10	170/15	155/5 125/15	170/10
PC oxidation index (c.a.)	0.20	0.22	0.21	0.20	0.25	0.23
Residual solvent content (ethyl alcohol), %	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02
Emulsion formation duration/emulsion stability before exfoliation, min <sup>4)</sup>	1.5/70	1.7/73	1.4/70	1.2/72	1.3/60 <sup>5)</sup>	1.7/72
pH of the emulsion <sup>6)</sup>	7.0	7.1	7.0	6.9	7.0	6.9

(+) - positive identification

<sup>2)</sup>Determined for the composition that was firstly reconstituted from the lyophilized composition upon addition of 20 ml of sterile isotonic 0.9% sodium chloride solution to the bottle

<sup>3)</sup>Mass ratio is calculated based on the determined quantitative content of the components in the lyophilized composition in the bottle. The lyophilized composition comprises, except for the main components, water that is a mandatory factor of formation of the liposomal structure, as well as chloride (zinc counter-ion) and residual solvent

<sup>4)</sup>Light precipitate is observed upon emulsion formation

Results of the physical and chemical analyses have confirmed individuality and formulation of certain embodiments as a liposomal product that comprises QC, PC, lactose and zinc, namely:

Positive qualitative identification of QC, PC, lactose and zinc that corresponds to these standards confirms preservation of a native nature of the components comprised in the composition;

Accurately established quantitative content of the components defines the mass ratio of QC:PC:Lactose:Zinc in the composition that is 1:36.7:54.5:(0.06-0.89);

Stability of liposomes in the composition emulsion having a size (180±5 nm) at almost monodispersity is accompanied by a low oxidation index of PC;

According to the gel-filtration data, PC, QC and zinc are quantitatively comprised in the liposomes in the composition;

The lyophilized composition is capable of quick forming the emulsion being stable for exfoliation;

pH of the emulsion that is formed from the lyophilized composition corresponds to the physiological parameters in vivo.

Summarized analysis of characteristics of the compositions according to examples 1-5 and the prototype compo-

sition confirms their pharmaceutical quality and allows to identify the formulation and liposomal nature. Only for the compositions according to examples 4-5 and the prototype there are minor variations of individual parameters (dispersiveness of the liposomes size, reconstitution and stability of the emulsion, PC oxidation index). It should be separately noted that formation of the light precipitate in the emulsion is peculiar to the composition of example 5 only. In general, such deviations do not reduce the pharmaceutical quality of the products, although they may affect their stability during intended use and storage.

Optimal pharmaceutical quality and potential correspondence to the parenteral administration as defined by the task of the invention is inherent to the liposomal compositions of examples 1-3 having the mass ratio QC:PC:lactose:zinc of 1:36.7:54.5:0.11-0.43.

According to the task of the invention, the quality of the claimed liposomal composition is evaluated according to parameters of the pharmacological activity in ARDS and inflammation models. The selected specificity of preclinical studies corresponds to the task of the invention, as well as means evidentiality of the pharmacological quality of the created composition at various parenteral routes of administration to the body.

## 11

According to preliminary evaluations, the subject embodiments and the prototype composition are safe. In order to meet bioethical conditions that recommend to optimize a number of animals in preclinical experiments [44], evaluation of safety was conducted for the composition of examples 3 and 5 and the prototype product. Upon single intravenous administration and upon repeated daily intraperitoneal injections, said products in the form of emulsion have not caused any animals' death, local irritating effect and manifestations of inflammatory reaction for 6 days, have not made any negative influence onto dynamics of body weight, behavioral reaction and parameters of blood formula, have not caused any dystrophic changes of internal organs upon macroscopic examination.

Therefore, according to evaluation of toxicity upon single and repeated administration, the subject embodiments and the prototype composition should be classified as almost safe agents with no evidences of system toxicity which serves as a ground for their safe pharmacotherapeutic use.

Evaluation and comparison of the specific pharmacological effect of the subject embodiments and the prototype composition were conducted in the following experimental models:

- 1) exudative inflammation that is caused by subplantar administration of a carrageenin solution to white mice (a carrageenin edema model) [45] with evaluation of influence of the composition emulsion onto development of edema of rear feet.
- 2) ARDS caused by intratracheal instillation of 0.1N of hydrochloric acid into lungs of the white mice (HCl model) [46] with evaluation of influence of the composition onto survival of the animals, clinical performance, body weight dynamics and morphological state of lungs.
- 3) fatal ARDS that is caused by intratracheal administration of a mixture of lipopolysaccharide, muramylpeptide and Freund adjuvant (LPS model) to the white mice [47] with evaluation of influence of the composition onto survival of the animals, clinical performance and morphological state of lungs and heart.

The pharmacological activity of the compositions was evaluated in groups of mature white mice having a body weight of 20-26 g. In order to minimize the number of animals in highly invasive experiments during determination of the pharmacological activity in the ARDS models, individual illustrative examples of the subject liposomal composition with varying administration routes were used. In order to provide an optimal balance between compliance with the bioethical conditions and reliability of the evaluation of pharmacological activity, the exemplary compositions in the HCl and LPS models of ARDS were selected according to a crossover principle, while all examples 1-5 of the subject embodiments were investigated in the inflammation model. It should be noted that the pharmacological effect of the prototype composition was investigated in all experimental models (Example 6).

ARDS in the HCl model was reproduced by intratracheal instillation of 0.1N of hydrochloric acid (pH 1.5) in experimental group with 7 animals per each group (n=7).

ARDS according to the LPS model was reproduced by intratracheal administration of a mixture of lipopolysaccha-

## 12

ride *E. coli* (150 µg/mouse), muramylpeptide (50 µg/mouse) and Freund adjuvant (10 µl/mouse) (n=7).

Before induction of ARDS in the HCl and LPS models, the animals were subjected to anesthesia by 1% solution of propofol (0.1 ml/mouse, intravenously). Comparison groups (control-pathology) were constituted by mice which were intratracheally administered with a sterile saline solution.

According to the task of the invention, pharmacological quality of the liposomal composition when treating ARDS was evaluated while varying parenteral administration routes according to the following schemes: a) one intravenous injection immediately before reproduction of the model followed by 1 injection per each 24 hours for 6 days; b) one inhalation 2 hours before reproduction of the model, next inhalations one time per day with 24 hours interval during 6 days; c) one intravenous injection immediately before reproduction of the model following by one inhalation 2 hours after reproduction of the model, next inhalations one time per day with 24 hours interval during 6 days.

The exudative inflammation model was reproduced by subplantar administration of 1% carrageenin solution in the amount of 0.05 ml/mouse (n=7). Anti-inflammatory effect of a single-use intravenous emulsion of the composition administered 15 minutes before induction of the carrageenin edema was evaluated. The control group included animals which were administered with a sterile saline solution according to the same procedure. Three hours after administration of anti-inflammatory agent, the animals were removed from the experiment by mortification, rear feet were amputated at a level of hip joints. Edema of feet was evaluated and influence of the liposomal compositions onto edema inhibition was calculated (% to the edema value in the control without treatment).

In all the described treatment schemes, the liposomal compositions of Examples 1-6 were used in the form of emulsion in the sterile 0.9% sodium chloride solution. In order to reconstitute the emulsion to the bottle with the lyophilized product stored at room temperature for 5 minutes, 18 ml of sodium chloride solution were added and stirred for 2 minutes.

In the treatment schemes, the administered dose of the product (mg/kg of body weight) was calculated according to the QC content with consideration of the QC/bottle content (Table 1).

Morphologic studies were conducted after subjecting the animals to euthanasia in the ARDS models under ether anesthesia in 24 hours after last administration of the liposomal composition. Samples of organs were fixed in neutral 10% formaline and placed into paraffin blocks according to standard methodology. Cut-offs were stained with hematoxylin-eosin and examined on a light microscope with photographic recording.

Experimental results were evaluated according to non-parametric statistic analysis methods using Statistica 5.5\* package and Student's t-test (probability at value of p<0.05).

Table 3 provides evaluation of the anti-inflammatory activity of the liposomal QC compositions in the inflammation model.

## US 12,168,018 B1

**13**  
TABLE 3

Pharmacological activity of the subject liposomal composition and the prototype composition regarding the anti-inflammatory effect in the inflammation model (anti-edema effect)			
Liposomal composition of example No. *	Edema degree in the inflammation model, c.u.		Anti-inflammation
	Control-without treatment	Influence of the liposomal composition	effect-inhibition of edema **, %
1	68.1 ± 0.3	38.4 ± 0.3	43.6
2: in the dose (according to QC content):			
3.8 mg/kg	72.0 ± 0.4	31.4 ± 0.4	55.0
5.7 mg/kg	70.5 ± 0.3	22.1 ± 0.5	68.4
3	72.0 ± 0.3	41.0 ± 0.2	43.0
4	79.1 ± 0.4	47.6 ± 0.3	39.9
5	69.2 ± 0.5	32.4 ± 0.5	54.7
6-the prototype	68.3 ± 0.3	42.1 ± 0.3	38.4

\* Intravenous administration of the composition emulsion in the dose of 3.8 mg/kg according to the QC content

\*\* Anti-inflammatory effect is determined according to % of the edema inhibition as compared to the control without treatment

**14**

All the studied products exhibit valuable anti-inflammatory effect that is manifested as (38-55)% inhibition of the induced edema. Embodiments of the subject invention has a higher pharmacological effect, namely, the examples 1-3 and 5 have a pharmacological effect degree which is 5-17% higher than the prototype composition (the difference is 1.4% in case of Example No. 4). It should be noted that the degree of the anti-inflammatory effect of the composition is positively dose-dependent (Table 3-dose-dependent increase to 68% for Example No. 2) which is important for explanation of schemes of the potential clinical use of the subject inventive product.

Tables 4 and 5 provide evaluation of the pharmacological activity of the subject liposomal composition and the prototype composition in ARDS according to parameters of the survival dynamics and body weight of the survived animals.

TABLE 4

Pharmacological activity of the subject liposomal composition and the prototype composition according to the parameter of the survival dynamics of the animals in ARDS in the HCl and LPS models according				
Liposomal composition ** according to the example and administration route***	Number of animals survived within the group in the day after reproduction the of (survived/entered) ARDS model*			
	1	2	4	6
HCl model of ARDS				
Example 1:				
i/v	7/7	6/7	6/7	5/7
inh	7/7	7/7	6/7	6/7
i/v + inh	7/7	7/7	7/7	7/7
Example 2:				
inh	7/7	7/7	7/7	6/7
i/v + inh	7/7	7/7	7/7	7/7
Example 4:				
i/v	6/7	5/7	5/7	5/7
i/v + inh	7/7	6/7	6/7	6/7
Example 6-the prototype:				
i/v	6/7	5/7	5/7	5/7
inh	7/7	6/7	6/7	6/7
i/v + inh	7/7	7/7	6/7	6/7
Control-pathology without treatment	6/7	4/7	4/7	3/7
LPS model of ARDS				
Example 2:				
inh	7/7	6/7	5/7	5/7
i/v + inh	7/7	6/7	6/7	6/7
Example 3:				
i/v	6/7	6/7	5/7	4/7
i/v + inh	6/7	6/7	6/7	5/7
Example 4:				
i/v	6/7	5/7	5/7	4/7
i/v + inh	6/7	5/7	5/7	4/7
Example 5:				
inh	7/7	6/7	5/7	5/7
i/v + inh	7/7	6/7	6/7	6/7

TABLE 4-continued

Pharmacological activity of the subject liposomal composition and the prototype composition according to the parameter of the survival dynamics of the animals in ARDS in the HCl and LPS models according				
Liposomal composition ** according to the example and administration route***	Number of animals survived within the group in the day after reproduction the of (survived/entered) ARDS model*			
	1	2	4	6
Example 6-the prototype:				
i/v	6/7	5/7	5/7	4/7
inh	6/7	4/7	4/7	4/7
i/v + inh	6/7	6/7	5/7	5/7
Control-pathology without treatment	5/7	3/7	2/7	2/7

\*Initial number of animals in each group n = 7.

\*\* Dose of liposomal composition according to the examples is 3.8 mg/kg of body weight according to QC content

\*\*\*Administration route: i/v - intravenous; inh - inhalation; i/v+inh - combined intravenous and inhalation administration

20

TABLE 5

Pharmacological activity of the subject liposomal composition and the prototype composition according to the influence onto the body weight parameter of the animals in ARDS in the HCl model			
Liposomal composition ** according to the example and administration route***	Initial weight of the animals*	Mass of the animals after reproduction of the ARDS model*, g ( $\pm 0.7$ )/% to the initial weight per day:	
	g ( $\pm 0.5$ )	3rd	6th
Example 1:			
i/v	24.7	23.3/-7.5	23.3/-6.5
inh	24.9	23.5/-7.0	23.4/-6.0
i/v + inh	24.6	23.7/-6.0	23.2/-5.4
Example 2:			
inh	25.6	23.9/-6.8	24.9/-5.1
i/v + inh	24.9	23.5/-5.8	24.2/-4.7
Example 4:			
i/v	25.6	23.4/-8.6	23.5/-8.3
i/v + inh	24.9	23.3/-6.3	23.5/-6.0
Example 6-the prototype:			
i/v	26.0	23.7/-8.9	23.8/-8.5
inh	25.8	24.0/-7.3	24.4/-6.6
i/v + inh	25.9	24.0/-6.6	24.7/-5.8
Control-pathology without treatment	25.0	22.4/-10.2	22.0/-12.0
Control-intact animals	25.4	26.2/+3.2	27.0/+6.3

\*Initial weight (before reproduction of the model) determined in the groups of 7 animals; the weight is determined in next days for the survived animals.

\*\* Dose of liposomal composition according to the examples is 3.8 mg/kg of body weight according to QC content

\*\*\*Administration route: i/v-intravenous; inh-inhalation; i/v + inh-combined intravenous and inhalation administration

ARDS in the HCl model resulted in death of the animals on the first and second days after acidic aspiration (1 of 7 and 3 of 7 animals respectively). In day 6 of follow-up, the survival rate was 43% of the population. Development of ARDS was accompanied by a characteristic clinical performance with depression of respiration cycle and depth, reduction of motor performance and ptosis, reduction of food and water consumption. In day 6 after pathology modeling, recovery of clinical state of the animals was not observed.

The studied liposomal compositions possess significant pharmacological activity in the HCl model of ARDS, and the composition of Examples Nos. 1 and 2 exhibited advantages as compared to the prototype composition: it increased

55 survival rate in day 1, 2 and 4, provided 100% prevention of animals' death in day 6 of follow-up (as compared to 85% for the prototype). Therewith, the clinical condition of the animals (respiration, motor performance etc.) was increased after day 2 and recovered on day 6 of follow-up, while the prototype composition did not provide full normalization of the clinical performance. Opportunely it should be noted that the composition of Example No. 4 has only minor advantages in terms of survival rate dynamics as compared to the prototype.

65 In the LPS model of ARDS, death of the control animals without treatment was permanently increased from 29% to 71% from the first day until the sixth day of follow-up.

Generally, the clinical condition of the population was close to the clinical performance in the HCl model of ARDS, but it was characterized by a rather sharper complication of respiration, drop of motor performance and convulsive reactions, while all negative manifestations in the animals which survived in the follow-up dynamics were enhanced.

Pharmacological effect of the studied liposomal compositions in the LPS model of ARDS manifests as a clear protective effect for animals' lives. The liposomal products ensure survival rate of animals being 85-100% and 57-85% in the first day and sixth day of follow-up. Therewith, the positive effect of the subject embodiments of Examples Nos. 2, 3 and 5 onto the survival rate in each day is 15% greater than the one of the prototype composition (29% for the Examples Nos. 2 and 5 at the end of testing). It should be noted that there was a relief of pathological clinical symptoms in the animals survived after the treatment: recovery of respiration, motor performance and coordination, and, at the same time, reduction of duration of the convulsive reactions (they are almost absent as a result of the effect of the claimed compositions of Examples Nos. 2 and 5).

Pharmacological activity of the liposomal products in ARDS (in case of significant reduction of food and water consumption being a part of the pathological clinical performance) is characterized by their positive effect onto the body weight dynamics. In order to provide proper evaluation of the body weight, the HCl model was used, where the pharmacological effect of the compositions at the end of the follow-up period caused 100% survival rate of the animals as compared to 29% in the LPS model. In ARDS without treatment reduction of the body weight of 10.2% and 12.0% respectively in days 3 and 6 was observed (Table 5), while a natural body weight gain of intact animals over time was present. Owing to the therapeutic effect of the liposomal products, the permanent reduction of the weight in the same time periods was only (6.0-8.9%) and (4.7-8.5)%, respectively. Stable positive effect of the claimed composition relative to the recovery of the body weight is 0.5-3.4% better as compared to the one of the prototype (for the Examples Nos. 1 and 2), although for the Example No. 4 the insignificant advantages appear as a trend only.

It should be noted that according to the task of the invention, the pharmacological activity of the subject liposomal compositions was confirmed during treatment of the ARDS at all used treatment schemes, and a comparatively higher effect was achieved in case of combination of the intravenous and inhalation administration of the product. Formally, this phenomenon was not expected, since the used algorithm of the combined administration did not imply only formal combination of two separate administration schemes.

Owing to reproduction of the alternative HCl and LPS models, characteristic morphological manifestations of ARDS being a severe inflammatory pulmonary affection were verified, as well as the pharmacotherapeutic effect of the liposomal compositions was confirmed for the influence onto histomorphological features of ARDS which are visualized and described in the drawings.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIGS. 1(a) and 1(b)—HCl model of ARDS. Animals which survived on day 6, namely:

FIG. 1(a)—edema of peribronchial and perivascular connective tissue of lungs with lymphocytic infiltration;

FIG. 1(b)—locus of hyperplasia and metaplasia of epithelium of mucosal lining of bronchus.

FIGS. 2(a) and 2(b)—HCl model of ARDS. Animals which survived on day 6, namely:

FIG. 2(a)—subendothelial edema of pulmonary artery, thickening and ribbed surface of its internal membrane, edema of smooth muscle fibers;

FIG. 2(b)—locus of emphysema at a periphery of a pulmonary lobule.

FIG. 3—LPS model of ARDS. Animals which died on day 6. Interstitial hemorrhagic pneumonia. Apparent venous plethora of lungs and ventilation-perfusion imbalances.

FIG. 4—LPS model of ARDS. Animals which survived on day 6. Left ventricle of myocardium—apparent infiltration of perivascular connective tissue by lymphocytes and macrophagocytes. Dystrophic changes of cardiac myocytes.

FIGS. 5(a) and 5(b)—HCl model of ARDS. Animals which survived on day 6. Combined inhalation and intravenous administration of the liposomal composition of Example 1, namely: FIG. 5(a) and

FIG. 5(b)—individual locuses of peribronchial infiltration with mononuclear cells. Expanded lumens of bronchia and small bronchiectasia having cavities which are filled with mucin.

FIGS. 6(a) and 6(b)—HCl model of ARDS. Animals which survived on day 6. Combined inhalation and intravenous administration of the liposomal composition of Example 6 (the prototype), namely:

FIG. 6(a)—infiltration of walls of terminal bronchias, alveolar ducts and saccules with mononuclear cells;

FIG. 6(b)—inflammatory changes of epithelium of the mucosal lining of bronchus.

FIGS. 7(a) and 7(b)—LPS model of ARDS. Animals which survived on day 6, namely:

FIG. 7(a)—treatment with intravenous administration of the liposomal composition of Example 2, moderate edema and infiltration of interalveolar septums with lymphocytes and macrophagocytes.

FIG. 7(b)—treatment with intravenous administration of the liposomal composition of the Example 6 being the prototype, small locuses of the lymphocytic infiltration at the periphery of bronchus with expanded lumens and vessels having a moderate blood filling.

FIGS. 8(a) and 8(b)—LPS model of ARDS. Animals which survived on day 6. Treatment with combined inhalation and intravenous administration of the liposomal composition of Example 3, namely:

FIG. 8(a)—moderate infiltration of interalveolar septums in the lungs with lymphocytes and macrophagocytes;

FIG. 8(b)—apparent vacuolization of cytoplasm.

FIGS. 9(a) and 9(b)—LPS model of ARDS. Animals which survived on day 6. Treatment with combined inhalation and intravenous administration of the liposomal composition of Example 2. Left ventricle of myocardium, namely:

FIG. 9(a)—moderate capillary plethora;

FIG. 9(b)—moderate infiltration of perivascular connective tissue with macrophagocytes without any essential features of dystrophy in cardiac myocytes.

Development of ARDS in the HCl model manifests in lungs and bronchus with morphological features which are characteristic for the inflammation: apparent pulmonary plethora with alteration of a wall of vessels, inflammatory changes of pulmonary interstitium and parenchyma (sometimes in a form of purulent bronchitis forming abscess pneumonia), manifestations of bronchiolitis and ventilation-perfusion imbalances (FIGS. 1(a)-2(b)).

Apparent deep structural damages of respiratory organs as a result of "fatal" LPS model of ARDS are reliably mani-

fested as an apparent vascular reaction with development of interstitial hemorrhagic pneumonia associated with apparent pulmonary plethora and ventilation-perfusion imbalances, as well as damage of vascular wall (FIG. 3). Apparent capillary plethora is noted in the left ventricle of myocardium that is accompanied by infiltration of the tissue with lymphocytes and dystrophic changes of individual cardiac myocytes (FIG. 4). Such histological features of myocardium correspond to inflammatory changes of a systemic nature.

Pharmacological activity of the studied liposomal compositions is manifested with a therapeutic and prevention influence onto morphology of target organs affected by ARDS. Manifestations of the effect of the liposomal products principally coincide in both alternative ARDS models, but they are the most obvious in the "fatal" LPS model at combined inhalation and injection administration of the composition that results in three-time increase of the survival rate of the animals (Table 4).

Generally, the treatment effect of the subject liposomal compositions is manifested by a significant reduction of pathological morphological changes in lungs and bronchus (FIGS. 5-8(b)): enhancement of resistance of walls of blood vessels and mucosal lining of bronchus; reduction of inflammatory changes of the pulmonary interstitium and parenchyma, as well as absence of abscesses and abscess pneumonia. Administration of the composition protects terminal bronchias and alveolas of structures of respiratory system, thereby inhibiting development of ventilation-perfusion imbalances as a mechanism of ARDS development. Moderate capillary plethora is noted in the left ventricle of myocardium only in individual cases (FIGS. 9(a) and 9(b)).

Activity of the prototype composition relative to recovery of the morphological structure of the affected organs is close in terms of manifestations, but is inferior in terms of influence degree as compared to the liposomal product: focal lymphocytic infiltration is still present at the periphery of bronchus and vessels moderately filled with blood, which is accompanied by vacuolization of cytoplasm in the alveolas of macrophagocytes (FIGS. 6(a)-7(b)), as well as dystrophic changes of cardiac myocytes of the left ventricle of cardiac myocardium.

Results of comparison of the pharmacological activity in terms of parameters of the anti-inflammatory effect and therapeutic effect in the alternative ARDS models prove the high pharmacological quality of the subject liposomal compositions of QC and zinc having provably identified formulation at different parenteral routes of administration to the body.

The integrally highest pharmacological activity and optimal pharmaceutical characteristics are peculiar to the liposomal compositions of the Examples 1-3, wherein the mass ratio of components QC:PC:lactose:zinc is 1:36.7:54.5:0.11-0.43. Deviations from said formulation by excluding zinc in the prototype or by relative reduction of its content in Example 4 (the corresponding mass ratio is 1:36.7:54.5:0.06) result in a relative drop of the pharmacological activity of the composition. This conclusion is the most obvious for the prototype composition which provides no presence of zinc. For the liposomal composition having the mass ratio QC:PC:lactose:zinc of 1:36.7:54.5:0.89 (Example 5), i.e., having the increased zinc content, the high pharmacological activity is accompanied by certain precautions as to the pharmaceutical quality (presence of precipitate and signs of emulsion oxidation), thereby deteriorating a forecast of its safe application and stability.

Optimal combination of the pharmacological effect in terms of therapeutic effect in ARDS, anti-inflammatory effect and safety with data of the positive pharmaceutical identification proves advantages of the subject liposomal composition of QC and zinc as compared to the liposomal product of QC according to the prototype when solving the problem of provision of the liposomal agent having a high pharmacological activity at different parenteral routes of administration to the body.

The stated information justifies the expediency of the proposed liposomal composition of quercetin and zinc as effective safe pharmacotherapeutic agent in acute respiratory distress syndrome.

#### SOURCES OF INFORMATION

- 1 Feldman C., Shaddock E. Epidemiology of lower respiratory tract infections in adults//Expert Review of Respiratory Medicine 2019, 13:1, 63-77.
- 2 Paul Glezen W., Floyd W. Denny. Epidemiology of Acute Lower Respiratory Disease in Children//N Engl J Med 1973; 288:498-505. doi: 10.1056/NEJM197303082881005
- 3 Rom W N, Bitterman P B, Rennard S I, Cantin A, Crystal R G. Characterization of the lower respiratory tract inflammation of nonsmoking individuals with interstitial lung disease associated with chronic inhalation of inorganic dusts//Am Rev Respir Dis. 1987 December-136(6): 1429-34.
- 4 Meger N. L., Gattinoni L., Calfee C. S. SEMINAR. Acute Respiratory distress syndrome//The Lancet V. 398, P 622-637, Aug. 14, 2021. doi.org/10/1016/S0140-6736(21)00439-6.
- 5 Miller K. Acute Respiratory distress syndrome/ WebMD. —December 2021.
- 6 A vicious circle between oxidative stress and cytokine storm in acute respiratory distress syndrome pathogenesis/G. H. Meftahi, Z. Bahari, Z. Jangravi, M. Iman//Ukr.Biochem.J. 2021; Volume 93, Issue 1. P 18-29 doi: https://doi.org/10.15407/ubj93.01.018
- 7 COVID-19 cytokine storm: The anger of inflammation/M. Mahmudpour, J. Roozbeh; M. Keshavarz et al.//Cytokine; 133: 155151, 2020 09. IMEDLINEID: —437203
- 8 Empson S., Rogers A. J., Wilson J. G. Acute Respiratory distress syndrome COVID-19//Crit Care Clin. 2022 July; 38(3): 505-519. NLM database. Published online 2022 Feb. 28. doi: 10.1016/j.ccc.2022.02.001/
- 9 Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus/Cheng-Ch. Lai, Yen-H. Liu, Cheng-Y. Wang et al.//J. Microbiol. Immun. and Infection, V. 33, 2020, pp. 404-412.
- 10 Nat. Heart, Lung and Blood Institute/An Office. Website of US government. Health Topics. This is an informational and educational material that cannot be printed. The specific file is: www.nhlbi.nih.gov/health/ards. The file provides information on various aspects of distress syndrome. The reader chooses the area of interest.
- 11 Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications/Nijveldt R J, van Nood E, van Hoor D E et al.//Am. J. Clin Nutr. 2001 October, 74(4): 418-25.
- 12 M. A. Read. Flavonoids: Naturally occurring anti-inflammatory agents//Am. J. Pathol. 1995, V. 147. —pp. 235-237.

## US 12,168,018 B1

## 21

- 13 Bishoff S C. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of diseases/Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Cure. —2008. —V. 11, N 6, pp. 733-740.
- 14 Ganesan, S., Faris, A. N., Comstock, A. T. et al. Quercetin inhibits rhinovirus replication in vitro and in vivo/Antiviral Research 2012, N 94(3). —p. 258-271.
- 15 Quercetin and vitamine C: An experimental, synergistic therapy for prevention and treatment of SARS-COV-2 related disease (COVID-19)/R. M. Biancatelli, M. Berilli, J. D. Catravas, P. Marik/Frontiers in Immun. —2020, V.11, art. 1451, p. 1-10.
- 16 Quercetinum: instruction, analogues/https://compendium.com.ua.
- 17 Drug delivery systems: An updated review//G. Tiwari, R. Tiwari, B. Sriwastawa et al/Int J Pharm Investig. —2012 January-March; 2(1): 2-11. doi: 10.4103/2230-973X.96920
- 18 Declarative patent for invention UA 38504 A, IPC A61K 9/14, A61K 31/79, A61K31/455, publ. on May 15, 2001.
- 19 Patent for invention RU 2181051, IPC A61K 33/22, A61K 9/08, A61K 31 351, A61K 31/198, publ. on Apr. 10, 2002.
- 20 Application WO2011019677 A1, IPC (2006.01): A23L 1/00, A23L 1/30, publ. on Feb. 17, 2011.
- 21 Synthesis of Quercetin-Metal Complexes, In Vitro and In Silico Anticholinesterase and Antioxidant Evaluation, and In Vivo Toxicological and Anxiolytic Activities/W. da Silva, S. de Oliveira Pinheiro, D. Alves et al/Neurotox Res. 2020 April; 37(4):893-903.doi: 10.1007/s12640-019-00142-7.
- 22 Synthesis, characterization, and pharmacological evaluation of some metal complexes of quercetin as P-gp inhibitors/K. Shastrala, S. Kalam, K. Damerakonda et al/Future Journal of Pharmaceutical Sciences. —volume 7, Article number: 99 (2021).
- 23 A simple liposome assay for the screening of zinc ionophore activity of polyphenols./G. Clergeaud, H. Dabagh-Bazarbachi, M. Ortiz et al/Food Chemistry Volume 197, Part A, 15 Apr. 2016, Pages 916-923.
- 24 Praead A S. Discovery of zinc for human health and biomarkers of zinc deficiency./In: Molecular, genetic and nutritional aspects of trace minerals./Acad. Press, Cambridge, 2017. —pp. 241-260.
- 25 Zinc-quercetin complex: From determination to bioactivity/S Uskoković-Marković, M. Milenković, L. A. Pavun/Acta agriculturae Serbica 2015, 25(50): 113-120, DOI:10.5937/A ASer 2050113U.
- 26 Compendium. Drugs. Corvitol®. Instruction. https://compendium.com.ua
- 27 Pharmaceutical and Biomedical Aspects of Drugs/Edited by I. M. Pertsev-Vinnytsia, 2007. Only the Title and Table of Contents are provided. The reference is to Chapter 7, Section 7.2.4. Excipients.
- 28 Elsevier B. V. Polyvinylpyrrolidone. ScienceDirect. 2020. Reproduced from: sciencedirect.com. An article from sciencedirect.com—Journal of Drug Delivery Science and Technology: M. Kurakula, K. Pharmaceutical assessment of polyvinylpyrrolidone (PVP): As excipient from conventional to controlled delivery systems with a spotlight on COVID-19 inhibition
- 29 The State Pharmacopoeia of Ukraine, 2015: Liposomal medicinal products N: pages 1036-1038.
- 30 Priprem A., Watanatorn J., Suthiparinyanout S., Phachonpai W. Anxiety and cognitive effects of Quer liposomes/Nanomedicine: Nanotechn. Biol. And Medic. —2008. —Vol. 4, N 1, pp. 70-78.

## 22

- 31 Patent CN 100367968 C, IPC: A61K 31/352; A61K 47/34; A61K 9/127; A61K 9/14; A61P 29/00; A61P 35/00; A61P 39/06; A61P 9/10, publ. on Feb. 27, 2008.
- 32 Patent CN 100367953 C, IPC: A61K 31/352; A61K 9/10; A61K 9/127; A61K 9/14; A61P 29/00; A61P 35/00; A61P 37/08; A61P 39/06, A61P 7/06, publ. on Feb. 13, 2008.
- 33 Patent CN 102058536 A, IPC: A61K 31/352; A61K 47/48; A61K 9/127; A61P 11/00, publ. on May 18, 2011.
- 34 Patent CN 101904821 A, IPC: A61K 31/352; A61K 9/16; A61K 9/19; A61K 9/20; A61K 9/48; A61P 29/00; A61P 3/06; A61P 35/00; A61P 37/08, A61P 39/06, A61P 7/02; A61P 9/10; publ. on Dec. 8, 2010.
- 35 Patent of Ukraine UA 76393, IPC: A61K 9/127; 31/353; A61K 47/44; A61P 31/06; A61P 31/00; A61P 35/00, ony orybn. π. Jul. 17, 2013.
- 36 Patent of Ukraine UA 111762. IPC: A61K 9/127; 31/353; A61K 47/44; A61P 39/06; A61P 9/10; A61P 27/02. A method for producing a pharmacologically active liposomal agent comprising quercetin/Hryhorieva G. S., Krasnopolskyi Yu. M., Konakhovych N. F., Pasechnykova N. V., publ. on Jun. 10, 2016, Bul. No. 11.
- 37 Compendium 2019. Drugs. Lipoflavon®. Instruction. UA/3581/01/01, https://compendium.com.ua.
- 38 Quercetinum, PVP Sociedade Anonima, BR.
- 39 Quercetinum, Alfa Aesar GmbH & CoKG, DE.
- 40 Phosphatidyleholine, Lecithin-standard UA/13014/01/01.
- 41 Phosphatidyleholine, Lipoid E PS S, DE.
- 42 The State Pharmacopoeia of Ukraine, —2001— Kharkiv—531 p., page 756.
- 43 Zinc chloride: Sigma-Aldrich. CAS Number 7646-85-7. Sources No. 38-41 and No. 43 are only references to substances that may have been used in the Application, indicating examples of typical manufacturers.
- 44 European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes as of Mar. 18, 1986: Verkhovna Rada of Ukraine, official web portal: International documents (Council of Europe).
- 45 Stefanov O. V. Preclinical studies of medicinal products (guidelines). Edited by O. V. Stefanov-K.: Avicenna, 2001. —528 p. The reference refers to the preclinical study of non-steroidal anti-inflammatory drugs described in this book, starting on page 292 and continuing on pages 293, 188-300. 292 and then on pages 293, 298-300.
- 46 Zhang Y., Wen Z., Guan L., Jiang P., Gu T., Zhao J., Lv X., Wen T. Extracellular histones play an inflammatory role in acid aspiration-induced acute respiratory distress syndrome. Anesthesiology. 2015 January; 122(1): 127-139.
- 47 Pomytkin I. A., Karkischenko V. N., Fokin Yu. V., Nesterov M. S., Petrova N. V. A fatal model of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. Biomedicina. 2020; 16(4). —p. 24-33.
- The invention claimed is:
1. A pharmacologically active liposomal composition for treating an acute respiratory distress syndrome, the composition comprising phosphatidyl choline, quercetin, lactose, and zinc chloride at a ratio of content of phosphatidyl choline:quercetin:zinc ion in liposomes being from 1:0.027:0.002 to 1:0.027:0.023 wherein the composition is a lyophilized powder having a ratio of components (wt. %) as follows:
- quercetin—1,  
phosphatidyl choline—36.7,  
zinc ion—0.11-0.43,  
lactose—54.51,  
remainder—water, chloride ion.

US 12,168,018 B1

23

2. The composition according to claim 1, wherein it is suitable for preparation of an emulsion for inhalation and/or injection use.

3. A method for treating an acute respiratory distress syndrome, the method comprising administering to a subject an effective amount of the composition of claim 1 and a pharmaceutically acceptable excipient and/or carrier.

4. The method of claim 3, wherein the subject has an acute respiratory distress syndrome.

\* \* \* \* \*

10

24