

©Коллектив авторов

## АНАЛИЗ ФИЗИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА *IN VITRO* И *IN SILICO*

Р.П. Терехов<sup>1\*</sup>, И.А. Селиванова<sup>1</sup>, А.К. Жевлакова<sup>1</sup>, Ю.Б. Порозов<sup>2,1</sup>, А.В. Дзубан<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8-2; \*эл. почта: r.p.terekhov@yandex.ru

<sup>2</sup>Университет информационных технологий, механики и оптики, 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49

<sup>3</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1, стр. 3

Композиты, содержащие флавоноиды, являются перспективными объектами для разработки новых функциональных материалов. Эта группа природных соединений характеризуется широким спектром биологической активности. Для основного флавоноидного компонента древесины лиственницы даурской (*Larix dahurica* Turcz.) дигидрокверцетина (ДКВ) получен ряд форм, в том числе микронизированных, с различными физико-химическими свойствами, биофармацевтическими параметрами и специфической морфологией. Данное исследование проведено с целью выявления влияния растворителя на самосборку молекул ДКВ при формировании твердой фазы двух модификаций: микротрубок и кристаллической формы. Выбор моделей для компьютерного расчета был обоснован экспериментальными данными дифференциальной сканирующей калориметрии. Вычисления проводили при помощи программы Materials Science Suite. По итогам анализа *in silico* была установлена определяющая роль растворителя при формировании твердой фазы. Полученные данные позволяют предположить, что микротрубки ДКВ могут быть использованы при разработке новых перевязочных материалов, а также для доставки лекарственных препаратов. Результаты проведенного исследования представляют интерес для создания новых композитов, содержащих флавоноиды.

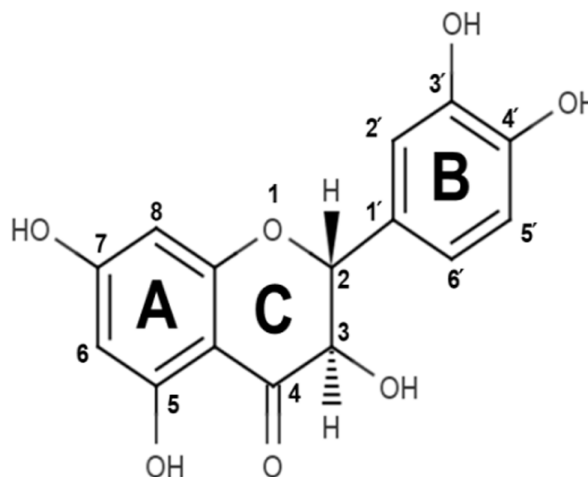
**Ключевые слова:** молекулярное моделирование; дигидрокверцетин; физическая модификация; микротрубки; дифференциальная сканирующая калориметрия

**DOI:** 10.18097/PBMC20196502152

## ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых функциональных материалов является одним из перспективных направлений развития медицины и фармации [1-3]. С этой точки зрения, флавоноиды представляют особый интерес ввиду присущего им широкого спектра биологической активности, экологичности и благоприятного соотношения “затраты – эффективность” [4].

В качестве перспективного объекта для разработки новых материалов, содержащих флавоноиды, можно рассматривать дигидрокверцетин (ДКВ) – 2,3-дигидро-3,5,7-тригидрокси-2-(3,4-дигидроксифенил)-4H-1-бензопиранон-4 (рис. 1). Данное соединение выпускается в промышленных масштабах в кристаллической форме в виде фармацевтической субстанции (ФС 000388-270812) и пищевой добавки (Regulation EU 2017/2470). В качестве сырья для получения ДКВ используется комлевая часть древесины лиственницы даурской (*Larix dahurica* Turcz.). ДКВ обладает выраженными антиоксидантными свойствами [5], приемлемым профилем безопасности [6] и является основой лекарственных средств “Диквертин” и “Асковертин” [7]. Некоторые фармакологические эффекты ДКВ были выявлены как в рамках целенаправленного анализа *in silico*, так и в полномасштабных трансляционных исследованиях, включающих молекулярное моделирование [8-9].



**Рисунок 1.** Стереохимическая формула ДКВ, имеющего два центра хиральности в положениях 2 и 3 бензопиранонового фрагмента.

В последнее время рядом исследователей получены разнообразные формы ДКВ, так называемые физические модификации, характеризующиеся специфической морфологией, различными физико-химическими свойствами и биофармацевтическими параметрами [10-12]. К одной из таких модификаций можно отнести микроструктурированную трубчатую форму, синтезированную из фармацевтической субстанции путём осаждения водой из этанольного раствора ДКВ

в присутствии мочевины [13]. Вопросы, касающиеся влияния определённых факторов на формирование твёрдой фазы модификаций ДКВ, в литературе практически не освещены. Применение методов *in silico* позволяет моделировать процессы на молекулярном уровне без значительных затрат.

Целью данной работы было изучение влияния растворителя на самосборку молекул при формировании двух модификаций ДКВ – микротрубок и кристаллической формы.

## МЕТОДИКА

### Материалы

В качестве исследуемого образца использовали микротрубки ДКВ, полученные при 25°C согласно методике, описанной в патенте РФ [14]. В качестве образца сравнения – коммерчески доступную фармацевтическую субстанцию ДКВ (“Аметис”, Россия), существующую в кристаллической форме.

### Анализ *in vitro*

Морфологию образцов исследовали в ходе микроскопического анализа с помощью инверторного оптического микроскопа Axiovert S100 с микрокамерой AxioCamMRc (“Carl Zeiss”, Германия). Микрофотографии снимали при увеличении в 400 раз.

Масс-спектрометрический анализ был выполнен на LCMS (“Advion”, США). Анализируемые образцы предварительно растворяли в смеси метанола и воды (объёмные соотношения 80:20) в присутствии 0,1% муравьиной кислоты. Ионизацию осуществляли путём электрораспыления. Детектор регистрировал масс-спектры в режиме определения отрицательных ионов в диапазоне от 10 до 1000  $m/z$ .

Анализ методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) проводили на приборе DSC 204 F1 Phoenix (“NETZSCH”, Германия), оснащённом термопарой Е-типа. Систему предварительно калибровали согласно стандартам ASTM E967 и ASTM E2253 по точно установленным параметрам фазовых переходов веществ высокой чистоты (99,999%): циклогексан  $C_6H_{12}$ , Hg, Ga, бензойная кислота  $C_6H_5COOH$ ,  $KNO_3$ , In, Sn, Bi, Pb, Zn, CsCl. Средняя ошибка калибровки составила 0,2°K по температуре и 5% по теплоте. Образцы взвешивали на аналитических весах A&DGH-202 с точностью  $1 \cdot 10^{-2}$  мг, помещали в стандартные алюминиевые ячейки ( $V = 56 \text{ мм}^3$ ,  $d = 6 \text{ мм}$ ), завальцованные крышкой с отверстием (отношение площади дна ячейки к площади отверстия составляло порядка 40), и тестировали относительно пустой ячейки сравнения в интервале температур 25–300°C со скоростью 10°/мин в токе осушенного азота (осч) 40 мл/мин. Экспериментальные данные обрабатывали с помощью пакета программ NETZSCH Proteus Thermal Analysis согласно норме ISO 11357-1.

### Анализ *in silico*

Все расчёты проводили на базе программного обеспечения Materials Science Suite 2018-2 (“Schrödinger, LLC”, США).

Исходная структура для компьютерного расчёта была взята из базы данных Cambridge Structural Database [15]. Корректировку 3D-модели, которая заключалась в постепенном удалении молекул воды из модели кристаллической ячейки, осуществляли при помощи графического редактора, встроенного в BIOVIA Discovery Studio Visualizer 4.5 (“Dassault Systèmes BIOVIA”, Франция).

Молекулярные модели фазового состояния физических модификаций ДКВ были построены при помощи модуля Disordered System Builder. Одним из параметров расчёта было количество кристаллических ячеек, участвующих в построении модели твёрдой фазы. Расчёты были проведены для 32, 64, 128, 512 и 1024 ячеек. Основываясь на экспериментальных данных, полученных в ходе рентгеноструктурного анализа, в качестве константы была выбрана плотность 0,114 г/мл [16]. Минимизацию энергии моделей осуществляли методом силового поля OPLS 2005 [17]. Все компьютерные симуляции и последующий анализ были проведены в трёхкратной повторности. Визуализацию результатов молекулярного моделирования выполняли в программе BIOVIA Discovery Studio Visualizer 4.5.

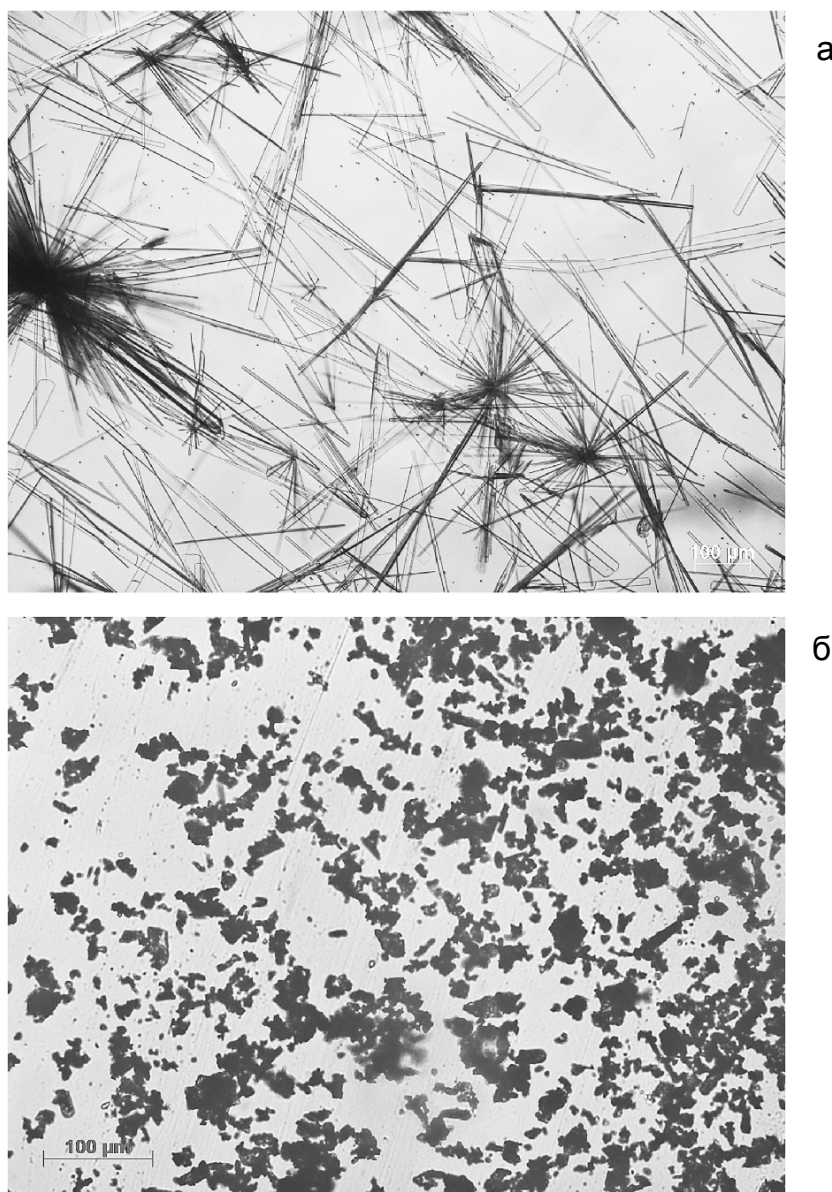
Для оценки физических характеристик модификаций ДКВ было проведено моделирование деформации наночастиц методом молекулярной динамики, интегрированным в модуль Elastic Constants. При работе с этим модулем выбраны стандартные условия восьмикратного расчёта по следующим параметрам: общее сжатие, общее растяжение, двухосное растяжение и деформация чистого сдвига. Вектор растяжения и сдвига может быть направлен по трём возможным осям как внутрь частицы, так и наружу, поэтому было проведено по 161 компьютерной симуляции для каждой модели. Минимизацию энергии моделей также осуществляли методом силового поля OPLS 2005 [17]. Релаксация деформации моделировалась для периода времени 100 пс при температуре 300°K. Виртуальные структуры, полученные после релаксации, подвергали визуальному анализу также при помощи программы BIOVIA Discovery Studio Visualizer 4.5.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Анализ *in vitro*

При изучении морфологии образцов были обнаружены значительные различия. В ходе микроскопии исследуемого образца выявлена трубчатая структура. Размеры микротрубок, полученных при комнатной температуре, составляли 215 мкм в длину и 13 мкм в ширину (рис. 2а). Образец сравнения представляет собой мелкие агломераты различной формы со средним диаметром около 22 мкм (рис. 2б).

В масс-спектрах образцов наблюдается пик при 302,9  $m/z$ , соответствующий пику молекулярного иона ДКВ в режиме отрицательной ионизации. Это свидетельствует об отсутствии образования новых ковалентных связей между ДКВ, этанолом и мочевиной в процессе получения микротрубок.



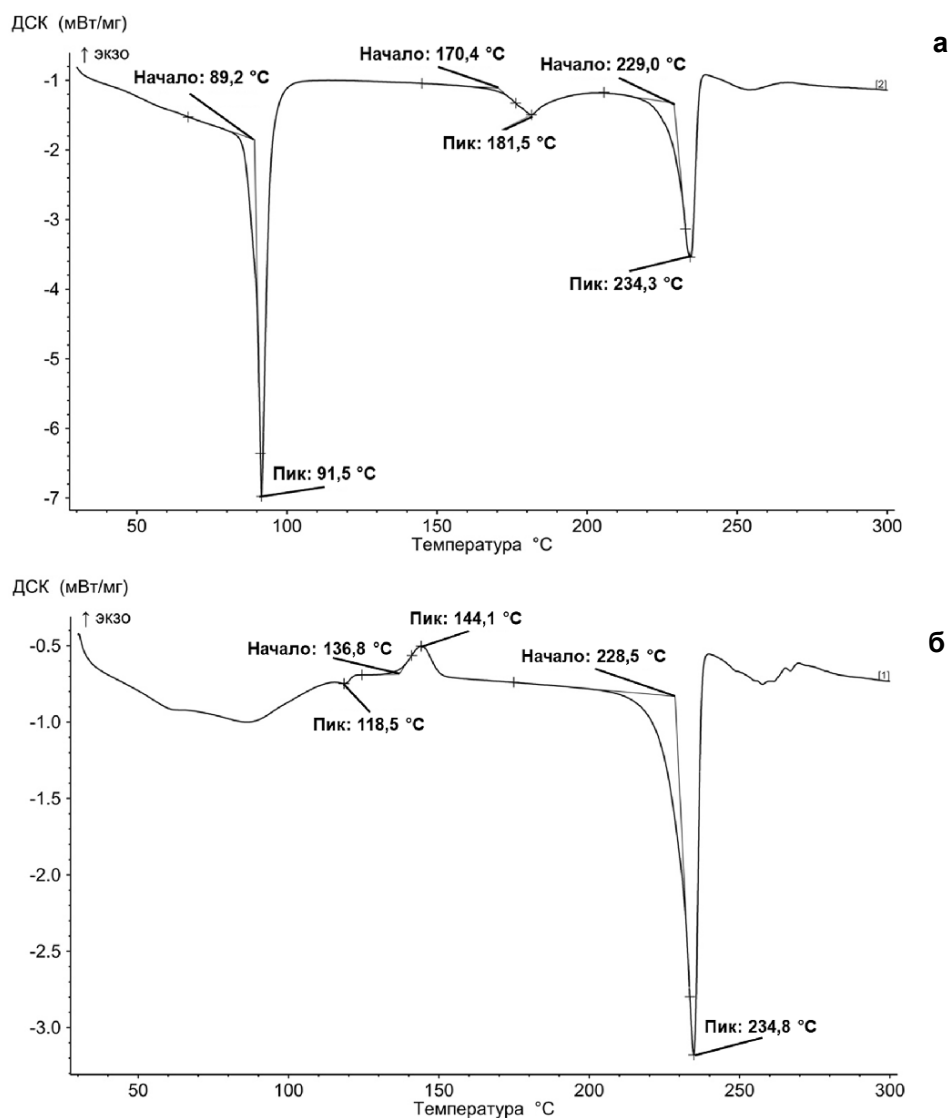
**Рисунок 2.** Оптическая микроскопия образцов ДКВ: а) микротрубки – вытянутые игольчатые кристаллы с хорошо заметными точками кристаллизации, б) кристаллическая форма – высокодисперсный порошок, частицы которого не структурированы.

Результаты ДСК обоих образцов представлены на рисунке 3. На обеих термограммах в начале присутствуют протяжённые эндотермические эффекты, отвечающие удалению сорбированной воды. При этом в случае микротрубок (рис. 3а) также наблюдается резкий пик с началом при 89,2°C, величина и форма которого свидетельствуют об отщеплении химически связанной (вероятнее всего, кристаллизационной) воды. Ранее подобное поведение было описано для государственного стандартного образца (ГСО) ДКВ [18]. В случае фармацевтической субстанции (рис. 3б) этот пик отсутствует, однако небольшую аномалию при 118,5°C можно интерпретировать как присутствие в исходном образце примеси гидратной формы. При ~229°C оба вещества плавятся с последующим разложением, о чём свидетельствует характерная форма правой части эффекта.

На основании результатов ДСК можно сделать вывод, что в формировании твёрдой фазы микротрубок помимо молекул ДКВ также участвуют молекулы растворителя.

#### *Анализ in silico*

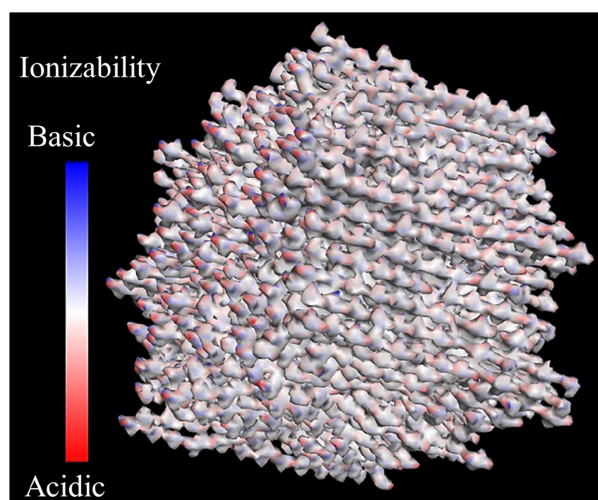
Исходная модель микротрубок для анализа *in silico* была построена на основе данных рентгеноструктурного анализа ГСО ДКВ, депонированных в Cambridge Structural Database под кодом LORKEI. В этой кристаллической ячейке на две молекулы ДКВ приходится пять молекул воды [16]. Такой выбор обусловлен тем, что в результате ДСК было обнаружено наличие растворителя как в микротрубках, так и в ГСО ДКВ [18]. Исходная компьютерная модель для кристаллической формы построена путём последовательного удаления молекул



**Рисунок 3.** ДСК-кривые образцов ДКВ: а) микротрубки, б) кристаллическая форма. Показаны пики экзо- и эндотермических эффектов и их начальные температуры.

кристаллизационной воды из структуры, установленной в ходе рентгеноструктурного анализа ГСО ДКВ. Всего было получено 15 вариантов моделей.

В результате молекулярного моделирования были построены виртуальные структуры наночастиц, обладающих подобной внешней формой. Наиболее значимые результаты получены при анализе моделей, состоящих из ячеек, включающих 5 молекул воды (модель твёрдой фазы микротрубок ДКВ), и ячеек, не содержащих кристаллизационной воды (модель твёрдой фазы кристаллической формы ДКВ). Обе наночастицы похожи на куб с вогнутыми гранями (рис. 4). Согласно литературным источникам, подобное строение характерно для многих наночастиц и обусловлено давлением внешней среды на их стенки [19]. Размер обеих частиц был около 17 нм. Внешние грани наночастиц обладают различными химическими свойствами: некоторые более склонны к кислотным взаимодействиям за счёт концентрации на их поверхности фенольных гидроксильных групп, а другие — к основным, что связано с атомами



**Рисунок 4.** Поверхность модели наночастицы ДКВ с наложением молекулярных поверхностей в псевдоцветах: красным обозначены участки с кислотными свойствами, синим — с основными.

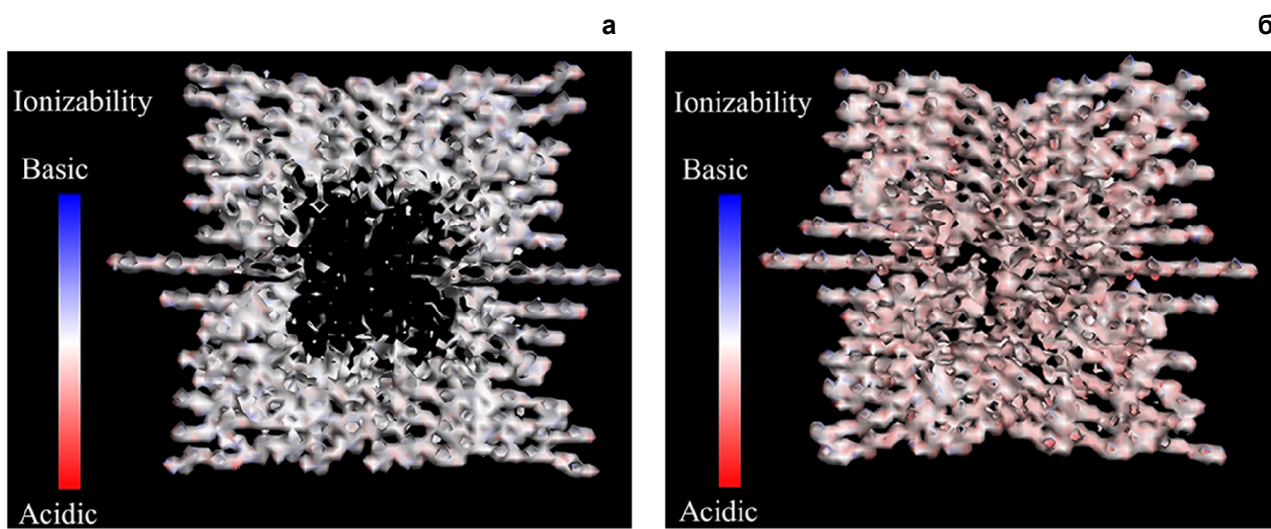


кислорода карбонильной группы и  $\pi$ -насыщенными ароматическими кольцами. Все остальные модели наночастиц обладали аналогичным внешним видом, однако различались по степени ионизации функциональных групп на поверхности частицы.

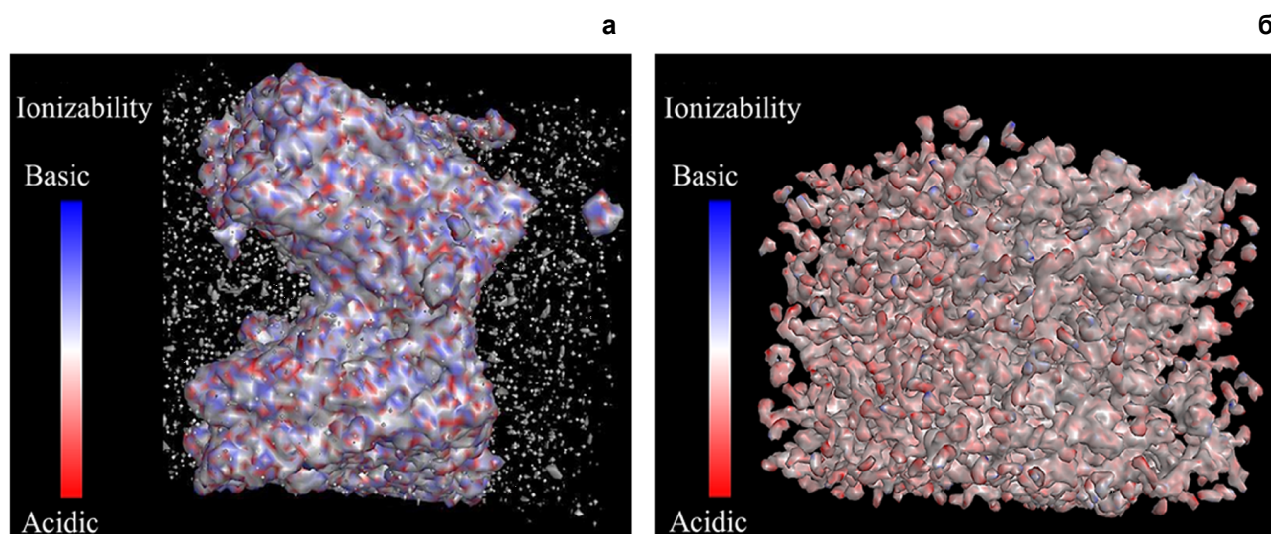
Наибольший интерес представляет тот факт, что, несмотря на внешнее сходство, при наложении на виртуальные структуры наночастиц молекулярных поверхностей в поперечном срезе видно, что модель микротрубки ДКВ имеет единую крупную полость внутри в форме креста (рис. 5а). Диаметр полости варьирует от 4 до 11 нм. При этом сама внутренняя поверхность полости остаётся нейтральной. Согласно материаловедческой классификации, данную наночастицу можно отнести к мезопористым системам, которые характеризуются наличием полостей и каналов с диаметром от 2 до 50 нм [20]. Подобные материалы имеют ряд преимуществ при их использовании в качестве перевязочного материала, таких как повышенная способность к набуханию и степень паропроницаемости [21].

На поперечном срезе модели кристаллической формы ДКВ внутренняя полость не выявлена (рис. 5б). В промежуточных случаях, когда из начальной структуры удалялось от одной до четырёх молекул воды, полость в наночастице сохранялась, но она не обладала такой выраженной симметрией, как в модели твёрдой фазы микротрубок. Поскольку при построении моделей наночастиц единственным различием было присутствие кристаллизационной воды, то можно предположить, что формирование мезопористой структуры обусловлено именно наличием молекул растворителя в исходной кристаллической ячейке.

Визуализация результатов моделирования деформации наночастиц позволяет судить о механических свойствах обоих материалов (рис. 6). Значительных различий в итогах 161 симуляции не наблюдалось. Это указывает на изотропность полученных наночастиц, то есть постоянство результатов деформации, не зависящих от вектора приложения силы. Этот факт может быть объяснён



**Рисунок 5.** Поперечный срез моделей наночастиц ДКВ толщиной 12 Å с наложением молекулярных поверхностей в псевдоцветах: а) микротрубки, б) кристаллическая форма.



**Рисунок 6.** Результат моделирования процессов деформации наночастиц ДКВ в течение 100 пс с наложением молекулярных поверхностей в псевдоцветах на полученные структуры: а) микротрубки, б) кристаллическая форма.

кубической формой модели, обладающей высокой степенью симметрии.

При изменении давления микротрубки, несмотря на значительную деформацию, сохраняют некоторые грани исходной наночастицы. Наблюдаемые повреждения обусловлены, во многом, разрывом одной из стенок в наиболее узком месте между внешней средой и внутренней полостью (рис. 6а). Толщина стенки в этом месте составляла не более 2 нм. Что касается кристаллической формы ДКВ, то в заданных условиях, на модели её наночастицы исчезают грани (рис. 6б), присущие исходной форме (см. рис. 5б). Сравнительный анализ полученных результатов позволяет предположить жёсткость у микротрубок ДКВ и эластичность – у кристаллической формы. Результаты компьютерных расчётов указывают на существенную роль молекул растворителя при формировании твёрдой фазы ДКВ: молекулы воды выполняют не только структурную функцию, способствуя формированию полости, но и придают дополнительную жёсткость наночастице. Полученные различия можно объяснить образованием дополнительных водородных связей. Более высокая жёсткость в совокупности с нейтральным зарядом поверхности внутренней полости может быть полезна при использовании микротрубок ДКВ для доставки лекарственных препаратов.

Перспективным направлением дальнейших исследований можно считать применение квантово-механических методов для оценки взаимодействия между лекарственными препаратами внутри микротрубок ДКВ и на их поверхности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В ходе проведённого исследования была оценена роль молекул растворителя при формировании твёрдой фазы двух физических модификаций ДКВ методами *in silico* и *in vitro*. Данные молекулярного моделирования указывают на то, что именно молекулы растворителя являются ключевым фактором для самосборки трубчатых форм. Согласно анализу механических свойств, выполненному по результатам моделирования процессов общего сжатия, общего растяжения, двухосного растяжения и деформации чистого сдвига, можно предположить более выраженную жёсткость у микротрубок ДКВ и эластичность – у кристаллической формы. В будущем представляет интерес использование аналитических методов *in silico* для изучения поведения молекул лекарственных веществ внутри микротрубок ДКВ.

Полученные данные могут быть использованы в инженерии кристаллов при разработке материалов для медицинского применения, содержащих флавоноиды.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Поддерживается “Проектом повышения конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров”.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Koh A., Kang D., Xue Y., Lee S., Pielak R.M., Kim J., Hwang T., Min S., Banks A., Bastien P. et al. (2016) *Sci. Transl. Med.*, **8**(366), DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf2593
- Prasad M., Lambe U.P., Brar B., Shah I.J.M., Ranjan K., Rao R., Kumar S., Mahant S., Khurana S.K., Iqbal H.N.M., Dhama K., Misri J., Prasad G (2018) *Biomed. Pharmacother.*, **97**, 1521-1537.
- Rizzollo L., Cingolani R., Pompa P.P. (2013) *Nanomedicine*, **8**(5), 807-821.
- Sathishkumar P., Gu F.L., Zhan Q., Palvannan T., Yusoff A.R.M. (2018) *Mater. Lett.*, **210**, 26-30.
- Ilyasov I.R., Beloborodov V.L., Selivanova I.A. (2018) *Chem. Paper*, **72**(8), 1917-1925. 9
- Schauss A.G., Tselyco S.S., Kuznetsova V.A., Yegorova I. (2015) *Int. J. Toxicol.*, **34**(2), 162-181.
- Плотников М.Б., Тюкавкина Н.А., Плотникова Т.М. (2005) Лекарственные препараты на основе диквертина, Томский университет, Томск.
- Raj U., Varadwaj P.K. (2016) *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.*, **8**(2), 132-141.
- Oi N., Chen H., Kim M.O., Lubet R.A., Bode A.M., Dong Z. (2012) *Cancer Prev. Res.*, **5**(9), 1103-1114.
- Zu Y., Wu W., Zhao X., Li Y., Wang W., Zhong C., Zhang Y., Zhao X. (2014) *Int. J. Pharm.*, **471**(1-2), 366-376.
- Naumov A.A., Potselueva M.M. (2010) *Cell Tissue Biol.*, **4**(3), 240-244.
- Tarahovsky Y.S., Kim Y.A., Ivanitsky G.R. (2008) *Dokl. Bioch. Biophys.*, **422**, 265.
- Тюкавкина Н.А., Селиванова И.А., Терехов Р.П. (2018) Получение нано- и микроструктурированных форм дигидрокверцетина, Фенольные соединения: свойства, активность, инновации - сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума “Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты”, сс. 532-536. ISBN: 978-5-604654-4-0
- Селиванова И.А., Терехов Р.П., Тюкавкина Н.А. (2018) Изобретения. Полезные модели, 1. Патент РФ 2640413.
- Allen F.H. (2002) *Acta Cryst. B*, **58**(3), 380-388.
- Selivanova I.A., Tyukavkina N.A., Kolesnik Yu.A., Nesterova V.N., Kuleshova L.N., Khutoryanskii V.A., Bazhenov B.N., Saibotalov M.Yu. (1999) *Pharm. Chem. J.*, **33**(4), 222-224.
- Jorgensen W.L., Maxwell D.S., Tirado-Rives J. (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, **118**(45), 11225-11236.
- Вязникова М.Ю., Николаева С.С., Быков В.А., Яковлева Л.В., Руленко И.А., Тюкавкина Н.А., Колесник Ю.А. (1997) *Хим.-фарм. журнал*, **31**(2), 42-45.
- Ван И., Цао Г. (2012) Наноструктуры и наноматериалы. Синтез, свойства и применение, “Научный мир”, Москва.
- McCusker L.B., Liebau F., Engelhardt G. (2001) *Pure Appl. Chem.*, **73**(2), 381-394.
- Sinha M., Banik R.M., Haldar C., Maiti P. (2013) *J. Porous Mater.*, **20**(4), 799-807.

Поступила в редакцию: 18. 01. 2019.  
После доработки: 14. 02. 2019.  
Принята к печати: 22. 02. 2019.

ANALYSIS OF DIHYDROQUERCETIN PHYSICAL MODIFICATION  
VIA *IN VITRO* AND *IN SILICO* METHODS

*R.P. Terekhov<sup>1\*</sup>, I.A. Selivanova<sup>1</sup>, A.K. Zhevlakova<sup>1</sup>, Y.B. Porozov<sup>1,2</sup>, A.V. Dzuban<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Sechenov First Moscow State Medical University,

8-2 Trubetskaya str., Moscow, 119991 Russia; \*e-mail: r.p.terekhov@yandex.ru

<sup>2</sup>Information Technologies, Mechanics and Optics University, 49 Kronverkskiy ave., Saint Petersburg, 197101 Russia

<sup>3</sup>Lomonosov Moscow State University, 1-32 Leninskiye Gory, Moscow, 119991 Russia

Flavonoid-mediated materials are promising substances for the design of new functional materials because of their bioactivity, eco-friendliness, and cost-effectiveness. Dihydroquercetin (DHQ) is the major flavonoid in the wood of *Larix dahurica* Turcz. Previously some new modifications were created on the basis of DHQ, they were characterized by different morphological, physico-chemical and biopharmaceutical properties. This study was performed to research the influence of the solvent on the formation of the solid phase in DHQ microtubes and crystal form as commercially available active pharmaceutical ingredient (API). The choice of the models for the computational simulation was based on the data of differential scanning calorimetry. All calculations were performed using Materials Science Suite. *In silico* analysis demonstrated that the molecules of solvent are a key player in the formation of the solid phase of the flavonoid-mediated material. Also the comparative analysis of physical characteristics between DHQ microtubes and crystal form was performed. These data give an opportunity to suggest, that DHQ microtubes may have a grate application as the dressing material and in the drug delivering. The results of this study could be helpful for the design of the new flavonoid-mediated materials by crystal engineering.

**Key words:** molecular modeling; dihydroquercetin; physical modification; microtubes; differential scanning calorimetry