

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на тему: «Химический состав и биологические свойства ультразвукового экстракта тимьяна ползучего флоры Центрального Казахстана, перспективы его применения в медицине», на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности 6D110400 – «Фармация»

Оразбаевой Перизат Зарухановны

Актуальность темы исследования

Лечебные свойства тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.) известны с древних времен и на протяжении многих веков используются в народной медицине. Трава тимьяна ползучего включена в Государственные Фармакопеи Казахстана, Российской Федерации, Украины, Британии и других стран, в официальной медицине применяется как лекарственное растительное сырье, обладающее антибактериальным, вяжущим, противовоспалительным, успокаивающим, противосудорожным, отхаркивающим, спазмолитическим, желчегонным, болеутоляющим, мочегонным, ранозаживляющим и глистогонным действием, используется в виде отваров и настоев.

И в настоящее время тимьяна ползучего привлекает пристальное внимание ученых всего мира, благодаря своим фармакологическим свойствам. В последние годы увеличился интерес к этноботаническим, фитохимическим и фармакологическим исследованиям тимьяна ползучего. В мировой практике доказано, что тимьяна ползучего в природе, в зависимости от географического региона, климатических условий и среды произрастания, представлен несколькими хемотипами, т.е. изменяется качественный состав и количественное содержание эфирного масла и основных групп биологически активных веществ, следовательно, изменяются и фармакологические свойства.

Несмотря на то, что трава тимьяна ползучего включена в Государственную Фармакопею Республики Казахстан, химический состав данного отечественного лекарственного растения практически не изучен. Поэтому изучение химического состава и биологических свойств тимьяна ползучего, в зависимости от территории и условий произрастания, имеет большое значение для использования данного лекарственного растения в фармацевтической промышленности и применения в медицине.

Кроме того, важное значение имеет способ получения биологически активных веществ из растительного сырья. На сегодняшний день в фармацевтической промышленности жидкий экстракт тимьяна ползучего производят классическим методом реперколяции, применяемая технология является многоступенчатой, трудоемкой и времязатратной.

Вследствие этого, фармакогностическое изучение тимьяна ползучего, произрастающего на территории Центрального Казахстана, разработка нового рационального способа и технологии получения суммы экстрактивных веществ из отечественного лекарственного растения тимьяна ползучего, изучение ее химического состава и биологических свойств, является важной и приоритетной задачей.

Цель диссертационного исследования: Исследование химического состава и биологических свойств ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.) флоры Центрального Казахстана, обоснование перспектив их применения в медицине.

Задачи исследования:

1. Провести фармакогностическое изучение тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.), произрастающего на территории Центрального Казахстана.

2. Разработать новый способ и технологию получения суммы экстрактивных веществ из тимьяна ползучего с применением ультразвуковой экстракции.

3. Исследовать химический состав полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего с применением современных инструментальных методов.

4. Исследовать биологические свойства и острую токсичность ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего, научно обосновать возможности их применения в медицине.

5. Разработать нормативные документы на субстанцию «Тимьяна ползучего экстракт сухой» в виде проекта НД и лабораторного регламента на получение.

Методы исследования: в работе использованы: ультразвуковая экстракция, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ/УФ, ВЭЖХ/МС), газовая хроматография (ГХ/ПИД), хромато-масс-спектрометрия (ГХ/МС), ультрафиолетовая (УФ) спектрофотометрия.

Объекты исследования: лекарственное растительное сырье: два образца травы тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.), собранные в популяциях Карагандинской области РК; суммы экстрактивных веществ: сухие ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего, субстанция тимьяна ползучего экстракт сухой.

Предмет исследования: биоморфологические особенности, диагностические признаки, товароведческие показатели и химический состав двух образцов травы тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.); способ и технология получения сухого ультразвукового экстракта тимьяна ползучего; химический состав и биологические свойства сухих ультразвуковых экстрактов хемотипов образцов тимьяна ползучего; нормативная документация на субстанцию «Тимьяна ползучего экстракт сухой».

Основные положения, выносимые на защиту:

- сравнительные фармакогностический, фитохимический и товароведческий анализы двух образцов травы тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.), собранные в популяциях Карагандинской области РК;

- новый способ и технология получения ультразвукового экстракта тимьяна ползучего;

- химический состав полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов двух хемотипов травы тимьяна ползучего;

- результаты биологических свойств и острой токсичности ультразвуковых экстрактов тимьяна ползучего;

нормативные документы на субстанцию «Тимьяна ползучего экстракт сухой», в виде проекта НД и лабораторного регламента на получение.

Научная новизна исследования:

- впервые проведено сравнительное фармакогностическое изучение лекарственного растительного сырья тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.), собранного в популяциях Карагандинской области РК, по внешним признакам, микроскопическим характеристикам, результатам товароведческого анализа оба образца соответствуют ГФ РК, при этом, установлены значительные отличия двух хемотипов травы тимьяна ползучего по количеству и компонентному составу эфирного масла, также по количественному содержанию основных групп биологически активных веществ;

- разработан новый способ получения суммы экстрактивных веществ из тимьяна ползучего с применением ультразвука;

- впервые исследован химический состав полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего методом ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС, всего идентифицировано и количественно определено 15 фенольных соединений, пять из которых фенольные кислоты, десять – флавоноиды.

- разработана эффективная, экономичная и экологически безопасная технология получения субстанции ультразвукового экстракта тимьяна ползучего;

- в результате проведенного биоскрининга впервые установлено, что ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, собранного в горно-лесном массиве Каркаралинска, обладает выраженным бактерицидным действием в отношении *Helicobacter pylori*, также проявляет выраженную антимикробную активность в отношении 5 штаммов грамположительных бактерий (двух линий штаммов *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*), 2 штаммов грамотрицательных бактерий (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*). Кроме того, обладает отхаркивающим действием сопоставимым с препаратом сравнения «Бронхикум С»;

- впервые по данным биоскрининга выявлено, что ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, собранного в Корнеевских лесах, обладает выраженным бактерицидным действием в отношении *Helicobacter pylori*, но, проявляет выраженную антимикробную активность только в отношении 3 штаммов грамположительных бактерий (двух линий штаммов *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, при этом, вызывает задержку роста культур *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*), 2 штаммов грамотрицательных бактерий (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*), также вызывает задержку роста культуры гриба *Candida albicans*. По отхаркивающему действию уступает препарату сравнения «Бронхикум С».

- в эксперименте *in vivo* установлено, что ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего обладают противовоспалительной активностью сопоставимой с препаратом сравнения диклофенаком натрия;

- по результатам исследования острой токсичности в эксперименте *in vivo*, определено, что ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего относятся к группе «Практически нетоксично» (V класс токсичности) и не обладают мутагенной активностью;

- разработана спецификация качества и проведена стандартизация субстанции ультразвукового экстракта тимьяна ползучего.

Практическая значимость работы:

- разработан проект НД на лекарственное растительное сырье «Тимьян ползучий трава»;

- впервые ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего, произрастающего на территории Карагандинской области, рекомендуются в качестве субстанции перспективной для создания отечественных лекарственных средств для лечения и профилактики *Helicobacter pylori* – ассоциированных заболеваний;

- разработана, апробирована и внедрена технология получения ультразвукового экстракта тимьяна ползучего, которая характеризуется значительным уменьшением продолжительности и увеличением производительности технологического процесса, увеличением выхода готового продукта и содержания действующих веществ, отсутствием токсичных растворителей;

- разработан проект НД на субстанцию «Тимьяна ползучего экстракт сухой»;

- разработан и утвержден лабораторный регламент на получение субстанции «Тимьяна ползучего экстракт сухой» (ЛР-005491-МК-04-21);

- на базе Научно-исследовательского центра НАО «МУК» организован выпуск опытных партий субстанции «Тимьяна ползучего экстракт сухой» для фармакологического исследования.

Личный вклад докторанта

Диссертантом по теме диссертационной работы самостоятельно проведен обзор и анализ отечественной и зарубежной литературы, выполнены экспериментальные работы по всем поставленным задачам. Достоверность и обоснованность результатов исследования подтверждается направленностью выполненных работ на решение актуальной на сегодняшний день проблемы, выполнением в современном исследовательском центре и проектом нормативных документов.

Выводы

1. Впервые по результатам сравнительного фармакогностического изучения лекарственного растительного сырья тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.), собранного в популяциях Карагандинской области РК, установлено, что тимьян ползучий представлен двумя хемотипами. Два образца травы тимьяна ползучего имеют внешнее сходство и идентичные анатомические диагностические признаки, при этом, установлены значительные отличия по выходу и компонентному составу эфирного масла. Также определены отличия двух хемотипов травы тимьяна ползучего по

количественному содержанию суммы флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, дубильных веществ, тритерпеновых соединений, водорастворимых полисахаридов, пектиновых веществ, аминокислот и органических кислот. По результатам товароведческого анализа оба хемотипа травы тимьяна ползучего соответствуют требованиям ГФ РК. Полученные данные включены в проект НД на лекарственное растительное сырье «Тимьян ползучий трава».

2. Разработан новый способ и технология получения сухого ультразвукового экстракта из тимьяна ползучего. Преимуществом разработанной технологии является увеличение производительности технологического процесса в 2,5 раз и значительное сокращение его продолжительности, увеличение выхода готового продукта.

3. Впервые исследован химический состав полифенольных соединений ультразвуковых экстрактов двух хемотипов тимьяна ползучего методом ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС, всего идентифицировано и количественно определено 15 фенольных соединений, пять из которых фенольные кислоты, десять - флавоноиды. У полученных ультразвуковых экстрактов обнаружено сходство по качественному составу фенольных соединений, но установлены значительные отличия по количественному содержанию фенольных кислот и флавоноидов, кроме розмариновой кислоты. Доминирующими полифенольными соединениями в исследуемых экстрактах являются цинарозид, розмариновая кислота, нарингенин и эпикатехин.

4. Впервые установлено, что ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего проявляют бактерицидную или бактериостатическую активность против 9 штаммов грамположительных бактерий, 6 штаммов грамотрицательных бактерий и 5 культур грибов в концентрации от 0.0625 до 20 мг/мл, но отличаются по силе воздействия в отношении тест-штаммов микроорганизмов, показывают максимальную бактерицидную активность в отношении *Helicobacter pylori*, при исследовании методом методом микроразведений. Эфирные масла двух хемотипов тимьяна ползучего обладают бактерицидным действием в отношении *Helicobacter pylori* в концентрации 0,0156 и 0,0313 мг/мл соответственно. Ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего предложены в качестве субстанции для создания отечественных лекарственных средств для лечения и профилактики *Helicobacter pylori* – ассоциированных заболеваний. Изучение антимикробной активности исследуемых образцов методом диффузии в агар против 2 штаммов грамположительных бактерий, 2 штаммов грамотрицательных бактерий и 1 культуры грибов показало, что ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (образец 1) обладает умеренно выраженной антимикробной активностью в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* сопоставимой с препаратом сравнения бензилпенициллина натриевой солью, и против грибка *Candida albicans*. Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего (образец 2) проявляет выраженную антимикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* сопоставимую с препаратом сравнения гентамицином, и превышает действие

бензилпенициллина натриевой соли. Также обладает умеренно выраженной антимикробной активностью против *Bacillus subtilis* сопоставимой с препаратом сравнения бензилпенициллина натриевой солью, и против грибка *Candida albicans*.

5. Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего, собранного в горно-лесном массиве Каркаралинска, обладают отхаркивающим свойством, сопоставимым с препаратом сравнения «Бронхikum С», ультразвуковой экстракт из тимьяна ползучего, собранного в Корнеевских лесах, по отхаркивающему действию уступает препарату сравнения «Бронхikum С». Ультразвуковые экстракты двух хемотипов тимьяна ползучего обладают противовоспалительной активностью сопоставимой с препаратом сравнения диклофенаком натрия.

6. По результатам исследования острой токсичности в эксперименте *in vivo*, установлено, что ультразвуковые экстракты тимьяна ползучего относятся к группе «Практически нетоксично» (V класс токсичности). По результатам проведенного теста Эймса определено, что ультразвуковые экстракты тимьяна ползучего не обладают мутагенной активностью.

7. Разработан проект НД и проведена стандартизация субстанции «Тимьяна ползучего экстракт сухой», изучена ее стабильность. Разработан и утвержден лабораторный регламент на получение субстанции ультразвукового экстракта тимьяна ползучего (ЛР-005491-МК-04-21). На базе Научно-исследовательского центра НАО «МУК» организован выпуск опытных партий субстанции «Тимьяна ползучего экстракт сухой» для фармакологического исследования.

Апробация результатов диссертации

Основные результаты диссертации представлены на: V научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (Москва, 15 марта 2017 г.); международной конференции молодых ученых «Мир науки и молодежь: тенденции и новые горизонты» (Караганда, 12 апреля 2017 г.); международной научно-практической конференции «Современная биология. Теоретические, прикладные аспекты и междисциплинарные связи» (Караганда, 12-13 октября 2017 г.); V международной научной конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (Шымкент, 8-9 декабря 2017 г.); 18th International Congress on Infectious Diseases (Buenos Aires, March 1-4, 2018); IV (XII) международной ботанической конференции молодых учёных (Санкт-Петербург, 22–28 апреля 2018 г.); XXV International scientific and practical conference of young scientists and students «Topical issues of new drugs development» (Kharkiv, April 18-20, 2018); международной конференции молодых ученых и студентов «Мир науки и молодежь: эра стремительных изменений» (Караганда, 28 апреля 2018 г.); IX Всероссийской научной конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 22-23 апреля 2019 г.).

Публикации. По материалам диссертации получены 1 Евразийский патент, 1 патент РК. Основные положения диссертации отражены в следующих публикациях:

- 3 статьи в журналах, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан;

- 1 статья в международном научном издании, входящем в базу данных Scopus Q3;

- тезисы 9 докладов, из них тезисы 7 докладов в материалах международных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 138 страницах машинописного текста, включает 14 рисунков и 31 таблиц. Работа состоит из введения, материалов и методов, 5 глав, заключения, списка использованных источников и приложений. Список литературы включает 167 литературных источников.