

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на тему:

«Разработка технологии противомикробного и противокариесного средства с эфирным маслом душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.)»

на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности

6D074800 - Технология фармацевтического производства

Бадековой Каракоз Жаиловны

Актуальность проблемы. Кариез зубов - наиболее распространенное хроническое инфекционное заболевание полости рта. По оценкам, во всем мире 2 миллиарда человек страдают кариесом постоянных зубов и 520 миллионов детей страдают кариесом молочных зубов. Основным этиологическим компонентом кариеса зубов являются виды бактерий (преимущественно стрептококки, лактобациллы и бифидобактерии). В 1 мл слюны человека содержится примерно от 20 до 400 миллионов микроорганизмов, принадлежащих к более чем 700 видам, в том числе *Streptococcus mutans*, открытому Клерке в 1924 г.

Кариесогенные бактерии могут легко образовывать биопленки на поверхности зубов, быстро вырабатывая молочную кислоту и, следовательно, вызывая кариес. В настоящее время заболеваемость кариесом продолжает расти. В течение последних пятидесяти лет не было никаких инноваций в области профилактики кариеса зубов. Участие микроорганизма как в оральных, так и в неоральных заболеваниях вызвало интерес к знанию его чувствительности к противомикробным агентам. Тем не менее, антибиотики не подходят для рутинного использования в качестве средств против зубного налета, и их использование в лекарственных препаратах должно быть ограничено. Современные методы лечения не обладают чувствительностью; они не являются видоспецифичными и убивают патогенные виды. Следовательно, существует потребность в восстановлении и разработке новых терапевтических стратегий, которые предотвращают или устраняют образование биопленок более точными способами, избирательно воздействуя на кариесогенные бактериальные биопленки и специально ориентированные на профилактику и лечение кариеса зубов в клинической практике.

Перспективным альтернативным подходом является фитотерапия. Известно, что эфирные масла и экстракты лекарственных растений или фитохимические вещества ингибируют образование зубных биопленок за счет уменьшения адгезии микробных патогенов к поверхности зубов, что является основным событием в инициации и развитии кариеса.

Цель исследования: разработка технологии противомикробного и противокариесного средства с эфирным маслом душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.) и его стандартизация.

Задачи исследования:

1 Провести анализ данных литературы о состоянии разработок в области создания противомикробного, противокариесного и

противовоспалительного средства и скрининговые исследования образцов эфирных масел на противокариесную активность и для обоснования выбора объекта исследования;

2 провести сбор и фармакогностический анализ лекарственного растительного сырья душицы обыкновенной (*Origanum vulgare L.*).

3 разработать технологию получения антимикробных и противокариесных субстанций, полученных из душицы обыкновенной (*Origanum vulgare L.*) и провести их стандартизацию;

4 провести фармацевтическую разработку геля на основе эфирного масла и этанольного экстракта душицы обыкновенной и изучить его стабильность; исследовать специфическую активность и безопасность разработанного состава лекарственной формы

5 провести технико-экономическое обоснование производства геля.

Методы исследования

Материалы и методы, использованные для проведения научных исследований, соответствуют требованиям Государственной фармакопеи Республики Казахстан, фармакопеи Евразийского экономического союза, European Pharmacopoeia, The United States Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia, нормативных документов, регламентирующих качество лекарственных средств в Республике Казахстан.

В процессе работы над темой исследования были использованы как общенаучные (анализ, индукция, сравнение, обобщение), так и эмпирические методы исследования (наблюдение, описание, эксперимент, моделирование, измерение).

Исследования проведены на базе Школы фармации под руководством д.х.н, профессора Атажановой Г.А. Для выполнения экспериментальной части имелись все необходимые материалы, оборудование и реагенты. При проведении экспериментов использованы описанные в литературе методики.

В рамках реализации работы использованы следующие методы исследования:

1. Выделены эфирных масел методом гидродистилляции с использованием аппарата Клевенджера из воздушно-сухой массы растительного сырья.
2. Методы получения биологически активных соединений в условиях ультразвуковой экстракции.
3. Скрининг антимикробной активности диско-диффузионным методом.
4. Тестирование эффективности эфирных масел на образование биопленок *Streptococcus mutans in vitro* с использованием колориметрического анализа.
5. Физико-химические методы анализа органических соединений: хромато-масс-спектрометрия, газожидкостная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография, УФ-спектроскопия.
6. Статистическая обработка полученных результатов проводилась согласно вариационно-статистического анализа с использованием критерия

Стьюдента, в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Республики Казахстан, European Pharmacopoeia, The United States Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia. Для расчетов использовали электронные программы Microcal Oridin и Excel.

Объекты исследования

Лекарственное сырье, эфирное масло, экстракты, душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.)

Предметы исследования

Микроволновая и ультразвуковая экстракция; биологическая активность и доклинические испытания сухого экстракта и эфирного масла душицы обыкновенной; гель, мягкая лекарственная форма; состав и технология получения геля; стандартизация.

Основные положения, выносимые на защиту:

- выделение эфирных масел из растений Казахстана. Поиск перспективного эфирного масла, обладающего противокариесным и противомикробным действием;
- экспериментальные исследования получения субстанции (эфирного масла и этанольного экстракта) из душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.);
- разработка состава комбинированного лекарственного средства антимикробного, противовоспалительного и противокариесного действия на основе орегано (*Origanum vulgare* L.) в виде геля;
- нормативные документы на стоматологический гель в виде проекта НД и лабораторного регламента на получение.

Описание основных результатов исследования

- результаты исследования антимикробной активности эфирных масел; результаты испытания ингибирующей активности эфирных масел в отношении образования биопленки *S. Mutans*;
- результаты анатомо-морфологического исследования душицы обыкновенной;
- результаты скрининга на антимикробную активность экстрактов душицы обыкновенной;
- оптимальный состав и технологии получения противомикробного и противокариесного геля на основе эфирного масла и этанольного экстракта душицы обыкновенной; лабораторный регламент получения геля, спецификации качества и проекты НД, опытно-промышленные регламенты на мягкие лекарственные формы на основе субстанции из травы душицы обыкновенной; методики качественного и количественного определения, действующего вещества карвакрола в мягкой лекарственной форме геля на основе экстракта из травы душицы обыкновенной методом газожидкостной хроматографии;
- реологические, биофармацевтические, физико-химические фармакологические показатели геля, результаты исследования на острую токсичность стоматологического геля.

Обоснование научной новизны:

- впервые проведено изучение противокариесное действие опытных образцов эфирных масел растений, где выявлено, что эфирное масло душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.) ингибирует образование биопленки *Streptococcus mutans*, т.е. обладает выраженным противокариесным эффектом и является перспективной фармацевтической субстанцией для разработки нового лекарственного стоматологического средства;

- впервые разработан состав нового комбинированного лекарственного средства антимикробного и противокариесного действия на основе душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.) в виде геля;

- впервые разработана технология получения антимикробного и противокариесного действия на основе субстанций, полученных из душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.);

- впервые разработаны методы контроля качества разработанного лекарственного средства на основе душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.); определен срок годности и условия хранения комбинированного геля.

Научная новизна диссертационного исследования подтверждена патентом РК на изобретение №35343 от 05.11.2021 г. «Антимикробный стоматологический гель».

Практическое значение полученных результатов:

На основе фармацевтических субстанции (эфирное масло и сухой экстракт *Origanum vulgare* L.) разработана мягкая лекарственная форма в виде геля противомикробного, противовоспалительного и противокариесного действия.

По результатам доклинических (неклинических) испытаний гель не обладает токсическими свойствами и рекомендован как противомикробное, противовоспалительное и противокариесное средство.

Разработан лабораторный регламент на получение стоматологического геля.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований НАО МУК в рамках научных проектов АР09562096 «Разработка получения нового стоматологического геля антимикробного и противокариесного действия на основе душицы обыкновенной» (договор № 256/12-2 от 15 июня 2021 г.) и АР14971364 «Разработка нового стоматологического средства на основе *Origanum vulgare* L» (договор №303-ЖГ-2-22-24 от 20 октября 2022 г.).

Личный вклад докторанта в диссертационную работу заключается в анализе литературных и патентных источников, проведении экспериментальных и расчётных работ, анализе, интерпретации, обобщении и обсуждении полученных экспериментальных результатов.

Выводы:

1. Накопление биопленки бактериями *Streptococcus mutans* на твердых зубных тканях приводит к кариесу зубов, который остается одним из наиболее распространенных заболеваний полости рта. Следовательно, разработка новых противобактериальных агентов имеет решающее значение. Нами проведен анализ компонентного состава эфирных масел 14 видов распространенных

казахстанских растений (*Achillea nobilis* L., *Achillea millefolium* L., *Artemisia austriaca* L., *Hyssopus ambiguus* (Trautv.) Iljin., *Matricaria chamomilla* L., *Mentha piperita* L., *Melissa officinalis* L., *Nepeta cataria* L., *Origanum vulgare* L., *Pinus sylvestris* L., *Thymus marschallianus* Willd., *Thymus crebrifolius* Klok., *Thuja orientalis* Endl., *Ziziphora clinopodioides* Lam) и изучено их влияние на образование биопленок *Streptococcus mutans*.

В результате скрининга образцов эфирных масел, выделенных из доступных растительных источников Центрального Казахстана, на образование биопленок *Streptococcus mutans*, впервые выявлено что эфирное масло *Origanum vulgare* L. снижает образование биопленки *S. mutans* на 98% по сравнению с необработанными бактериями.

2. Сбор и заготовка растительного сырья душицы обыкновенной были осуществлены согласно Надлежащей практикой сбора лекарственных растений в окр. г. Щучинск Бурабайского района Акмолинской области (52°56' с. ш. 70°12' в.д.) и в Восточно-Казахстанской области.

В связи с тем, что эксплуатационные запасы душицы обыкновенной находятся в пределах от 4.3 – 22.9 тонн, то рекомендовано ежегодно собирать сырье в казахстанской части Алтая, а именно в окрестностях горных хребтов Ивановский (12.9+0.9), Нарын (16.5+1.9), Листвяга (22.99+1.7) тонн. Общая площадь зарослей душицы обыкновенной в ВКО составляет 120,8 га с плотностью запаса сухого сырья – 25.6 ц/га.

Заготовку сырья *Origanum vulgare* L. рекомендовано производить сушку сырья на открытом воздухе без воздействия прямых солнечных лучей, размещая его на сушильных рамах слоями в 10 – 15 см при температуре не выше 18°C.

Диагностическими признаками сырья душицы обыкновенной являются форма и расположение листьев на стебле, ветвистость побегов и их окраска. Четырехгранные, прямые, в верхней части - разветвленные. Форма и размер листовых пластин, форма края, верхушки и основания, цвет нижней и верхней стороны, степень опушения, расположение железок. Листья продолговатые, супротивные, черешковые, цельнокрайные, на верхушке заостренные, обе стороны окрашены в зеленый цвет.

Исследованы фармацевтико-технологические параметры сырья душицы обыкновенной для оптимальной технологии экстрагирования: удельная масса ($1,73 \pm 0,02 \text{ г/см}^3$), объемная масса ($0,35 \pm 0,01 \text{ г/см}^3$), порозность ($0,37 \pm 0,01 \text{ г/см}^3$), свободный объем слоя сырья ($0,81 \pm 0,01 \text{ г/см}^3$), коэффициент поглощения экстрагента (3,45).

Для мажорного выхода суммы экстрактивных веществ выбран спирт этиловый (70%) с оптимальным выходом 55,69%.

3. Из сырья душицы обыкновенной были получены экстракты различными методами: настаиванием, ультразвуковой кавитацией и микроволновой экстракцией.

Разработан новый способ получения сухого экстракта душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.), который за счет применения

ультразвуковой экстракции, характеризуется высокой производительностью технологического процесса, низким расходом экстрагента, исключением трудоемких и времязатратных процедур, что делает его доступным, рациональным и экономичным.

Разработана технологическая схема получения эфирного масла из надземной части душицы обыкновенной. Разработана спецификация качества на эфирное масло: описание, идентификация, тяжелые металлы, микробиологическая чистота, количественное определение, упаковка, маркировка, транспортировка, хранение, срок хранения, основное фармакологическое действие, время удерживания карвакрола - 20,3 мин; количественное определение - 65%. Получены данные по долгосрочному испытанию эфирного масла на основе растительного сырья душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.), существенные изменения по результатам определения показателей качества не наблюдались.

4. Проведена фармацевтическая разработка геля на основе эфирного масла и сухого экстракта душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.). Разработан оптимальный состав, технология получения геля, в состав которого входят: фармацевтическая субстанция для практического применения растительного происхождения – сухой экстракт, полученный в результате ультразвуковой кавитации - 0,6; эфирное масло душицы обыкновенной – 1,2; Na-КМЦ – 2,2; глицерин – 2,2; подсластитель натуральный – 0,3; вода очищенная – до 100. Разработана технология получения геля на основе фармацевтических субстанций из души обыкновенной. Разработана спецификация качества на гель на основе, а также разработан проект НД. Результаты испытания стабильности геля на основе эфирного масла и сухого экстракта при долгосрочных условиях: при температуре $(25\pm 2)^\circ\text{C}$, относительной влажности $(60\pm 5)\%$ показали, что существенные изменения по результатам определения показателей качества не наблюдались. Исследования по определению стабильности геля продолжаются.

Разработаны методики качественного и количественного определения действующего вещества карвакрола в мягкой лекарственной форме геля на основе эфирного масла экстракта из травы душицы обыкновенной газожидкостной хроматографии методом. На всех этапах стандартизации объекта в ряду сырья – субстанция – препарат для оценки его подлинности и количественного определения действующего вещества в качестве внешнего стандарта использовали карвакрол – стандартный образец, выделенный нами из эфирного масла душицы обыкновенной.

Получены воспроизводимые результаты физико-химических, биофармацевтических, фармакологических показателей геля на основе эфирного масла и этанольного экстракта из травы душицы обыкновенной.

Исследовано, что образец стоматологического геля в дозе 25 мг/кг обладают противовоспалительной активностью, что выразилось в достоверном уменьшении на 41,4%, соответственно количества воспалительного экссудата в брюшной полости у крыс по сравнению с контролем. Противовоспалительная активность стоматологического геля с эфирным маслом и этанольным

экстрактом душицы обыкновенной сопоставима с препаратом сравнения диклофенаком натрия.

Впервые проведено изучение противокариесное и антибактериальное действие опытных образцов стоматологического геля. Произведен выбор образцов стоматологического геля, проявляющих сравнительно высокий противокариесный и антибактериальный эффект в отношении тест-штаммов при минимальных концентрациях эфирного масла и экстракта душицы обыкновенной.

При определении острой токсичности исследуемый противокариесный гель проявил низкую токсичность. Для мышей и крыс показатель ЛД₅₀ составила 2000 мг/кг внутрижелудочно. Согласно общепринятой классификации токсичности веществ новый разработанный нами гель можно отнести к классу малотоксичных веществ (IV класс токсичности, LD₅₀>5000 мг/кг, внутрижелудочного введение), то есть к практически не токсичным соединениям.

5. Проведено технико-экономическое обоснование производства противомикробного и противокариесного средства с эфирным маслом душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.), которое показывает целесообразность выпуска продукции в промышленных масштабах.

Апробация результатов диссертации. Основные положения диссертационной работы доложены и опубликованы в материалах международных и республиканских конференций: «Научное сообщество XXI века» (г. Анапа, 2020 г.); «Наука и образование в современном мире: вызовы XXI века» (г. Нур-Султан, 2020 г.); «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения», (г. Москва, 2020 г.); «Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике» (г. Алматы, 2022 г.); «Международные проблемы экологии» (г. Караганда, 2023 г.).

Публикации. По материалам диссертации получен 1 патент РК. Основные положения диссертации отражены в следующих публикациях:

- 4 статьи в журналах, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования Республики Казахстан;
- 2 статьи в зарубежных научных изданиях, входящих в базы данных Scopus;
- тезисы 6 докладов на международных конференциях.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на страницах 164 страниц машинописного текста, включает 38 рисунка и 43 таблицы; состоит из введения, 8 глав, заключения, списка использованных источников и приложений. Список литературы включает 238 литературных источников.