


На правах рукописи



Филатов Виктор Андреевич

**Стандартизация новой комбинированной фармацевтической субстанции
растительного происхождения с антимикробным действием**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук,
профессор

Каленикова Елена Игоревна

Официальные оппоненты:

Зилфикаров Ифрат Назимович – доктор фармацевтических наук, профессор РАН, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», отдел химии природных соединений, главный научный сотрудник

Лякина Марина Николаевна – доктор фармацевтических наук, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт фармакопеи и стандартизации в сфере обращения лекарственных средств, консультант

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России

Защита диссертации состоится «18» декабря 2024 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.02 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр.2

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ДСУ 208.002.02

доктор фармацевтических наук, профессор  **Дёмина Наталья Борисовна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Новая национальная стратегия развития фармацевтического рынка «Фарма 2030» предусматривает разработку новых фармацевтических субстанций (ФС) с целью расширения номенклатуры лекарственных средств (ЛС) для терапии распространенных заболеваний и валидацию новых методов контроля качества.

Дерматологические заболевания кожи головы в значительной мере влияют на качество жизни людей. Себорейный дерматит (СД) включен в Международную классификацию болезней под кодом L21. По оценкам медицинских специалистов распространенность СД и его легкой формы, перхоти, очень велика и достигает 50% среди населения в отдельных регионах мира.

Для лечения СД рекомендована комплексная терапия фунгицидными и противовоспалительными ЛП для наружного применения. Несмотря на разнообразие ЛП, продолжается поиск новых мишеней и подходов в профилактике и лечении СД в связи с возникновением резистентных штаммов микрофлоры кожи головы и нарушением её качественного состава, что затрудняет терапию СД и повышает риск рецидива заболевания.

В настоящее время для лечения дерматологических заболеваний человека пристальное внимание привлекают новые ФС растительного происхождения. В отличие от синтетических антимикробных субстанций, данные субстанции могут обладать сопоставимой фармакологической активностью, таргетированным действием на необходимые патогенетические мишени СД и меньшим риском развития антимикробной резистентности. Наличие комплекса данных об эффективности индивидуальных субстанций, токсикологическом профиле и дерматологической переносимости определили выбор активных веществ для разработки новой комбинированной фармацевтической субстанции (НКФС) растительного происхождения – эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола (эвкалиптола) и α -(-)-бисаболола. Выбранные вещества представляют

собой высокоактивные соединения из группы терпенов с антимикробным, противогрибковым и противовоспалительным эффектом.

Широкому внедрению в медицинскую практику ЛС на основе субстанций растительного происхождения препятствует необходимость стандартизации. Литературные данные о валидированных методиках анализа комбинированных субстанций растительного происхождения в настоящее время немногочисленны.

Таким образом, разработка новых комбинированных субстанций растительного происхождения для наружного применения с антимикробным эффектом позволяет расширить номенклатуру отечественных ЛП для высокоэффективной терапии дерматологических заболеваний кожи головы со сниженным риском развития антимикробной резистентности.

Степень разработанности темы исследования

В работах зарубежных исследователей показано, что комбинации субстанций и БАВ растительного происхождения могут проявлять синергетическое антимикробное действие. Эфирные масла и их индивидуальные вещества представляют наибольший интерес в разработке ЛС для терапии СД, поскольку обладают необходимым спектром фармакологических эффектов: антимикробным, противогрибковым, противовоспалительным, антиоксидантным. Ранее в научных работах продемонстрирован синергетический антимикробный эффект для комбинированных субстанций на основе эфирных масел, что позволило повысить их фармакологическую активность. Есть данные о фармакологической активности эфирного масла листьев чайного дерева для терапии СД легкой степени тяжести, однако улучшение состояния наблюдалось только у 41% пациентов в течение 4 недель применения. В то же время недостаточно данных об эффекте 1,8-цинеола и α -(-)-бисаболола в отношении микроорганизмов, являющихся основными этиологическими факторами СД – *Malassezia spp.*, *C. albicans*, *S. epidermidis*. Среди зарегистрированных фармацевтических субстанций для терапии СД отсутствуют комбинированные субстанции растительного происхождения.

Цель и задачи

Цель исследования – стандартизация НКФС растительного происхождения с антимикробным действием в отношении патогенной микрофлоры СД.

Задачи:

1. Провести поиск данных научной литературы о субстанциях для терапии СД с целевой антимикробной активностью и выбрать действующие вещества для НКФС растительного происхождения;
2. Оценить антимикробную активность НКФС в отношении патогенной микрофлоры СД в сравнении с её индивидуальными компонентами и клинически рекомендованными синтетическими субстанциями;
3. Разработать комплекс методов контроля качества НКФС растительного происхождения по следующим показателям: описание, растворимость, плотность, угол вращения, показатель преломления, нежелательные примеси, микробиологическая чистота;
4. Разработать аналитическую методику оценки подлинности НКФС методом тонкослойной хроматографии (ТСХ);
5. Разработать аналитическую методику оценки подлинности и количественного определения действующих веществ НКФС методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС);
6. Валидировать аналитическую методику количественного определения действующих веществ НКФС методом ГХ-МС;
7. Изучить стабильность НКФС методом ГХ-МС;
8. Подготовить проект фармакопейной статьи (ФС) на НКФС.

Научная новизна

Впервые предложена и стандартизирована НКФС растительного происхождения на основе эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола (эвкалиптола) и α -(-)-бисаболола, обладающая синергетической и

таргетированной антимикробной активностью в отношении стандартных штаммов микроорганизмов, участвующих в патогенезе СД (патент RU 2 788 358). Впервые для субстанции растительного происхождения показана возможность достижения антимикробной эффективности, сопоставимой с бензалкония хлоридом, кетоконазолом и климбазолом.

Разработаны и валидированы методики контроля качества НКФС растительного происхождения с помощью ТСХ и ГХ-МС.

Теоретическая и практическая значимость работы

Доказано, что таргетное действие и синергизм действующих веществ НКФС растительного происхождения обеспечивают выраженный антимикробный эффект в отношении патогенной микрофлоры СД, сопоставимый с клинически рекомендованными синтетическими субстанциями (бензалкония хлорид, кетоконазол, климбазол).

Предложенные валидированные методики могут быть взяты за основу при разработке специфичных методик анализа иных многокомпонентных субстанций на основе терпенов. Установлены показатели качества субстанции и методы его оценки, на основании которых разработан проект ФС на НКФС растительного происхождения с антимикробным действием.

Подход, использованный для разработки НКФС растительного происхождения с синергетическим антимикробным действием в отношении патогенной микрофлоры СД, может применяться при решении подобного рода задач в отношении других дерматологических заболеваний бактериальной или грибковой природы. Разработанная НКФС является перспективной для создания новых ЛФ для наружного применения и инновационных фармацевтических продуктов с антибактериальным и противогрибковым эффектами и может быть внедрена в фармацевтическую промышленность или в аптечную практику.

Методология и методы исследования

Настоящая работа выполнена с учетом требований к разработке и анализу качества фармацевтических субстанций и валидации впервые предложенных методик – ОФС.1.1.0006 «Фармацевтические субстанции», ОФС.1.5.2.0001 «Эфирные масла», ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» Государственной Фармакопеи XV издания и Федерального закона от 12.04.2010 N 61-ФЗ "Об обращении лекарственных средств".

Методологическую основу составил целевой научный поиск литературных данных (PudMed, PubChem, Web of Science, Scopus, Google Scholar, РИНЦ) и нормативной документации в области разработки, изучения и анализа качества комбинированных субстанций растительного происхождения. При проведении исследований использовались современные методы: молекулярный докинг, прогноз фармакологической активности, микробиологическая оценка антибактериального эффекта и типа взаимодействия веществ комбинированной субстанции, хроматографические методы, поляриметрия, рефрактометрия. Обработка результатов, полученных в ходе проведения исследования, осуществлялась с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel.

Личный вклад

Автором определена тема исследования, поставлена цель и сформулированы задачи исследования. В период подготовки и написания диссертации автором проведен поиск и анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, составлен план исследования, выбраны объекты исследования. Все представленные результаты качественного анализа и количественного определения действующих веществ комбинированной субстанции растительного происхождения получены автором самостоятельно. При непосредственном участии автора проведено количественное определение комбинированной субстанции растительного происхождения совместно с научными сотрудниками

ЦКПНО «Арктика» ФГАОУ ВО «Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В.Ломоносова». Разработка и валидация методики ГХ-МС были проведены лично автором с использованием оборудования ЦКПНО «Арктика» ФГАОУ ВО «Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В.Ломоносова». Микробиологические исследования новой комбинированной ФС растительного происхождения были проведены автором совместно с ведущим научным сотрудником микробиологической лаборатории Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» д.б.н. Каюмовым А.Р. Автором подготовлен проект ФС на НКФС с целью последующего контроля качества. Статистический анализ результатов экспериментов был лично проведен автором.

Автором полностью самостоятельно были подготовлены научные публикации в отечественных и международных журналах, тезисы и доклады о результатах исследования, сформулированы основные положения и написаны главы диссертации.

Положения, выносимые на защиту

1. Обоснование состава НКФС на основе эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола и α -(-)-бисаболола: наличие таргетного и синергетического антимикробного действия в отношении патогенной микрофлоры СД.
2. Комплексный подход к оценке качества НКФС растительного происхождения в целях её стандартизации.
3. Разработанные и валидированные методики качественного и количественного анализа НКФС с использованием ТСХ и ГХ-МС.
4. Результаты оценки стабильности НКФС растительного происхождения комплексом физико-химических методов и определение срока годности и условий хранения.

5. Проект фармакопейной статьи «Комбинированная фармацевтическая субстанция на основе эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола и α -(-)-бисаболола».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации и направления исследований соответствуют формуле специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пунктам 3 «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления» и 6 «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе».

Степень достоверности и апробация результатов

Научные положения и выводы базируются на достаточных по своему объему данных и количеству материала, современных методах исследования и результатах статистической обработки данных. Достоверность и точность полученных экспериментальных данных основывается на достаточном объеме выполненных исследований, применении современных физико-химических методов анализа (ТСХ, ГХ-МС). Объектами исследования послужили 10 фармацевтических субстанций синтетического и растительного происхождения, включая НКФС. Исследования проведены на высокотехнологичном поверенном оборудовании. Микробиологические исследования проводились на 5 стандартных штаммах микроорганизмов, участвующих в патогенезе СД, из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт». Все исследования проведены как минимум в трех повторностях в зависимости от рекомендаций ГФ XV издания.

Разработанные методики качественного и количественного анализа с помощью ТСХ и ГХ-МС валидированы в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» ГФ XV издания. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel согласно требованиям ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов эксперимента» ГФ XV издания.

Основные результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на всероссийских и международных конференциях: XXIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2022» (г. Москва, 11–22 апреля 2022 г.); VII Международная научно-практическая конференция молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (г. Екатеринбург, 17-18 мая 2022 г.); Международная научная конференция «От биохимии растений к биохимии человека» (г. Москва, 16-17 июня 2022 г.); Всероссийская конференция «Проблемы антибиотикоустойчивости микроорганизмов и пути её решения» (г. Санкт-Петербург, 16-17 июня 2022 г.); 2-ая Международная Электронная Конференция по Биомедицине в рамках сессии «Лекарственные растения и фитохимические вещества для медицинского применения» (The 2nd International Electronic Conference on Biomedicines session Medicinally Active Plants and Phytochemicals, Basel, June 1 2022); 7-ой Международный Симпозиум Фитохимических веществ в медицине и продуктах питания (7th International Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food, Beijing, August 2-8, 2023); Международная конференция Фитохимического Общества Европы, посвященная поиску натуральных лекарственных средств: текущий подход и перспективы (Conference PSE 2023 Natural Drug Discovery: Current Approach and Future Perspectives, Antalya, October 12-15, 2023); Всероссийская научно-практическая конференция «Образование и наука – стратегическая платформа для будущего Фармации», посвященная 15-летию создания фармацевтического отделения на факультете фундаментальной медицины (Москва, 2023); III Всероссийская научно-практическая конференция для студентов, аспирантов и молодых ученых

«Политех наукам о жизни» (Санкт-Петербург, 2023); Школа-конференция для молодых ученых «Антибиотики и факторы бактериальной резистентности к ним» Института молекулярного биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (Москва, 2023); I Международная конференция «Интеграционные связи фармацевтической экологии в современных реалиях – 2023», посвященная памяти академика А.П. Арзамасцева (Москва, 2023).

Апробация работы проведена на заседании кафедры фармацевтической химии и организации фармацевтического дела Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова (протокол №4 от 27.03.2024 г.).

Внедрение результатов исследования

НКФС растительного происхождения используется при разработке новых продуктов для профилактики и лечения перхоти и СД в Научном центре ООО «СПЛАТ ГЛОБАЛ» (акт внедрения от 19.01.2024 г.). Методики анализа многокомпонентных субстанций растительного происхождения используются в учебном процессе и научно-исследовательской работе на кафедре фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова (справка о внедрении от 15.01.2024 г.), в Научном центре ООО «СПЛАТ ГЛОБАЛ» (19.01.2024 г.), отделе контроля качества ООО «Органик Фармасьютикалз» (акт внедрения от 22.01.2024 г.). Материалы исследований внедрены в лекционный курс и практические занятия фармацевтической химии со студентами на Факультете фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова (справка о внедрении от 15.01.2024 г.).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований кафедры фармацевтической химии и организации

фармацевтического дела Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 17 печатных работ, в том числе: 5 научных публикаций, отражающих основные результаты диссертации (из них 1 научная публикация в издании из Перечня ВАК при Минобрнауки России; 3 научных публикации в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science и Scopus; 1 научная публикация в иных изданиях); 11 тезисов в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 3 – в сборниках зарубежных конференций); 1 патент на изобретение РФ.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 181 странице, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 2-х глав результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, заключения, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и 6 приложений. Диссертация содержит 40 таблиц (38 – в тексте и 2 – в Приложениях) и 44 рисунка (34 – в тексте и 10 – в Приложениях). Список литературы включает 257 источников (из которых 244 – зарубежные).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования были выбраны эфирное масло листьев чайного дерева (Bernardi Group, Франция), 1,8-цинеол (Wuxi Lous Essence Co., Ltd., Китай), α -(-)-бисаболол (Merck KGaA, Германия) и их стандартные образцы

(Ernesto Ventos S.A., Испания). Оценка показателей качества НКФС проводилась в соответствии с требованиями ГФ XV издания.

Оценку подлинности НКФС по наличию терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и α -(-)-бисаболола проводили ТСХ на пластинках «TLC Silica gel 60 F₂₅₄» (Merck, Германия) размером 10×10 см с подвижными фазами из толуола, этилацетата, метанола и муравьиной кислоты в различных соотношениях, детектированием уксуснокислым раствором анисового альдегида в метаноле, выдерживанием при 100–105 °С в течение 10 минут и проявлением в дневном свете и в УФ-свете при 365 нм.

Оценку подлинности и количественное определение НКФС проводили методом ГХ-МС на газовом хроматографе фирмы «Shimadzu» модель GCMS TQ 8040 с автосамплером АОС 5000 plus, капиллярной полярной колонкой HP-INNOWAX (30 м x 0,25 мм, толщина неподвижной фазы 0,25 мкм) и масс-селективным детектором.

Валидация методики ГХ-МС проводилась в соответствии с ОФС.1.1.0012 ГФ XV издания с дополнительным проведением теста на перенос пробы.

Сравнительная оценка свободной энергии связывания соединений НКФС и синтетических субстанций с доменами ланостерол-14 α -деметилазы и ABC-транспортеров была выполнена с помощью программы AutoDock (версия 4.2). Прогностическую оценку фармакологической активности для терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и α -(-)-бисаболола НКФС осуществили с помощью программы Phyto4Health.

Сравнительную оценку антибактериальной и противогрибковой активности отдельных соединений НКФС и синтетических антимикробных субстанций (кетоконазол, климбазол, бензалкония хлорид) проводили методом серийных разведений с резазурином на стандартных штаммах *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 14990, *Micrococcus luteus* ATCC® 10240a, *Malassezia furfur* ATCC® 14251 и *Candida albicans* ATCC® 10231. Для каждой субстанции рассчитывали минимальную подавляющую концентрацию (МПК₉₀) или минимальную фунгицидную

концентрацию (МФК₉₀) – минимальную концентрацию, при которой происходит видимое угнетение роста более 90% бактерий или дрожжеподобных грибов в течение 24 часов инкубации. Тип антимикробного взаимодействия соединений НКФС оценивали методом шахматной доски для выявления синергизма и рассчитывали индекс фракционной ингибирующей концентрации (ИФИК).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel (версия 2016). Статистическую значимость полученных данных принимали при уровне $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обоснование выбора соединений новой комбинированной субстанции с антимикробным действием

Анализ научной литературы позволил выбрать 3 вещества со значительным фармакологическим потенциалом для разработки НКФС растительного происхождения: эфирное масло листьев чайного дерева (*M. alternifolia*), стандартизированное по содержанию терпинен-4-ола, 1,8-цинеол и α -(-)-бисаболол, обладающие антибактериальным, противогрибковым и противовоспалительным действием.

Терпинен-4-ол, 1,8-цинеол и α -(-)-бисаболол обладали значительным сродством к активному центру и ТМН₁-домену ланостерол-14 α -деметилазы, превышающим показатели климбазола (Таблица 1). Синтетические субстанции итраконазола и кетоконазола, обладающие наибольшим сродством к активному центру ланостерол-14 α -деметилазы, вызывают развитие резистентности у дрожжеподобных грибов *Malassezia* при лечении СД. Соединения НКФС обладали значительным сродством к нескольким доменами АВС-транспортеров микроорганизмов, сравнимым с климбазолом, вызывающим антимикробную резистентность. Олигомицин А и кетоконазол показали более значительное сродство только к ТМД-домену АВС-транспортеров, не обеспечивающее, однако, полной защиты от выброса молекул ЛС.

Таблица 1 – Значения сродства изучаемых соединений НКФС с доменами ланостерол-14-деметиلاзы и ABC-транспортеров дрожжеподобных грибов

Соединение	Ланостерол-14 α -деметилаза		ABC-транспортеры	
	Область связывания <i>in silico</i>	Значение энергии связывания, ккал/моль	Область связывания <i>in silico</i>	Значение энергии связывания, ккал/моль
Терпинен-4-ол	FSL-домен	-6,2	NBD-домен	-4,6
1,8-Цинеол	TMH ₁ -домен	-5,8	NBD-домен	-4,2
α -(-)-Бисаболол	FSL-домен	-4,8	TMD-домен	-5,1
Климбазол	FSL-домен	-5,2	TMD-домен	-4,9
Кетоконазол	FSL-домен	-6,7	TMD-домен	-7,3
Итраконазол	FSL-домен	-7,9	TMD-домен	-8,9

С помощью программы Phyto4Health спрогнозирована противовоспалительная, фунгицидная и анальгетическая виды активности для терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и α -(-)-бисаболола, способные в комплексе влиять на различные клинические проявления СД. 1,8-цинеол может увеличивать проникновение терпинен-4-ола и α -(-)-бисаболола в клетки микроорганизмов. α -(-)-Бисаболол является усилителем фунгицидного действия других соединений в составе НКФС.

НКФС обладала значительной антимикробной активностью в отношении патогенетической микрофлоры СД *S. epidermidis* и *S. aureus* при минимальном влиянии на нормальную микрофлору – *M. luteus* (Таблица 2), в отличие от контрольной субстанции бензалкония хлорида.

Таблица 2 – Антибактериальная активность объектов исследования в отношении тест-штаммов бактерий себорейного дерматита

Объект исследования	МПК ₉₀ , мг/мл		
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	<i>M. luteus</i> ATCC 10240a
1,8-Цинеол	40,00	2,50	40,00
Эфирное масло листьев чайного дерева	40,00	1,25	40,00
α -(-)-Бисаболол	5,00	1,25	20,00
НКФС	1,25	1,25	20,00
Бензалкония хлорид	5,00	5,00	5,00

НКФС обладала значительной, превышающей климбазол, противогрибковой активностью в отношении стандартных штаммов *C. albicans* и *M. furfur* (Таблица 3). Кетоконазол продемонстрировал сопоставимую с НКФС противогрибковую активность.

Таблица 3 – Противогрибковая активность объектов исследования в отношении тест-штаммов дрожжеподобных грибов себорейного дерматита

Объект исследования	МФК ₉₀ , мг/мл	
	<i>C.albicans</i> ATCC 10231	<i>M.furfur</i> ATCC 14251
1,8-Цинеол	40,00	40,00
Эфирное масло листьев чайного дерева	5,00	40,00
α -(-)-Бисаболол	20,00	20,00
НКФС	2,50	5,00
Климбазол	10,00	10,00
Кетоконазол	2,50	2,50

Попарные комбинации эфирного масла листьев чайного дерева с 1,8-цинеолом (1:1) и эфирного масла листьев чайного дерева с α -(-)-бисабололом (1:1) продемонстрировали синергизм в отношении штаммов *S. epidermidis* и *S. aureus*. Добавление 1,8-цинеола позволило достичь синергизма и в отношении *C. albicans* (Таблица 4).

Таблица 4 – Индексы антимикробного взаимодействия между попарными комбинациями объектов исследования в составе НКФС

Штамм микроорганизмов	Значения ИФИК для попарных комбинаций, Mean \pm SD		
	Эфирное масло листьев чайного дерева + 1,8-цинеол	Эфирное масло листьев чайного дерева + α -(-)-бисаболол	1,8-цинеол + α -(-)-бисаболол
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1,056 \pm 0,159	0,523 \pm 0,014	1,316 \pm 0,472
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1,913 \pm 0,276	1,025 \pm 0,013	3,052 \pm 0,565
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	0,344 \pm 0,125	0,625 \pm 0,261	1,500 \pm 0,435

Стандартизация новой комбинированной субстанции на основе эфирного масла чайного дерева, 1,8-цинеола и α -(-)-бисаболола

Метод ТСХ был успешно применен для подтверждения подлинности НКФС. При подборе подвижной фазы изучались комбинации толуола, этилацетата и муравьиной кислоты, рекомендованные в научной литературе. Введение метанола позволило достичь оптимального разделения терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и α -(-)-бисаболола при соотношении фазе толуол-этилацетат-метанол (85:10:5) (Рисунок 1, Таблица 5).

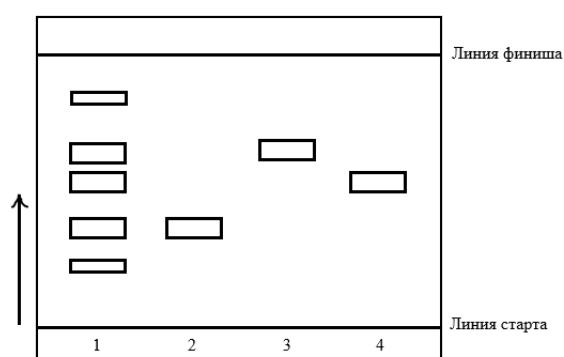


Рисунок 1 – Графическая хроматограмма НКФС в системе толуол-этилацетат-метанол (85:10:5): 1 – НКФС; 2 – СО терпинен-4-ола; 3 – СО 1,8-цинеола; 4 – СО α -(-)-бисаболола

Таблица 5 – Показатели подлинности НКФС по методу планарной ТСХ с детектированием в видимом свете и УФ-свете при 365 нм

№ п/п	Соединение	Окраска пятен в видимом свете	Окраска пятен в УФ-свете 365 нм	$R_f \pm SD$ (n=5)
1	Не идентифицировано	Коричневая	Слабо-розовая	0,47 \pm 0,01
2	Терпинен-4-ол	Красно-коричневая	Желтая	0,54 \pm 0,03
3	α -(-)-Бисаболол	Розовато-красная	Оранжевая	0,64 \pm 0,03
4	1,8-Цинеол	Фиолетово-коричневая	Желтая	0,71 \pm 0,02
5	Не идентифицировано	Розово-пурпурная	Розово-пурпурная	0,97 \pm 0,01

Разработанная методика ГХ-МС позволила достоверно разделить пики определяемых терпинен-4-ола, 1,8-цинеола, (-)- α -бисаболола от пиков остальных компонентов НКФС (Рисунки 2а и 2б). Масс-спектрометрическое детектирование

с использованием библиотеки полных масс-спектров NIST-2017 позволило количественно идентифицировать 15 соединений НКФС (Таблица 6).

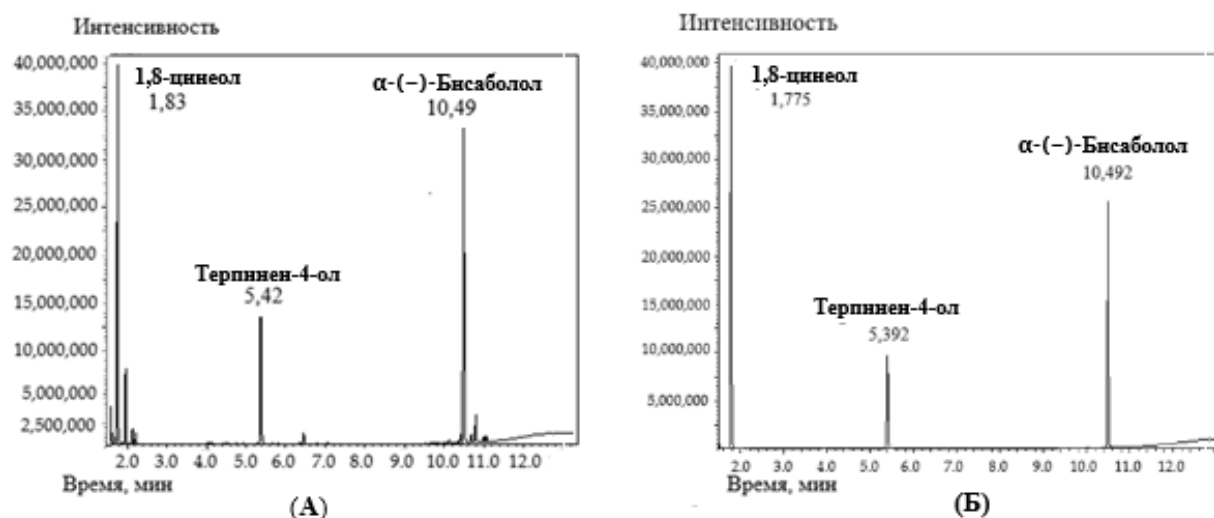


Рисунок 2 – (а) ГХ-МС испытуемого раствора НКФС на основе эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола и $\alpha(-)$ -бисаболола; (б) ГХ-МС стандартного раствора смеси терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и $\alpha(-)$ -бисаболола

Таблица 6 – Вещества НКФС, идентифицированные методом ГХ-МС

Название вещества	Химический класс	RT, мин	Относительное содержание, %
β -Мирцен	Ациклический монотерпен	1,550	0,27 \pm 0,01
α -Фелландрен	Циклический монотерпен	1,663	3,86 \pm 0,02
α -Терпинен	Циклический монотерпен	1,663	3,86 \pm 0,02
D-Лимонен	Циклический монотерпен	1,766	0,45 \pm 0,03
1,8-Цинеол	Бициклический оксид монотерпена	1,833	25,63 \pm 0,25
γ -Терпинен	Циклический монотерпен	2,045	10,36 \pm 0,05
<i>m</i> -Цимол	Ароматический монотерпен	2,229	3,78 \pm 0,01
Терпинен-4-ол	Бициклический окси монотерпен	5,418	16,98 \pm 0,09
α -Терпинеол	Циклический монотерпен	6,486	15,31 \pm 0,03
δ -Кадинен	Бициклический сесквитерпен	7,083	0,31 \pm 0,01
β -Бисаболол	Моноциклический сесквитерпеновый спирт	10,134	0,27 \pm 0,02
β -Кариофиллен	Сесквитерпен	10,419	0,79 \pm 0,01
$\alpha(-)$ -Бисаболол	Моноциклический сесквитерпеновый спирт	10,494	27,67 \pm 0,21
Фарнезол	Ациклический монотерпен	10,801	2,52 \pm 0,01
Транс-геранилгераниол	Ациклический монотерпен	11,001	0,55 \pm 0,01

Разработанная методика ГХ-МС была успешно валидирована и признана специфичной, точной и достоверной (Таблица 7).

Таблица 7 – Результаты валидации методики ГХ-МС НКФС

Характеристика	Критерий анализа	Результаты		
		1,8-цинеол	Терпинен-4-ол	$\alpha(-)$ -Бисаболол
Пригодность	Число теоретических тарелок >10000	19319	179154	678580
	Разрешение между пиками >1,5	$\geq 2,0$	$\geq 2,0$	$\geq 2,0$
	RSD пика	2,6%	3,2%	2,7%
	Фактор асимметрии пика	1	1	1
Специфичность	Время удерживания в испытуемом образце НКФС	1,768	5,388	10,492
	Число теоретических тарелок >10000	19275	179021	678839
	Количественное содержание в НКФС	23,01–23,51%	18,57–18,75%	29,74–30,16%
Аналитическая область определения	Диапазон содержания НКФС	от 0,01% до 1% (соответствует диапазону определения от 2% до 200%)		
Линейность	Коэффициент корреляции	0,999	0,999	0,999
Правильность	Средний процент восстановления	100,2	100,7	100,0
	Коэффициент вариации открываемости, %	1,00	0,88	1,51
Прецизионность	Коэффициент вариации, %	1,28	1,96	1,99

Ввиду многокомпонентности состава НКФС, особенностей физико-химических свойств составляющих компонентов и выбранных хроматографических условий был проведен тест на перенос пробы. Эффект переноса пробы, невыявленный для стандартного раствора смеси соединений, был обнаружен при испытании раствора НКФС в виде пика остаточного $\alpha(-)$ -

бисаболола на хроматограммах холостых образцов (Рисунок 3), что позволило рекомендовать промывку инжектора и хроматографической колонки между анализами НКФС.

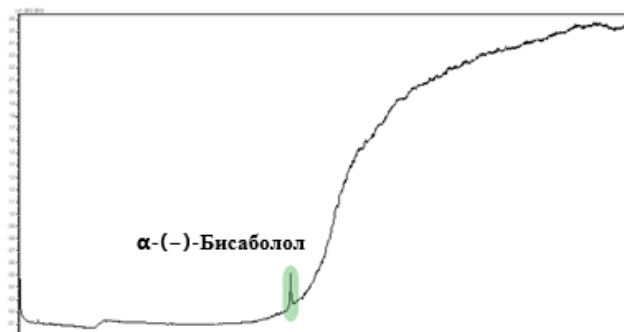


Рисунок 3 – ГХ-МС первой холостой пробы после анализа НКФС

Оценка стабильности фармацевтической субстанции при хранении

Оценка стабильности НКФС проводилась при хранении в условиях пониженной температуры (4 ± 2)°C через каждые 3 месяца в течение 12 месяцев и в условиях комнатной температуры (25 ± 2)°C в течение 6 месяцев в соответствии с требованиями ГФ XV издания. Органолептические (цвет, прозрачность, запах), физико-химические показатели и содержание терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и α(-)-бисаболола в НКФС при температуре (4 ± 2)°C достоверно не изменялись в течение всех 12 месяцев хранения (Рисунок 4), в то время как при (25 ± 2)°C изменялись количественный состав НКФС, перекисное и кислотное числа. По результатам исследования, рекомендовано хранение в специально оборудованных холодильных камерах при температуре от 2 до 8 °C в целях сохранения основных действующих соединений НКФС.

Подготовлен проект ФС «Комбинированная фармацевтическая субстанция на основе эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола и α(-)-бисаболола» для стандартизации по наличию и содержанию 1,8-цинеола, терпинен-4-ола, α(-)-бисаболола методами ТСХ и ГХ-МС и основным показателям качества.

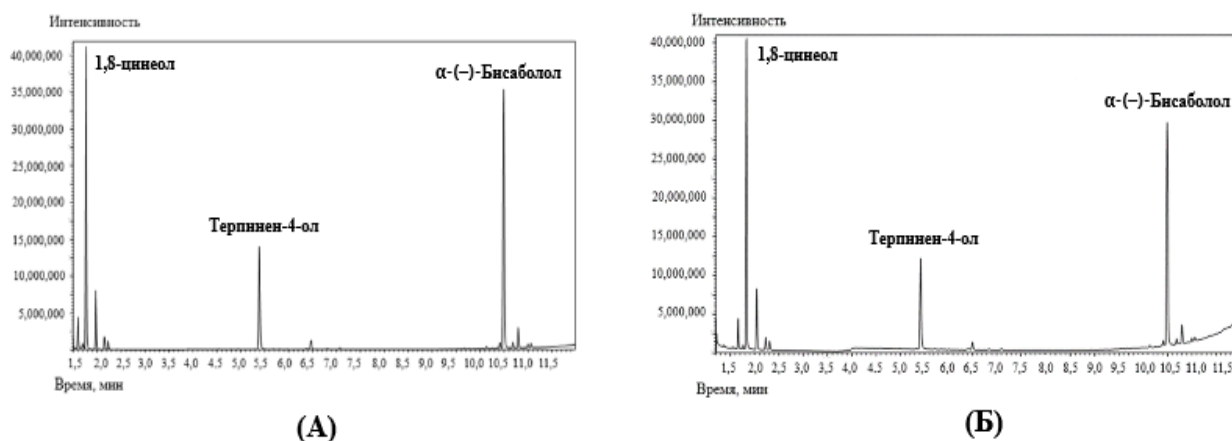


Рисунок 4 – ГХ-МС (а) свежеприготовленного испытуемого раствора НКФС; (б) испытуемого раствора через 12 месяцев хранения при температуре $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе предложен и использован алгоритм поэтапной разработки НКФС растительного происхождения с таргетированным и синергетическим антимикробным действием: от научного поиска перспективных веществ, анализа их состава физико-химическими методами, оценки *in silico* степени сродства отдельных соединений к патогенетическим мишеням, выбора оптимального состава НКФС по результатам тестирования *in vitro* антимикробного действия до её стандартизации с использованием валидированной аналитической методики ГХ-МС. Обоснование эффективности НКФС при сохранении приемлемого уровня безопасности в соответствии с принципами доказательной медицины дает возможность расширения областей её применений в клинической практике.

ВЫВОДЫ

1. Обоснован выбор субстанций растительного происхождения – эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола и $\alpha(-)$ -бисаболола, обладающих таргетным антимикробным действием в отношении патогенетических мишеней микроорганизмов СД: доменов ABC-транспортеров и ланостерол-14 α -деметилазы.

2. Разработана НКФС растительного происхождения на основе эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола и α -(-)-бисаболола в массовом соотношении 1:1:1, обладающая синергетической и таргетированной антимикробной активностью в отношении стандартных штаммов микроорганизмов, участвующих в патогенезе СД: *S. epidermidis*, *S. aureus*, *M. furfur*, *C. albicans*. Антимикробная активность НКФС превосходит активность индивидуальных соединений терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и α -(-)-бисаболола и сопоставима с клинически рекомендованными синтетическими субстанциями бензалкония хлорида, кетоконазола и климбазола.

3. Разработан комплекс методов контроля качества НКФС растительного происхождения по показателям качества ГФ XV издания: описание, растворимость, плотность, угол вращения, показатель преломления, нежелательные примеси, микробиологическая чистота, подлинность, количественное определение, хранение.

4. Разработана аналитическая методика оценки подлинности НКФС методом ТСХ: подобрана система растворителей толуол-этилацетат-метанол (85:10:5) для наилучшего разделения терпинен-4-ола, 1,8-цинеола, α -(-)-бисаболола и других соединений в составе НКФС и способ детектирования.

5. Разработана аналитическая методика оценки подлинности и количественного определения действующих веществ НКФС методом ГХ-МС: подобраны пригодные хроматографические условия для обеспечения достаточной эффективности разделения соединений НКФС, их количественного определения с требуемым критерием приемлемости. По результатам анализа обнаружено 15 соединений с преобладанием терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и α -(-)-бисаболола, определяющих основное антимикробное действие НКФС.

6. Проведена валидация аналитической методики оценки подлинности и количественного определения действующих веществ НКФС методом ГХ-МС. Аналитическая методика обладает достаточной специфичностью, линейностью, правильностью, сходимостью, прецизионностью в выбранном аналитическом диапазоне 0,01–0,5 масс.% НКФС и соответствует требованиям ГФ XV издания.

Впервые предложено использование теста на перенос пробы для НКФС растительного происхождения в рамках процедуры валидации на основании выявленного эффекта переноса пробы $\alpha(-)$ -бисаболола.

7. Изучена стабильность НКФС комплексом физико-химических методов, определен срок годности и условия хранения. Рекомендовано хранение НКФС в специально оборудованных холодильных камерах при температуре от 2 до 8 °С и установлено, что в этих условиях субстанция стабильна на протяжении не менее 12 месяцев.

8. Подготовлен проект ФС «Комбинированная фармацевтическая субстанция на основе эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола и $\alpha(-)$ -бисаболола» для последующего контроля качества в соответствии с требованиями ГФ XV издания, с применением разработанных и валидированных методик ГХ-МС и ТСХ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Предложенный и реализованный алгоритм поэтапной разработки антимикробной НКФС растительного происхождения может успешно применяться при решении подобного рода задач в отношении других дерматологических заболеваний бактериальной или грибковой природы. Благодаря доказанному таргетному антимикробному действию соединений, эффективность НКФС в отношении стандартных штаммов сопоставима с клинически рекомендованными ЛС, что обосновывает возможность использования в качестве альтернативы антимикробным средствам синтетического происхождения в лечении СД.

Предложенные валидированные методики ТСХ и ГХ-МС могут быть взяты за основу при разработке специфичных методик анализа иных многокомпонентных субстанций растительного происхождения липофильной природы.

Введение теста на перенос пробы в качестве одного из показателей ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» представляется

инновационным в рамках алгоритма разработки и исследования новых веществ и комбинированных субстанций растительного происхождения.

Результаты оценки стабильности НКФС позволяют рекомендовать внесение дополнений в раздел «Хранение» ОФС.1.5.2.0001 «Эфирные масла» ГФ XV издания и установить условия хранения в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные экспериментальные данные служат основанием для продолжения исследований эффективности и безопасности лекарственного шампуня на основе НКФС с целью последующей регистрации в качестве нового ЛС для терапии СД.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Филатов, В.А.** Алгоритм разработки многокомпонентной фармацевтической субстанции растительного происхождения с антимикробным действием: от научного поиска до лекарственной формы / **В.А. Филатов**, О.Ю. Куляк, Е.И. Каленикова // **Разработка и регистрация лекарственных средств**. – 2024. – Т. 13. – № 2. – С. 78–89. [Scopus]
2. **Filatov, V.A.** Chemical Composition and Antimicrobial Potential of a Plant-Based Substance for the Treatment of Seborrheic Dermatitis // **V.A. Filatov**, O.Yu. Kulyak, E.I. Kalenikova // **Pharmaceuticals**. – 2023. – Vol. 16. – № 3. – P. 328-347. [Scopus, Web of Science]
3. Development and Validation of a Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method for the Analysis of the Novel Plant-Based Substance with Antimicrobial Activity / **V.A. Filatov**, E.A. Пин, O.Yu. Kulyak, [at al.] // **Antibiotics**. – 2023. – Vol. 12. – P. 1558-1573. [Scopus, Web of Science]
4. **Filatov, V.A.** In vitro and in vivo antimicrobial activity of an active plant-based quadrocomplex for skin hygiene // **V.A. Filatov**, O.Yu. Kulyak, E.I. Kalenikova // **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**. – 2022. – Vol. 10. – № 5. – P. 905-921. [Scopus]
5. **Filatov V.A.** The development of plant-based pharmaceutical substance for treatment of seborrheic dermatitis / **V.A. Filatov**, O.Yu. Kulyak, E.I. Kalenikova // **Journal of Investigative Dermatology**. – 2022. – Vol. 142. – № 12. – P. 206.
6. **Filatov V.A.** The Development of Medical Shampoo with the Plant-Based Substance for the Treatment of Seborrheic Dermatitis / **V.A. Filatov**, O.Yu. Kulyak, E.I. Kalenikova // **Medical Science Forum**. – 2023. – Vol. 3. – P. 1-6.
7. **Филатов В.А.** Субстанция на основе биологически активных веществ для терапии себорейного дерматита: разработка и изучение антимикробного действия / **В.А. Филатов**, О.Ю. Куляк, Е.И. Каленикова // «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА»: Сборник тезисов 25-ой Пущинской школа-конференции молодых ученых с международным участием. г. Пущино, 2022. – С. 243–243.
8. **Филатов В.А.** Субстанция на основе биологически активных веществ для терапии себорейного дерматита: разработка и изучение антимикробного действия / **В.А. Филатов**, О.Ю. Куляк, Е.И. Каленикова // «Молодая Фармация — потенциал будущего»: Материалы XII

Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием. г. Санкт-Петербург, 2022. – С. 427–430.

9. **Филатов В.А.** Субстанция на основе биологически активных веществ для терапии себорейного дерматита: разработка и изучение антимикробного действия / **В.А. Филатов**, О.Ю. Куляк // «Ломоносов-2022»: Материалы Международного молодежного научного форума. г. Москва, 2022. – С. 1.

10. **Филатов В.А.** Изучение антимикробной активности многокомпонентной субстанции растительного происхождения для терапии себорейного дерматита / **В.А. Филатов**, О.Ю. Куляк, Е.И. Каленикова // XXII Всероссийский съезд дерматовенерологов и косметологов: Тезисы научных работа. г. Москва, 2022. – С. 11.

11. **Filatov V.A.** The development and research of a novel plant-based substance based on terpenes for the treatment of seborrheic dermatitis / **V.A. Filatov**, O.Yu. Kulyak, E.I. Kalenikova // 8th International Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food (8-ISPMF): Abstract Book. Beijing, 2023. – С. 205–206.

12. **Filatov V.A.** Towards a cure for the seborrheic dermatitis: the development of a novel terpene-enriched plant-based combination with antimicrobial activity / **V.A. Filatov**, O.Yu. Kulyak, E.I. Kalenikova // PSE Natural Drug Discovery: Current Approach and Future Perspectives: Abstract Book. Antalya, 2023. – P. 107.

13. **Филатов В.А.** Разработка состава лекарственного шампуня с субстанцией растительного происхождения и изучение его антимикробного действия / **В.А. Филатов**, О.Ю. Куляк, Е.И. Каленикова // Всероссийская научно-практическая конференция, посвящённая 15-летию создания фармацевтического отделения на факультете фундаментальной медицины МГУ: Сборник тезисов. г. Москва, 2023. – С. 183–185.

14. **Филатов В.А.** Антимикробный потенциал новой комбинированной субстанции растительного происхождения для профилактики и лечения себорейного дерматита / **В.А. Филатов**, О.Ю. Куляк, Е.И. Каленикова // Школа-конференция для молодых ученых «Антибиотики и факторы бактериальной резистентности к ним» Института молекулярного биологии им. В.А. Энгельгардта РАН: Сборник тезисов. г. Москва, 2023. – С. 48.

15. **Филатов В.А.** Молекулярный докинг и оценка антимикробного эффекта новой субстанции растительного происхождения для лечения себорейного дерматита / **В.А. Филатов**, О.Ю. Куляк, Е.И. Каленикова, Е.А. Ильин // III Всероссийская научно-практическая конференция для студентов, аспирантов и молодых ученых «Политех наукам о жизни»: Сборник тезисов докладов. г. Санкт-Петербург, 2023. – С. 102.

16. **Филатов В.А.** Разработка состава лекарственного шампуня с субстанцией растительного происхождения и исследование его антимикробного действия / **В.А. Филатов**, О.Ю. Куляк, Е.И. Каленикова, Е.А. Ильин // I Международная конференция «Интеграционные связи фармацевтической экологии в современных реалиях – 2023», посвященная памяти академика А.П. Арзамасцева: Сборник тезисов. г. Москва, 2023.

17. Биологически активный квадрокомплекс для регуляции биоразнообразия микробиоты кожи: пат. 288358 РФ МПК А61К 8/18 (2006.01), А61К 8/9789 (2017.01), А61К 33/28 (2006.01), А61К 36/61 (2006.01), А61Q 17/00 (2006.01), А61Q 19/10 (2006.01). Е.Ю. Белоус, **В.А. Филатов** ; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью "СПЛАТ ГЛОБАЛ" - № 2021108187 ; заявл. 26.03.2021, опублик. 17.01.2023. Бюл. № 2. – 37 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ABC-транспортер – АТФ-связывающие кассетные транспортеры

FSL – сложный цитоплазматический домен с активным центром ланостерол-14 α -деметилазы

NBD – домен ABC-транспортеров с АТФазной активностью, связывающий нуклеотиды

TMD – сложный трансмембранный домен ABC-транспортеров

TMH₁ и MH₁ – сложный трансмембранный домен ланостерол-14 α -деметилазы