

С. Н. Суслина¹, К. В. Алексеев¹, М. В. Стародубова², В. Л. Багирова²**РАЗРАБОТКА ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ДЕРМАТОЛОГИЧЕСКОЙ ФОРМЫ С МАСЛОМ ВИТОН И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЕЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ**¹ Российский университет дружбы народов, Москва;² Институт стандартизации лекарственных средств НЦ ЭСМП, Москва

В арсенале средств профилактики большое по терапевтической значимости и потребительским предпочтениям место занимают лекарственные препараты и космецевтики на основе веществ природного происхождения.

Одним из таких препаратов является масло Витон (ФС 42-0215-0858-01, Р № 000367/01-2001), представляющее собой масляный экстракт из 12 лекарственных растений (мяты перечной листьев экстракт, сосны почек экстракт, шиповника плодов экстракт, полыни горькой травы экстракт, тысячелистника травы экстракт, зверобоя травы экстракт, чистотела травы экстракт, календулы цветков экстракт, ромашки цветков экстракт, фенхеля плодов экстракт, тмина плодов экстракт, чабреца травы экстракт, камфора). Масло Витон — препарат с широким спектром местного и общего воздействия на организм, он обладает противовоспалительным, антимикробным, анальгезирующим, регенерирующим действием, его успешно применяют в дерматологии, проктологии, гинекологии. Несмотря на обширный спектр показаний и большой опыт применения данного препарата, его использование при лечении воспалительных реакций кожи ограничено неудобством лекарственной формы для аппликационной терапии. При нанесении на кожу масло неравномерно дозируется, стекает с места аппликации, вследствие чего сокращается время терапевтического воздействия. Эти и другие причины ведут к неоправданному расходу препарата, что удорожает лечение [1, 2].

Согласно современной биофармацевтической концепции, лекарственная форма и степень дисперсности

лекарственного вещества в значительной мере обуславливают терапевтическую эффективность лекарств. Одним из способов повышения активности жирорастворимых веществ и повышения дисперсности масляной фазы является включение в липосомы. Перспективность использования липосомальных препаратов в дерматологии обусловлена улучшением усвоения лекарственных веществ клеточными мембранами и клетками [3, 4].

В ряду веществ, используемых для получения липосом, наиболее физиологичными являются фосфолипиды (ФЛ) желтка куриного яйца, полученные с их помощью липосомы являются не только носителями лекарственного вещества, но и строительным материалом клеточных мембран, что, несомненно, положительно сказывается на репаративных процессах в коже. Поскольку масло Витон представляет собой масляный экстракт, а исходя из описанных в теории и полученных на практике липосомальных препаратов, представляется целесообразным введение его в липосомы, что предположительно позволит повысить его терапевтическую активность.

Результаты и их обсуждение

Все исследования по разработке и получению липосом выполнены в МГАТХТ им. М. В. Ломоносова на кафедре биотехнологии. Исходным сырьем для получения липосом являлась субстанция “Липофолк” (НПО “Техкон”, Долгопрудный, Московская обл.), представляющая собой спиртовой экстракт куриных фолликул.

Качественный анализ исходной и производных фосфолипидных субстанций осуществлен с использованием хроматографии в тонком слое сорбента на пластинах “Silufol” (“Kavalier”, Чехия) или “Сорбтон” (МВП “Хромдет-Экология”, Москва) размером 10 × 10 см в системе хлороформ – метанол – вода (65 : 25 : 4). Идентификация проведена несколькими способами — в парах йода, опрыскивание реактивом молибденовым синим, 0,25 % раствором нингидрина в ацетоне, прожиганием. В зависимости от выбранного способа проявления хроматограмм обнаруживаются различные пятна фосфолипидов с определенными значениями R_f . Хроматограмма фосфолипидов в субстанциях серии “Липофолк” представлена на рис. 1.

Для определения липидного фосфора использован метод Васьяковского и Светашева, основанный на измерении оптической плотности раствора, содержащего продукты взаимодействия продуктов минерализа-

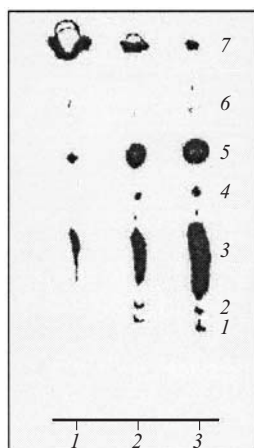


Рис. 1. Хроматограмма субстанции Липофолк различной степени очистки: 1 – Липофолк неочищенный, 2 – Липофолк-1, 3 – Липофолк-2.

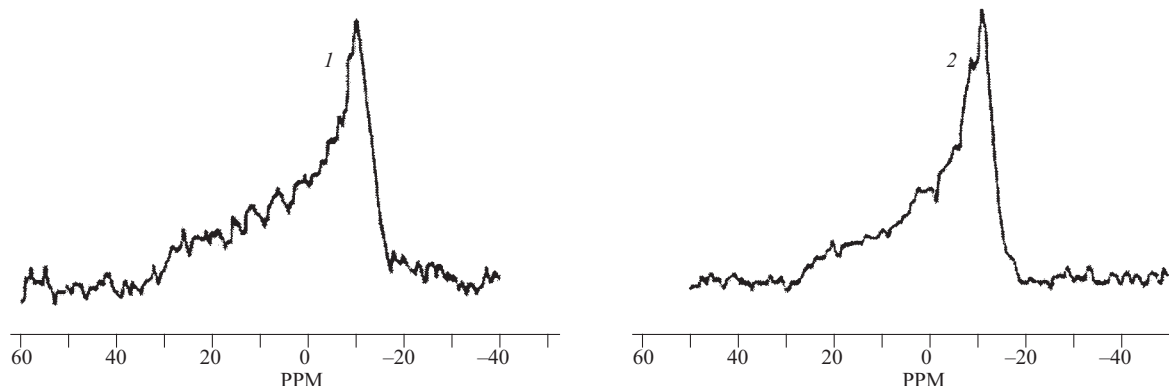


Рис. 2. ^{31}P ЯМР (81,01 МГц)-спектр водных дисперсий фосфолипидных субстанций: 1 – лецитин-стандарт (10 мг/мл); 2 – липофолк-2 (11,5 мг/мл)

ции ФЛ со смесью солянокислого гидразина с молибдатом натрия при длине волны 815 нм. Полученные данные усреднены, по калибровочной прямой найдено молярное содержание фосфора в пробе и рассчитана масса фосфолипидов в пробе ($M_{\text{фл}} = 80$ г/моль, $m_{\text{фл}} = \nu_{\text{рн}} M_{\text{фл}}$).

Установлено что “Липофолк” не содержит нелипидных примесей. Суммарное содержание ФЛ в исходной субстанции “Липофолк” составляет 19 % [5]. Поскольку содержание ФЛ недостаточно для получения липосом разработан метод очистки ФЛ путем двукратной экстракции, в результате которого содержание ФЛ повышается до 87 %, а полученное производное вещество названо нами “Липофолк-2” (рис. 1).

Фракционный анализ “Липофолк-2”, проведенный с помощью препаративной ТСХ с последующим определением липидного фосфора по методу Васьяковского и Светашева, показал наличие шести фосфолипидных компонентов, преобладающей фракцией является фосфатидилхолин (71 %) и следовые количества холестерина (рис. 1, табл. 1).

Поскольку для образования липосом в водных дисперсиях ФЛ необходимо наличие ламеллярной фазы изучено фазовое состояние водных дисперсий фосфолипидов, в качестве вещества сравнения использован яичный лецитин – стандарт (“Биолек”, Харьков) 1 % водный раствор с содержанием фосфолипидов 85 %.

Изучение фазового состояния фосфолипидных дисперсий проведено методом ^{31}P ЯМР спектроскопии. Спектры получены на импульсном Фурье-спектрометре MSL-200 (“Bruker”, ФРГ) с рабочей частотой 81,01 МГц при широкополосной развязке от протонов. Число сканирований составляло от 1500 до 6000 в зависимости от структурной организации исследуемого образца. Для улучшения отношения сигнал : шум при обработке спектров проводили экспоненциальное уширение линий с параметром уширения LB от 20 до 80 Гц.

Результаты ^{31}P ЯМР-спектроскопии водных дисперсий фосфолипидов показали (рис. 2) для лецитин-стандарт и “Липофолк-2” характерный спектр ламеллярной фазы с максимумом 14 м.д., плечом, направленным в область слабого поля и анизотропией

химического сдвига 50 м.д. Таким образом, у “Липофолк-2” выявлены свойства, необходимые для создания липосомальной дисперсии.

Для получения липосом выбран метод озвучивания, однако существование разных типов установок и широкого спектра параметров процесса не позволяет заранее стандартизовать условия проведения эксперимента, в связи с этим нами разработаны параметры озвучивания, позволяющие получать на используемом приборе липосомы заданного качества.

Озвучивание водных дисперсий “Липофолк-2” и лецитин-стандарт в качестве вещества сравнения осуществлялось на приборе УЗДИ-20 с излучателем погруженного типа с частотой 22 кГц и мощностью 20 Вт при пониженной температуре. При озвучивании в течение 20 мин исследуемых водных дисперсий быстро формируются липосомы диаметром около 130 нм и высокой степени гомогенности.

Для характеристики озвученных дисперсий выбраны размеры липосом, определяемые методом спектров мутности, их поведение в присутствии ионов празеодима, изученное методом ^{31}P ЯМР-спектроскопии, и степень окисленности липидного материала, определяемая косвенно по концентрации малонового диа-

Таблица 1
Хроматографический анализ фосфолипидов “Липофолка-2”

№ п/п	Идентификация			Фосфор неорганический, % от общего	Компонент
	R_f	Молибденовый синий	Нингидрин		
1	0,18	+	+	4,10	Фосфатидилсерин
2	0,20	+	–	2,80	Сфингомиелин
3	0,30	+	–	71,70	Фосфатидилхолин
4	0,54	+	–	2,95	Фосфатидилглицерин
5	0,65	+	+	13,10	Фосфатидилэтаноламин
6	0,70	+	–	5,30	Дифосфатидилглицерин
7	0,90	+	–	0	Холестерин

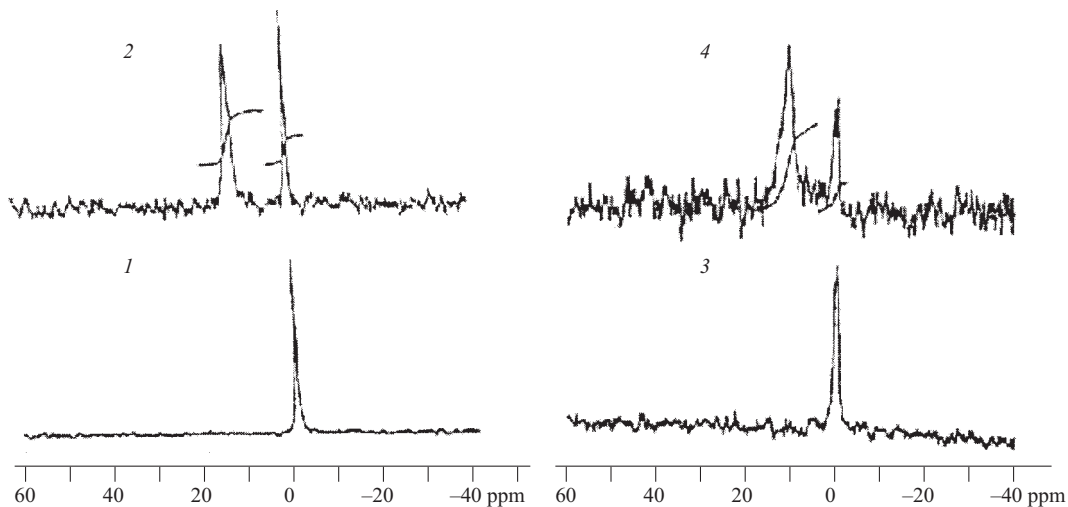


Рис. 3. ^{31}P ЯМР (81,01 МГц)-спектры липосом (время озвучивания 20 мин): 1 – лецитин-стандарт (10 мг/мл); 2 – лецитин-стандарт (10 мг/мл) 8 мин после добавления Pr^{3+} ; 3 – Липофолк-2 (11,5 мг/мл); 4 – Липофолк-2 (11,5 мг/мл) 8 мин после добавления Pr^{3+}

льдегида (МДА) — конечного продукта перекисного окисления липидов.

Определение уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) проведено по содержанию продукта перекисного окисления липидов МДА методом пробы с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Измеряли оптическую плотность анализируемого образца относительно реагента при длине волны 580 и 532 нм, и рассчитывали содержание в пробе малонового диальдегида по формуле:

$$C = \frac{(D_{532} - D_{580}) \cdot 6 \cdot 1000}{155(\text{нмольМДА/мл})},$$

где: D_{532} — оптическая плотность при длине 532 нм; D_{580} — оптическая плотность при длине 580 нм.

Определение размера липосом проведено по спектрам мутности — методом спектротурбидометрии. Оптическую плотность липосомальных дисперсий измерили на спектрофотометре “Beckman UV-8” в интервале λ 400 – 700 нм с шагом 50 нм. Показатель преломления определен в рефрактометре ИРФ-22. Об-

работка экспериментальных данных проведена в программе “Statgraf” на ЭВМ Notebook 386 DX-33.

Наличие внутреннего объема дисперсной фазы доказано с помощью метода ^{31}P ЯМР-спектроскопии с парамагнитными ионами празеодима. Празеодим является так называемым сдвигающим реагентом, образуя комплекс с атомами фосфора в полярной головке молекул ФЛ. На ^{31}P ЯМР спектрах в присутствии празеодима обнаруживается сдвиг сигнала в сторону слабого поля, а поскольку в системе имеются молекулы ФЛ, головки которых недоступны для ионов празеодима, то сдвигается лишь часть сигнала. Изначально все образцы озвученных дисперсий характеризуются одним узким изотропным сигналом с $d = 0$ м.д. в ^{31}P ЯМР спектрах. Добавление Pr^{3+} в виде 0,1 М раствора не вызывает визуальных изменений в дисперсиях, но приводит к расщеплению сигнала ^{31}P ЯМР спектров, следовательно все дисперсии при озвучивании формируют агрегаты с внутренним объемом (рис. 3).

Результаты исследования выбранных характеристик липосомальных дисперсий представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2

Основные характеристики дисперсий из фосфолипидных субстанций

Образец, содержание ФЛ, %	Концентрация в пробе, %/конц ФЛ	Показатель преломления μ	Коэффициент $m = \mu/\mu_0$	Время озвучивания, мин.	Волновое число коэффициент корреляции (для $\lambda = 400 - 700$ нм) n/ε	Относительный размер α	Диаметр частиц d , нм	Концентрация МДА, нмоль/мл
Лецитин-стандарт (Р-85 %)	1,0 % /0,85 % (ФЛ)	1,4495	1,0873	–	0,3663/0,7220	20,6	2700	0,56 ± 0,18
				10	2,2560/0,9996	3,1	408	3,15 ± 0,25
				20	4,9780/0,9839	<< 1,0	<< 130	23,4 ± 3,3
Липофолк-2 (Р-87 %)	1,15 % /1,0 % (ФЛ)	1,4473	1,0855	–	0,4586/0,9960	20,1	2640	8,13 ± 0,19
				10	2,2900/0,9982	3,0	395	15,58 ± 0,14
				20	3,3990/0,9985	~ 1,0	~ 130	22,99 ± 0,95

По результатам исследования физико-химических свойств субстанций Липофолк-2 установлено, что она вполне пригодна для формирования стабильных липосом.

Для обоснования принципиальной возможности использования созданных липосом в качестве носителя лекарственных веществ разработана технология получения липосомальной дисперсии с маслом Витон, включающая несколько стадий: получение “Липофолк-2” разработанным ранее методом; формирование водной дисперсии “Липофолк-2”; эмульгирование водной дисперсии с маслом Витон в соотношении 1 : 1; для получения липосомальной формы с маслом Витон эмульсию обрабатывают ультразвуком (при частоте 22 кГц и мощности 20 Вт), погружив пробирку в баню со льдом. Продолжительность обработки составляет 20 мин по одной минуте с перерывами по 30 с.

Количество включенного масла по расчетам составляет около 95 % от “Липофолк-2”. Липосомальная система с Витоном по размеру липосом и степени их окисленности сопоставима с “пустыми” полученными ранее липосомами.

Структура и размеры липосом соответствуют межклеточным интервалам и могут обеспечить проникновение масла “Витон” в глубокие слои эпидермиса. В связи с этим представляется целесообразным введение полученной липосомальной дисперсии с маслом Витон в эмульсионную основу с целью разработки липосомального крема. Состав вспомогательных веществ подобран на основе комплексных исследований и представляет собой оригинальную дерматологическую композицию.

Состав липосомального крема в граммах:	Масло Витон	2,0
	Липофолк-2	2,0
	Эмульсионная мазевая основа	До 100,0

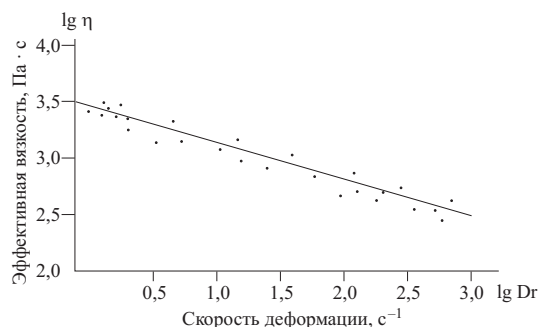


Рис. 4. Логарифмическая зависимость эффективной вязкости от скорости сдвига.

Одним из факторов, влияющих на терапевтические и потребительские свойства мазей (высвобождаемость и всасывание лекарственных веществ, фасуемость и экструзия из туб, адгезия, намазываемость и др.), являются реологические свойства [6]. Для характеристики структурно-механических свойств разработанного липосомального крема на ротационном вискозиметре Rheotest-2 были изучены его реологические свойства (динамическая вязкость, касательное напряжение сдвига, тиксотропность). На рис. 4 представлен график, показывающий прямую зависимость логарифма вязкости от логарифма скорости сдвига, что характеризует липосомальный крем как структурированную систему, обладающую аномальной вязкостью. На рис. 5 представлены кривые кинетики деформации при градиенте скорости сдвига от 5,04 до 145,8 с⁻¹, наличие восходящей и нисходящей кривых петли гистерезиса и ее небольшая ширина свидетельствует о наличии слабых тиксотропных свойств, что указывает на высокую стабильность системы и соответствует хо-

Таблица 3

Результаты анализа липосомального крема с маслом Витон в процессе хранения

Вид упаковки	Описание	Диаметр липосом, нм	Качественные реакции на компоненты масла Витон			Концентрация МДА, %	Микробиологическая чистота	pH водного извлечения	Срок хранения, год
			Терпеноиды	Ненасыщенное лактонное кольцо	Флавоноиды				
Тубы алюминиевые	Крем белого цвета нежной консистенции	Не более 200 нм	С раствором ванилина в конц. серной кислоте на границе слоев - красное окрашивание	С раствором пикриновой кислоты оранжевое окрашивание	С раствором алюминия хлорида желтое окрашивание	Не более 30 %	В 1 г препарата допускается не более 100 бактерий грибов (суммарно)	5,5 – 7,0	
Тубы	Соответствует	130	Соответствует	Соответствует	Соответствует	23,4	Соответствует	6,0	нач.
		160				26,9		6,0	0,5
		190				28,0		6,0	1,0
		240				38,0		6,0	1,5
Тубы	Соответствует	120	Соответствует	Соответствует	Соответствует	25,8	Соответствует	6,2	нач.
		150				29,0		6,2	0,5
		190				30,0		6,2	1,0
		250				38,0		6,2	1,5

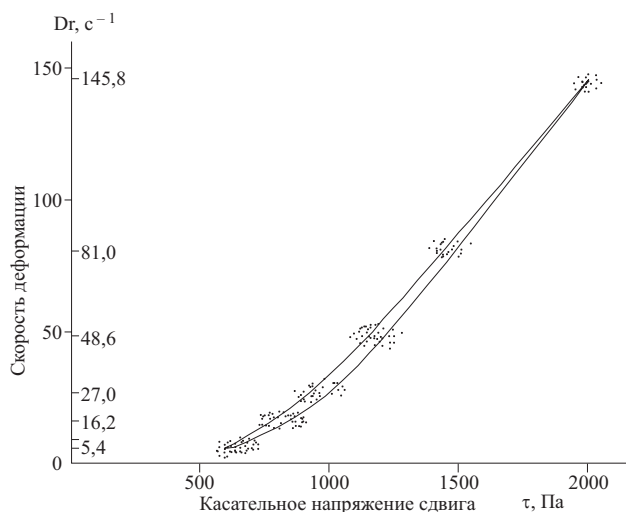


Рис. 5. Петля гистерезиса липосомального крема.

рошей намазываемости и способности к выдавливанию из туб.

В процессе исследования показателей качества с целью установления срока годности липосомального крема с маслом Витон обнаружено, что числовой показатель уровня окисленности липидного материала резко возрастает после одного года хранения, а также наблюдается слияние липосом в агрегаты крупного размера, показатели качества масла Витон в течение всего срока хранения были стабильными (табл. 3).

Срок годности липосомального крема с маслом Витон установлен в 1 год, что соответствует требованиям к лечебно-косметическим кремам.

Высокие требования к происхождению и терапевтической активности компонентов современных лечебных и лечебно-профилактических дерматологических средств предъявляются как к лекарственным веществам, так и к вспомогательным. Достижимость терапевтического результата определяется сбалансированностью состава препарата по количеству и природе лекарственных веществ, адьювантным действием вспомогательных веществ, которые из пассивных структурообразователей и носителей становятся активными соучастниками в достижении терапевтического эффекта и технологическими приемами, направ-

ленными на уменьшение количества действующего вещества при одновременном повышении его доступности [7].

Обязательным этапом при разработке дерматологических форм является комплекс биологических исследований, включающий определение специфической активности на лабораторных животных, а также изучение безвредности. (Исследование проводилось на базе Научно-исследовательской лаборатории иммунологии и лепры под руководством проф. докт. мед. наук Е. Н. Голощаповой).

Для характеристики специфической активности воспроизведен ряд моделей воспаления на лабораторных животных. В каждом эксперименте животных делили на 4 группы: первая — контрольные животные, вторую — лечили липосомальной мазью, третью и четвертую лечили препаратами сравнения мазью с маслом Витон 10 % и чистым маслом Витон соответственно. Статистическую обработку результатов проводили с вычислением средней и ее стандартной ошибки. Достоверность различий между средними определяли вычислением критерия “Стьюдента”.

По методу Тринуса 32 морским свинкам весом 250 – 300 г в подушечку лапки вводили 0,1 мл 1 % раствора формалина. Затем на воспаленные лапки непосредственно после инъекции наносили изучаемые препараты. Всем животным контрольной и опытных групп измеряли объем лапки до введения формалина, после введения и нанесения препаратов через 1 ч, 2 ч и 3 ч. На основании полученных данных рассчитывали процент угнетения воспаления по формуле:

$$УВ = \frac{(V_k - V_o)}{V_o} \times 100\%,$$

где УВ — угнетение воспаления, в %; V_k — объем лапки отечной в контроле минус объем лапки до опыта; V_o — объем лапки отечной в опыте минус объем лапки до опыта.

Модель каррагенинового отека воспроизведена на крысах массой 115 – 135 г введением в задние конечности 0,1 мл 1 % каррагенина. До введения каррагенина дважды за 1 и 2 ч наносили исследуемые препараты. Динамику развития отечной реакции в течение 5 ч

Таблица 4

Специфическая активность лекарственных форм масла Витон в опытах *in vivo*

Препарат	Биологические модели поражения										
	по методу Тринуса угнетение воспаления, %			каррагениновый отек угнетение отека, %				химический ожог		термопоражение	
	1 ч	2 ч	3 ч	1 ч	2 ч	4 ч	5 ч	величина отека, мг	угнетение отека, %	величина отека, мг	противовос- палительная актив- ность, %
Контроль				0	0	0	0	58,5	0	56,5	0
Масло Витон	28,4	26,2	35,6	9,2	14,1	22,5	22,7	50,1	14,3	35,7	36,81
Мазь 10 %	16,8	28,5	41,6	7,9	13,9	19,7	21,0	53,0	9,41	42,9	24,08
Липосомаль- ный крем	16,5	25,0	38,0	7,9	13,9	19,7	21,0	53,5	9,0	43,0	24,0

оценивали онкометрически при помощи плетизмометра (“Уго Базиле”).

Модель термopожения на белых мышах массой 18,0 – 24,0 г, которых подвергали термическому воздействию, а затем через 10 мин и 2 ч наносили тонким слоем исследуемые препараты. Через сутки животных забивали, ампутировали обе задние лапки (здоровую и отечную) и взвешивали их. Результаты эксперимента рассчитывали по следующей формуле:

$$A = 100 - \frac{(M_o - M_3)}{(M_{ок} - M_{зк})} \times 100\%,$$

где A — антиэкссудативная активность; M_o — масса отечной лапки в опыте; M_3 — масса здоровой лапки в опыте; $M_{ок}$ — масса отечной лапки в контроле; $M_{зк}$ — масса здоровой лапки в контроле.

Противовоспалительную активность препаратов оценивали по их способности уменьшать развитие термоотека.

Модель химического ожога воспроизведена по методике Апоян И. А. и Мелконян М. С. на 32 белых крысах массой 150 – 160 г путем нанесения на правое ухо ватным тампоном 20 % спиртового раствора серной кислоты в течение 60 с. Через 30 мин после раздражения на ухо тонким слоем наносили исследуемые образцы. Животных выдерживали 4 ч, после чего забивали, срезали оба уха, которые взвешивали. Противовоспалительную активность препаратов определяли по способности уменьшать развитие отека.

Результаты экспериментальных данных по изучению специфической активности по методу Тринуса, на моделях каррагенинового отека, термopожения и химического ожога представлены в табл. 4.

Установлено, что липосомальный крем при концентрации масла 2 % практически не уступает по силе противовоспалительного действия 10 % эмульсионной мази, что свидетельствует о правильном подборе компонентов состава и их физического состояния. Исследование биологической безвредности липосомального крема с маслом Витон показало отсутствие местно-раздражающего, общетоксического и сенсибилизи-

рующего действия на организм лабораторных животных.

Таким образом, изучены качественный состав и содержание ФЛ в субстанции “Липофолк” 19 % и разработан метод очистки, повышающий содержание ФЛ до 87 % — Липофолк-2. Установлены фракционный состав Липофолк-2 с содержанием фосфатидилхолина 71 % и наличие ламеллярной фазы, что позволило получить методом озвучивания липосомы высокой степени гомогенности и диаметром менее 130 нм.

Получен крем с липосомальным включением масла Витон 2 %, определены его реологические параметры.

На моделях по методу Тринуса, каррагенинового отека, химического ожога и термopожения на лабораторных животных установлено наличие противовоспалительной активности липосомального крема с маслом Витон, сопоставимой с эффектом, проявляемым 10 % эмульсионной мазью с маслом Витон.

Разработанный липосомальный крем с маслом Витон можно рекомендовать в качестве лечебно-косметического средства для активной профилактики и лечения аллергических и воспалительных реакций кожи, при воспалении, шелушении и раздражении кожи лица.

ЛИТЕРАТУРА

1. И. В. Кутузова, *Дис ... доктора фармац. наук*, Москва (1996).
2. *Лечение кожных болезней: Руководство для врачей*, А. Л. Машкиллейсон (ред.), Медицина, Ленинград-Москва (1990).
3. А. С. Дудниченко, Ю. М. Краснополяский, В. И. Швец, *Липосомальные лекарственные препараты в эксперименте и клинике*, изд. Группа “РА-Каравелла”, Харьков (2001).
4. Л. Б. Марголис, Л. Д. Бергельсон, *Липосомы и их взаимодействия с клетками*, Наука, Москва (1986).
5. К. В. Алексеев, А. А. Селищева, С. Н. Суслина, Т. П. Калмыкова, *Труды НПО “Биомедицинские технологии”*, Москва (1997), сс. 36 – 40.
6. А. А. Аркуша, *Автореф. дис ... канд. физ. наук*, Харьков (1982).
7. А. И. Тенцова, В. М. Грецкий, *Современные аспекты исследования и производства мазей*, Медицина, Москва (1980).

Поступила 13.04.04