ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОСОМ С НАНОЧАСТИЦАМИ СЕЛЕНА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ДЕРМАТОЛОГИИ

© Мамучиева М.Б., Компанцев Д.В., Саградян Г.В.

Кафедра технологии лекарств Пятигорского медико-фармацевтического института, Пятигорск

E-mail: m-madina.15@yandex.ru

В настоящей статье рассмотрена проблема роста уровня заболеваемости дерматитами. Предложено создание наружного лекарственного средства с наночастицами селена. Проанализированы уже существующие препараты селена для наружного и внутреннего применения. Отмечена низкая токсичность наноселена по сравнению с другими формами селена. Описаны способы получения липосом с наноселеном различными методами: методом инъекции, методом ручного встряхивания и методом обращения фаз. Исследованы размеры и структура полученных липосом. В результате исследования выявлен наиболее оптимальный способ получения липосом – метод ручного встряхивания. Отмечены преимущества использования нанотехнологий для лечения кожных заболеваний.

Ключевые слова: наночастицы, наноселен, липосомы, средства доставки лекарственных веществ, дерматиты.

OBTAINING THE LIPOSOMS WITH NANOPARTICLES OF SELENIUM FOR APPLYING IT IN DERMATOLOGY

Mamuchieva M.B., Kompantsev D.V., Sagradyan G.V.

Technology of Drugs Department of Pyatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute, Pyatigorsk

This article examines the problem of growing level of dermatitis. The new medicine for external use with nanoparticles of selenium was offered. The available selenium-based medicines for external and internal use were analyzed. The low toxicity of nanoselenium was marked as compared to other selenium-based medicines. The ways of obtaining liposoms with nanoselenium by different methods were described: the method of injection, the method of manual shake-up and the method of direct phase. The sizes and structures of obtaining liposoms were investigated. The advantages of applying nanoparticles for managing skin diseases were noted. The study identified the method of manual shake-up as the most optimal method of obtaining liposoms.

Keywords: nanoparticles, nanoselenium, liposoms, means of delivery of medicinal substances, dermatitis.

В последнее десятилетие отмечается значительный рост уровня заболеваемости дерматитами, что вызвано многими факторами: экологическим состоянием окружающей среды, климатическими условиями, нерациональным использованием лекарственных препаратов и другими [8]. Дерматиты – это заболевания кожи, представляющие собой воспалительный процесс, обусловленный клеточно-опосредованной реакцией, ключевую роль в которой играют Т-лимфоциты. Процесс воспаления запускается при контакте с сенсибилизаторами, которые, связываясь с белками, изменяют их структуру и образуют антиген [7].

Для лечения дерматитов используются противовоспалительные, антиоксидантные лекарственные препараты. Инновационным методом лечения дерматозов может быть использование лекарственных препаратов с наноструктурными активными компонентами. Например, использование липосом обеспечивает доставку лекарственных веществ к органам-мишеням или пораженным тканям [3, 5]. Анализ доступных литературных источников и патентной базы выявил три наиболее широко используемых способа получения липосом (инъекция, метод ручного встряхивания, обращение фаз) [6].

Разработка технологии получения липосомального геля с наноселеном является актуальной задачей настоящего исследования.

Препараты селена активно используются в дерматологии и косметологии. Например, французская лаборатория «Цитолнат» выпускает крем для наружного применения цитолнат селен, который используется в качестве антиоксидантного средства [9]. Также выпускают различные биологические активные добавки с селеном, которые применяются для лечения псориаза, аллергических дерматитов, нейродермитов (неоселен в форме раствора для внутреннего применения, солгар селен и селен-актив в форме таблеток).

Для введения в полость липосом мы предлагаем использовать наноселен, так как доказана его низкая токсичность в сравнении с другими препаратами селена (селенитом натрия) и лучшее усвоение за счет размера частиц до 60 нм [1].

Применение липосом с содержанием наноселена позволит обеспечить доставку наночастиц селена через кожный барьер, избежать нежелательных побочных эффектов, поддерживать локальную концентрацию препарата, регулировать необходимую дозировку и пролонгировать его действие.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили раствор наночастиц селена с содержанием селена 1,4 мг/мл и средним гидродинамическим радиусом частиц 25 нм, липосомальная основа MIRRA PROFESSIONAL (соответствует ГОСТу 31695-2012) и лецитин АртЛайф (соответствует ISO 9001, ISO 22000, GMP). Раствор наночастиц селена был предоставлен Северо-Кавказским федеральным университетом (г. Ставрополь). Исследования проводили на испарителе ротационном ИР-1-ЛТ Labtex, лабораторном ультразвуковом экстракторе НО-230.00 производства компании ООО «Александра-плюс» г. Вологда, лабораторной центрифуге ОПН-0539 производства ОАО «ТНК «ДАСТАН» г. Бишкек, Кыргызская Республика, анализаторе вольтамперометрическом АКВ-07МК производства компании АО «Аквилон» г. Москва. Анализ полученных липосом проводили с помощью микроскопа Биолам Д.11. Микрофотографии выполнены с использованием цифровой насадки DigitalMicroscope 20 MPIX с последующей обработкой фотографий в программе AdobePhotoshop 6.0. Липосомы получали тремя способами: методом инъекции, методом ручного встряхивания и методом обращения фаз.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение липосом инъекционным методом (методом впрыскивания).

В пробирку, содержащую 1,5 мл раствора наночастиц селена и 3,5 мл фосфатного буфера (рН 7,5), впрыскивали 0,35 мл 5% раствора липосомальной основы в 95% этаноле. Иглу шприца максимально погружали в водную фазу при постоянном помешивании на магнитной мешалке. Структуру липосом изучали под микроскопом [6].

Полученные липосомы располагаются одиночно, отличаются по размерам, имеют тонкую стенку. Технологический выход продукта составил около 54 %.

Получение липосом методом ручного встряхивания. Лецитин в количестве 200 мг растворяли в 100 мл хлороформа в круглодонной колбе роторного испарителя емкостью 200 мл. Колбу подсоединяли к роторному испарителю и при пониженном давлении, создаваемом вакуумным насосом, проводили выпаривание органического растворителя. Давление регулировали таким образом, чтобы не допустить его кипения. После полного удаления хлороформа на стенках колбы образовывалась тонкая пленка липидов. В колбу с пленкой добавляли 5 мл буферного раствора, содержащего 0,2 г наночастиц селена, и выдерживали 1-2 часа при комнатной температуре для набухания фосфолипидов. Затем колбу встряхивали в течение нескольких минут механическим способом. Для этого в колбу вносили стеклянные бусинки и интенсивно перемешивали содержимое колбы скоростной мешалкой. При этом образовывалась взвесь липосом, структуру которых наблюдали под микроскопом [4].

Рис. 1. Липосомы, полученные методом инъекции (Ув. 1:1000X).

Рис. 2. Липосомы, полученные методом ручного встряхивания (Ув. 1:1000X).

Полученные липосомы одинаковых размеров, расположены парно, имеют достаточно плотную стенку. Технологический выход продукта составил более 76 %.

Получение липосом методом обращения фаз. 100 мг лецитина растворяли в 10 мл смеси эфира с хлороформом в соотношении 2:1 и вносили в круглодонную колбу роторного испарителя. Наноселен в количестве 0,2 г в 3 мл фосфатного буфера pH 7,5 добавляли к раствору лецитина в органической фазе и обрабатывали ультразвуком частотой 16 кГц в ультразвуковом экстракторе в течение 1 минуты.

Образовывалась эмульсия, колбу с которой присоединяли к роторному испарителю и при вращении колбы постепенно понижали давление так, чтобы не происходило кипения хлороформа, который полностью удаляли. Затем к образовавшемуся гелю добавляли 5 мл фосфатного буфера (pH 7,5) и встряхивали до образования суспензии [2]. Образование липосом не наблюдалось, что возможно связано с низкой частотой ультразвука на используемом нами ультразвуковом экстракторе.

Далее проводили микроскопический анализ липосом, полученных разными методами. Липосомы наносили бактериологической петлей на сетку – подложку, покрытую вольфрамовой пленкой. Затем исследуемый препарат контрастировали 1% водным раствором уранилацетата. Материал исследовали на электронном микроскопе при инструментальном увеличении в 50000-80000 раз. Размеры липосом измеряли на электронных микрофотографиях, полученных с микроскопа с увеличением в 50000 – 60000 раз.

Средний диаметр липосом вычисляли по формуле:

$$D = \left(\frac{\sum n \cdot D_v^{-3}}{\sum n} \right)^{\frac{1}{3} K^{-1}}$$

где D – средний диаметр липосом в препарате, мкм;

DV – средний диаметр липосом в каждой группе, мкм;

n – число липосом в каждой группе;

K – коэффициент увеличения, включая инструментальное увеличение и увеличение микрофотографий.

Для достоверности и статистической значимости в каждой из трех исследуемых групп (по числу способов получения) делали 12 снимков.

Результаты микроскопического исследования приведены в таблице 1.

Липосомы, полученные методом инъекции и ручного встряхивания, оставляли на хранение при пониженной температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 3 месяцев.

Полученные данные, представленные в таб. 2, показывают, что липосомы, полученные методом ручного встряхивания, сохраняют гомогенную структуру в течение 3 месяцев, а липосомы, полученные методом инъекции, разрушаются, что проявляется в виде расслоения сред и помутнения раствора.

Определение процента включения наночастиц селена в липосомы осуществляли вольтамперометрическим методом. Для чего к навеске липосом добавляли 10 мл деионизированной воды,

Таблица 1

Сравнительная характеристика размеров липосом, полученных различными методами

Метод получения липосом	Характер везикул	Размер липосом, нм
Инъекция	Большие моноламилярные (>98%)	255-1900
Ручное встряхивание	Мультиламилярные (22%)	100-750
Обращение фаз	Образование липосом не наблюдалось	-

Таблица 2

Изучение стабильности липосом при хранении

Метод получения липосом	Период хранения, месяц		
	1	2	3
Инъекция	Гомогенная среда	Расслоение сред	Расслоение, помутнение
Ручное встряхивание	Гомогенная среда	Гомогенная среда	Гомогенная среда

осторожно перемешивали стеклянной палочкой, а затем центрифугировали в лабораторной центрифуге ОПН-0539 при скорости 4000 тыс. оборотов в минуту в течение 5 минут. Надосадочную жидкость декантировали и использовали для количественного определения селена на приборе анализатор вольтамперометрический АКВ-07МК.

Проведенные расчеты показали, что уровень связывания (включения) наноселена с липосомами, получаемыми методом встряхивания, составляет порядка 40%.

Таким образом, можно сделать вывод, что из трех методов получения липосом наиболее оптимальным является метод ручного встряхивания. Липосомы, полученные этим методом, имеют однородный размер, достаточно устойчивую стенку и более стабильны при хранении. Мультиламилярная структура способствует глубокому проникновению активных ингредиентов и активизации восстановительных процессов кожи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карпова Е.А., Демиденко О.К., Ильина О.П. К вопросу о токсичности препаратов на основе наноселена // Вестник КрасГАУ. – 2014. – №4. – С. 207-210.
2. Кузякова Л.М. Конструирование трансдермальных липосомальных препаратов с заданными свойствами // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. – 2005. – Т. 46. – №1. – С. 74-79.
3. Кузякова Л.М., Черникова М.А. Состав косметических средств и инновационные технологии эффективной доставки в организм человека известных активных веществ // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – №2 (часть 3) – С. 437-440.
4. Огай М.А., Степанова Э.Ф. Разработка и технологические исследования лекарственного препарата инсулин в липосомальной форме // Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. – 2010. – № 10(81). – С. 79-84.
5. Полянский А. Через кожу? – Нет проблем! Несколько слов о косметике будущего // Косметика и медицина. – 2008. – № 2. – С. 12-14.
6. Способ получения липосом: заявка 2007114164/15 РФ / Королёва А.И., Безруков Д.А., Михайлова Н.А., Каплун А.П., Швеи В.И.; заявлено 17.04.07; опубл. 27.05.08, Бюл. №15. – 5 с.
7. Ткач А.В., Иванова Л.А., Измерова Н.И., Стаценко Ю.В. Современные представления о клеточных механизмах патогенеза профессиональных аллергических контактных дерматитов // Медицина труда и промышленная экология. – 2006. – № 7. – С. 23-28.
8. Ходжаева М.Х., Табаров М.С., Исаева М.С., Тоштемурова З.М. Нарушение показателей функционального состояния эндотелия у больных дерматитами // Научно-медицинский журнал «Вестник Авиценны». – 2015. – №4. – С. 99-103.
9. Цитолнат селен [Электронный ресурс] // cytolnat.ru – Режим доступа: <http://cytolnat.ru/selen>, свободный (28.05.17).