**Умнов Александр Вениаминович. Разработка и совершенствование биотехнологических процессов в производстве липосомальных косметических препаратов лечебно-профилактического назначения : диссертация ... кандидата биологических наук : 03.00.23.- Ставрополь, 2002.- 250 с.: ил. РГБ ОД, 61 03-3/515-8**

НАУЧНО - ПРОИЗВОДИЛ ВЛННьа, *kjd* ьЕДИНііНИЕ «ПУЛЬС»

C:\Users\Pavel\AppData\Local\Temp\Rar$DIa0.726\media\image1.jpeg

НА ПРАВАХ РУКОПИСИ

**УМНОВ АЛЕКСАНДР ВЕНИАМИНОВИЧ**

**РАЗРАБОТКА И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ КОСМЕТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ЛЕЧЕБНО - ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ**

03.00.23 - биотехнология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

**на соискание ученой степени кандидата биологических наук**

**Научный руководитель: Кузякова Л.М.**

доктор фармацевтических наук

Ставрополь - 2002

СОДЕРЖАНИЕ

Введение

1. Современные тенденции биотехнологии липосомальных препаратов наружного применения (обзор литературы).
   1. Строение липосом, свойства биомолекул, способных фор­мировать мембрану липосом.
   2. Биотехнология конструирования липосом.
      1. Методы приготовления мультиламеллярных и одно ла­меллярных везикул.
      2. Факторы, влияющие на включение веществ в липосомы. Химические и биофизические подходы.
      3. Перекисное окисление липидов и защита мембран от окисления. Воздействие продуктов перекисного окисления ли­пидов на клетки кожи.
   3. Взаимодействие липосом с клетками и их использование для транспортировки биологически активных веществ.
   4. Трансдермальные косметические препараты и их влияние на кожу.
2. Материалы и методы исследований.
   1. Материалы исследований.

2.2 Методы исследований.

1. Товароведческий анализ.
2. Биологический метод определения токсичности.
3. Определение гидрофильно-липофильного баланса.
4. Выявление критической концентрации мицеллобразо- ванния.
5. Исследование упруго-вязко-пластичных свойств геля.
6. Определение количества липидов.
7. Расчет удельного внутреннего объема липосом
8. Определение проникающей способности липосомальных препаратов в слои кожи.
9. Исследование степени перекисного окисления липидов.
10. Определение липидных компонентов состава липосом.
11. Электронно-микроскопический контроль формирования липосом.
12. Акустический метод оценки эффективности биологиче­ского действия липосомальных препаратов.
13. Методы статистической обработки материала
14. Разработка и совершенствовании биотехнологии липосо­мальных лечебно - косметических препаратов
    1. Подбор состава и подготовка сырья для конструирования трансдермальных гелей
    2. Разработка биотехнологии трансдермальных фитогелей лечебно-профилактического назначения
15. Стандартизация и определение биологической активности трансдермальных лечебно - косметических препаратов
    1. Стандартизация липосомальных препаратов
    2. Биологические исследования лечебно - профилактических гелей

Заключение

Выводы

Список литературы

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| БМВ | - | большие моноламеллярные везикулы |
| МЛВ | - | мультиламеллярные везикулы |
| ММВ | - | малые моноламеллярные везикулы |
| МОВ | - | малые одноламеллярные везикулы |
| БОВ | - | большие одноламеллярные везикулы |
| хмв | - | моноламеллярные везикулы |
| ПОЛ | - | перекисное окисление липидов |
| МДА | - | малоновый диальдегид |
| ГЛБ | - | гидрофильно-липофильный баланс |
| ккм | - | критическая концентрация мицеллообразования |
| ТБК | - | тиобарбитуровая кислота |
| тех | - | тонкослойная хроматография |
| ФЛ | - | фосфолипиды |
| КРС | - | крупный рогатый скот |
| дмсо | - | диметилсульфоксид |
| БАВ | - | биологически активные вещества |
| ЛсАНТ | - | липосомы с антиоксидантами |
| ЛсЖ | - | липосомы животного происхождения |
| ЛсР | - | липосомы растительного происхождения |
| ПАВ | - | поверхностно активные вещества |
| нд | - | нормативная документация |

**Введение.**

**Актуальность темы.**

Открытия в области биологии, химии и медицины в конце 70-х годов 20 века, позволившие сформировать новые взгляды на кожу и процессы, происходящие в ней, а также появление в последнее десятилетие на россий­ском рынке новых методов и зарубежных средств омоложения кожи повыси­ли требования к отечественному косметическому производству. На первый план вышли препараты, замедляющие процесс старения кожи, влияющие на скорость деления клеток кожи и стимулирующие ее иммунные функции. По большому счету эти препараты уже нельзя назвать косметическими, так как они влияют на физиологические процессы в коже, как это делают фармацев­тические препараты. Поэтому в обиход входят понятия: лечебная, дермато­логическая, фармацевтическая косметика или космецевтика.

Отечественное производство лечебной косметики находится в настоя­щее время на стадии становления. Требуются как разработки рецептур новых трансдермальных средств, отработка новых подходов к проведению клини­ческих испытаний, как это принято в фармации, так и создание новых био­технологий, повышающих эффективность лечебно-косметических препара­тов, определение оптимальных технологических параметров в производст­венных условиях. Данные требования обуславливают актуальность выбран­ной темы исследования.

В трансдермальной косметике содержатся специальные компоненты, обеспечивающие транспорт биологически активных соединений в глубокие слои эпидермиса. Наиболее популярными носителями являются липосомы, построенные из полярных липидов, похожих на те, из которых построен эпи­дермальный барьер кожи.

Разработкам и исследованию липосомальных препаратов посвящены работы таких ученых, как Бергельсона JI. Д., Владимирова Ю. А., Грегориа- диса Г., Голубчиковой Н. А., Ефременко В. И., Закревского В. И., Кобрин- ского Г. Ф., Кузяковой JL М., Лось Г. В., Маргулиса JI. Б. и многих других. В то же время исследований в области биотехнологии липосомальных косме­тических препаратов крайне мало. В Госреестре РФ 1998 года впервые пред­ставлены лечебно - профилактические средства, но, к сожалению, в нем от­сутствуют препараты отечественного производства. Поэтому исследования в области создания нового поколения российских косметических средств целе­сообразны.

**Цель и задачи исследования.**

Целью настоящего исследования является разработка и совершенство­вания биотехнологических процессов производства оригинальных трансдер­мальных фитопрепаратов лечебно - профилактического назначения, их стандартизация, разработка и утверждение на них НД, выработка методиче­ских подходов к исследованию их биологической активности.

Для достижения поставленной цели следовало решить следующие ос­новные задачи:

на основе изучения фракционного состава экстрактов липидов раститель­ного и животного происхождения подобрать оптимальное сырье для по­лучения липосом;

изучая характеристические показатели липосом (липидный состав мем­бран, удельный внутренний объем, и т.д.), выбрать метод конструирова­ния липидных везикул;

разработать вспомогательные и технологические стадии производства, составить их материальный баланс;

совершенствовать принципиальную технологическую схему опытно - промышленной установки производства липосомальной суспензии; определить отсутствие токсичности полученных интактных липосом; изучить глубину проникновения липосом в эпидермис кожи; подобрать ингредиенты, выбрать фитокомпозиции для получения косме­тических лечебно - профилактических препаратов;

разработать вспомогательные и технологические стадии производства липосомальных косметических препаратов лечебно - профилактического назначения;

провести изучение биологической активности разработанных препаратов;

**Научная новизна.**

Усовершенствованы научно - методические подходы к конструирова­нию липосомальных косметических препаратов лечебно - профилактическо­го назначения. Разработаны вспомогательные и технологические стадии по­лучения липосомальных препаратов в производственных условиях, составлен их материальный баланс.

Совершенствована принципиальная схема опытно - промышленной ус­тановки по производству липосомальных суспензий. Впервые в схеме пре­дусмотрен замкнутый цикл возвращения органических растворителей ком­понентов с низкими температурами кипения в производство, что увеличивает экономическую рентабельность на 9 - 11%.

Разработаны оригинальные лечебно - профилактические липосомаль- ные фитопрепараты, имеющие сырьевую базу в регионе Северного Кавказа. Доказано их взаимодействие с клетками эпидермиса кожи. На основе био- фармацевтических исследований обоснована и экспериментально подтвер­ждена целесообразность применения отечественного гелеобразователя арес- пола, как основы носителя в трансдермальных косметических препаратов, увеличивающего гидратантные свойства препарата. На разработанные пре­параты получено 4 патента РФ на изобретение.

Впервые доказано, с помощью *Paramecium Caudatum,* как биомодели, отсутствие токсических свойств у интактных липосом, сконструированных из различного сырья. Установлено, что повышению толерантности *Parame­cium* способствуют липосомы, полученные из растительных или из смеси растительных и животных липидов. С помощью гистологических исследова­ний подтверждена доставка веществ, иммобилизованных в липосомы, до клеток зернистого слоя эпидермиса и их внутриклеточное проникновение.

**Практическая значимость и результаты внедрения.**

Апробация разработанных стадий технологического процесса в произ­водственных условиях позволила дать рекомендации косметической про­мышленности по включению в производство следующих липосомальных фи­топрепаратов: гидратантного крема, очищающего косметического молочка, крем после бритья и геля - бальзама для волос серии «Альпика»; противо­воспалительного и венотонизирующего геля «Лавр» и светозащитного про­тивоожогового геля «Фитолон».

Данные препараты прошли технологическую производственную апро­бацию и в настоящее время выпускаются НПО «Пульс» г. Ставрополь. Усо­вершенствованные методы контроля качества сырья и готового продукта, ис­пользуются в работе ОТК данного объединения. За высокое качество фитоге­ли "Лавр" и "Фитолон" крем "Альпика" награждены Рубиновыми и Сапфиро­выми крестами СЦСМ, гель "Лавр" в 2001г. стал победителем конкурса "100 лучших товаров России".

Разработан и утвержден Опытно - промышленный регламент на произ­водство липосомальных косметических фитогелей лечебно - профилактиче­ского назначения (№ 00002 от 17.03.1997г.). Утверждены переработанные НД на следующие фитопрепараты серии «Альпика»: питательный крем ТУ 9158 - 041 - 10280704 - 02; косметическое молочко ТУ 915211 - 032 - 10280704 — 02; гель - бальзам после бритья ТУ 9158 - 011 - 10280704 - 98; гель бальзам для волос ТУ 9158-012 - 10280704 - 98; гели «Лавр» ТУ 9158 - 051 - 10280704 - 02 и «Фитолон» ТУ 9158 - 052 - 10280704 - 02. НД на данные препараты рекомендованы для соответствующего целевого назначения к ис­пользованию на предприятиях, производящих трансдермальные косметиче­ские препараты.

При апробации трансдермальные косметические фитопрепараты пока­зали достаточно высокую биологическую активность: увеличение количества липидов, увлажненности, пластичности кожи и т. д. (заключения, отчеты, ак­ты).

Некоторые теоретические положения работы и результаты эксперимен­тальных исследований оформлены в виде методических рекомендаций «Ос­новы физиологии кожи и фармацевтической косметологии с элементами эс­тетической медицины», внедренные в работу Центра красоты и Здоровья г. Ставрополь (Акт от 30.08.2002г.). Имеются акты внедрения в учебный про­цесс кафедры физиологии Ставропольского Госуниверситета дисциплина специализации "Физиология человека и животных", раздел "Физиология клетки" и кафедры технологии лекарств Пятигорской государственной Фар- макадемии.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

разработка вспомогательных и технологических стадий производства липосомальных лечебно-косметических фитопрепаратов; совершенствование принципиальной технологической схемы опытно - промышленной установки получения липосомальной суспензии; подбор сырья растительного и животного происхождения для конструи­рования липосом;

выбор оптимального метода и параметров получения липосом; проверка токсических свойств интактных липосом, полученных из раз­личного вида сырья;

подтверждение возможности проникновения липосомальных веществ в эпидермис и внутрь живой клетки кожи (гистологические исследова­ния);

стандартизация и исследование биологической активности трансдер- мальных косметических фитопрепаратов.

**Апробация работы и публикации.**

Основные положения диссертационной работы представлены на **II** Ме­ждународном съезде «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения» (г. Санкт - Петербург, 1998г.), на национальных конгрессах «Человек и лекарство» в 2001 и 2002г.г.

По теме диссертации опубликовано 10 работ, в том числе получено 4 патента на изобретение РФ.

**Объем и структура диссертации.**

Работа изложена на 181 страницах машинописного текста, содержит 41 таблицу и 19 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, объектов и методов исследования и двух глав собственных исследований, а также общих выводов, списка литературы (189 источников, в том числе 74 иностранных) и приложений.

**Общие выводы.**

1. Разработана биотехнология оригинальных липосомальных косметиче­ских препаратов лечебно - профилактического действия: выработаны единые методические подходы к созданию и исследованию липосо­мальных препаратов различной природы; усовершенствована блок- схема производства липосомальных препаратов наружного примене­ния; впервые разработаны принципиальные схемы вспомогательных и технологических стадий; определены оптимальные параметры и соот­ношения сырья и материалов в производственных условиях, на основа­нии чего составлена нормативная документация и даны соответствую­щие рекомендации производству.
2. Подобраны составы для шести трансдермальных лечебно - косметиче­ских препаратов. На основе изучения фармакотерапевтической актив­ности лекарственных трав региона Северного Кавказа разработаны со­ставы фитокомпозиций. С помощью биофармацевтических исследова­ний в качестве основы кремов выбран отечественный гелеобразователь ареспол, благодаря прочной гелеобразующей структуре которого уве­личено содержание воды в продукте на 8 - 23%, что соответственно усилило гидратантные свойства кремов.
3. Для производства липосом обоснована целесообразность применения метода обращения фаз, позволяющего получать стерильные липидные везикулы с удельным внутренним объемом 9,2 ± 0,5 л. на моль липи­дов, избегая при этом выраженного перекисного окисления липидов. Усовершенствована принципиальная технологическая схема опытно­промышленной установки производства липосомальной суспензии, в которой предусмотрено улавливание, конденсация и возвращение в процесс легколетучих компонентов. Данная разработка увеличивает экономическую рентабельность производства на 9 - 11%, экономится 23,18% легколетучих жидкостей. В качестве сырья для производства липосом предложено использовать смесь растительных и животных фосфолипидов в соотношении 7:3, в отличии от ранее применяемого 1:1. Доказано, что при данном соотношении качество липосом не ухудшается, а экономическая рентабельность производства увеличива­ется на 3- 5%.
4. Установлено, что разработанная биотехнология позволяет получать в производственных условиях трансдермальные препараты с достаточно высокой степенью микробиологической чистоты и активности. Разра­ботанные этапы технологического процесса производства липосомаль­ных фитопрепаратов свидетельствуют о их доступности, простоте экс­плуатации и экономической рентабельности, что послужило основой для опытно-промышленного выпуска отечественных косметических лечебно-профилактических липосомальных препаратов.
5. С помощью одноклеточных микроорганизмов *Paramecium caudatum* впервые доказано отсутствие токсических свойств у интактных липо­сом, сконструированных из фосфолипидов растительного и животного происхождения, доказана их биологическая активность.
6. Установлено, что под влиянием липосомальных препаратов, получен­ных по разработанной биотехнологии, в коже возрастает количество поверхностных липидов на 11,1%, влаги на 14%, увеличиваются пока­затели эластичности кожи на 10%. Определено, что липосомальный гель «Лавр» по сравнению с аналогичной композицией, не содержащей бислойных липидных везикул и гелем троксевазина, проявляет более выраженную противовоспалительную активность при травматических отеках, а также эффективно усиливает резорбцию при веностазе и тор­мозит процесс эксудации. Противоожоговый эффект «Фитолона» через 2 сут после нанесения на ожоговую поверхность немного уступает дей­ствию 10% метилурациловой мази, однако, через 7 сут превосходит ее ранозаживляющее действие в 1,8 раза.

Список литературы.

1. А.с. 1421344 СССР, МКИ А61К 7/06. Средство для ухода за кожей после бритья / М.В. Огилец, Т.С. Цупренкова, Т.А. Нахарова, С.М. Глушко и др. (СССР). - 4 с.
2. А.с. 1586671 СССР, МКИ А61К 4/11. Способ диагностики воспалитель­ных заболеваний околоносовых пазух / А.П. Сарвазян, Д. Вучелич, В.П. Пономарев и др. (СССР). - 16 с.
3. А.с. 1683750 СССР, МКИ А61К 7/00. Средство для ухода за кожей лица / Е.П. Зотов, А.А. Амбышев, И.О. Сарма, Б.М. Арончик (СССР). - 10 с.
4. А.с. 833977 СССР, МКИ А61 6/09. Способ извлечения лецитина из рас­тительного сырья / Ю.А Зилберс, А.А. Томсон, И.К. Гозите и *др.* (СССР). - 11 с.
5. Аксенова, О.Г. Патоморфологические аспекты акустического анализа кожи: Афтореф. дис. ... канд. мед. наук / О.Г. Аксенова. - М.: Б.и., 1998.- 21 с.
6. Алавердиева, С. Антиоксидантный баланс в косметических средствах / С. Алавердиева, А. Кривова // Косметика и медицина. - 1999. - № 1. - С. 11-15.
7. Амерян, С.С. Влияние ряда биогенных и физических факторов на дина­мику функционально - структурного восстановления поврежденных тка­ней в эксперименте и в клинике: Автореф. дис. ... д-ра фармац. наук / С.С. Амерян. - Ереван: Б.и., 1991. - 46 с.
8. Андреева, И.Н. О методологии создания многокомпонентных фитопре­паратов в виде современных лекарственных форм / И.Н. Андреева, Э.Ф. Степанова, А.М. Сампиев // Теория и практика створення лікарських пре­паратів: Материалы междунар. конф., посвящ. 75-летию ректора ХФИ д- р фармац. наук Д.П. Сала. - Харьков, 1988. - С. 25-31.
9. Антонов, В.Д. Термоуправляемые липосомы / В.Д. Антонов, Е.В. Шев­ченко // Фармация. - 1993. - T.XLII, № 4. - С. 32-34.
10. Антонов, В.Ф. Биологические мембраны. Структура, свойства / В.Ф. Ан­тонов, С.А. Вознесенский. - М.: Гуманит. Изд. Центр ВЛАДОС, 1999. - С. 8-31.
11. Аристархова, С.А. Регуляторная роль взаимосвязи изменений в концен­трации антиоксидантов в составе липидов клеточных мембран / С.А. Ари­стархова, Е.Б. Бурлакова, В.О. Гвахария // Докл. АН СССР. - 1976. - Т. 228, № 1.-С. 215-218.
12. Аркт, *Я.* Основа косметических средств как система доставки активных инградиентов / Я. Аркт // Косметика и медицина. - 2001. - № 6. - С. 23-29.
13. Аркуша, А.А. Исследование структурно - механических свойств мазей с целью определения оптимума консистенции: Автореф. дне. ... канд. фар- мац. наук /А.А. Аркуша. - Харьков: Б.и., 1982.- 23 с.
14. Балабьян, В.Ю. Разработка системы скрининга лекарственных веществ антиоксидантного и мембраностимулирующего действия: Автореф. дис. ... канд. фармац. наук /В.Ю Балабьян. - М.: Б.и., 1998. - 22 с.
15. Барсуков, Л.И. Липосомы / Л.И. Барсуков // Биология. - 1998. - ? с.
16. Березин, В.Э. Использование нового неионного детергента МЭСК для выделения и реконструкции в липосомы гликопротеидов вируса Сендай /В.Э. Березин, В.И. Зайдес, Г.Г. Миллер // Молекуляр. генетика, микро- биолология и вирусология. - 1984. - № 2. - С. 36-41.