Липосомальные технологии в создании современных средств личной гигиены и профилактики гнойничковых заболеваний кожи

Грашин Р.А., доктор медицинских наук, доцент
Барбинов В.В., доктор медицинских наук, профессор
Военно-медицинская Академия
кафедра кожных и венерических болезней, кафедра клинической биохимии и лабораторной диагностики

Санкт-Петербург, 2014

Негативный эффект для кожи существующих антибактериальных средств

* При исследовании больных с частыми повторяющимися инфекционными поражениями кожи установлено, что популяция патогенных микроорганизмов у них более многочисленна, чем в контроле, что вызвано **регулярным употребление антимикробных лосьонов и мыл, так как их кожа становится более восприимчивой к микробной колонизации** (McBride M.E., и соавт. 1977)
* **Негативный эффект антибактериальных косметических изделий проявляется в подавлении не только патогенной, но и защитной резидентной микрофлоры**, приводя при регулярном употреблении к дисбактериозу кожи и возникновению гнойничковых заболеваний. Такими отрицательными свойствами обладают фармацевтические средства различных классов (антисептики, антибиотики и сульфаниламидные препараты) (Noble W.C., 1981, Смычков А.В., 2000, Levy S.B., 2001)
* **Триклозан** не только может убивать полезные защитные бактерии, не подавляя патогенные (McMurry L.M., Oethinger M., Levy S.B., 1998; Heath R.J., Rock C.O., 2000; Levy S.B., 2001) но и способен вызывать рост последних, приводя к опасным заболеваниям (менингит, сепсис и т. д.) (Levy S.B., 2001)

Новое поколение антибактериальных средств гигиены

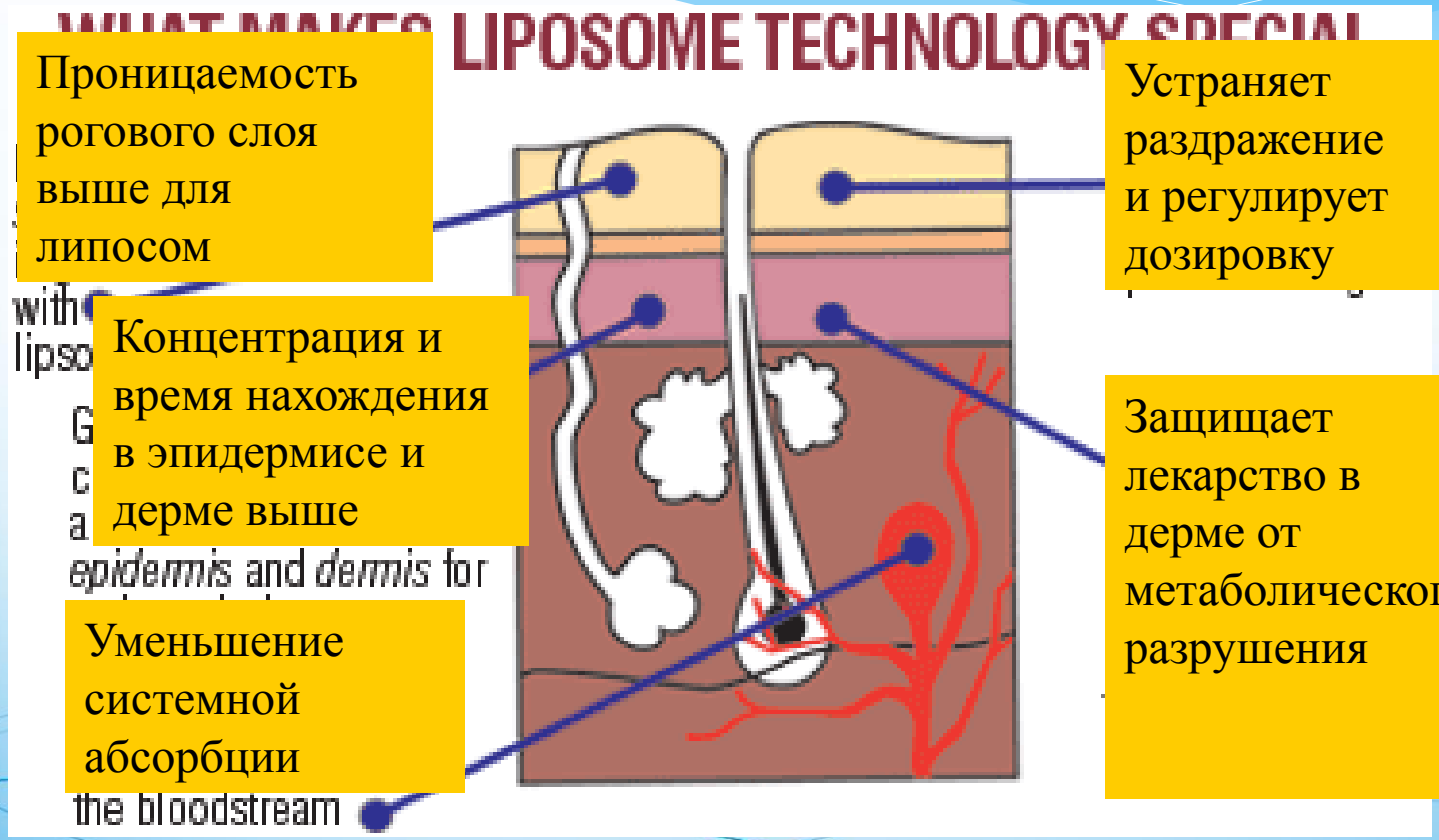
Антибактериальные средства гигиены с липосомальным диоксидином

Липосомальные антимикробные средства гигиены содержащие в субтерапевтической концентрации антибактериальный препарат диоксидин, обладают способностью резко повышать антимикробную активность диоксидина в анаэробных условиях, проникнувшего за счет липосом в глубокие слои кожи (клетки Лангерганса, базальные кератиноциты и придатки кожи).

В результате подавляется глубокая патогенная микрофлора, при одновременном отсутствии антибактериального эффекта на поверхностную защитную микрофлору .

Наша разработка средств гигиены с липосомальным диоксидином защищена патентом РФ №2246292 от 20.02.2005 г. "Наружное средство для профилактики инфекционных заболеваний кожи и способ его изготовления".

Функции липосом



Проницаемость рогового слоя выше для липосом

Устраняет раздражение и регулирует дозировку

Концентрация и время нахождения в эпидермисе и дерме выше

Защищает лекарство в дерме от метаболического разрушения

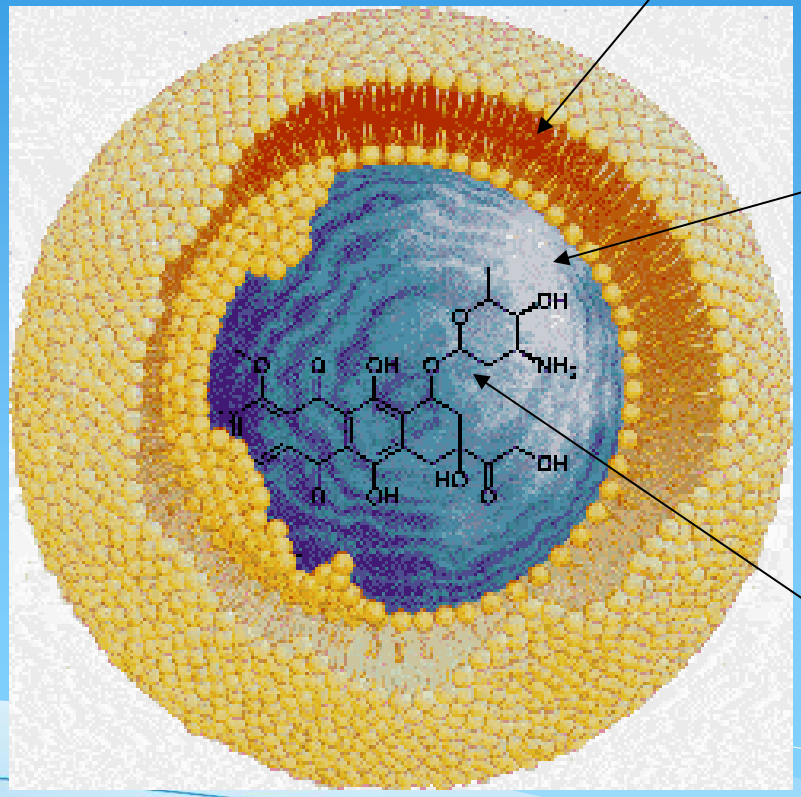
Уменьшение системной абсорбции

Функции липосом

Липосомы – источник фосфолипидов мембран и керамидов рогового слоя эпидермиса:

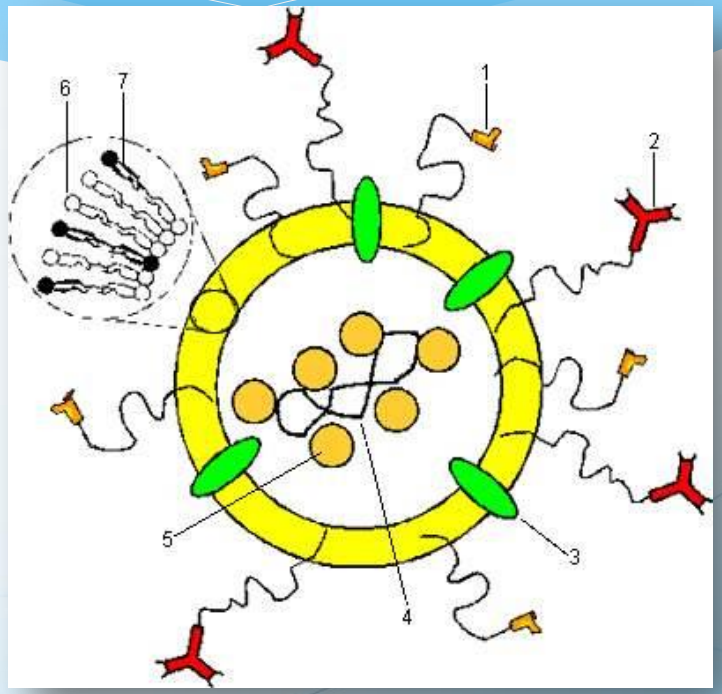
- ✓ проводник активных веществ через все дермоэпидермальные слои;
- ✓ формируют и сохраняют естественную гидролипидную мантию кожи;
- ✓ препятствуют развитию ксероза;
- ✓ Снижают интенсивность испарения воды с поверхности рогового слоя эпидермиса;
- ✓ Смягчают и увлажняют кожу.

Схема липосомы



«Идеальная» конструкция липосомы для направленной доставки лекарственного вещества в клетку

1. Полимер для стерической защиты от РЭС (например, ПЭГ);
2. "Молекулярный адрес" на полимерной ножке (в основном иммуноглобулины);
3. Белки слияния (например, гемагглютинин);
4. Лекарственное вещество (например, ДНК);
5. Липидные положительно заряженные частицы для компактизации ДНК;
6. Мембранообразующие липиды (фосфатидилхолин);
7. Липиды, дестабилизирующие мембрану (например, ФЭ)



Диоксидин
2,3-бис-(оксиметил)хиноксалина 1,4-ди-N-оксид

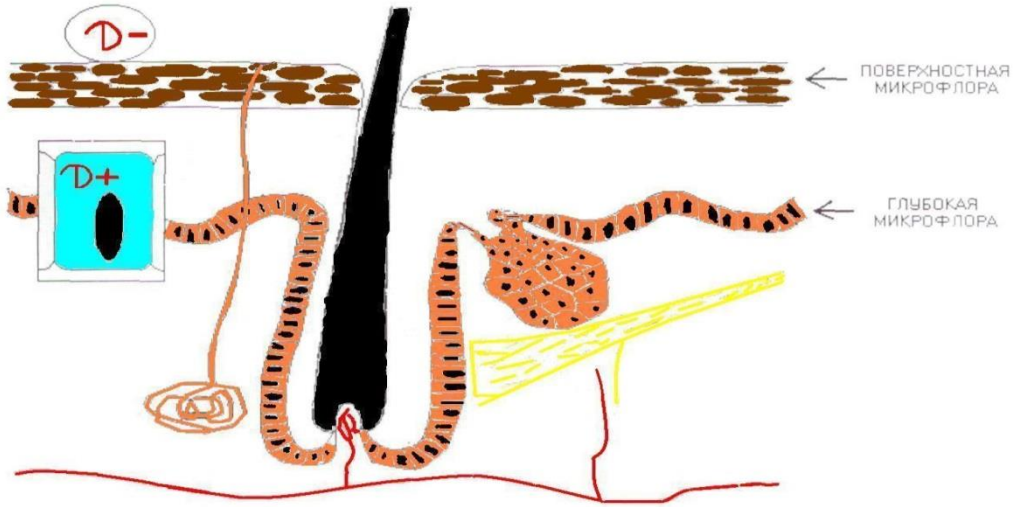
- противомикробное средство широкого спектра действия;
- бактерии практически не вырабатывают к нему устойчивости;
- в анаэробных условиях повышает свою антимикробную активность в 10-30 раз.

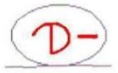
«Реестр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств. Москва, 2001:298-299.

Функции липосомального диоксидина

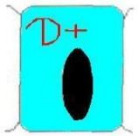
- ✓ Подавляет микробную активность в глубине кожи.
- ✓ Сохраняет естественную микрофлору поверхности кожи.
- ✓ Уменьшает воспаление.
- ✓ Очищает кожу от угревой сыпи и других гнойничковых поражений.
- ✓ Предупреждает инфицирование эпидермиса до и после косметических процедур.

Механизм действия антибактериального мыла с липосомальным диоксидином



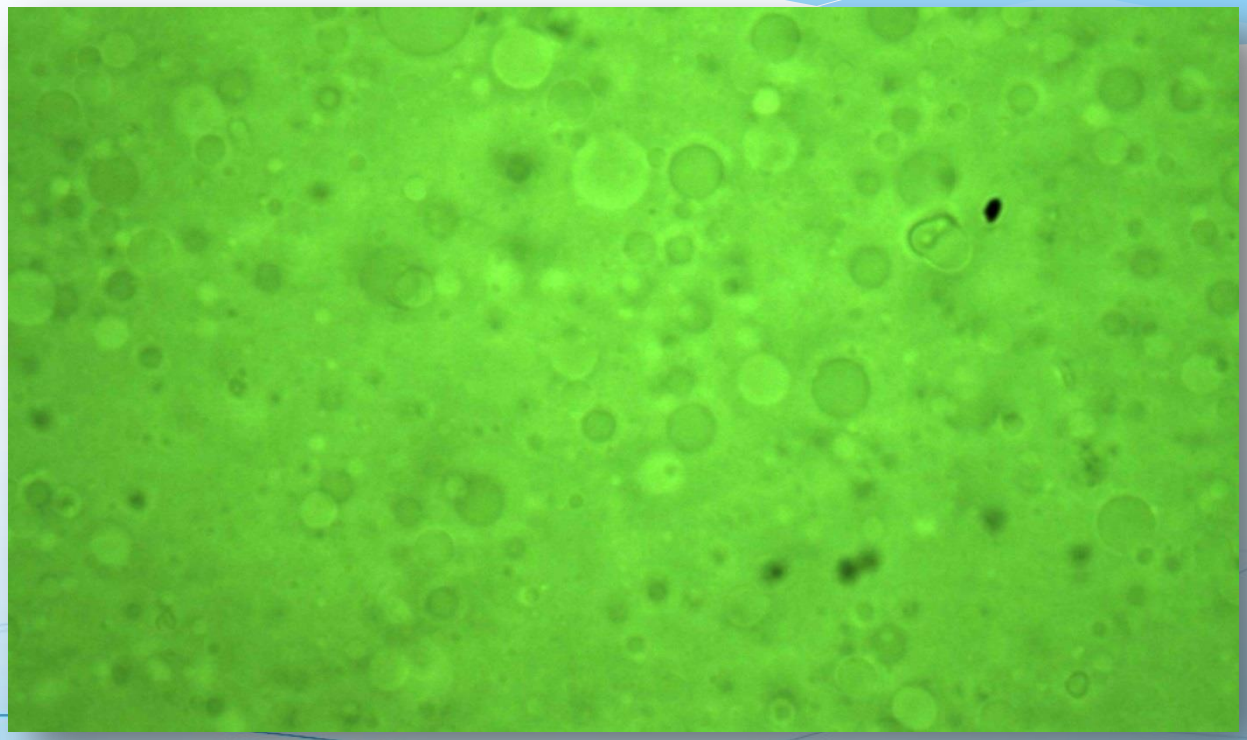


- липосомальный неактивный диоксидин в субтерапевтической концентрации на поверхности кожи



- внутриклеточный активный диоксидин в анаэробных условиях

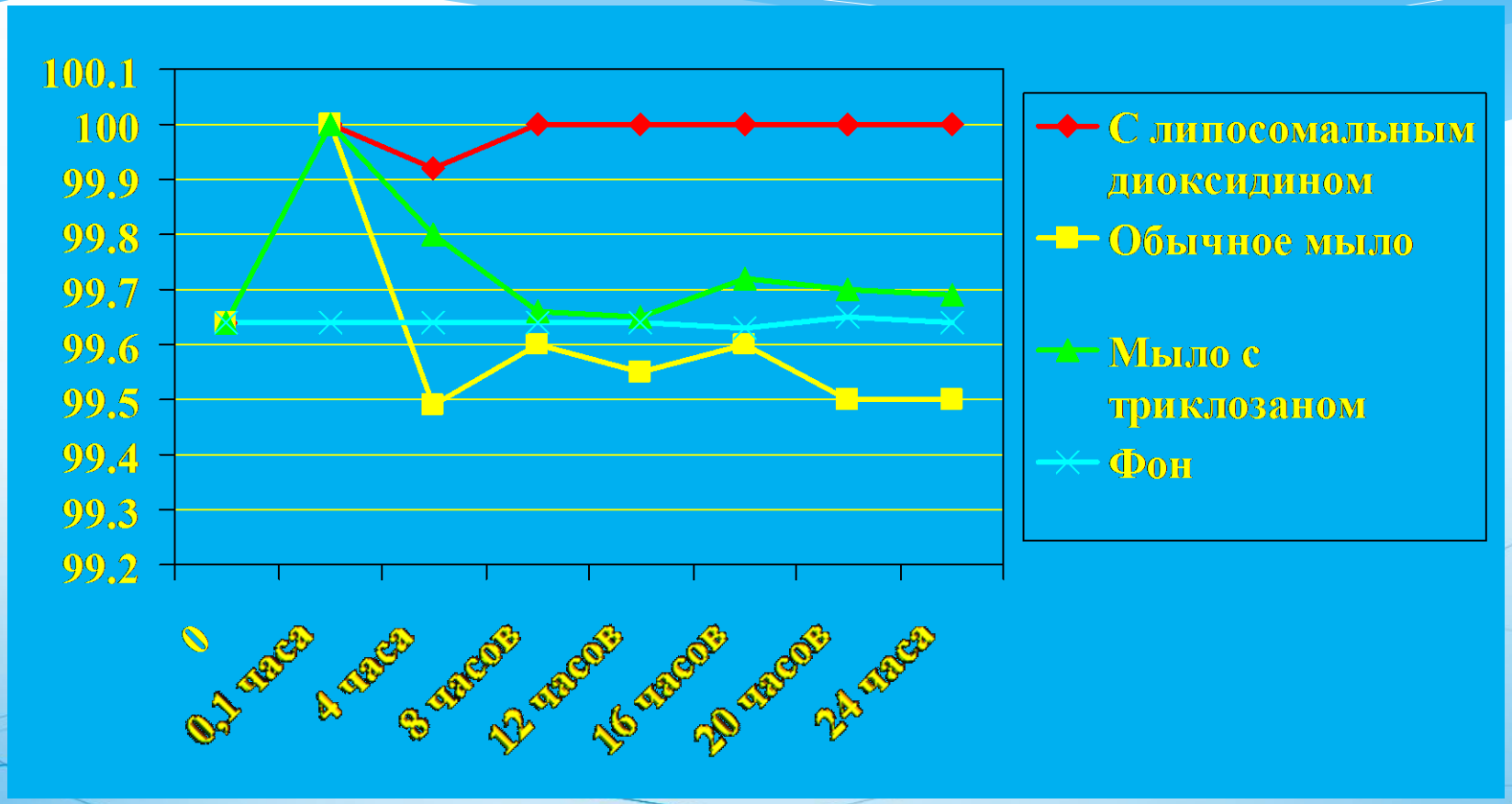
Образец липосом в эмульсии (диоксидин)



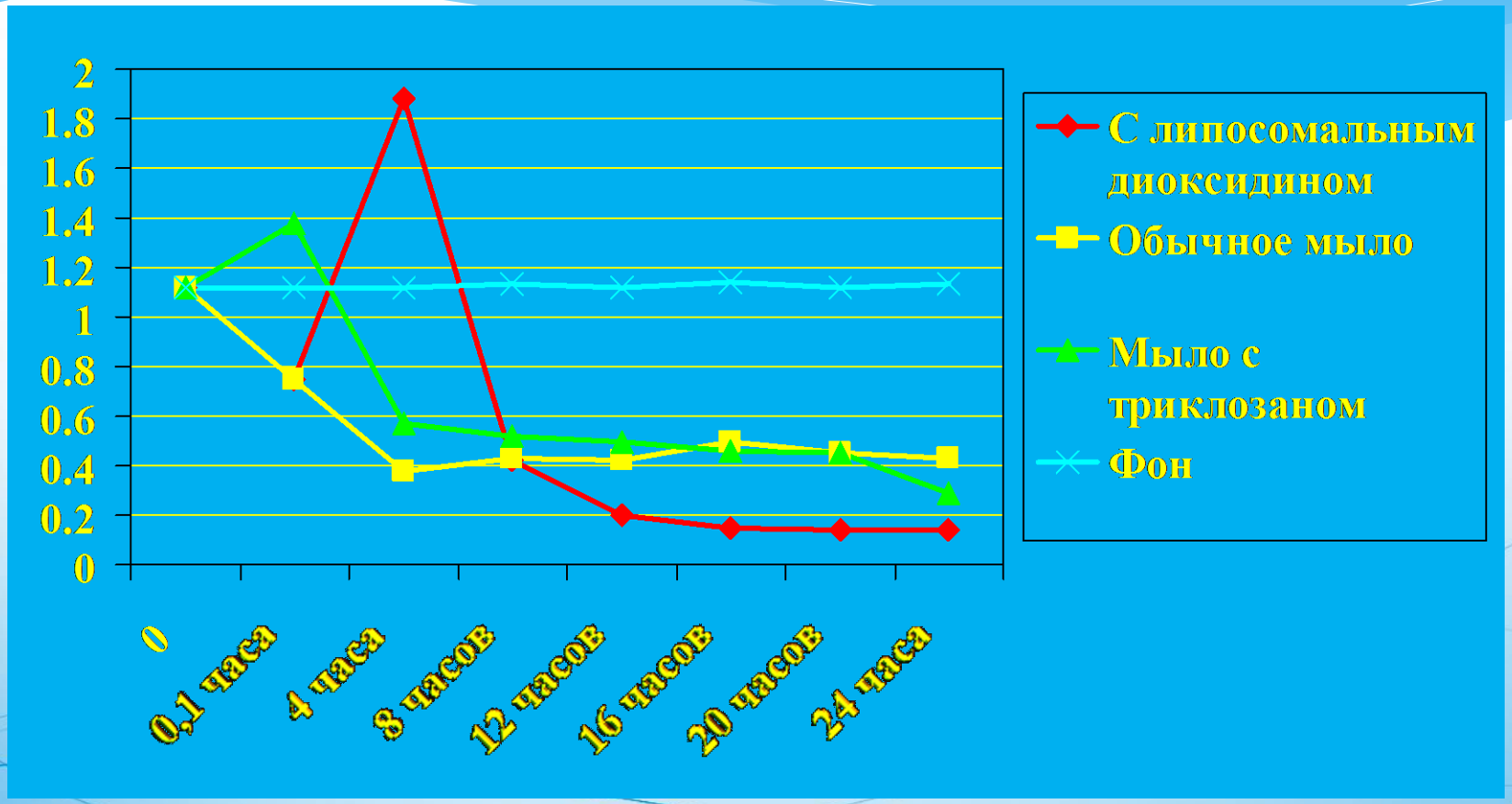
Клинические испытания различных типов мыла

- **Обычное мыло (без антимикробных добавок)**
- **Мыло с триклозаном**
- **Мыло с липосомальным диоксидином**

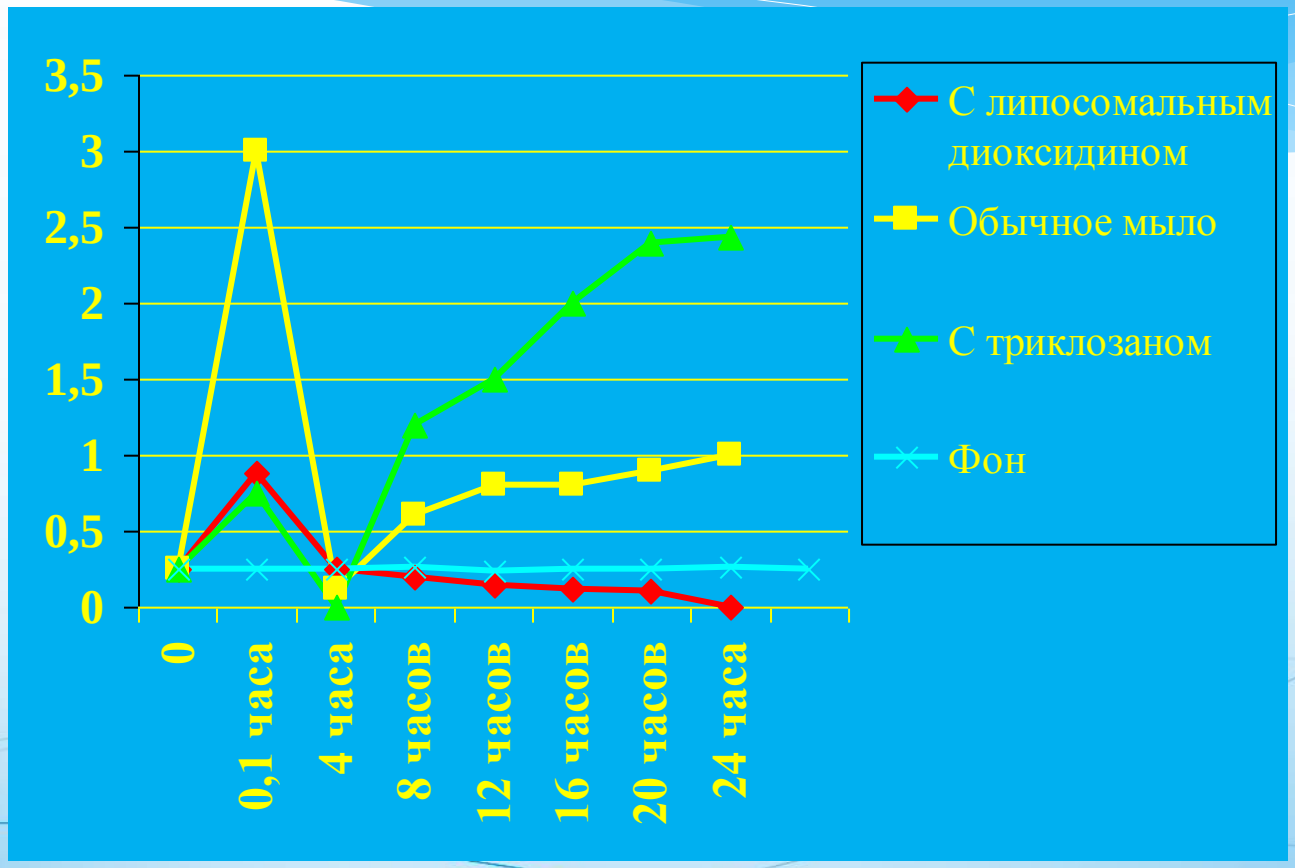
Влияние различных типов мыла на бактерицидные свойства кожи (%)



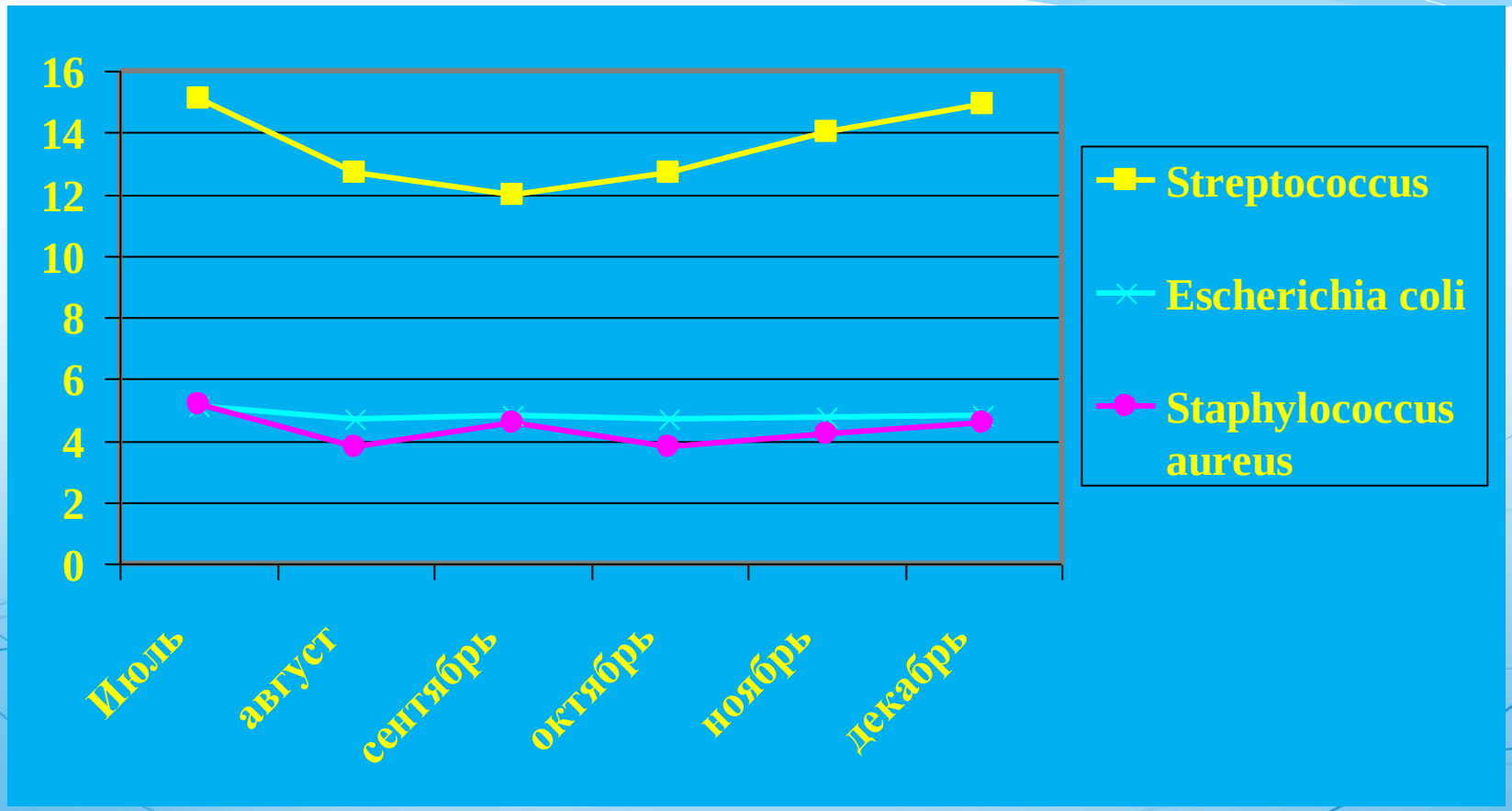
Влияние различных типов мыла на поверхностную потенциально патогенную аутомикрофлору кожи (КОЕ/см²)



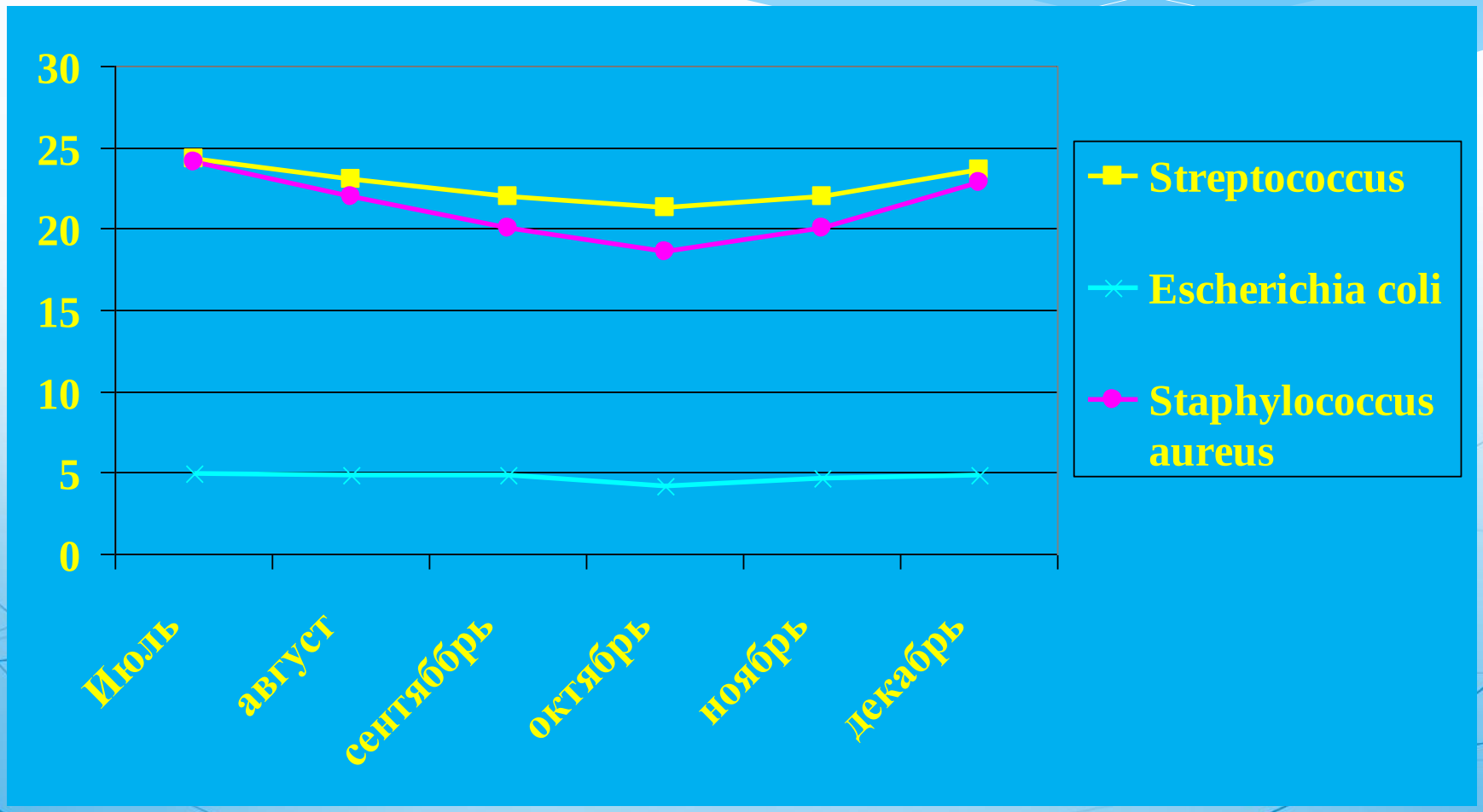
Влияние различных типов мыла на глубокую потенциально патогенную аутомикрофлору кожи (КОЕ/см²)



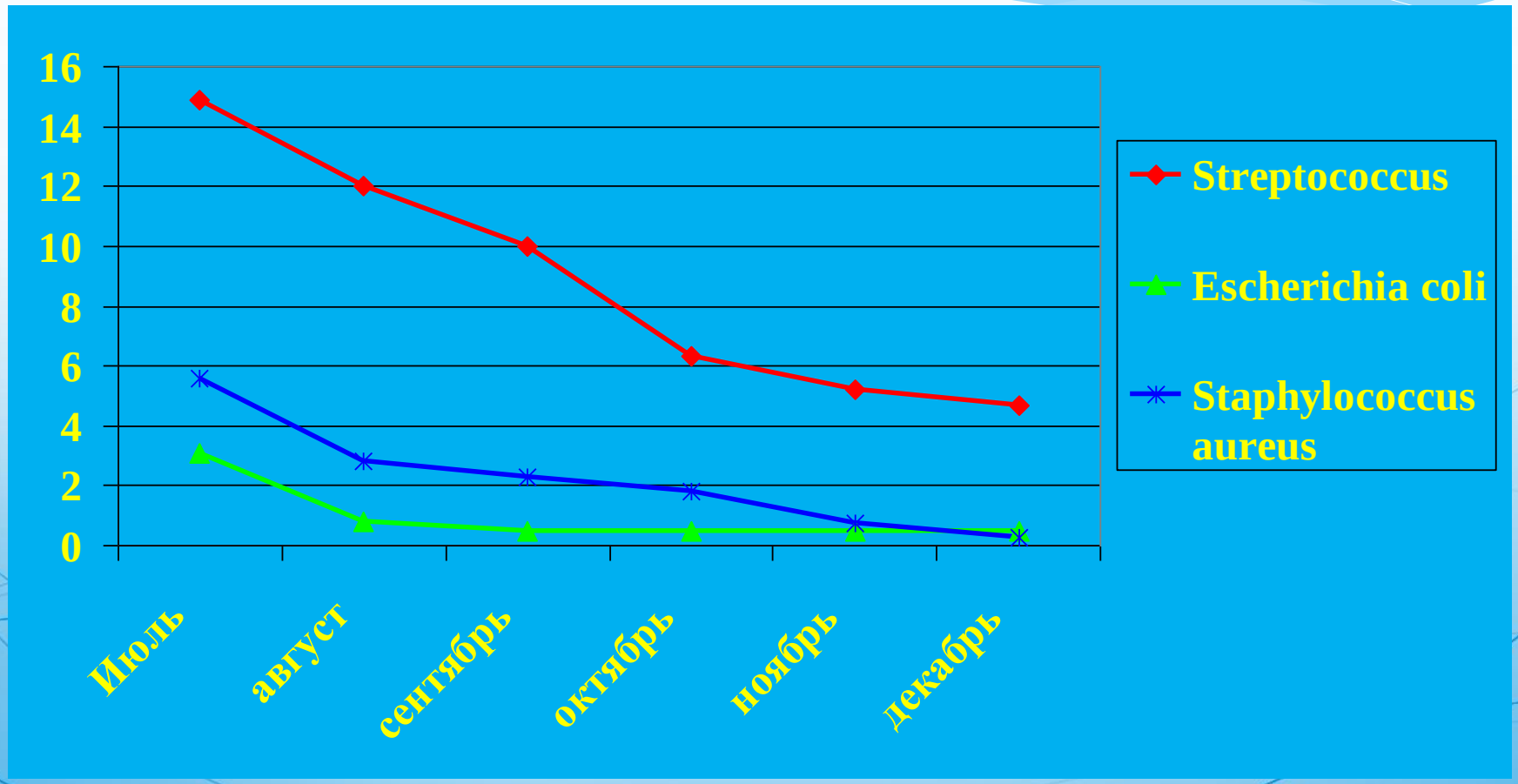
Изменения состояния поверхностной потенциально патогенной микрофлоры кожи при длительном применении обычного мыла (КОЕ/см²)



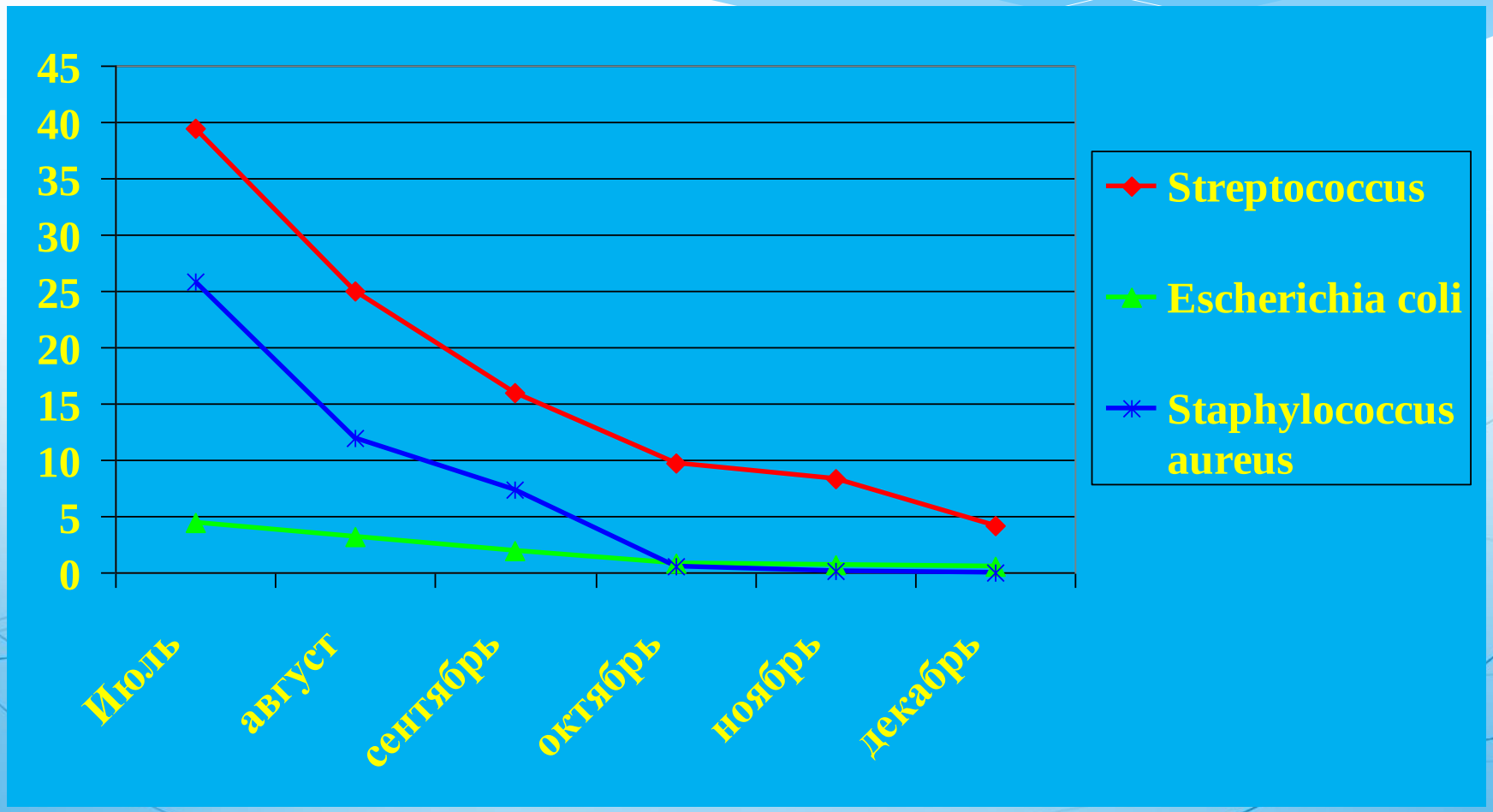
Изменения состояния глубокой потенциально патогенной микрофлоры кожи при длительном применении обычного мыла (КОЕ/см²)



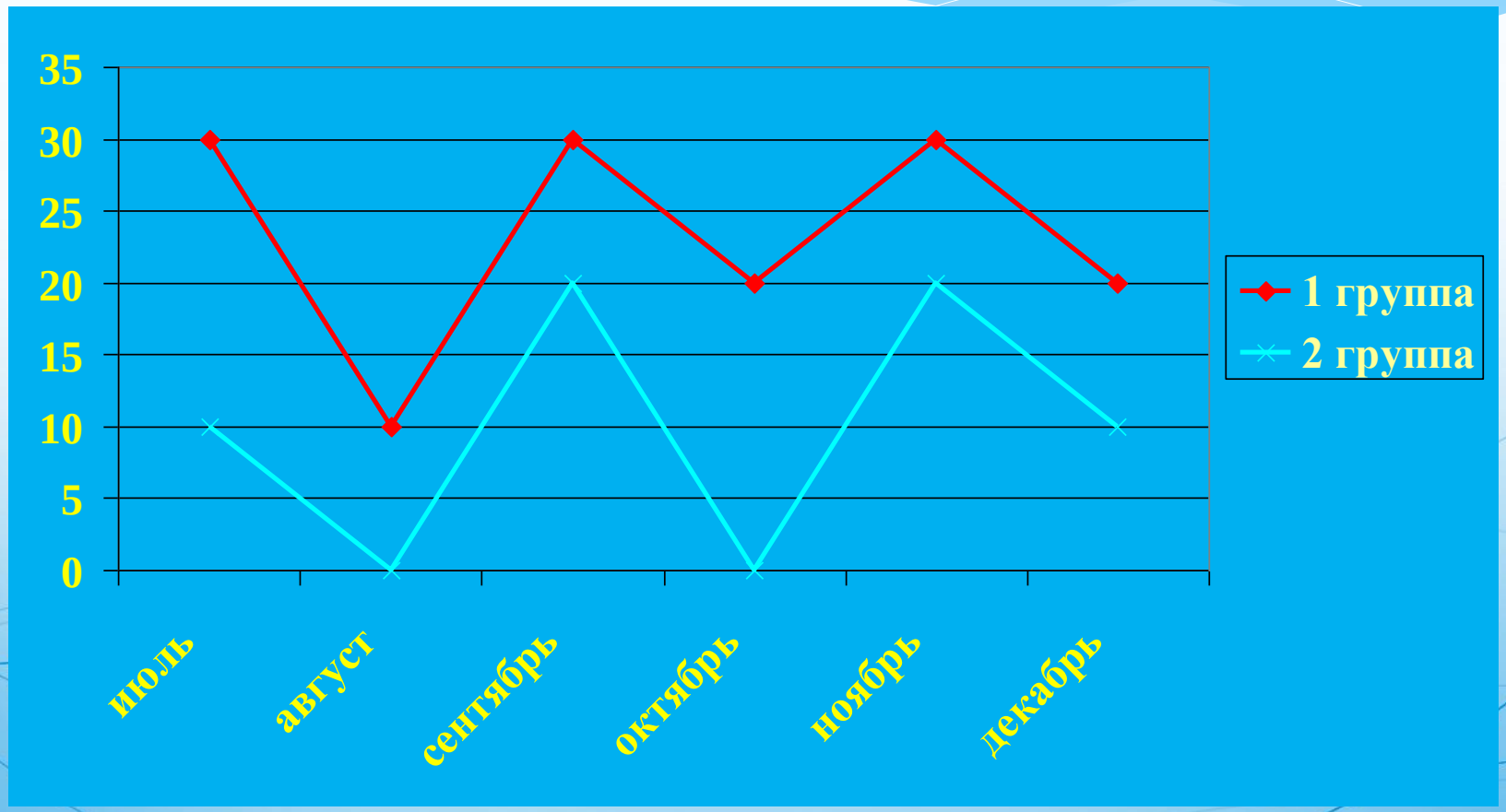
Изменения состояния поверхностной потенциально патогенной микрофлоры кожи при длительном применении мыла с липосомальным диоксидином (КОЕ/см²)



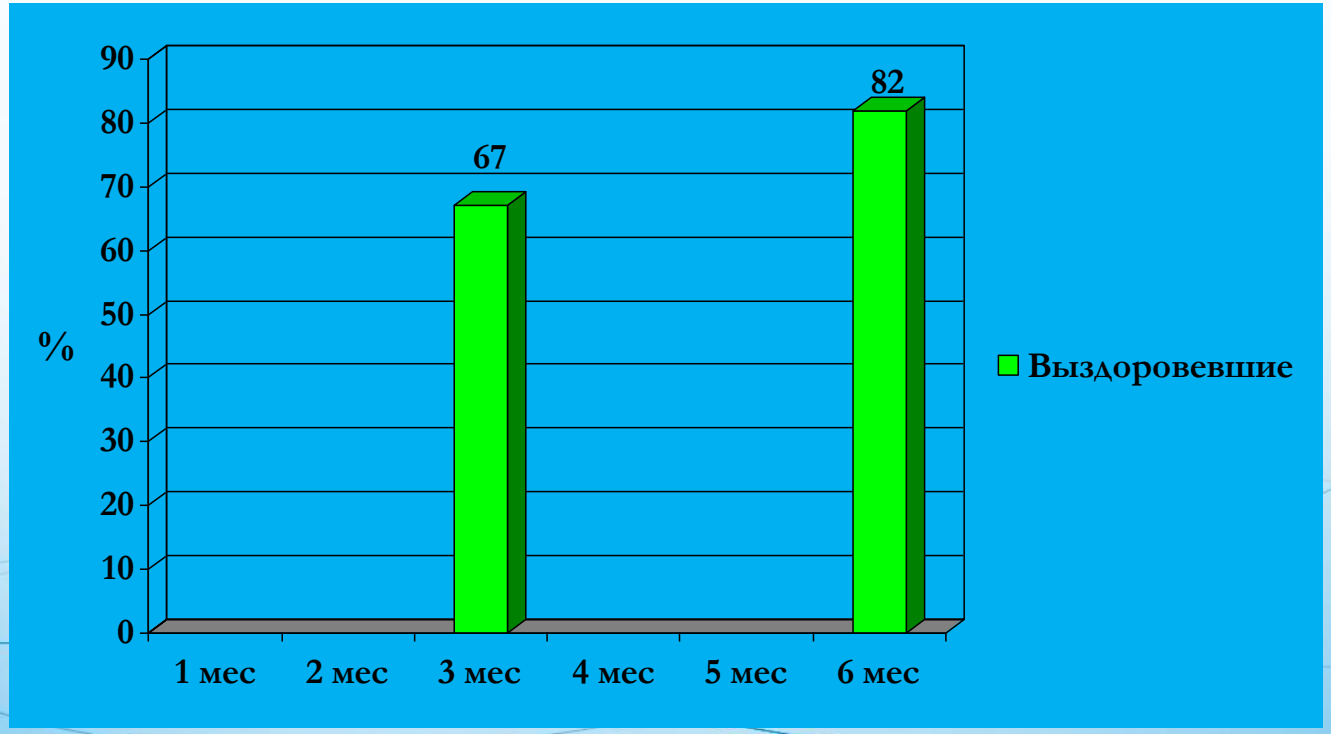
Изменения состояния глубокой потенциально патогенной микрофлоры кожи при длительном применении мыла с липосомальным диоксидином (КОЕ/см²)



Динамика заболеваемости пиодермитами у лиц с повышенной заболеваемостью пиодермитами, употреблявших обычное мыло (1 группа) и мыло с липосомальным диоксидином (2 группа)



Процент выздоровления лиц, страдающих общим хроническим фурункулёзом при длительном употреблении мыла с липосомальным диоксидином



Новое поколение лекарственных средств для наружной терапии вульгарных или розовых угрей

Липосомальный крем для лечения и профилактики гнойничковых поражений кожи

* Крем «Липро» - корригирующее средство для проблемной кожи, склонной к появлению вульгарных или розовых угрей.
* Крем с липосомами содержит биологически активные вещества, комбинация которых способствует подавлению микробной активности в очагах поражения, восстановлению и сохранению естественной микрофлоры кожи, уменьшению воспаления, очищению кожи от угревой сыпи, а также защите ее от инфекции.
* Рекомендуется к применению при вульгарных угрях, розацеа (розовые угри), демодекозе, розацеаподобном дерматите.
* Крем так же целесообразно использовать для профилактики инфекционных осложнений как после процедур аппаратной косметологии (пилинг, терапевтическая дермабразия, эпиляция, лазеротерапия, криотерапия и др.), так и после операций эстетической хирургии.

Состав и механизм действия крема «ЛИПРО»

Действующими веществами крема являются:

* Антибактериальное средство **диоксидин**, вещество, подавляющее гнойничковую микрофлору.
* Метаболиты **пробиотиков**, вещества, восстанавливающие полезные микробы и стимулирующие иммунитет.
* **Антиоксидантный комплекс**, обладающий антиокислительным и противовоспалительным действием.
* **Липосомы** используются как для лучшего проникновения указанных веществ в глубокие слои кожи, так и в качестве источника фосфо- и гликолипидов для борьбы с ксерозом (повышенной сухостью кожи).

Состояние кожи до и после применения крема «ЛИПРО»

до лечения

после 6 месяцев лечения

Состояние кожи до и после применения крема «ЛИПРО»

до лечения

конец первой недели лечения

Состояние кожи до и после применения крема «ЛИПРО»

до лечения

конец первой недели лечения

Коррекция пролиферации кератиноцитов с использованием липосом как направление в наружной терапии псориаза

Резюме научной работы

* Разработка нового направления наружной терапии псориаза, основанного на комплексной регуляции процессов пролиферации;
* Создание комбинированного лекарственного средства в липосомальной форме для осуществления данной терапии;
* Разработка лабораторных показателей его биологической активности;
* Изучение его клинической эффективности.

Задачи исследования

1. Разработать технологию получения липосомальных форм отдельных лекарственных препаратов и их смесей, обладающих антипролиферативным действием, для последующего практического использования.
2. Разработать лабораторный метод определения чувствительности кератиноцитов больного псориазом к антипролиферативным препаратам и их смесям.
3. Изучить биорегулирующее действие отдельных лекарственных препаратов, включённых в липосомы, на культуры кератиноцитов больных псориазом для выбора наиболее эффективных из них.
4. Изучить биорегулирующее действие смесей лекарственных препаратов, включённых в липосомы, на культуры кератиноцитов больных псориазом для выбора комбинации в наибольшей степени подавляющей пролиферацию и, таким образом, разработать высокоэффективное комбинированное средство для наружной терапии.
5. Изучить клиническую эффективность созданного препарата в сравнении с наиболее эффективными современными средствами.
6. Изучить характер метаболизма и молекулярные механизмы регуляции пролиферативно-дифференцировочной активности кератиноцитов в культуре клеток на основе методов комплексной оценки процессов свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты.

Основные положения

- Культуры кератиноцитов кожи больных псориазом как с поражённых, так и с непоражённых участков кожи обладают высокой пролиферативной активностью и способны длительное время пролиферировать без добавления специальных ростовых факторов, что свидетельствует о том, что кератиноциты больного псориазом способны секретировать собственные факторы роста.
- Лекарственные препараты механизм действия которых, связан с подавлением клеточной пролиферации: пентоксифиллин, пирроксан, селенит натрия, глутатион окисленный и сальбутамол, переведённые в липосомальную форму, обладают антипролиферативным действием на кератиноциты больных псориазом.
- Комбинации из наиболее эффективных липосомальных лекарственных препаратов целесообразно использовать в качестве лекарственных средств для наружной терапии псориаза так как они обладают синергидным действием.

Основные положения

- Процессы свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты принимают самое непосредственное участие в регуляции пролиферативно-дифференцировочной активности клеток кожи при псориазе таким образом, что увеличение интенсивности СРО ведёт к остановке пролиферации, а высокий уровень АОЗ её поддерживает.
- Крем «Липсор», в состав которого входят липосомальные: пентоксифиллин, пирроксан и селенит натрия является высокоэффективным средством для наружной терапии псориаза и может быть использован как в остром, так и в стационарном периоде заболевания так как по клинической эффективности он не уступает современным наружным средствам.
- Лабораторный метод определения чувствительности кератиноцитов больных псориазом к различным препаратам целесообразно использовать как для определения индивидуальной терапевтической эффективности средств наружной терапии, так и для изучения пролиферативно-дифференцировочных, морфологических и метаболических процессов кожи с последующим созданием новых лекарственных препаратов для оптимизации наружной терапии.

Экспериментальная часть работы

1. Изготовление липосом и включение в них лекарственных субстанций производилось по методу Г. Грегориадиса, А. Аллисона (1983), в нашей модификации. Таким образом, были приготовлены липосомальные эмульсии: пентоксифиллина, этмозина гидрохлорида, сальбутамола, натрия селенита, глутатиона окисленного и кальция хлорида, а также различные липосомальные комбинации из данных препаратов.
2. Выделение и выращивание первичной культуры кератиноцитов человека проводилось по методу Rheinwald J.G., Green H. (1975), в нашей модификации.
3. Активность пролиферации оценивали по включению в клетки меченного предшественника синтеза ДНК- 3Н-тимидина.
4. Методы исследования свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты тканей в культурах кератиноцитов до и после использования липосомальных препаратов и их смесей оценивали по:

концентрации	**активности ферментов**
• восстановленного глутатиона, • сульфгидрильных групп белков, • малонового диальдегида, • диеновых коньюгатов , • общей антиокислительной активности.	• глуатионпероксидазы (ГП), • глутатионредуктазы (ГР), • супероксиддисмутазы (СОД) , • каталазы, • глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ).

Клинические испытания комбинированного лекарственного средства в липосомальной форме для наружной терапии псориаза

Патент №2196583 от 20 января 2003 года «Средство для наружной терапии псориаза и способ его изготовления»

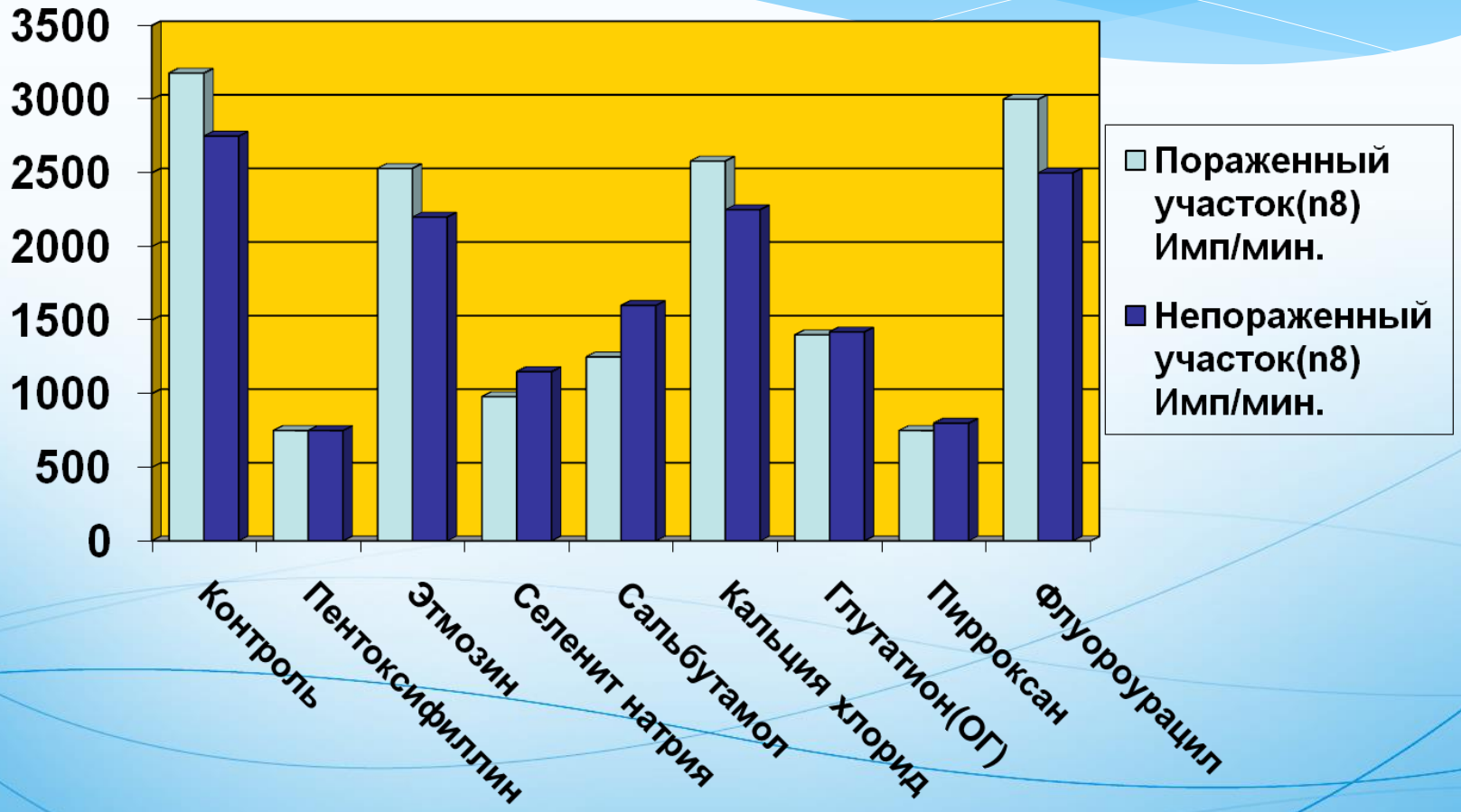
Общая характеристика больных

Категории		Больные	
		Количество	%
Пол:	Мужской	1380	69
	Женский	620	31
«Семейный» анамнез:	Есть	580	29
	Нет	1420	71
Возраст начала болезни:	<40 лет (I тип)	1520	76
	> 40 лет(II тип)	480	24
ВСЕГО		2000	100

Клиническая характеристика больных

Категории		Больные	
		Количество	%
Клиническая форма:	Ограниченный псориаз	1064	53,2
	Распространенный псориаз	800	40
	Ограниченный экссудативный псориаз	82	4,1
	Диффузный псориаз	54	2,7
Тяжесть болезни (по индексу PASI):	Легкой степени (< 12 баллов)	1419	71
	Средней степени(12-20 баллов)	363	18,1
	Тяжелой степени(>20 баллов)	218	11
Сезонность:	Летняя форма	300	15
	Смешанная форма	380	19
	Зимняя форма	1320	66
Течение:	Интермиттирующее	1360	68
	Часторецидивируюшее	640	32
ВСЕГО		2000	100

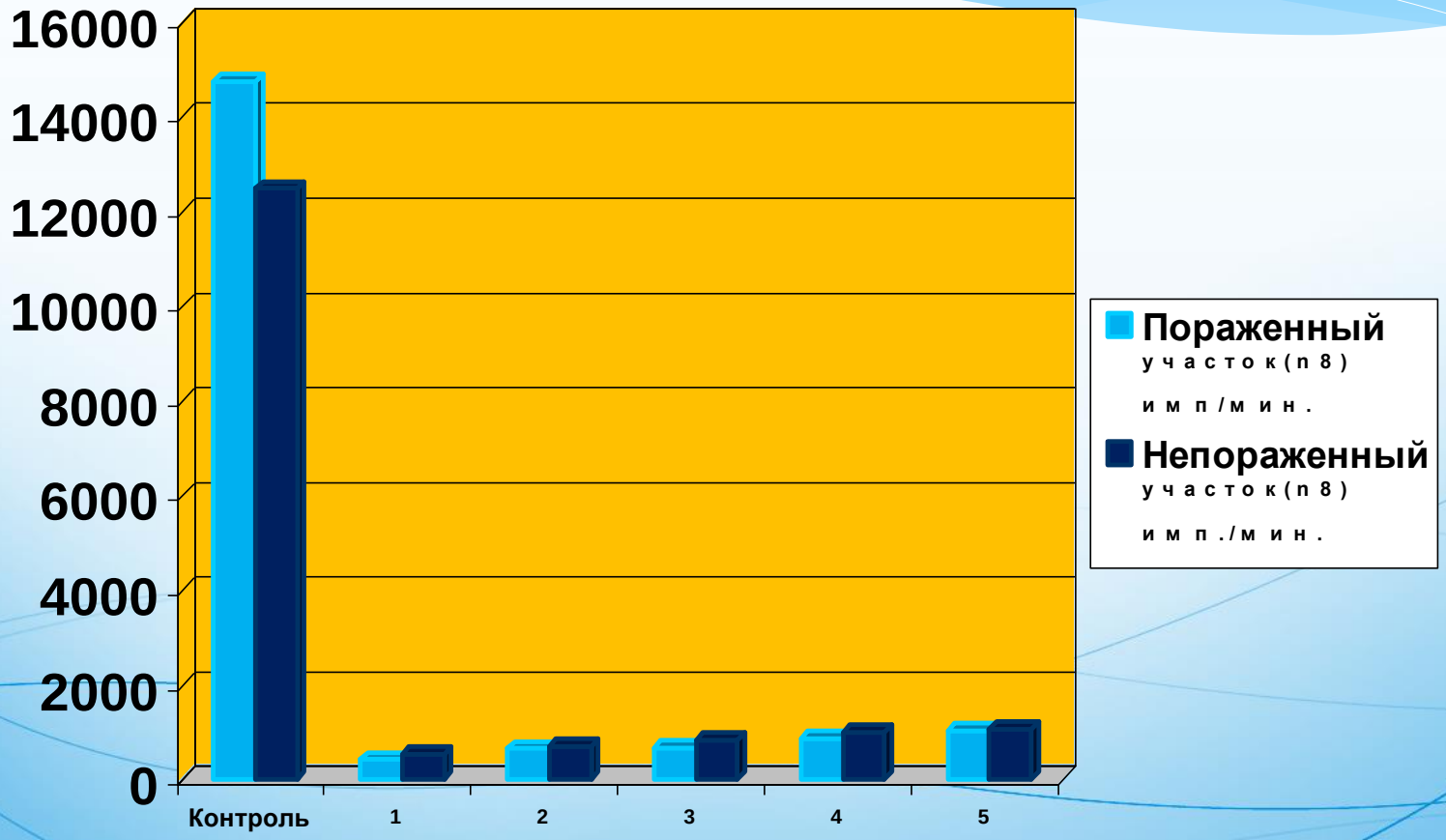
Влияние липосомальных препаратов на активность пролиферации кератиноцитов



Состав смесей липосомальных препаратов

№ 1 – пентоксифиллин, селенит натрия, пирроксан
№ 2 – пентоксифиллин, этмозин, селенит натрия
№ 3 – пентоксифиллин, селенит натрия, сальбутамол, пирроксан
№ 4 – пентоксифиллин, сальбутамол, пирроксан
№ 5 – пентоксифиллин, селенит натрия

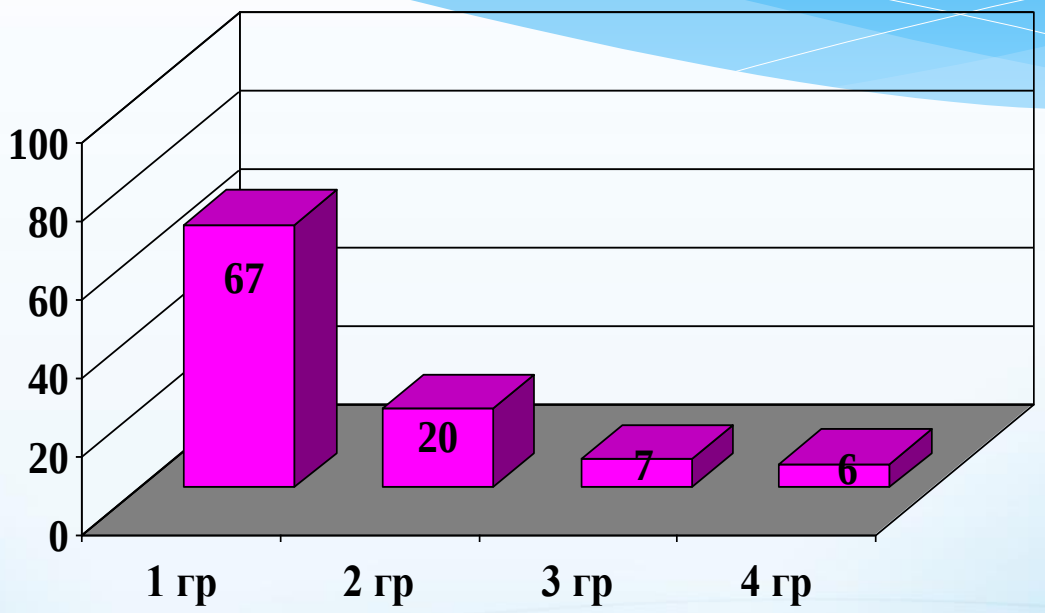
Влияние смесей липосомальных препаратов на активность пролиферации кератиноцитов



Результаты изучения клинической эффективности липосомального крема «Липсор» на течение вульгарного псориаза в различных группах больных в стационарных условиях

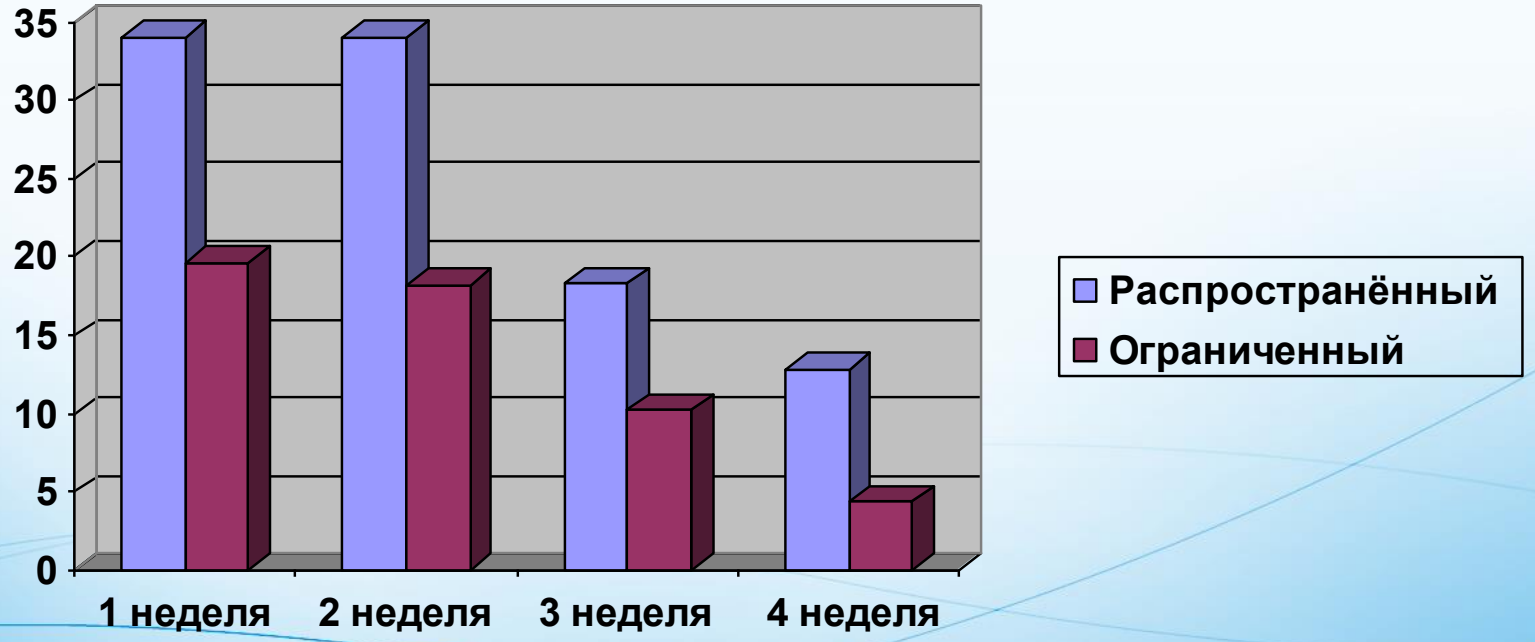
* На основе выбранной комбинации в наибольшей степени подавляющей пролиферацию из пентоксифиллина, пирроксана и селенита натрия был создан липосомальный крем для наружной терапии псориаза, получивший авторское название «Липсор».
* Крем наносился на поражённые участки кожи три раза в сутки. Курсовая доза составила от 60 до 300 грамм мази в зависимости от характера и распространённости поражения кожи. Больные также получали общую терапию, которая включала в себя фолиевую и аскорбиновую кислоты перорально, цианкобаламин и глюконат кальция внутримышечно (т.н. «венгерская схема»). 40% амбулаторных больных использовали «Липсор» как монотерапию.
* Эффективность применения рецептуры оценивалась:
  - по определению индекса PASI до начала терапии и в конце лечения (число, размер и распространённость высыпаний, выраженность эритемы, инфильтрации, шелушения);
  - субъективным ощущениям больного (жжение, зуд, сухость кожи).
* Окончательный итог определялся на основании достигнутого результата лечения:
  - клиническая ремиссия, значительное улучшение, незначительное улучшение, без изменений, ухудшение;
  - определения индекса PASI.
* Переносимость рецептуры оценивалась по следующим параметрам: очень хорошая, хорошая, плохая, очень плохая.

Результаты клинической эффективности применения препарата «Липсор» у стационарных больных (%)

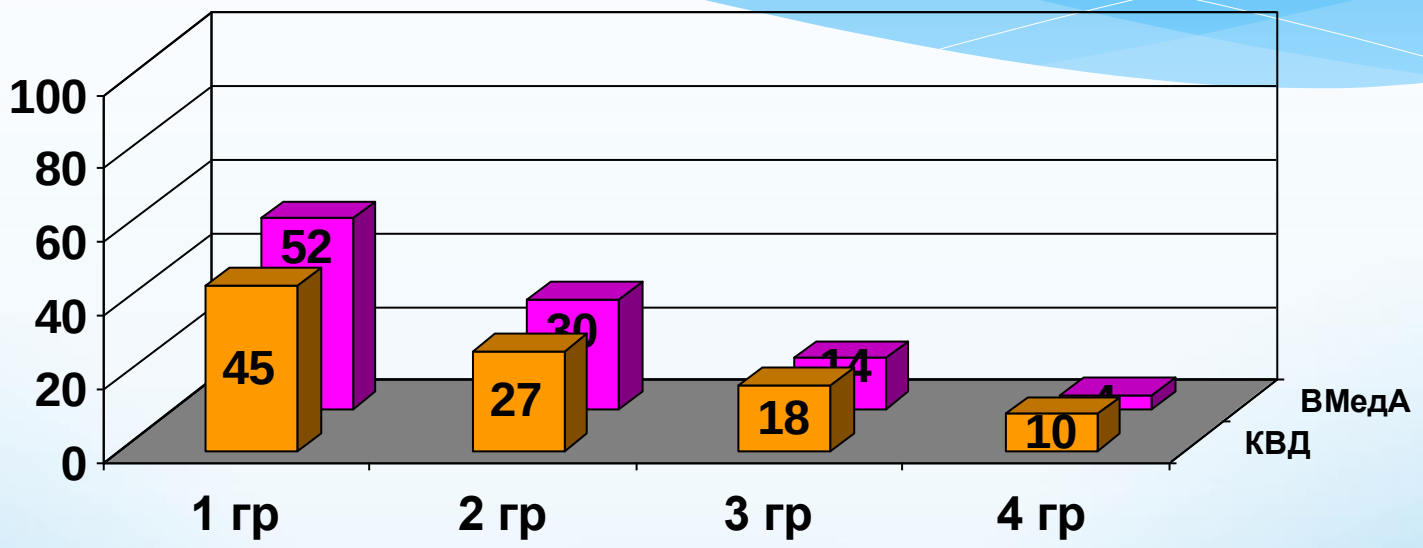


- 1 группа – полная клиническая ремиссия (PASI - 0)
- 2 группа – значительное улучшение
- 3 группа – незначительное улучшение
- 4 группа – без изменений

Динамика индекса PASI при применении крема «Липсор» в течение месяца у стационарных больных

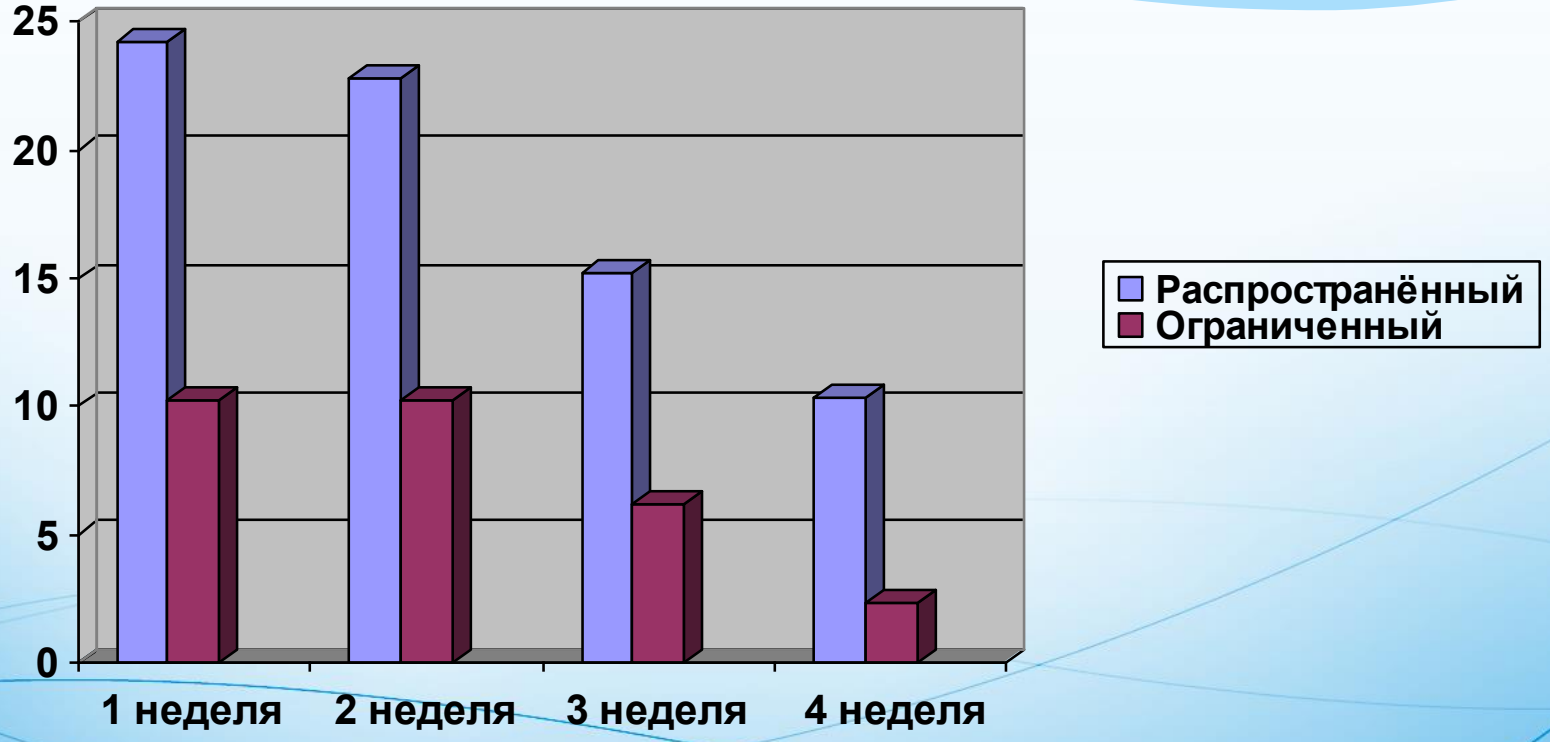


Результаты изучения клинической эффективности применения крема «Липсор» у амбулаторных больных (%)

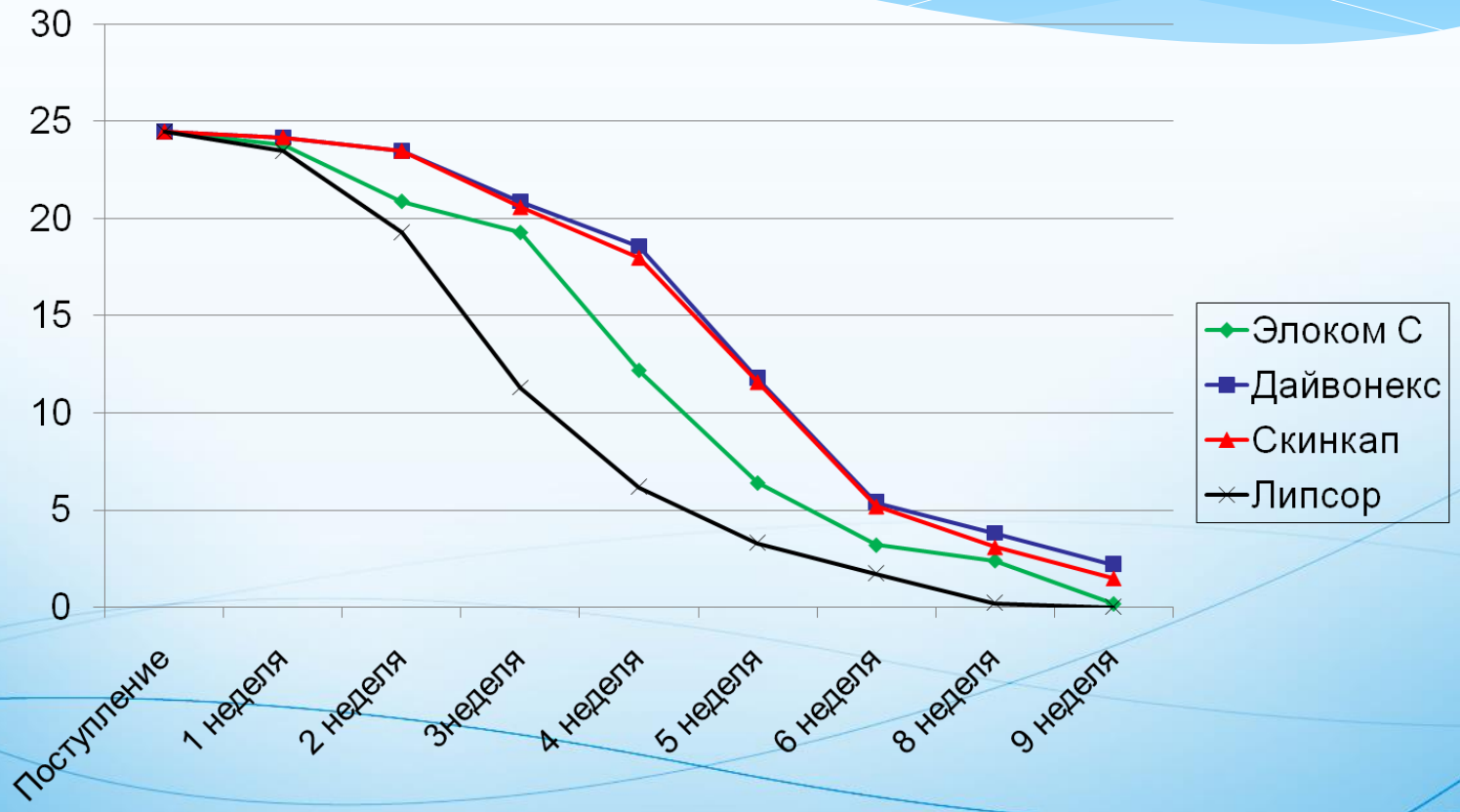


- 1 группа – полная клиническая ремиссия (PASI - 0)
- 2 группа – значительное улучшение
- 3 группа – незначительное улучшение
- 4 группа – без изменений

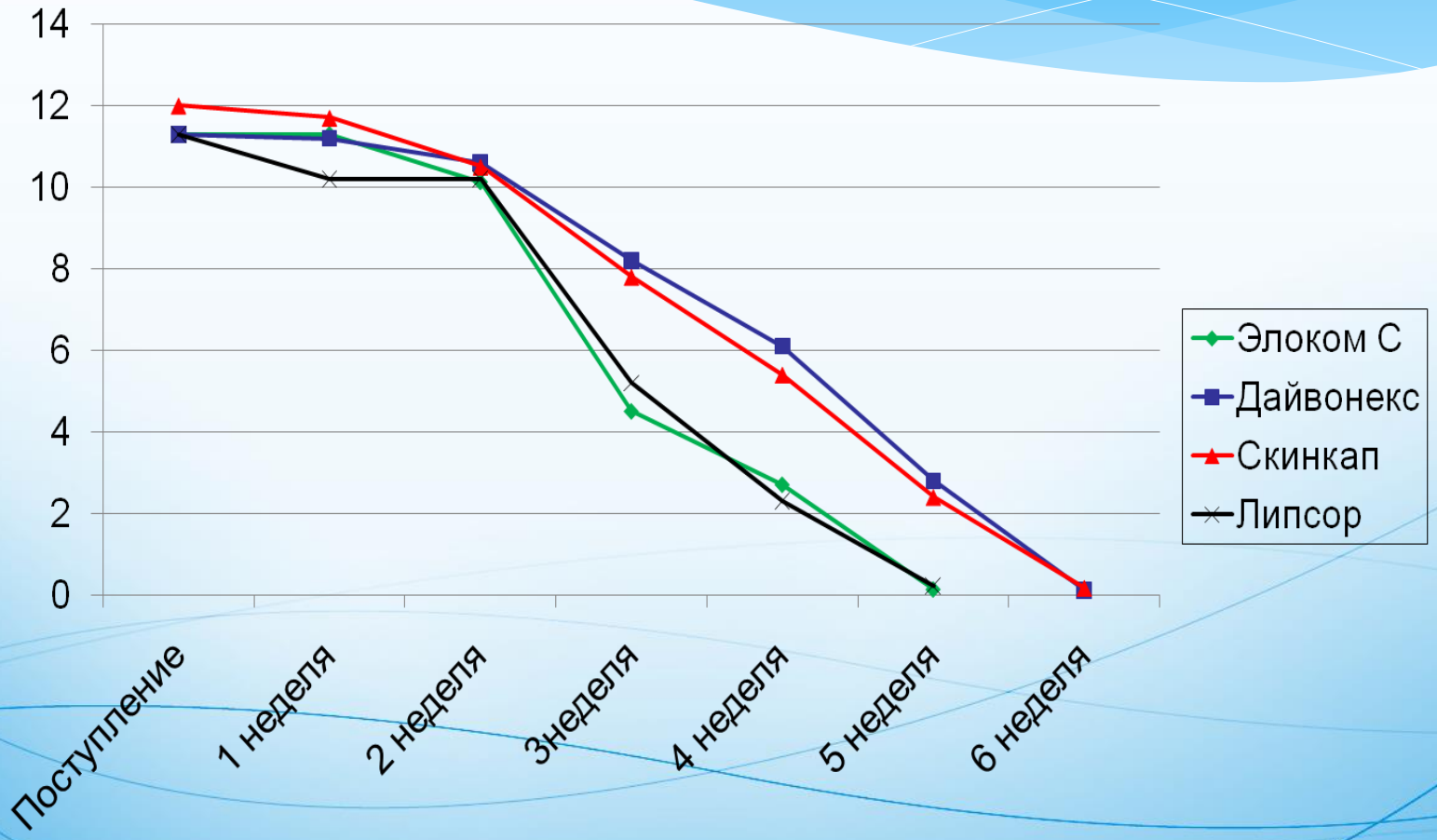
Динамика распределения индекса PASI у больных вульгарным псориазом, получавших амбулаторное лечение



Динамика изменений индекса PASI у больных с распространенным псориазом при применении различных препаратов для наружной терапии



Динамика изменений индекса PASI у больных с ограниченным псориазом при применении различных препаратов для наружной терапии



Выводы

- Культуры кератиноцитов кожи больных псориазом обладают высокой пролиферативной активностью и способны длительное время пролиферировать без добавления специальных ростовых факторов, что свидетельствует о том, что одно (или несколько) из биологически активных веществ, стимулирующих пролиферацию клеток, продуцируется самими кератиноцитами.
- Показатели пролиферативной активности культур кератиноцитов, выделенных как с поражённых так и с непоражённых участков кожи, после 20 дней культивирования практически не различимы.
- Процессы свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты принимают самое непосредственное участие в регуляции пролиферативно-дифференцировочной активности клеток кожи при псориазе таким образом, что увеличение интенсивности СРО ведёт к остановке пролиферации, а высокий уровень АОЗ ее поддерживает.
- Наиболее выраженным антипролиферативным действием обладают пентоксифиллин, пирроксан, селенит натрия, глутатион окисленный и сальбутамол (подавление в 4,2; 4,2; 3,2; 2,5 и 2.2 соответственно в порядке убывания; $p < 0,001$), предварительно переведённые в липосомальную форму.

Выводы

- Комбинации из липосомальных: пентоксифиллина, селенита натрия и пирроксана, а также из пентоксифиллина, селенита натрия и этмозина наиболее целесообразны для использования в качестве лекарственных средств наружной терапии псориаза, так как наиболее эффективно подавляют пролиферацию в культурах кератиноцитов больных псориазом (подавление в 36,2 и в 23 раза соответственно; $p < 0,001$).
- Крем «Липсор», в состав которого входят липосомальные: пентоксифиллин, пирроксан и селенит натрия является высокоэффективным средством для наружной терапии псориаза и может быть использован как в остром, так и в стационарном периоде заболевания.
- По сравнению с традиционными наружными средствами крем «Липсор» обладает высокой терапевтической эффективностью, что доказано как на высокой чувствительности (93,9 % стационарных и 90% амбулаторных) к нему больных так и на быстрой скорости разрешения псориатических элементов кожной сыпи (5 недель у больных с ограниченной и 8 недель при распространённой формах болезни).

Клинические испытания комбинированного лекарственного средства в липосомальной форме для наружной терапии атопического дерматита

Механизм действия крема ЛИПЭК

* Липосомальный препарат ЛИПЭК состоит из:
  - пентоксифиллина
  - селенита натрия
  - мочевины
* Мочевина – блокирует аллергические реакции немедленного (реагинового) типа, удерживает влагу в коже.
* Пентоксифиллин - блокирует аллергические реакции замедленного типа.
* Селенит натрия – восстанавливает нарушенный иммунный статус кожи, обладает противовоспалительным действием.
* Липосомы - используются как для лучшего проникновения указанных веществ в глубокие слои кожи, так и в качестве источника фосфо- и гликолипидов для борьбы с ксерозом (повышенной сухостью кожи).

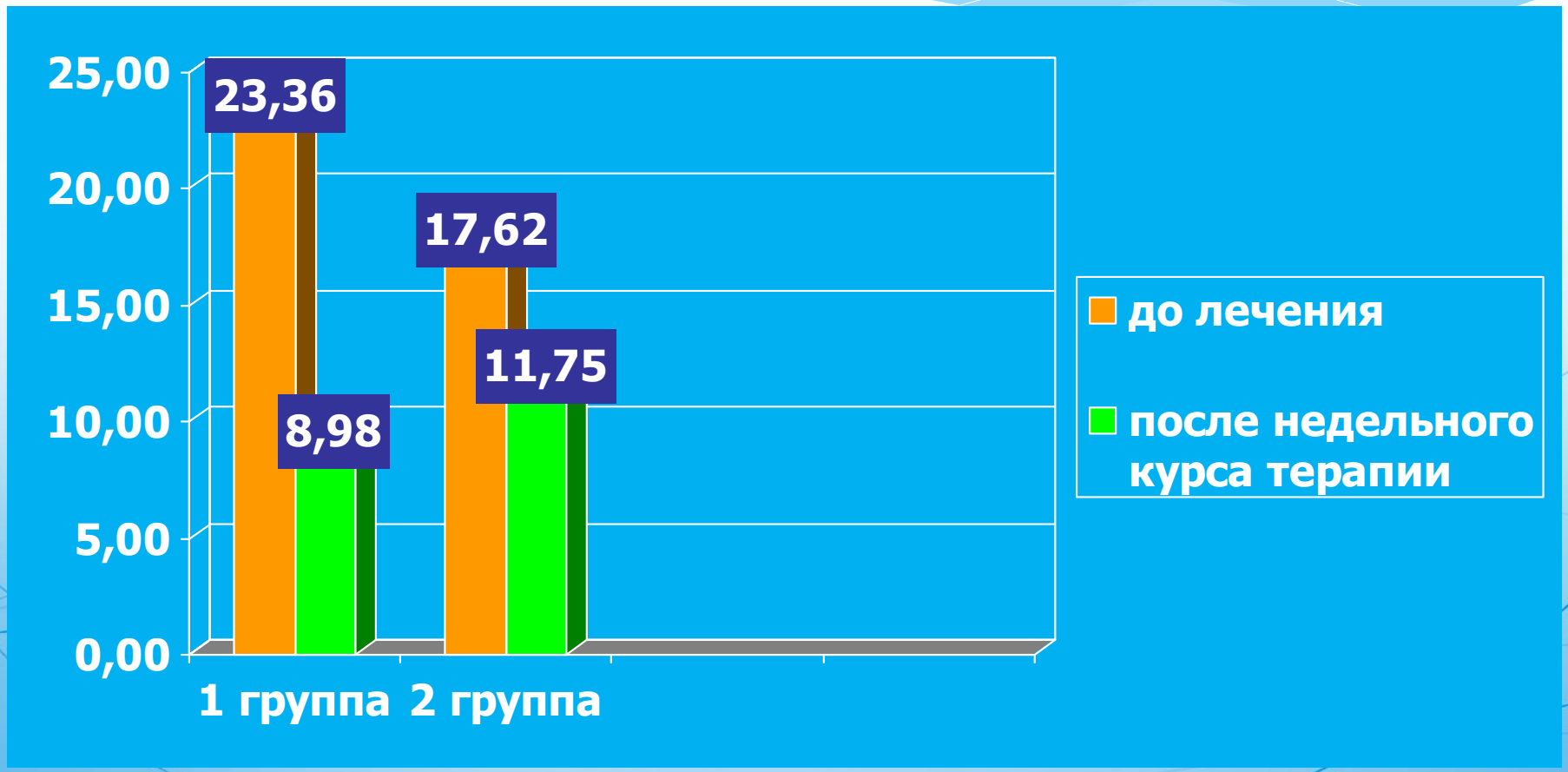
Показания к применению крема ЛИПЭК

Рекомендуется к применению при:

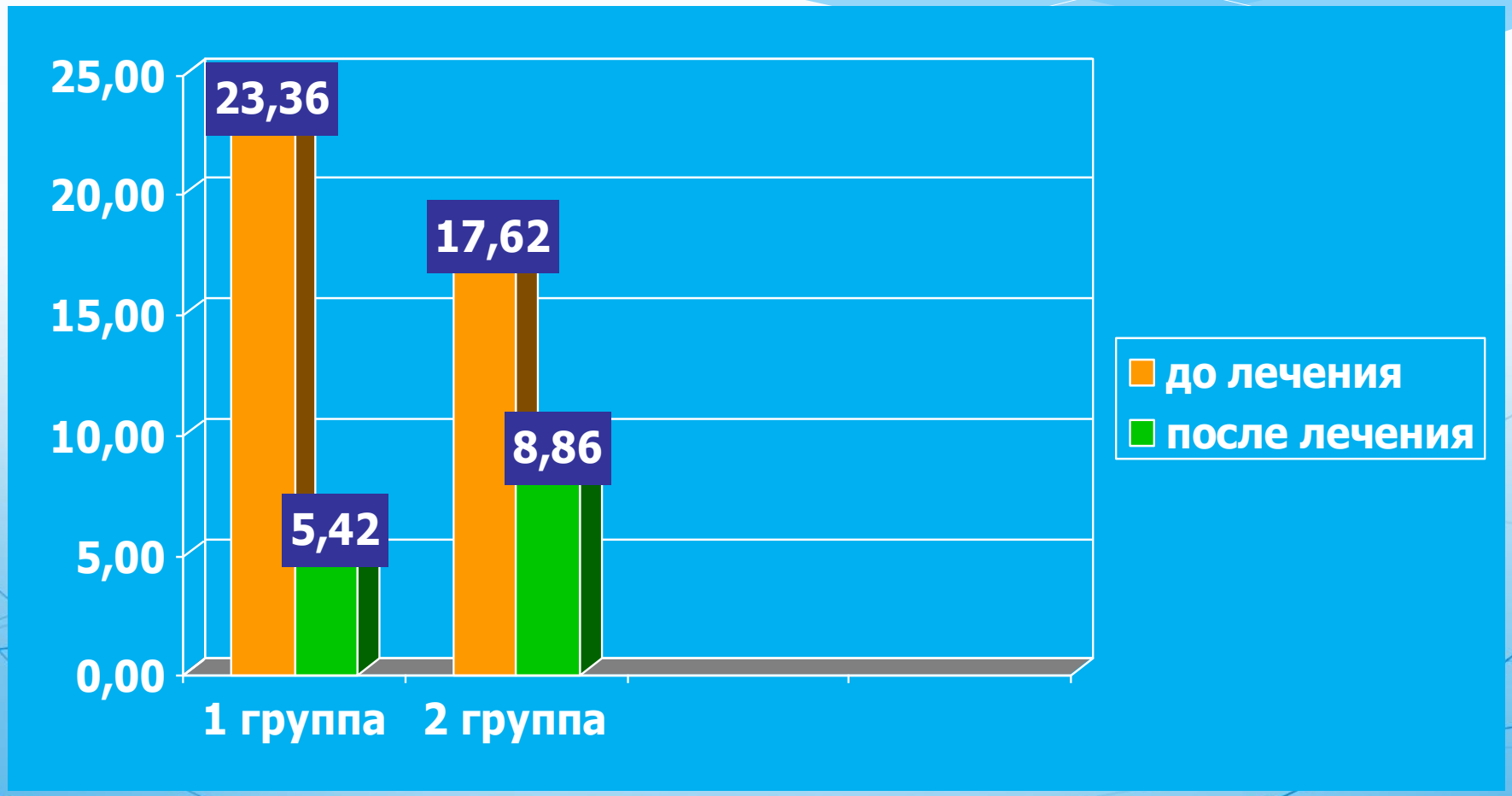
* нейродермите очаговом и диффузном;
* атопическом дерматите средней и легкой степени тяжести;
* аллергическом контактном дерматите остром и хроническом (кроме стадии выраженного мокнутия);
* крапивнице;
* токсикодермии (кроме пузырных форм);
* очаговой алопеции.

Целесообразно так же применять для профилактики аллергических реакций как после процедур аппаратной косметологии (пилинг, терапевтическая дермабразия, эпиляция, лазеротерапия, криотерапия и др.), так и после операций эстетической хирургии.

Изменение индекса SCORAD у больных АД через неделю после проведенной терапии



Изменение индекса SCORAD у больных АД через две недели после проведенной терапии



Состояние кожи лица до и после применения крема «ЛИПЭК»

до лечения

конец второй недели лечения

Выводы

1. Мочевинсодержащие средства значимо корригируют пластическую и детоксикационную функцию печени, восстанавливают концентрации карбамида, холестерина и общего иммуноглобулина Е в крови больных, ведут к регрессу клинических проявлений заболевания (снижение индекса SCORAD в 4,3 раза через 2 недели от начала наблюдения).
2. Клиническая эффективность комплексной терапии с применением средства, содержащего мочевину составляет 95% и сопоставима с препаратами, содержащими кортикистероиды.
3. Комплексное лечение с применением липосомального препарата «ЛИПЭК», содержащего мочевину, ведёт к более быстрой нормализации: клинической картины (снижение индекса SCORAD в 2,15 раз быстрее), концентраций мочевины и общего иммуноглобулина Е (выше на 23% и ниже на 36% соответственно у пациентов с тяжелым течением заболевания) и более длительной ремиссии (на 20%) по сравнению со стандартной терапией (с использованием наружных гормональных средств).