
РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ГЕЛЯ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ

О.А. Семкина

Кафедра общей фармацевтической и биомедицинской технологии
Медицинский факультет
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198
Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский институт
лекарственных и ароматических растений
Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВИЛАР РАСХН)
ул. Грина, 7, Москва, Россия, 117216

И.П. Смирнова

Кафедра биохимии
Медицинский факультет
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

М.А. Джавахян, О.В. Бондаренко

ГНУ ВИЛАР РАСХН
ул. Грина, 7, Москва, Россия, 117216

Л.М. Кишмахова

Кафедра общей фармацевтической и биомедицинской технологии
Медицинский факультет
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

Для изготовления геля с L-лизин-альфа-оксидазой в качестве структурообразователей был выбран Карбопол (974Р). Изучена стабильность разработанного геля с использованием физико-химических, реологических и микробиологических методов анализа по следующим показателям: внешний вид геля, запах, значение pH, однородность, коллоидная стабильность. Подлинность, активность L-лизин- α -оксидазы в геле, вязкость геля и микробиологическая чистота соответствовали проекту ФСП «L-лизин- α -оксидаза гель, 1% концентрации».

Изучена специфическая активность разработанного геля в опытах на животных. Результаты этого исследования позволяют говорить о высокой ранозаживляющей активности геля с экстрактом с L-лизин-альфа-оксидазы 1% концентрации.

Ключевые слова: мягкая лекарственная форма, гель, L-лизин- α -оксидаза, культуральная жидкость, гриб рода *Trichoderma*, технология геля, гидрофильная основа для мазей, Carborol.

Фермент L-лизин-альфа-оксидаза, продуцируемый грибами рода *Trichoderma*, обладает противомикробной и противовирусной активностью, а также ранозаживляющим действием. Исследована острая токсичность фермента грибного происхождения L-лизин- α -оксидазы на крысах. Показано, что субстанция при внутривенном введении 3000 Е/кг не вызывает никаких симптомов отравления, тем более гибели животных [1, 2].

Все это открывает перспективы для разработки лекарственных форм на основе L-лизин- α -оксидазы, которые могут быть рекомендованы для применения

при различных кожных инфекциях и механических повреждениях кожи. Использование концентрированной культуральной жидкости также является весьма актуальным в экономическом плане, так как не требует специфической дорогостоящей очистки [3].

Цель работы: разработка состава и технологии геля с L-лизин-альфа-оксидазой, исследование полученной лекарственной формы. Для достижения цели были решены следующие задачи: осуществлен выбор вспомогательных веществ для изготовления геля с L-лизин-альфа-оксидазой, разработана оптимальная технология геля, изучены показатели стабильности геля с L-лизин-альфа-оксидазой, а также специфическая активность геля в опытах на животных.

Методы исследования. При выборе вспомогательных компонентов при разработке лекарственной формы руководствовались следующими основными положениями: компоненты геля должны быть совместимы, не вызывать раздражающего действия, способствовать максимальному высвобождению активного компонента, обеспечивать легкость нанесения и фасуемость геля.

Определение значения pH геля осуществляли с помощью ионметра универсального Sartorius professional Meter PP 20. Для изучения структурно-механических свойств лекарственной формы использовали ротационный вискозиметр («Reotest-2» типа RV, Brookfield DV-II типа RV Германия) [4].

Штамм *Tr. harzianum* выращивали на среде сусло-агаре в течение 7 суток в термостате при 28 °С. Полученную культуру со средой (1—1,5 см) вносили в колбу объемом 250 мл. Полученный водный экстракт использовали для определения активности L-лизин- α -оксидазы [3]. Определяли активность фермента спектрофотометрическим ортодианизидиновым микрометодом по количеству образующейся в процессе ферментативной реакции H_2O_2 [5].

Выбор оптимальной концентрации L-лизин- α -оксидазы, обеспечивающей достаточный противовоспалительный и ранозаживляющий эффекты, основывался на проведенных ранее исследованиях, целью которых являлось определение активности фермента L-лизин- α -оксидазы на животных (лабораторные мыши и кролики). Для разработки состава и технологии геля с L-лизин- α -оксидазой изготовлены модельные образцы с 1%-й концентрацией фермента [2].

Результаты исследования. Культуральная жидкость представляет собой непрозрачную жидкость светло-желтого цвета со слабым грибным запахом, стабильная при хранении. L-лизин- α -оксидаза, белок, ненасыщенные жирные кислоты, моно- и дисахара, крахмал, клетчатка, органические кислоты, витамин B1, витамин B2 (придает окраску), витамин PP, железо, калий, кальций, магний, натрий, фосфор, нитрат натрия.

Культуральная жидкость обладает pH-оптимумом для проявления ферментативной активности 5,9—6,0. Такой факт видимо объясняется тем, что фермент находится в ассоциации с другими ферментами и продуктами жизнедеятельности триходермы и имеет оптимальные условия для жизнедеятельности [3].

На первом этапе исследований осуществлен скрининг основ, способных обеспечить максимальный ранозаживляющий эффект в лекарственной форме. Для это-

го изготовлены образцы геля на гидрофильных основах: МЦ и РАПов. Ранозаживляющая активность геля с L-лизин- α -оксидазой проведено в виварии РУДН под руководством профессора И.П. Смирновой. Гель с L-лизин- α -оксидазой исследовали на экспериментальной модели раны морских свинок.

Исследования проводили на морских свинках, самцах, массой 320 ± 15 г, выращенных в виварии РУДН. Рану создавали у животных на предварительно депилированном участке (5×5 см) кожи спины. Лечение начинали через 18 ч и проводили один раз в сутки в течение двух недель до полного излечения животных. Лечебный эффект 1% геля с L-лизин-альфа-оксидазой изучали в сравнении с плацебо геля (основа геля). В качестве препарата сравнения использовали 1% гель с L-лизин-альфа-оксидазой на фосфолипидной основе, полученный от Н.М. Мурашовой, сотрудника Российского химико-технологического университета (РХТУ). В одинаковых условиях опыта контролем служила группа животных без лечения. Результаты опыта учитывали по средним срокам заживления раны (в сутках). При использовании геля на основе карбопола рана затягивалась в течении 6—7 суток. Гель на основе мАРСа и МЦ способствовал заживлению раны в течение 8—9 суток

Анализ полученных данных показал, что основа оказывает значительное влияние на противовоспалительную и ранозаживляющую активность фермента L-лизин- α -оксидазы. Высокую терапевтическую активность проявили образцы, изготовленные с использованием редкосшитых акриловых полимеров (мАРСа и карбопола), низкую активность — образцы на МЦ, однако наиболее быстрое заживление ран наблюдалось при использовании образцов на карбополе.

Гели, изготовленные на основе редкосшитых акриловых полимеров, имеют ряд преимуществ перед мазями на липофильных основах, поскольку при нанесении на кожу образуют тончайшие гладкие пленки, обеспечивая пролонгированный эффект препаратов; более полно и равномерно высвобождают лекарственные вещества, поглощают кожные экскреторные и секреторные продукты, хорошо распределяются по кожной поверхности; оказывают охлаждающее действие, не нарушают физиологические функции кожи, не вызывают аллергических реакций и раздражающего действия, не загрязняют одежду, имеют приятный внешний вид и консистенцию [4].

С целью выбора оптимального структурообразователя для геля с L-лизин-альфа-оксидазой изучено влияние концентрации полимера на величину эффективной вязкости гелевых композиций карбопола и мАРСа, нейтрализованных раствором гидроксида натрия (значение pH 5,5—6,5).

Образцы основ, в состав которых структурообразующий компонент входит в концентрации до 0,25% для карбопола и до 0,5% для мАРСа, представляют собой текучие системы. Объектом исследования выбран карбопол (974 P), так как его количество значительно меньше при сопоставимых значениях вязкости, а также значительно меньше время набухания полимера.

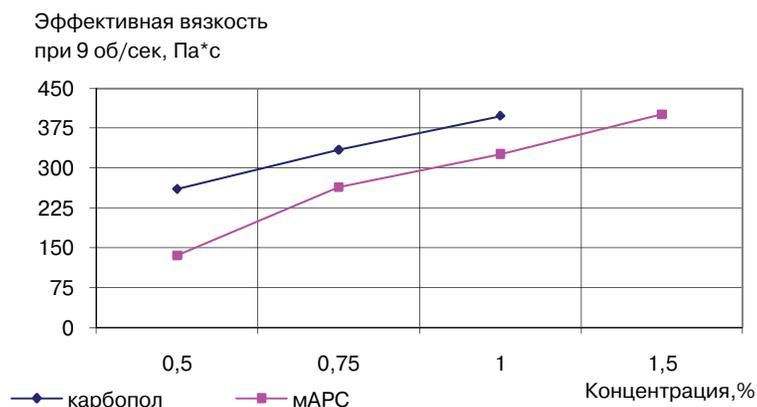


Рис. 1. Зависимость эффективной вязкости гелевых основ (карбопола и МАРСа) от концентрации полимера

Для изучения тиксотропных свойств построены кривые кинетики деформации геля с L-лизин-альфа-оксидазой в координатах: скорость сдвига — напряжение сдвига в области изменения градиентов скорости течения от малых к большим и от больших к малым (рис. 2 и 3).

Анализ данных, представленных на рис. 2 и 3, показывает присутствие восходящих и нисходящих кривых «петли гистерезиса», говорящее о том, что исследуемый образец обладает слабыми тиксотропными свойствами, на основании которых можно предполагать хорошую намазываемость, способность к выдавливанию из туб и стабильность разработанного геля с L-лизин-альфа-оксидазой.

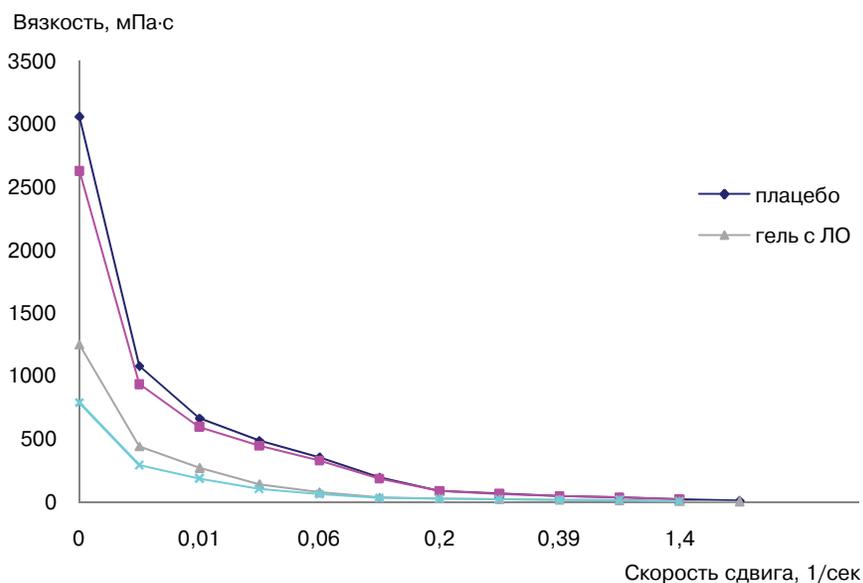


Рис. 2. Реограмма эффективной вязкости карбопола 1% и геля с L-лизин- α -оксидазой

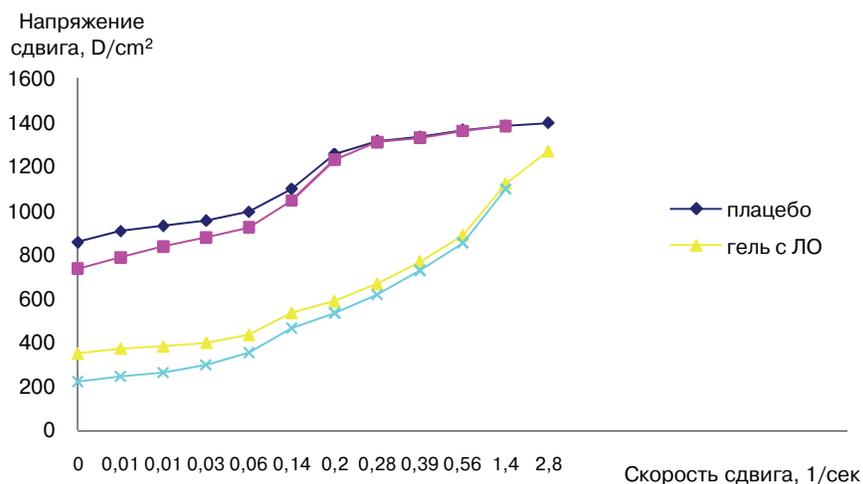


Рис. 3. Реограмма течения карбопола 1% и геля с L-лизин-альфа-оксидазой

Как видно на рисунках 2 и 3, при данной концентрации полимера происходит увеличение петель гистерезиса (восходящая кривая — разрушение системы, нисходящая кривая — восстановление системы), что свидетельствует о возрастающей глубине структурообразования в системе карбопол : вода и подтверждает тиксотропные свойства полученного геля [7].

Таким образом, в результате комплекса физико-химических, биологических и реологических исследований разработан следующий состав геля с L-лизин- α -оксидазой:

- карбопол (974 P NF),
- европейская фармакопея 2001 г. ст. «Carbomers» 1,0,
- культуральная жидкость 1,0 (5,4 Ед/мл.),
- раствор натрия гидроксида (30%) (ГОСТ 4328-77) до рН 6,0—6,5,
- вода очищенная (ФС 42-2619-97) до 100,0.

Гель имеет приятный внешний вид, без механических включений, бесцветный со слабым желтоватым оттенком, без запаха, гелеобразной консистенции, при использовании легко наносится, плотно прилегая к поверхности кожи, быстро высыхает на ней, образуя пленку, не обладает липкостью, не пачкает одежду, стабилен при хранении.

Технологическая схема производства (рис. 4) включает подготовительный этап и собственно процесс изготовления геля с L-лизин- α -оксидазой. Подготовительный этап производства: изготовление дезинфицирующих растворов, подготовка производственных помещений, оборудования, персонала, а также упаковка (баночки стеклянные, ТУ 9463-015-07609129-2003). Технологический процесс состоит из следующих стадий: изготовление геля, фасовка, упаковка и оценка качества лекарственной формы. Изготовление геля начинают с подготовки лекарственного вещества и основы. В операцию подготовки основы входит процесс растворения и набухания, а также регулирование значения рН с помощью гидроксида натрия.

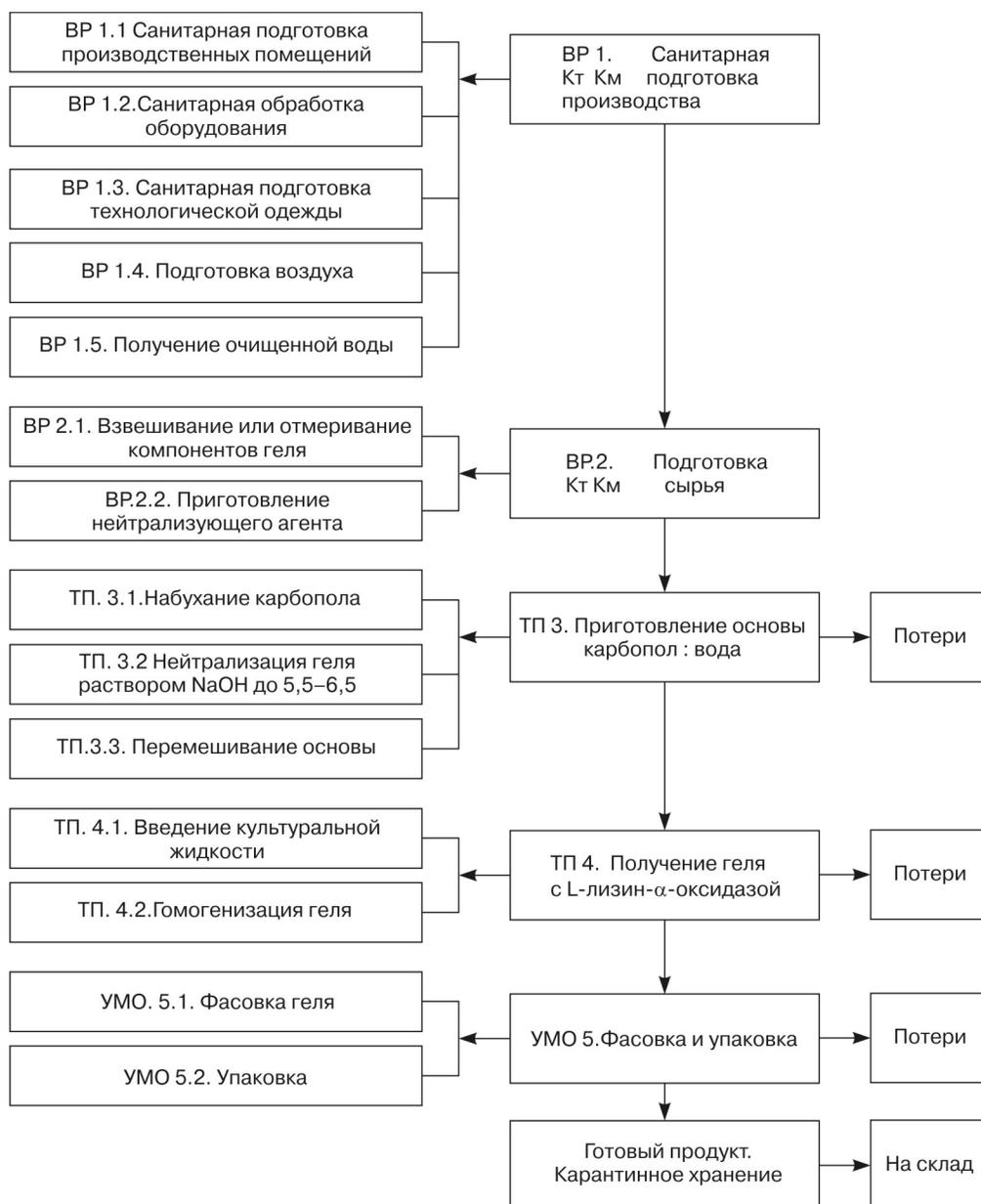


Рис. 4. Технологическая схема изготовления геля с L-лизин-альфа-оксидазой

Изготовление основы «РАП : вода». В производственную емкость отмеривают рассчитанное количество воды очищенной. Порошок РАПа (карбопол) настилают на поверхность воды и оставляют набухать в течение 1 часа, затем систему перемешивают с помощью механической мешалки (ЭКРОС-8100) со скоростью 100—120 об/мин. до получения гомогенного геля. После этого при постоянном перемешивании добавляют рассчитанное количество натрия гидроксид, для получения заданного значения рН среды (5,5—6,5). Введение нейтрализующего агента приводит к загущению системы и повышает уровень вязкости. Ин-

гредииенты тщательно перемешивают с помощью высокоскоростной мешалки (ЭКРОС-8100). Полученный гель оставляют до полного завершения структурообразования в течение 4—6 ч.

Изготовление геля с L-лизин- α -оксидазой. Культуральную жидкость вносят в полученную основу геля и гомогенизируют на лопастной мешалке (ЭКРОС-8100, 120 об/мин.) в течение 10 минут.

Технология изготовления разработанного геля с L-лизин- α -оксидазой характеризуется достаточной воспроизводимостью.

Изучение стабильности геля с L-лизин- α -оксидазой при хранении проводили с помощью физико-химических, химических и микробиологических методов анализа. С этой целью изготовлены три серии геля с L-лизин- α -оксидазой по разработанному и экспериментально изученному составу, расфасованы по 10 г в стеклянные баночки (ТУ 9463-015-07609129-2003). Образцы хранили в условиях холодильника (8 ± 2 °С). В момент изготовления и далее через 6 месяцев контролировали визуально, определяли подлинность, активность L-лизин- α -оксидазы, значения рН и микробиологическую чистоту, вязкость геля.

Для определения активности L-лизин- α -оксидазы была использована методика спектрофотометрического анализа. Измерение оптической плотности раствора осуществляли при длине волны $\lambda = 540 \pm 3$ нм (максимум поглощения раствора перекиси водорода). Раствором сравнения служил раствор плацебо лекарственной формы [5].

Изучение стабильности геля с L-лизин- α -оксидазой при хранении проводили с помощью физико-химических, химических и микробиологических методов анализа. С этой целью изготовлены три серии геля с L-лизин- α -оксидазой по разработанному и экспериментально изученному составу, расфасованы по 10 г в стеклянные баночки (ТУ 9463-015-07609129-2003).

Образцы хранили в условиях холодильника (8 ± 2 °С). В момент изготовления и далее через 6 месяцев контролировали визуально, определяли подлинность, активность L-лизин- α -оксидазы, значения рН и микробиологическую чистоту, вязкость геля.

Для определения активности L-лизин- α -оксидазы была использована методика спектрофотометрического анализа. Измерение оптической плотности раствора осуществляли при длине волны $\lambda = 540 \pm 3$ нм (максимум поглощения раствора перекиси водорода). Раствором сравнения служил раствор плацебо лекарственной формы [5].

Такие показатели, как внешний вид геля, запах, значение рН и однородность, в процессе хранения не изменились. При проведении испытаний не наблюдалось выделения водной фазы. Подлинность, активность L-лизин- α -оксидазы в геле, вязкость геля и микробиологическая чистота соответствовали проекту ФСП «L-лизин- α -оксидаза гель, 1% концентрации».

Одним из обязательных этапов доклинического исследования нового разработанного лекарственного препарата является проведение комплекса экспериментов, включающих изучение специфической активности на лабораторных животных.

Проведен опыт на 20 морских свинок, самцах, массой 320 ± 15 . Установлено, что гель с L-лизин-альфа-оксидазой 1% концентрации оказывает ранозаживляющее действие, сокращая средние сроки заживления ран у животных на 5,4 дня по сравнению с контрольной группой (без лечения); и на 4,2 дня по сравнению с плацебо геля соответственно.

Использование геля с L-лизин-альфа-оксидазой на карбополе показало наиболее эффективную степень заживления раны — в течение 6—7 суток. Гель с L-лизин-альфа-оксидазой, изготовленный на фосфолипидной основе, способствовал заживлению раны в течение 8—9 суток.

Выводы.

В результате проведенных исследований осуществлен выбор вспомогательных веществ, разработан состав и технология получения геля с L-лизин- α -оксидазой 1% концентрации, установлена стабильность разработанной лекарственной формы в течение 6 месяцев хранения.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Шнейдер Ю.А., Хомик А.С., Кишмахова Л.М. и др. Культивирование сапрофитного гриба Триходерма и биосинтез L-лизин- α -оксидазы // Вестник РУДН. Серия «Агрономия и животноводство». — 2010. — № 3. — С. 49—55.
- [2] Смирнова И.П. Продукты оксидаз L-аминокислот и возможные области их практического применения // Ж-л Биотехнология. — 1991. — № 3. — С. 3—7.
- [3] Смирнова И.П., Алексеев С.Б. Биосинтез противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы Trichodermap // Антибиотики и химиотерапия. — 2009. — Т. 54. — В. 5—6. — С. 8—11.
- [4] Семкина О.А. Разработка состава и технологии мягких лекарственных форм эвкалимина: Дисс. ... к.ф.н. — М., 2005.
- [5] Смирнова И.П., Сяткин С.П., Берёзов Т.Т. Спектрофотометрический метод определения L-лизин- α -оксидазы // Вопросы медицинской химии. — 1984. — № 1. — С. 133—136.
- [6] Семкина О.А., Джавахян М.А., Левчук Т.А., Охотникова В.Ф. Вспомогательные вещества, используемые в технологии мягких лекарственных форм (мазей, гелей, линиментов, кремов) // Химико-фармацевтический журнал. — 2005. — Т. 39. — № 9. — С. 45—48.
- [7] Семкина О.А., Суслина С.Н., Краснюк И.И. Обоснование состава геля Эвкалимина на основе сравнительного изучения реологических параметров редкосшитых акриловых полимеров // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия «Медицина». Специальность «Фармация». — 2004. — № 4 (28). — С. 216—222.

REFERENCES

- [1] Schneider Yu.A., Khomik A.S., Kishmakhova L.M. et al. Cultivation of saprophytic fungus Trichoderma and biosynthesis of L-lysine- α -oxidase // Bulletin of Peoples' Friendship University of Russia, Series "Agronomy and animal husbandry". — 2010. — № 3. — P. 49—55.
- [2] Smirnova I.P. Producers oxidases L-amino acids and possible areas of practical application // Biotechnology. — 1991. — № 3. — P. 3—7.
- [3] Smirnova I.P., Alekseev S.B. Biosynthesis of antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase Trichodermap // Antibiotics and Chemotherapy. — 2009. — Vol. 54. — № 5—6. — P. 8—11.
- [4] Semkina O.A. Development of technology and pharmaceutical dosage forms of Eukalimin: Thesis PhD. — M., 2005.

- [5] *Smirnova I.P., Syatkin S.P., Berezov T.T.* Spectrophotometric method for determination of L-lysine- α -oxidase // *Questions of Medical Chemistry*. — 1984. — № 1. — P.133—136.
- [6] *Semkina O.A., Dzhavakhyan M.A., Levchuk T.A., Okhotnikova V.F.* Excipients used in the technology of pharmaceutical dosage forms (ointments, gels, liniments, creams) // *Chemical-Pharmaceutical Journal*. — 2005. — V. 39. — № 9. — P. 45—48.
- [7] *Semkina O.A., Suslina S.N., Krasnyuk I.I.* Justification of Evkalimin gel based on a comparative study of the rheological parameters of lightly crosslinked acrylic polymers // *Bulletin of Peoples' Friendship University of Russia. Series of "Medicine", specialty "Pharmacy"*. — 2004. — № 4 (28). — P. 216—222.

DEVELOPMENT OF STRUCTURE AND TECHNOLOGY OF WOUND HEALING GEL

O.A. Semkina

Department of the general pharmaceutical and biomedical technology
Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

All-Russian Institute of Medicinal and Aromatic Plants
Grina str., 7, Moscow, Russia, 117216

I.P. Smirnova

Department of biochemistry
Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

M.A. Dzhavakhyan, O.V. Bondarenko

All-Russian Institute of Medicinal and Aromatic Plants
Grina str., 7, Moscow, Russia, 117216

L.M. Kishmakhova

Department of the general pharmaceutical and biomedical technology
Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

Carbopol (974 P) was selected as the structure former to make a gel with L-lysine- α oxidase.

Stability of the gel developed was studied with the use of physico-chemical, rheological and microbiological methods of analysis for the following indicators: the appearance of the gel, odor, pH, uniformity, colloid stability. The authenticity of the activity of L-lysine- α -oxidase in the gel, the viscosity of the gel and microbiological purity of the project comply with manufacturer's monograph L-Lysine- α -oxidase gel, 1% concentration.

Studied the specific activity of the developed gel in animal experiments. The results of this study suggest a high wound-healing activity of gel with extract of L-lysine α -oxidase of 1%.

Key words: soft dosage form, L-lysine- α -oxidase, culture medium, Trichoderm, gel technology, a hydrophilic ointment base, Carbopol.