

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ГОУ ВПО «СТАВРОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Хатков Эдуард Магометович

МИКРОБИОЦЕНОЗ КОЖИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ АКНЕ НИОСОМАЛЬНЫМ
АНТИМИКРОБНЫМ ГЕЛЕМ.

03.02.03 – микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор Базиков И.А.

Ставрополь 2014 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ТРАНСДЕРМАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АКНЕ	
1.1. Микробиоценоз кожи и роль условно-патогенных микроорганизмов в развитии акне.....	12
1.2. Использование антимикробных и других препаратов для лечения акне	17
1.3. Микрокапсулирование для трансдермальной доставки активных веществ	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1. Бактериологические исследования	51
2.1.1. Методы культивирования и идентификации микроорганизмов.....	51
2.1.2. Определение чувствительности выделенной микрофлоры к растительным экстрактам	53
2.2. Обоснование выбора лекарственных растений, обладающих антимикробной активностью	55
2.2.1. Методы приготовления растительных экстрактов	57
2.3. Технология приготовления антимикробного ниосомального геля.....	60
2.3.1. Получение ниосом и инкапсулирование растительных экстрактов....	60
2.3.2. Отработка фаз приготовления и рецептуры ниосомального геля с растительными экстрактами	61
2.4. Экспериментальные методы исследования.....	62
2.5. Анализ эффективности антимикробного ниосомального геля.....	64
2.5.1. Характеристика группы пациентов, критерии включения.....	64

2.5.2. Оценка соматических параметров.....	65
2.6. Статистическая обработка материала.....	66
ГЛАВА 3. БИОЦЕНОЗ КОЖИ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ К АНТИМИКРОБНОМУ ДЕЙСТВИЮ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ	
3.1. Определение состава основных возбудителей, участвующих в развитии акне.....	67
3.2. Отработка оптимальных методов экстрагирования ромашки, зверобоя, конского щавеля, колендулы и солодки.....	67
3.3. Определение чувствительности выделенных микроорганизмов к растительным экстрактам.....	73
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ НИОСОМАЛЬНОГО ГЕЛЯ У БОЛЬНЫХ АКНЕ.	
4.1. Биотехнология приготовления ниосомального геля	84
4.2. Противомикробная активность растительных экстрактов в различных лекарственных формах и исследование возможности образования резистентной микробной флоры.....	90
4.3. Экспериментальная оценка способности проникновения ниосом через дерму.....	93
4.4. Оценка клинической эффективности применения ниосомального геля у больных акне	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	105
ВЫВОДЫ.....	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	113

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

БАВ	биологически активные вещества
ВЛТ	весы лабораторные тензометрические
ГОСТ	государственный стандарт РФ
ГИСК им. Л.А. Тарасевича	Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л. А. Тарасевича
ЖКТ	желудочно-кишечный тракт
Кг	килограмм
КОЕ/мл -	колониообразующие единиц на миллилитр
МЗ СССР	Министерство здравоохранения Союза советских Социалистических республик
Мл	миллилитр
НПО	научно-производственное объединение
НУК	надуксусная кислота
Нм	нанометр
Па	паскаль
ПАВ	поверхностно-активное вещество
ПЭГ	полиэтиленгликоль
РФ	Российская Федерация
СанПиН	санитарные правила и нормы
СтГМУ	Ставропольский государственный медицинский университет
США	Соединенные штаты Америки
ТД	терапевтическая доза
ТУ	технические условия
УРЛ	универсальный рефрактометр лабораторный
УФ-лучи	ультрафиолетовые лучи
ФКУЗ СтамНИПЧИ	Федеральное казенное учреждение здравоохранения "Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
ФГУН	Федеральное государственное учреждение науки
ФС	Федеральный стандарт

ФРГ	Федеральная Республика Германии
D	диаметр
GCP	Good Clinical Practice
H ⁺ и OH ⁻	ионы водорода и гидроксигруппы
HP UV Visible ChemStation	Hewlett Packard Visible ChemStation
m	средняя квадратическая ошибка
ScCO ₂	суперкритичный диоксид углерода
pH	Водородный показатель

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования.

Акне – одно из самых распространенных заболеваний, связанное с нарушением циркуляции гормонов, размножением патогенных бактерий, развитием воспалительных элементов, черных точек, жирного блеска кожи (Адаскевич, В.П., 2001; Арешидзе, Д.А. с соавт., 1990).

Кожная экосистема наиболее обильно населена микроорганизмами, вследствие непосредственного контакта с внешней средой. Представителями микробиоценоза кожи являются коагулазонегативные кокки, коринобактерии, спорообразующие бациллы, непатогенные микобактерии и дрожжеподобные грибки (Водовозова Е.Л. с соавт., 2004; Водовозова Е.Л., с соавт., 2008). Несмотря на такое обилие эпидермального биоценоза, особого внимания заслуживает состав кожного сала. В его составе обнаружено высокое содержание жирных кислот, которые влияют на колонизационную резистентность микрофлоры кожи, оказывая при этом как ингибирующее (на стафилококки и стрептококки), так и стимулирующее действия (на пропионобактерии) (Арзуманян В.Г. с соавт., 2004).

Частыми представителями микробного сообщества, вызывающими воспалительные процессы в сальных железах и всегда присутствующими в комедонах являются *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, реже *Streptococcus* spp., *Propionibacterium acne* и даже обнаруживается представитель семейства Enterobacteriaceae - *Escherichia coli*.

Многие исследователи высказывают мнение о том, что липиды сального секрета, аминокислоты и соли потового секрета являются основными факторами роста возбудителей акне (Давыдов А. Б. с соавт., 1974).

Для лечения заболеваний микробной этиологии широко используют не только антибиотические препараты, но также настои и экстракты лекарственных растений, обладающих антимикробным действием

(Аравийская, Е.Р. с соавт. 1998). Это связано с тем, что прием антибиотиков, как правило, носит затяжной характер, а это негативно влияет как на резистентность патогенных микроорганизмов, так и на нормофлору организма в целом (Адаскевич, В.П. 2000г ; Государственная фармакопея СССР XI издание - М.: Медицина, 1989).

Создание лекарственного препарата растительного происхождения, содержащего комплекс экстрактов, способных как ингибировать рост патогенных микроорганизмов, так и снижать синтез секрета сальных желез позволит решить ряд задач в сфере борьбы с акне.

Необходимость разработки нанопрепаратов местного действия для лечения кожных заболеваний появилась в связи с новыми подходами к созданию носителей лекарственных веществ. Новая область наномедицины - применение системы доставки лекарств с помощью наночастиц различной природы, открыла возможности использования инновационных подходов и для лечения ряда кожных заболеваний. Принцип адресной доставки – сокращение общего количества вводимого препарата в сочетании с оптимизацией его активности, является перспективным и для трансдермального транспорта при лечении таких кожных заболеваний, как акне.

Наиболее изученными переносчиками в области лекарственной терапии являются липосомы и ниосомы. С 1990-х годов, неионогенные везикулы ПАВ рассматриваются в качестве альтернативы липосомам как носители лекарств (Manconi et al., 2006). Преимущества ниосом включают 1) более высокую чистоту и стабильность неионогенных поверхностно-активных веществ по сравнению с фосфолипидами, (т.е. деградацию путём окисления и гидролиза) (Vora et al., 1998), 2) возможность массового производства без использования органических растворителей (Fang et al., 2001), 3) контроль скорости высвобождения лекарственных препаратов и адресация лекарств (Tabbakhian

et al., 2006) путём модификации их состава или поверхности (Alsarra et al., 2005; Schreier and Boustra, 1994).

Акне является самым распространённым заболеванием кожи. Использование выделенных экстрактов из лекарственных растений в качестве сырья для получения антибактериальных препаратов, является также перспективным направлением для наружного лечения этого заболевания.

Актуальной задачей является оценка чувствительности микроорганизмов кожи к действующим компонентам растительных антимикробных препаратов применяемых в виде ниосомальных форм, а также изучение динамики изменений биоценоза во время и после лечения.

Цель исследования – изучение микробиоценоза кожи и разработка антимикробного наногеля с растительными экстрактами, инкапсулированными в ниосомы кремнийорганической природы.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить структуру биоценоза кожи у обследуемых групп и определить состав основных возбудителей, участвующих в развитии акне.
2. Подобрать растительные объекты, обладающие антимикробным действием и отработать оптимальные методы экстрагирования биологически активных веществ из выбранных растений.
3. Определить чувствительность микроорганизмов кожи к растительным экстрактам.
4. Изучить противомикробную активность ниосомальных форм растительных экстрактов и трансдермальную способность разработанного геля.
5. Изучить особенности воздействия ниосомальных форм растительных экстрактов на биоценоз кожи.
6. Исследовать возможность образования микробной флоры, резистентной к растительным экстрактам и их ниосомальным препаратам.

7. Дать оценку эффективности разработанного ниосомального геля для лечения акне.

Научная новизна исследования.

1. Впервые изучена возможность формирования устойчивости условно-патогенных микроорганизмов основных представителей биоценоза кожи к антимикробному действию растительных экстрактов зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum*), ромашки аптечной (*Marticaria recutita*), конского щавеля (*Rúmex confértus*) и солодки голой (*Glycyrrhíza glabra*). Установлена низкая частота образования резистентных форм.
2. Впервые подобрана комбинация растительных субстанций зверобоя, конского щавеля и солодки голой, обладающих выраженным антимикробным действием. Для этого отработаны оптимальные методы экстрагирования растительного сырья.
3. На основании исследования чувствительности к выделенным из акне-элементов микроорганизмам, определены необходимые для бактериостатического и бактерицидного действия концентрации.
4. Впервые разработана технология инкапсулирования полученных экстрактов в ниосомы и отработаны фазы приготовления антимикробного ниосомального геля для лечения акне.

Приоритетность выполненных исследований подтверждена заявкой на патент № 2013100467 от 09.01.2013 г. «Наружное средство для лечения акне на основе кремнийорганических наноконтейнеров». Результаты исследований внедрены в работу Ставропольского краевого кожно-венерологического диспансера, и используются в учебном процессе на кафедрах микробиологии, а также дерматовенерологии и косметологии с курсом ПДО СтГМУ.

Теоретическая и практическая значимость исследования.

Отработана технология экстрагирования лекарственных трав с антимикробным действием. Определена чувствительность выделенных от

больных акне, микроорганизмов, к растительным экстрактам. На основании проведённых исследований разработана технология инкапсулирования полученных экстрактов в ниосомы. Разработаны фазы приготовления и рецептура антимикробного ниосомального геля с растительными экстрактами. Эффективность препарата изучена на больных акне. Разработаны технические условия (ТУ) для производства препарата на базе ООО НПО «Клеточные технологии».

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Микробный пейзаж у обследованных групп населения представлен разнообразными формами, при этом, при развитии акне основная роль отводится представителям семейства *Micrococcaceae*, *Staphylococcus aureus* 41,9% и *Staphylococcus epidermidis* 39,2%, реже (11,7%) встречали *Streptococcus spp.*. В 6,3% случаев у пациентов обнаружили *Enterobacteriaceae spp.*, и в 0,9% *Propionibacterium acne.*

2. Низкий уровень образования микробных форм, резистентных к антимикробному действию растительных экстрактов зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum*), ромашки аптечной (*Marticaria recutita*), конского щавеля (*Rúmex confértus*) и солодки голой (*Glycyrrhíza glabra*) свидетельствуют о перспективе их использования для терапии акне.

3. Ниосомальные формы растительных экстрактов обладают трансдермальным действием и антимикробной эффективностью в отношении патогенной микрофлоры в сальных железах при акне.

4. Ниосомальный антимикробный трансдермальный гель с растительными экстрактами не обладает токсичностью, а результаты проведенных клинических исследований свидетельствуют о его эффективности по сравнению с другими наружными антибактериальными препаратами, предназначенными для лечения акне.

Апробация работы.

Результаты работы докладывались на международных, всероссийских и региональных конференциях, конгрессах и симпозиумах: 8 итоговая конференция молодых учёных с международным участием, СтГМА, Ставрополь, 2010 г.; 17-я ежегодная Неделя медицины Ставрополья. 19-21 сентября 2013 г.; II международная конференция «Инновационные разработки молодых ученых – развитию агропромышленного комплекса», Ставрополь 20-21 сентября 2013г.; V Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины», г.Ростов-на-Дону, 3-5 октября 2013г.; Международная конференция в г. Токио 2013г.(Japan-Russia International Workshop 2013); XXXII международная научно-практическая конференция «Современная медицина: актуальные вопросы», - г. Новосибирск, 11 июня 2014 г.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 4 из них в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки России и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание искомой ученой степени.

Объем и структура диссертации.

Материалы диссертации изложены на 141 страницах компьютерного текста и включают введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, две главы собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы и практические рекомендации, список литературы, включающий 103 отечественных и 185 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 26 рисунками и 5 таблицами.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Научно-методические основы разработки новых трансдермальных препаратов для лечения акне

1.1. Микробиоценоз кожи и микрофлора у больных акне

Кожные покровы представляет собой экосистему, обильно населенную микроорганизмами, вследствие непосредственного контакта с внешней средой. Кожа включает ороговевшие клетки эпидермиса и нормальную микрофлору [Кутасевич Я.Ф., Маштакова И.А., Багмет А.Н., Шаповалова О.В., 2003].

Состояние симбиотической микрофлоры является важнейшим критерием определяющим здоровье кожи. Благодаря метаболической активности нормальной микрофлоры кожных покровов противодействует ее колонизации патогенными микробами [Иванов А.А., 1989].

Наибольшее количество микробов насчитывается в местах, защищенных от действия света и высыхания - подмышечные впадины, межпальцевые и паховые складки, промежность [Коротяев А.И., Бабаичев С.А., 1998].

Микрофлора кожи является наиболее стабильной в ее глубоких слоях, в области устьев сально-волосянных фолликулов. Ее состав варьирует в анатомических зонах, от аэробных или анаэробных условий, особенностей секреции (бактерицидные свойства пота, присутствие жирных кислот, лизоцима в кожном сале), а также близость слизистых оболочек [Иванов А.А., 1989].

Представителями микробиоценоза кожи являются коагулазонегативные кокки (*Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*), коринобактерии, спорообразующие бациллы (*B. subtilis*), непатогенные микобактерии, а также дрожжеподобные грибки *Candida* [Нобл У.К., 1986; Никифоров В.А., Шкарин В.В., 2000].

По мнению ряда авторов, особое внимание заслуживает состав кожного сала, так как высокое содержание жирных кислот влияет на колонизационную резистентность нормофлоры кожи, оказывая при этом как ингибирующие (на стафилококки), так и стимулирующие действия (на пропионобактерии) [Нобл У.К., 1986; Клемпарская Н.Н, 1989; Кутасевич Я.Ф., Маштакова И.А., Багмет А.Н., Шаповалова О.В., 2003].

Способность кожи пропускать или задерживать различные вещества является ее проницаемостью [Чернуха А.М., 1982]. Выделяют два альтернативных пути проникновения: трансдермальный и через волосяные фолликулы («шунт»). Первый путь проникновения происходит через тонкий запасующий, практически непроницаемый роговой слой [Скрипкин Ю. К., Мордовцев В.Н., 1999; Elias M., 1983; Stoughton R.B., 1989]. Барьерным механизмом кожи является кератин [Elias M., 1983].

Кожа является непроницаемым барьером для различных микроорганизмов и веществ, однако их длительное воздействие может явиться следствием их проникновения [Чернуха А.М., 1982]. Липиды и жирорастворимые могут достаточно быстро преодолевать кожный барьер, в отличие от воды и водных растворов [Скрипкин Ю. К., Мордовцев В.Н., 1999].

Нарушение нормальных физиологических процессов, определяющих иммунореактивность организма на колонизационную резистентность микроорганизмов, способствует быстрому размножению условно-патогенных бактерий, еще до развития каких-либо патологических процессов [Клемпарская Н.Н, 1989;].

При травмах, потертостях, потливости, экзематозных поражениях кожи происходят процессы гнилостного разложения, отторжения эпидермиса, воспаление сальных и потовых желез, что служит показателем увеличения грамотрицательных бактерий и нарушением микробиоценоза кожи [Коротяев А.И., Бабаичев С.А., 1998]. Такая закономерность актуальна и для угревой

болезни, когда еще до появления признаков воспалительных изменений в сальных железах уже просматривается микробный дисбаланс, который позже способствует развитию гнойно-деструктивных процессов [Корчак И.В., Проценко О.А., Гриценко Л.З., 1998].

Наиболее часто встречаемыми микроорганизмами, вызывающими воспалительные процессы в сальных железах и всегда присутствующими в комедонах являются *P.acne*, *Staphylococcus epidermidis* и другие кокки, липофильные дрожжи рода *Pityrosporum (P.ovale et orbiculare)*. Кокки, в том числе *Staphylococcus epidermidis*, обнаруживаются в основном в верхней части воронок волосяных фолликулов или в местах открытия протоков потовых желез и не играют значимой роли в патогенезе угревой болезни. Основным агентом, играющим ключевую роль в развитии инфекции, является *P.acne*. Однако чаще всего микроб встречается в ассоциации с дрожжеподобной флорой (*P.ovale*). Эти возбудители продуцируют липазу, активируют комплемент, усиливают десквамацию устья волосяного фолликула, приводя к его закупорке [Проценко Т.В., 2001].

В 2000 году группой зарубежных исследователей было высказано мнение о том, что 99 % нормافлоры кожи представлено пропионовыми бактериями, стафилококками и дрожжами рода *Malassezia*, которые ассоциируются с такими заболеваниями как, акне и себорейный дерматит [Till A.E., Goulden V., Cunliffe W.J., Holland K.T., 2000].

В настоящее время для исследования микрофлоры кожи и выделения доминирующей группы микробов пользуются тремя основными методами, предложенные еще в 1986 году У.К. Ноблом.

Метод отпечатков является наиболее часто используемым на практике, однако при сравнении с методами смывов или соскобов и биопсии дает широко варьирующие данные. Для культивирования этим методом используют герметичные стерильные контейнеры – бакпечатки, на которые

предварительно наносят питательную среду и облучают УФ-лучами [Арзуманян В.Г., Зайцева Е.В., Темпер Р.М. и др., 2004].

Согласно исследованиям *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* и *S. aureus* установлено, что лишь 10 % штаммов *S. epidermidis* и *S. haemolyticus* обладают липолитической активностью. Однако, 95 % штаммам *S. aureus* характерна аналогичная активность, а также присуща гемолитическая и коагулазная [Арзуманян В.Г., Зайцева Е.В., Темпер Р.М. и др., 2004; Tyski S., Ciborowski P., Hryniewicz W., Jeljaszewicz J., 1983].

Основными факторами роста всех вышеперечисленных микробов являются липиды сального секрета, аминокислоты и соли потового секрета [Noble W.C., 1993].

Сальные железы связаны с волосяными фолликулами и обнаруживаются практически на всех участках кожи. По мнению Альберта Клигмана, секрет сальных желез является атавизмом, который утратил свое назначение и кожа человека при его отсутствии могла бы выглядеть гораздо лучше [Нобл У.К., 1986; Майорова А.В., Шаповалов В.С., Ахтямов С.Н., 2005].

На поверхности кожи находятся эпидермальные липиды и липиды, которые синтезируются в сальных железах. В состав эпидермальных липидов входят линолевая кислота, церамиды и стеринны, которые препятствуют проницаемости клеток [Самгин, М.А., 2001].

Повышенное содержание фолликулярного сульфата холестерина, усиливающего адгезию кератиноцитов в акроинфундибулуме, является причиной накопления филагрина и профилагрина. Результатом становится ороговение и адгезия клеток, формирование роговой пробки, скопление сального секрета и прекращение доступа кислорода [Майорова А.В., Шаповалов В.С., Ахтямов С.Н., 2005].

Вышеописанная картина является универсальной средой для развития *P. acnes* – анаэробной липофильной бактерии, часто встречаемой на поверхности кожи [Машкиллейсон А.Л., Гомберг М.А., 1996].

Микроорганизмы этого вида способны синтезировать хемоаттрактанты, которые притягивают лейкоциты и формируют инфильтрат. Продуцируя ферменты и синтезируя липазу *P. acnes* способна повреждать стенку фолликула, что приводит к контакту содержимого комедона с тканями, тем самым провоцируя развитие воспаления [Мурзина Е.О., 2000; Майорова А.В., Шаповалов В.С., Ахтямов С.Н., 2005].

Большинство отечественных и зарубежных авторов отводят ведущую роль *P. acnes* в развитии угревой болезни (Гусаков Н.И., 2004; Суворова К.Н. и соавт. 2005; Dreno B. et al., 2001). Однако в микробиологическом исследовании, проведенном J.P. Leeming et al. (1988) 10,7% закрытых комедонов и 7,1% открытых комедонов не содержалось *P. acne*, *Staphylococcus spp* и *Pytirosporum spp*, а зрелые комедоны были более колонизированы микроорганизмами, чем молодые. Эти результаты ставят под сомнение роль *P. acne*, как индуктора комедонообразования. Кроме того, по данным F. Ochsendorf (2006), количество *P. acnes*, выделяемых у пациентов с угревой болезнью, не коррелирует с тяжестью воспаления, а снижение количества *P. acnes* не находится в прямой зависимости от динамики регресса клинических проявлений (Ochsendorf F., 2006).

Известны также сапрофитные микроорганизмы, постоянно присутствующие на коже и в волосяных фолликулах. Такие бактерии, как стафилококки (золотистый и эпидермальный), микрококки, грибы рода *Candida* и *Pytirosporum*, не являются непосредственной причиной заболевания, но могут провоцировать местные воспалительные процессы (Аравийская Е.Р. и соавт. 1998). Однако по мнению В.П. Адаскевич (2000), непосредственной причиной воспаления в сальной железе являются коринебактерии акне или стафилококки. Ряд зарубежных авторов (Leeming

J.P., Holland K.T. et al., 1984; Nishijima S. et al. 2000) из акне-элементов выделяли *Pityrosporum* spp., *Propionibacterium* spp, *Staphylococcus* spp (*S. epidermidis*). Эти данные подтверждает В. Dreno et al. (2001), который у пациентов с акне выделял *S. epidermidis* в 95% случаев, *P. acnes* в 90%, *S. capitis* в 47,5%, *Micrococcus* в 47,5% случаев.

Представляет интерес исследования В.П. Адаскевич (2000), обнаруживающие у *Staphylococcus* spp., как и *P. acnes*, выработку фермента липазы, в результате накопления которой, происходит гидролиз кожного сала в свободные жирные кислоты, оказывающие раздражающее действие на окружающие ткани, вызывая в них воспаление. В свою очередь, росту бактерий способствует гиперсекреция кожного сала и увеличение проницаемости фолликулярного эпителия.

1.2. Использование антимикробных и других препаратов для лечения акне

Современные научные исследования в области разработки инновационных систем доставки лекарств являются одним из самых перспективных и быстроразвивающихся направлений во всём мире. Повышение эффективности новых лекарств, связано с усилением их адресности за счёт трансдермального пути приникновения. Благодаря новым трансдермальным системам доставки появилась возможность оптимизации терапии различных заболеваний, в том числе акне.

Актуальность исследования акне диктуется масштабами заболеваемости, рецидивирующим, часто осложняющимся течением, а также особенностями возрастного контингента больных.

Акне (угревая болезнь) – одно из самых распространенных заболеваний, характеризующееся появлением прыщей, черных точек, жирного блеска кожи, сопровождающееся психологическими проблемами, депрессиями [Адаскевич В.П., 2000].

Ключевыми факторами развития акне является нарушение циркуляции гормонов, дисбаланс липидов, размножение патогенных бактерий и развитие воспаления. Повышенная продукция кожного сала сальных желез предшествует развитию угревой сыпи [Самгин М.А., Монахов С.А., 2003].

Клинические наблюдения зарубежных авторов свидетельствуют о проявлении акне у подростков в 90% случаев. Этот факт, по их мнению, является атрибутом пубертатного периода.

По мнению отечественных исследователей, данным заболеванием страдают молодые люди старше 25 лет, причем болезнь протекает в тяжелой форме [Кубанова А.А., 2003; Самгин М.А., Монахов С.А., 2003].

По мнению ряда авторов при акне нарушаются процессы ороговения в устье волосяных фолликулов, куда открывается просвет сальной железы и это приводит к закупорке фолликулярного протока и образования микрокомедона. Прекращение доступа кислорода, скопление кожного сала и отмерших роговых чешуек способствуют быстрому размножению бактерий [Кубанова А.А., 2003].

По мнению Даниловой А.А. и Шеклаковой М.Н., лечение пациентов с акне требует комбинационного подхода в сочетании наружных и системных препаратов. При назначении терапии учитывается длительность протекания процесса, его распространенность, тип поражения кожи, тяжесть, глубина поражения, гормональные нарушения и другие факторы.

Форма течения акне, как правило, характеризуется количеством воспалительных элементов.

Исходными морфологическими элементами развития акне являются комедоны, часть которых впоследствии может становиться ключевой формой папул, пустул, узлов и кист [Самгин М.А., Монахов С.А., 2003].

Образование комедонов начинается с повышения салоотделения на коже и волосяной части головы. Скопление роговых эпителиальных клеток в устье волосяного фолликула формирует комедоны – шарообразные узлы,

которые на фоне себореи способствуют развитию закрытых и открытых структур. При открытой форме комедона, содержимое фолликула свободно перемещается, что ведет к образованию черных угрей [Аравийская Е.А., 1998].

Часть комедонов преобразуется в папулы, а в случае их воспаления влечет за собой гнойную деструкцию фолликула - пустулы. Папула является морфологической формой кожной сыпи, характеризующейся бесполосным образованием, возникающим в ходе воспалений сально-волосяного фолликула, в результате миграции нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов. Морфологический элемент, представляющий пузырек с гноем образует пустулу. Папуло-пустулезные высыпания могут локализоваться на лице, шее, груди, плечах и спине [Кубанова А.А., 2003].

Наиболее серьезным проявлением акне является киста – патологическая полость в тканях, имеющая стенку и содержимое. По морфологической структуре кисты имеют дермальное и субдермальное фолликулярное происхождение [Аравийская Е.А., 1998].

Асептическое воспаление вследствие разрыва кист приводит к образованию узлов - инфильтрата, развивающегося в глубоких слоях дермы и подкожной клетчатки, образующегося в результате деформации стенки сального фолликула и выхода из него. Узлы достигают верхней части подкожной клетчатки, где они часто сливаются в конгломераты, в дальнейшем превращающиеся в абсцессы [Кубанова А.А., 2003].

Другим морфологическим элементом акне является рубец, который формируется из коллагеновых волокон соединительной ткани в результате регенерации. Узелковые элементы, плотноватой консистенции - от розовато-красного до желтовато-бурого цвета, как правило, локализуются на лице. При диаскопии регистрируют феномен «запыленности». На месте разрешившихся элементов формируются мелкие атрофические рубцы [Качук М.В., Музыченко М.В., 2001].

Обязательным и важнейшим методом лечения акне при наличии воспалительных элементов на коже является применение антибактериальных средств. Коррекция таких нарушений включает в себя элиминацию условно-патогенных микроорганизмов [Страчунский Л.С., Козлов С.Н. 2002].

Характерный представитель угревой болезни - *P. acnes*, чувствителен к различным антибиотикам, включая ампициллин, клиндамицин, эритромицин, тетрациклин, доксициклин, надифлоксацин, офлоксацин, миноциклин, цефалексин и гентамицин, но, несмотря на это, данный перечень препаратов является не эффективными в силу того, что они не способны проникать в фолликулярный аппарат и сальную железу [Leyden J.J. 2001].

Наиболее распространенными антибактериальными препаратами, применяемыми для лечения акне, являются тетрациклины и макролиды [Аравийская Е.А. и соавт. 1998].

Тетрациклин и его производные (доксициклин, вибрамицин, юнидокс солютаб, медомицин, метациклин, миноцин) являются препаратами выбора, они накапливаются в сальных железах, снижают уровень коллагеназ, тем самым подавляют активность пропионебактерий [Шиханова Е.Н., 2008; Akamatsu H. et. al. 1992; Tan НН., 2004].

Однако, по данным А.В. Майорова, В.С. Шаповалова и С.Н. Ахтямова (2005), несмотря на обладание широким спектром действия, многие бактерии проявляют резистентность к препаратам тетрациклинового ряда.

По мнению Ключева М.А. (1989), Страчунский Л.С., Козлов С.Н. (2002), длительный прием тетрациклинов сопровождается побочным действием связанных с расстройством функции кишечника, поражением кожи и слизистых оболочек полости рта и желудочно-кишечного тракта.

Тетрациклин и диоксидин в период активного солнца запрещены для употребления беременным, кормящим и детям до 13 лет, что связано с их фототоксичным эффектом [Шиханова Е.Н., 2008].

Прием метациклина может вызывать аллергические реакции, желудочно-кишечные расстройства, дисбактериозы и кандидозные осложнения [Клюев М.А., 1989].

Другими исследователями, характеризующими тетрациклины – как препараты для лечения угревой болезни, также отмечается их негативное действие на развитие синдрома псевдоопухоли мозга, тубулярного некроза и фототоксических реакций [Akamatsu H. et. al. 1992; Tan HH., 2004].

В качестве прототипа или более безопасного аналога можно использовать макролиды, а именно эритромицин [Аравийская Е.А. и соавт., 1998; Страчунский Л.С., Козлов С.Н. 2002].

Макролиды являются препаратами альтернативного выбора, которые обладают более низкой липофильностью и менее эффективно ингибируют липазы, по сравнению с тетрациклинами [Аравийская Е.А. и др. 1998]. Они относятся к числу наименее токсичных антибиотиков и делятся на природные (эритромицин, спирамицин, мидекамицин) и полусинтетические (klarитромицин, рокситромицин, азитромицин) [Ткаченко Е.И., Успенский Ю.П., 2006].

В своей монографии Л.С. Страчунский и С.Н. Козлов (2002) отмечают, что прием макролидов вызывает диспептические и диспепсические явления, обусловленные стимуляцией моторики ЖКТ. Также, Клюев М.А. (1989), описывает побочное действие эритромицина – рвота, понос и аллергические реакции. К числу недостатков эритромицина относят частую кратность применения в течение суток, лекарственные взаимодействия с эуфиллином, карбамазепином [Майорова А.В., Шаповалова В.С., Ахтямова С.Н., 2005].

По результатам исследования F. Ochsendor (2006) достоверных отличий в эффективности лечения антибиотиками тетрациклинового ряда и макролидами не установлено [Шиханова Е.Н., 2008].

При папуло-пустулезных и индуративных формах акне применяют клиндамицин [Noble W.C., 1990], однако существуют сведения о его влиянии

на подавление анаэробной неспорообразующей микрофлоры кишечника и размножения *Clostridium difficile* [Страчунский Л.С., Козлов С.Н., 2002].

Современным эффективным средством лечения акне является изотретиноин или Роаккутан, который обеспечивает стойкую ремиссию, предотвращает рубцевание, за счет подавления продукции кожного сала [Качук М.В., Музыченко М.В., 2001; Самгин М.А., 2002; Шиханова Е.Н., 2008]. Несмотря на положительное влияние на процессы пролиферации и дифференцировки эпителиоцитов и себоцитов, при лечении изотретионином регистрируют побочное действие на кожу и слизистые. При пероральном приеме изотретиноина возрастает риск тератогенного эффекта. [Zouboulis С., 1996]. Отмечаются реакции со стороны кожи и слизистых оболочек, повышение показателей функциональных проб печени, нарушение липидного обмена, нарушения поведения, депрессии [Майорова А.В., Шаповалова В.С., Ахтямова С.Н., 2005].

J. Leyden (1986) отмечает выраженное усиление колонизации золотистым стафилококком, а вследствие этого - появление фурункулов и изотретиноининдуцированного ринита [Pleving G., Kligman A.M., 1993]. К недостаткам данного препарата также можно отнести его высокую себестоимость [Cargnello J.A., 1996].

При гормональных нарушениях может назначаться терапия с применением половых гормонов. При выраженной андрогенизации терапия угревой болезни предусматривает использование ципротерона ацетата и диногеста [Сметник В.П., Тумилович Л.Г., 1997]. Такие препараты подавляют выброс гонадотропинов, обладают кортикостероидным действием, однако их прием повышает риск развития опухоли печени [Потекаев Н.С., и др., 1993; Van Wayjen R.J., 1995].

Высокая эффективность в терапии гиперандрогенных акне у женщин отмечена у эстраген-гестагеновых препаратов [Гомболевская С.Л., Потекаев Н.С., 1998]. Зарубежные авторы отмечают, что монотерапии гормонами

недостаточно и длительная терапия антиандрогенными препаратами мало эффективна [Cargnello A., 1996; Jansen T., Pleving G., 1999].

Другим препаратом, блокирующим андрогенные рецепторы является спироналактон, обладающий прогестагенным действием [Shaw J.C., 1991]. Длительный прием того препарата согласно результатам исследований Lubbos H.G. (1998) повышает риск возникновения опухолей молочной железы.

Для лечения тяжелых форм акне с выраженной пустулизацией, деструкцией тканей, тяжелым кистозным и нагноительным процессом применяется комбинация системной и наружной терапии. Исключение составляет изотретиноин, применяющийся, как монотерапия [Суворова К.Н., Гомболевская, 1996; С.Л. Колесниченко С.А., 1999].

Наиболее частым проявлением заболевания в подростковом возрасте являются невоспаленные комедоны. Для лечения используют наружные средства (препараты салициловой кислоты, адапален, изотретиноин и др.), которые уменьшают образование комедонов и подавляют развитие патогенных микроорганизмов [Кушлинский Н.Е., Самсонов В.А., Саламова И.В., 1994; Аджмал М. Х., 1996].

Одним из препаратов наружного действия является бензоилпероксид, обладающий кератолическими и бактериостатическими свойствами. Препарат способствует ингибированию роста *S. epidermidis* и *P. acnes*. При длительном применении препарата может возникнуть фоточувствительность за счет истончения рогового слоя эпидермиса [Майорова А.В., Шаповалова В.С., Ахтямова С.Н., 2005].

В настоящее время создан широкий ассортимент антибактериальных кремов и мазей, широко применяемых для лечения акне. Действующим веществом в таких препаратах являются антибиотики широкого спектра действия: эритромицин (Зинерит, Даверцин, эрифлюид), тетрациклин (Амрацин) и, клиндамицин (Делацин-Т) [С.Л. Колесниченко С.А., 1999].

Местное применение таких препаратов позволяет уменьшить риск развития побочных эффектов, дает возможность увеличивать концентрацию активного вещества [Gibson J.R., 1996; Gollinick H., Shramm M., 1998; Toyoda M., Morohashi M., 1998].

Однако, по мнению Соколовской Е.В. (1998) сочетание наружных антибактериальных средств с местной терапией часто приводит к развитию резистентных штаммов микроорганизмов.

Легкая форма акне характеризуется образованием незначительного количества папул и пустул для лечения, которых используют наружно спиртовые растворы, обладающие кератолитическим, комедонолитическим и антибактериальным действием [Ковалев В.М., 1991]. В настоящее время при легкой и средней степени тяжести акне применяют довольно большое количество различных препаратов для наружной (местной) терапии: кремы, гели, мази, лосьоны и т.п., содержащие активные вещества, препятствующие образованию комедонов или разрушающие их, уменьшающие образование кожного сала и воспаление. К веществам такого рода относят ретиноиды, антибиотики, бензоилпероксид и другие [Самгин М.А., Монахов С.А., 2002].

Наиболее широко используются антибактериальные средства, синтетические ретиноиды, производные азелаиновой кислоты [Leyden J., 1986].

Ретиноиды, обладают комедонолиптическим действием, уменьшают продукцию кожного сала, оказывают противовоспалительное действие за счет торможения выработки воспалительных цитокинов и ингибирования колонизации *P. acnes* [Zouboulis C.C., 1996; Cunliffe W.J., 2000].

Ретиноидом третьего поколения является Дифферин. Он быстро проникает в фолликулы и путем избирательного связывания со специфическими рецепторами кератиноцитов, обеспечивает лучшую переносимость по сравнению с третиноином [Самгин М.А., Монахов С.А., 2002; Shalita A.R., 2001; Tu P., Zhu X.-J., 2001].

Азелоиновая кислота - природная дикарбоновая кислота, обладающая способностью торможения биосинтеза клеточных белков, проявляет антиоксидантные свойства. По мнению ряда отечественных исследователей препарат нормализует процессы кератинизации, вследствие угнетения продукции филаргина и уменьшения формирования кератина [Адаскевич В.П., 2000; Кохан М.М., 2001]. Скинорен или азелоиновая кислота обладает противокелоидным действием [Самцов А.В., Шимановский Н.Л., 1999]. При применении скинорена в первые две недели может образоваться ритема, зуд, жжение и шелушение [Майорова А.В., Шаповалова В.С., Ахтямова С.Н., 2005]. В одиночку азелоиновая кислота малоэффективна, она хорошо работает в сочетании с другими противоугревыми средствами, однако часто вызывает раздражение [Webster G., 2000].

К препаратам, содержащим клиндамицин, относится Далацин. Препарат обладает бактериостатическим действием и уменьшает количество свободных жирных кислот на коже. Однако при повышенной чувствительности к клиндамицину, он противопоказан [Самцов А.В., Шимановский Н.Л., 1999].

Куриозин гель – препарат, содержащий геалуронат цинка, обладающий выраженным асептическим действием. Содержание цинка ускоряет процесс деления клеток. Куриозин гель не обладает фотосенсибилизирующими свойствами [Cunliffe W.J., 2000].

Препараты для наружного применения, содержащие метранидозол, оказывают бактериостатическое действие. Такие препараты, как правило, назначают на фоне применения пероральных антибиотиков, иначе их использования при лечении акне имеет незначительный эффект [Майорова А.В., Шаповалова В.С., Ахтямова С.Н., 2005].

Бензамицин является комбинированным препаратом для наружного применения в форме геля. Эритромицин, входящий в состав препарата действует бактериостатически на *P. acnes*, бензоилпероксид оказывает

кератомическое и десквамативное действие [Gibson J.R., 1996]. Большинство средств с бензоилпероксидом раздражает и сушит кожу, особенно те, в которых его концентрация высока, или он сочетается с другими раздражающими кожу ингредиентами [Johnson B.A., Nuntley J.R., 2000].

Для химических пилингов часто используют альфа-гидроксикислоты (яблочная, тартаровая, цитрусовая, молочная и гликолевая) [Олисова О.Ю., Галлиулина Н.И., 2004].

Однако, несмотря на широкий ассортимент препаратов, антибиотикотерапия у пациентов с акне, как правило, носит затянутый характер, что может сопровождаться не только дисбактериозом, но и оказывать негативное влияние на организм в целом.

Для лечения заболеваний микробной этиологии широко используют лекарственные растения, обладающие антимикробным действием [Головкин Б.Н., Руденская Р.Н., Трофимова И.А., Шретер А.И., 2001].

Растения содержат широкий перечень разнообразных веществ и при переводе их в более доступную форму, можно достигнуть высокой профилактической и лечебной эффективности [Бирюков И.В., 2005].

В организме человека растительные препараты не только оказывают антимикробное действие, но и повышают его защитные силы. Механизмом лечебного действия растительных субстанций в известной степени объясняется и тот факт, что к антибиотикам из растений резистентность микробов возникает гораздо реже и медленнее [Авакьянц Б.М., 2001].

В растительных субстанциях можно обнаружить такие питательные вещества, как флавоноиды, фитогормоны, дубильные вещества, гликозиды, алкалоиды, а также уникальные вещества органического происхождения – биогенные стимуляторы [Кородецкий А., 2007]. Изучение биологически активных веществ растительного происхождения, проведенное сотрудниками Главного ботанического сада имени Н.В. Цицина РАН, позволило установить, что одно и то же растение может явиться источником широкого

спектра компонентов, обладающих различными свойствами [Головкин Б.Н., Руденская Р.Н., Трофимова И.А., Шретер А.И., 2001].

Важнейшим качеством антибактериальных препаратов, приготовленных из растительных субстратов, является их экономические преимущества. В связи с этим, изучение эффективности применения растительных субстратов в качестве источника биологически активных веществ, является перспективным направлением [Кедрова М., 2006].

Растительные субстанции содержат целый комплекс питательных веществ и при их переводе с помощью экстрагирования в доступную для микроорганизмов форму можно рассчитывать, что они могут явиться ингибиторами роста микробов [Авакьянц Б.М., 2001].

На сегодняшний день существует много растительных объектов, которые нашли широкое применение в народной медицине, и успешно применяются в научной медицине, в том числе в микробиологии. Так, особый интерес, на наш взгляд, представляет трава зверобоя продырявленного [Кугач В.В., Никульшина Н.И., Ищенко В.И., 1988].

В составе зверобоя продырявленного *Hypericum perforatum* L./ (семейство *Guttiferae*) обнаружены фотоактивные конденсированные антраценовые производные (гиперицин, псевдогиперицин, протопсевдогиперицин, и др.), флавоновые соединения: гликозид гиперозид, кверцетин, рутин, кверцетрин, изокверцетрин и кверцетин. В траве содержатся эфирные масла, дубильные вещества, смолы, антоцианы, сапонины, каротин, никотиновая и аскорбиновая кислоты, витамин Р, цериловый спирт, холин, следы алкалоидов, микроэлементы (Mn, Zn), биофлавоновые соединения, главное из которых – авентофлаван, который обладает противовоспалительной активностью [Машковский М.Д., 1993].

Фитоэкстрагены, катехины зверобоя могут влиять на продукцию и биологическое действие андрогенов и других гормонов [Liao S., 2001; Kawai N., 2003].

Зверобой издавна пользуется популярностью в народной медицине. Название растения происходит от казахского «джерабой», что означает «целитель ран». Первые научные сведения об этом растении относятся ко временам Гиппократ (460-377 годы до н.э.). Плиний давал советы по лечению зверобоем, писал о нем и Авиценна [Лавренков В.К., Лавренова Г.В., 1999].

Русская народная медицина называет зверобой «травой от девяноста девяти болезней». Трава зверобоя обладает многосторонними фармакологическими свойствами: вяжущим, антимикробным, противовоспалительным, кровоостанавливающим, обезболивающим, ранозаживляющим эффектом.

В научной медицине известен препарат «Новоиманин» - антибактериальное средство, представляющее собой комплексный препарат, содержащий антраценпроизводные (гиперицин), флавоноиды, катехины и другие фенольные соединения, экстрагируемых ацетоном; после удаления ацетона комплекс веществ растворяют в 95% этаноле. Применяют наружно при лечении гнойных ран, абсцессов [Оганесян Э.Т., Симонян А.В., Чомаева С.Х., 1992].

Зверобой и зверобой содержащие препараты используют при лечении тяжелых ожогов, гнойно-воспалительных процессах кожи и подкожной клетчатки. Они оказывают антибактериальное действие на грамположительную гноеродную микрофлору, обладает противовоспалительным действием, влияют на регенерацию тканей и некоторые стороны иммуногенеза (усиление фагоцитоза) [Дербенцева Н.А., 1972]. Результаты исследований Н.И. Горюхи (1988) по использованию зверобоя, свидетельствуют о сокращении сроков выздоровления и улучшении показателей крови.

Для лечения кожных заболеваний также очень эффективны различные горячие ванны из настоев зверобоя с ромашкой. Эффективность применения

зверобоя очень высока. Таким способом лечат различные воспаления кожи - прыщи и различные женские воспалительные заболевания [Горьков В.А., Раюшкин В.А., Олейчик И.В., Чурилин Ю.Ю., Карамышева Е.И., 2000; Дробижев М.Ю., Сыркин А.Л., Полтавская М.Г., Печерская М.Б., 2002; Багай Т., Грунце Х., Сарториус Н., 2008].

В качестве антисептического средства для лечения ран применяют ромашку аптечную. Входящее в ее состав эфирное масло оказывает противомикробное действие на широкий спектр микроорганизмов. Эфирное масло цветочных корзинок ромашки лекарственной содержит хамазулен, кадинен; флавоноиды, никотиновую и аскорбиновую, каприловую, антемисовую, изовалериановую, салициловую кислоты, кумарины, холин, фитостерины, каротин, горечи, слизи, камедь, сахара, белковые вещества, а также гликозид спазмолитического действия, расслабляющий гладкую мускулатуру и обезболивающий при кишечных спазмах, гликозид потогонного действия, апигенин, апиин, герниарин, матрицин [Соколова Л.Н., Белова Л.Ф., Киселева Е.Я., 1972].

Экстракт ромашки оказывает на кожу противовоспалительное, противоаллергическое, смягчающее, обезболивающее, увлажняющее, регенерирующее, успокаивающее и ранозаживляющее действие. В косметике применяется в препаратах детского ассортимента (мыло, кремы, лосьоны), зубных пастах, кремах для лица и рук, губных помадах, средствах для загара, маслах для ухода за кожей тела, шампунях и ополаскивателях. Настой ромашки оказывает лёгкое окрашивающее действие на светлые волосы, придавая им золотистый оттенок [Yokota T., Nishio H., Kubota Y., Mizoguchi M., 1998].

В составе ромашке обнаруживают антимисовую кислоту, гликозид, а также азулен, который обладает противовоспалительными свойствами, ослабляет аллергические реакции, усиливает процессы регенерации.

Выделенное из ромашки вещество – апигенин, оказывает спазмолитическое действие [Машковский М.Д., 1987; Огарков В.Н., 2004].

Вытяжку из ромашки часто используют в средствах для ванны и кремах, предназначенных для кожи с воспалительными элементами и поврежденным барьером, в том числе и для ухода за кожей в области подгузника [Yokota T., Nishio H., Kubota Y., Mizoguchi M., 1998].

Очень часто в медицинской практике применяют корни и подземные побеги многолетних дикорастущих травянистых растений, к ним относится Конский щавель, который оказывает полезные и лечебные действия на организм, из-за чего применяется в народной и традиционной медицине для лечения многих заболеваний. Полезные свойства конского щавеля обусловлены его целебным составом [Машковский М.Д., 1993; Семенова А.Н., 2004].

Корни конского щавеля содержат до 4% производных антрахинона, в составе которых имеются хризофановая кислота (хризофанол), эмодин. Корни и корневища конского щавеля содержат дубильные вещества (8-12%), кофейную кислоту и флавоноид неподаин. В плодах содержатся производные антрахинонов и дубильные вещества. В листьях конского щавеля найдены флавоноиды - гиперозид, рутин, аскорбиновая кислота и каротин. В цветках содержится аскорбиновая кислота. Во всех органах растения имеется большое количество щавелево-кислого кальция. В корнях и корневищах содержание его достигает 9% [Соколова Л.Н., Белова Л.Ф., Киселева Е.Я., 1972].

Конский щавель обладает противовоспалительным, вяжущим, противомикробным, спазмолитическим, гипотензивным, отхаркивающим, противоатеросклеротическим, мочегонным, желчегонным, репаративным, кровоостанавливающим и седативным свойствами [Муравьева Д.А., 1991]. Наружно настой и отвары конского щавеля используются для полосканий при воспалительных заболеваниях полости рта (ангина, язвенные стоматиты

и др.). В народной медицине отваром конского щавеля лечат также кожные болезни [Государственная фармакопея СССР XI издание, 1989; Соловьева В.А., 2005].

Особый интерес представляет Солодка голая (лакричник, солодковый или лакричный корень) *Glycyrrhiza glabra* L. /, семейства бобовых. Качественный состав корня очень разнообразен. Содержащаяся в значительных количествах в корне глицирризиновая кислота представляет собой гликозид, агликон которого - глицирритиновая кислота, а сахаристая часть состоит из двух молекул глюкуроновой кислоты. По тритерпеноидам солодки на сегодняшний день опубликованы много исследований: как отечественных, так и зарубежных.

Многообразие сторон действия корней солодки обусловлено во многом глицирризиновой кислотой, в том числе ее тритерпеновым агликоном: минералокортикоидоподобный эффект, противовоспалительная активность, антидотное действие; ярко выраженный, определяемый, антиаллергический эффект и широкое антибиотическое и антисклеротическое действие.

Впервые флавоноиды в подземных органах солодки голой были найдены в 1934 году. Несколько позднее некоторые из них были выделены и идентифицированы как ликвиритин, ликвиритигенин, изоликвиритин, изоликвиритигенин [Литвиненко В.И., Максютин Н.П., Колесников Д.П., 1963].

В корнях и траве содержится эфирное масло приятного запаха, однако количества его невелики, поэтому предполагать его практическое применение нет оснований. Но состав его практически расшифрован: в него входят альдегиды, кетоны, спирты - тиглиновый альдегид, бензальдегид, метилэтилкетон, ацетоны, пентанол, гексанол, диметил-фенэтиловый и другие спирты.

Некоторые авторы характеризуют солодку как дубильное сырье, так как корень ее содержит 8,4% дубильных веществ. Трава же - более 5%

дубильных веществ обеих групп (пирокатехиновой и пирогалловой). Есть рекомендации к использованию стеблей для выработки волокна, общий выход его составляет 13%.

Корни солодки содержат 2,5% соединений кумариновой природы [Степанова Э.Ф., 1988]. В составе *Glycyrrhiza glabra* обнаружены ликуразид, глицерризиновая кислота, флавоноиды, слизистые и другие фармакологически активные вещества. Глицериновая кислота является тритерпеноидным гликозидом и обладает противовоспалительным действием. Ликвиритозид – флавононовый гликозид и 2,4,4-триоксихалкон оказывают спазматическое действие. Пентациклический тритерпен – карбеноксолон – ускоряет заживление [Ладыгина Е.А., Морозова Р.С, 1989; Яковлев Г.П., Челомбитко В.А., 1990; Муравьева Д.А., 1991].

Солодковый корень входит в сбор грудной №2, входил в состав капель «датского короля». Включен в композицию «пектала», по-прежнему популярны в детской практике сироп солодкового корня, грудной эликсир. Сегодня солодковый корень - это источник элективных и технологически более совершенных препаратов: глицирама, имеющего широкий спектр действия, применяющегося при бронхиальной астме, аллергических дерматитах и т.д. Ликвиритон - представляет сумму флавоноидов, выделенных из корней солодки и успешно применяется для лечения неосложненной язвенной болезни желудка.

Аналогичные препараты выпускаются за рубежом: биогастрон в ФРГ, карбеноксолон, обладающий также противоязвенным действием, не влияющий на водно-солевой обмен, что снижает их ценность. В этом отношении несколько лучше зарубежный препарат такого же типа Caveds [Машковский М.Д., 1993].

Таким образом, наружное использование вышеуказанных растительных субстратов, обладающих антимикробным и противовоспалительным действием, является весьма перспективным для лечения акне.

1.3. Микрокапсулирование для трансдермальной доставки активных веществ

Индустрия направленного внедрения мелких частиц вещества в тонкую пленкообразную оболочку материала называется микрокапсулированием. Такой процесс позволяет получить продукт в виде отдельных микрокапсул [Давыдов А. Б. 1974].

Датой рождения микрокапсулирования принято считать 1953 год, когда американская фирма «National Cash Register» предложила самокопирующую бумагу, приготовленную из микрокапсул с красителями для массового использования во всех отраслях промышленности. Однако фундаментом или базовыми источниками развития такого направления явились работы Бунгенберга де Йонга, исследовавшего комплекс «полимер – растворитель», а также П.А. Ребиндера и А.И. Опарина, изучавших явление коацервации [Солодовник В.Д., 1980].

Предпосылки к развитию такого мощного актуального направления как микрокапсулирование, были зарегистрированы еще в 1800 г. французским исследователем Мозесом. Он предложил использовать желатин, в качестве водорастворимой оболочки для получения лекарственных капсул [Солодовник В.Д., 1980].

Капсула – это миниатюрный контейнер, который защищает биологически активные вещества, находящиеся в ней от испарения, окисления и загрязнения [Bojana Bon, Boštjan Šumiga, 2008; Kumar Ghost, 2006].

Существуют также различные типы композиций микрокапсул. Оболочка может разделять несколько компонентов и защищать их от воздействия внешней среды. Другим вариантом является сферическая оболочка в которой находится жидкость, а внутри нее диспергировано другое активное вещество в оболочке [Danfeg Yu, 2012; Zenderovska D., Stafilov T., Milosevski P., 2003].

Ядром микрокапсул является капсулируемое вещество, а капсулирующий материал составляет оболочку. Вещество, подвергающееся микрокапсулированию, может находиться в любом агрегатном состоянии.

Оболочки микрокапсул выполняют важные функции разграничения частиц капсулируемых веществ друг от друга и изолирования от внешней среды до момента использования.

Активное вещество, содержащееся в ядре микрокапсулы, как правило, составляет 70-95 % от всего веса капсулы [Грядунова Г.П., Лебеденков В.Я., 1976].

Очень важно и то, что микрокапсулирование позволяет в течение длительного времени удерживать летучие вещества в наноконтейнере [Yin-Feng Shi, Zhong Tian, Yang Zhang et al, 2011].

Микрокапсулирование позволяет целенаправленно доставлять активные вещества и оказывать терапевтическое действие. Этот процесс реализуется с помощью ряда физических, химических и физико-химических методов, путем образования полиэлектролитных комплексов [Солодовник В. Д., 1980]. Однако такая классификация является условной, в связи с тем, что в нее положена только природа процессов, протекающих при микрокапсулировании. На практике часто применяется аэрозольный метод капсулирования [Айсина Р.Б., 1986; Сидоров Л.Н., Юровская М.А., Борщевский А.Я. и др., 2005].

Химические методы микрокапсулирования предполагают синтез полимера из низкомолекулярных веществ. Выделяют несколько подходов: межфазовая поликонденсация, полимеризация на поверхности и отверждение высококонцентрированных эмульсий [Солнцев К.М, 1980; Amir Mortazavian, Seyed Hadi Razavi, Mohammad Reza Ehsani et al., 2007; Pavan Kumar B., Sarath Chandiran I., Bhavya B. et al., 2011].

Метод межфазовой поликонденсации основан на получении микрокапсул жидких веществ. Оболочка формируется в результате

полимеризации (в непрерывной фазе) мономеров, используемых для инкапсуляции биологически активного вещества. Затем во внешнюю среду вводится второй компонент, перемешивается при высоких температурах и сушится [Amir Mortazavian, Seyed Hadi Razavi, Mohammad Reza Ehsani et al., 2007; Pavan Kumar B., Sarath Chandiran I., Bhavya B. et al., 2011].

Для получения микрокапсул полимеризацией на поверхности, измельченное биологически активное вещество диспергируют в мономере, который может находиться в жидком или газообразном состоянии, в эмульсии или растворе. Катализаторы или инициаторы, используемые для формирования оболочки, либо наносят на биологически активное вещество, либо они содержатся в ядре или же распределяются в дисперсионной среде. Для более быстрого протекания полимеризации дополнительно используют различные типы излучения, ультравысокие давления и тлеющие разряды [Pavan Kumar B., Sarath Chandiran I., Bhavya B. et al., 2011].

Суть метода отверждения высококонцентрированных эмульсий заключается в использовании мономера в водном растворе, в котором уже содержится инкапсулируемое вещество в виде мелких капель. Для придания устойчивости в эмульсии вносят эмульгаторы, которые в процессе полимеризации способствует осаждению молекул в водном растворе и формированию поверхностных пленок – микрокапсул [Ming Li, Olivier Rouaud, Denis Poncelet., 2008].

Исходными материалами для микрокапсулирования физико-химическими методами являются готовые полимеры, находящиеся в состоянии растворов или расплавов. При этом особое внимание уделяют плотности раствора, которая должна колебаться в диапазонах плотности ядра, что связано с адгезией [Вилесова М.С., 2001; Bhattacharyya A., Argillier J-F., 2005]. Использование поверхностно-активных веществ позволяет улучшить адсорбцию, способствует эффективной отмывке микрокапсул от

дисперсионной среды. Выделяют следующие позиции физико-химических методов:

- разделение фаз в водной среде - коацервация;
- разделение фаз в среде органического растворителя;
- испарение летучего растворителя;
- охлаждение расплавов, или гелей полимеров;
- диффузные методы микрокапсулирования - экстракция [Бородина Т. Н., 2008; Bhattacharyya A., Argillier J-F., 2005].

Самым распространенным методом капсулирования веществ является расслоение раствора на две жидкие фазы – коацервация. В простой коацервации для разделения фаз используется десольватирующий агент, а сложная – представляет собой коацервацию двух полимеров и включает в себя несколько этапов: создание фаз, осаждение и отверждение оболочки [Xiao Jun-xia, Yu Hai-yan, Yang Jian., 2011].

Метод разделения фаз в среде органического растворителя используют для микрокапсулирования водных растворов. В таком методе дополнительно используют осадитель жидкости, который не растворяет биологически активное вещество, но вызывает разделение фаз [Mahmood Ahmad, Asadullah Madni, Muhammad Usman et al., 2011].

Способ испарения летучего растворителя позволяет получать многоядерные сферические микрокапсулы. Метод состоит из трех этапов: диспергирование биологически активного вещества в растворе полимера; эмульгирование дисперсии во втором растворителе; испарение первого растворителя и образование полимерной оболочки [Народицкий Б. С. и др., 2008].

Для охлаждения расплавов, или гелей полимеров не имеет значения агрегатное состояние капсулируемого вещества, которое диспергируют в инертной нелетучей жидкости, как правило, кремнийорганической природы.

Расплав обволакивает биологически активную субстанцию, а после, при охлаждении, затвердевает [Ruimin Cui, Xiaoyan Liu, Weidong Yu et al., 2012].

Методы экстракционного замещения основаны на частичной проницаемости оболочки. Микрокапсулирование начинается с эмульгирования раствора полимера, содержащего биологически активный субстрат. После чего начинается удаление растворителя при нагревании, выпаривании или вакууме, а затем промывка и сушка микрокапсул [Pat. WO/2008/104717 FR, 2008].

Микрокапсулирование физическими методами предполагает использование специальных устройств и подразделяется на несколько способов: сушка при распылении, покрытие в псевдокипящем слое, суспензионное сшивание, обволакивание и заплavление, метод пропитки, контролируемое покрытие, инкапсулирование при быстром расширении [Ali Nokhodchi, Djavad Farid, 2002; Pavan Kumar B., Sarath Chandiran I., Bhavya B. et al., 2011].

Метод сушки при распылении часто применяется для получения микрокапсул твердых порошкообразных веществ. Для этого инкапсулируемое вещество суспендируют в полимерном растворителе, распыляют в сушильной камере и сушат газом-носителем [Pavan Kumar B., Sarath Chandiran I., Bhavya B. et al., 2011].

Методы напыления в псевдокипящем слое позволяет образовывать оболочку вследствие испарения раствора пленкообразователя на поверхности капсулируемого вещества. Существуют три разновидности данного метода: сверху, снизу и тангенциальное распыление. Тангенциальное распыление – метод вращающегося диска позволяет получать частицы сферической формы с высокой насыпной плотностью. Технология напыления в псевдокипящем слое снизу характеризуется производством микрокапсул в виде пленки. Для получения частиц, имеющих, неправильную форму и низкую насыпную плотность используют метод напыления в псевдокипящем слое сверху [Ali

Nokhodchi, Djavad Farid, 2002; Anil Kumar Anal, Harjinder Singh, 2007; Pavan Kumar B., Sarath Chandiran I., Bhavya B. et al., 2011].

Метод суспензионного сшивания является универсальным методом микрокапсулирования жидких и твердых веществ. Данный метод основан на диспергировании водного раствора полимера в раствор биологически активной субстанции в несмешивающихся органических растворителях [Pavan Kumar B., Sarath Chandiran I., Bhavya B. et al., 2011].

Способ обволакивания и заплавления характеризуется получением капсул «по очереди». Жидкая пленка вязкого раствора обволакивает частицы, находящиеся в твердом или жидком состоянии, при помощи сушки или обработки сшивающимися агентами застывает.

Существует также метод пропитки полимерных матриц органическими соединениями за счет диффузии из насыщенного ScCO_2 , который часто применяется для инкапсулирования лекарственных препаратов [Pavan Kumar B., Sarath Chandiran I., Bhavya B. et al., 2011].

Сравнительно новым методом инкапсулирования является технология контролируемого покрытия, заключающаяся в растворение полимера в ScCO_2 .

Наиболее новым методом для наночастиц является инкапсулирование при быстром расширении. В основе разработки метода лежат свойства соединений, при небольших изменениях температуры плотность веществ сильно изменяется [Patel K.R., Mukesh R. Patel, Tarak J. Mehta et al., 2011; Pavan Kumar B., Sarath Chandiran I., Bhavya B. et al., 2011; Vishnu P., Ravindrababu B., Sudheer B. et al., 2011]. Выделяют несколько разновидностей метода: быстрого расширения раствора; газового нерастворения и получения частиц в насыщенном растворе газа [Сидоров Л.Н., Юровская М.А., Борщевский А.Я. и др., 2005; Bhattacharyya A., Argillier J-F., 2005 Pavan Kumar B., Sarath Chandiran I., Bhavya B. et al., 2011].

Подбор метода осуществляется с учетом всех показателей конечного продукта и его себестоимости. Важным параметром микрокапсулирования,

позволяющим разделять методы, является размер полученных продуктов. Такая классификация базируется не только на этом признаке, но также характеризуется процессом образования микрокапсул с помощью расплава или разделения фаз в жидких или газообразных средах [Бородина Т. Н., 2008].

Первая группа методов позволяет получать капсулы средних и больших размеров при помощи центрифуг, экструдированных устройств и в псевдооживленном слое, а также обеспечивает минимальное содержание пылевидной фракции.

Вторая группа методов нацелена на получение микрокапсул размерами до нескольких микрон, для приготовления которых пользуются коацервацией, электростатической коагуляцией, полимеризацией или высушиванием при распылении эмульсионной системы.

Появление микрокапсул позволяет выборочно влиять на клеточные процессы в их естественных масштабах [Pat. 20110223314 US, 2011; Huang Y.-Y., Chung T.-W, 2001]. Их уникальные свойства заключаются в ориентации тканей, доступ к глубоким слоям, контроль выхода лекарств, позволяют решить проблему адресной доставки биологически активного вещества [Rama Dubey, Shami T.C., Bhasker K.U, 2009; Meyers M.A., Ritchie R.O., Sarikaya M.B. Nano, 2003].

На практике в качестве системы доставки активных веществ используют различные наночастицы. Одной из моделей таких нанопереносчиков являются липосомы, которые образуются в растворах липидов [Yurasov V.V., Kucheryanu V.G., Kryzhanovsky G.N., et al., 1996]. Для вакцинации трансдермальным методом эффективно используются аденовирусы. Помимо липосом, биогенной природой обладают липидные нанотрубки, некоторые циклические пептиды, хитозаны и наночастицы из нуклеиновых кислот [Мальцева П.П., 2008].

В 1950 году была предложена копирующая безуглеродная бумага с использованием микрокапсул. [Saurabh Jyoti Sarma, Kannan Pakshirajan, Biswanath Mahanty, 2011; Вилесова М.С., 2001].

По мнению многих авторов, микрокапсулы должны отвечать следующим требованиям:

- стабильность микрочастицы;
- процесс разработки должен быть стерильным;
- оболочка микрокапсулы должна быть пригодной для перорального или парентерального введения [Bharat Bhushan, 2004; Meyers M.A., Ritchie R.O., Sarikaya M.B., 2003].

Очень интересной моделью микрокапсулирования являются дендримеры, представляющие собой новый тип полимеров, имеющих «ветвящееся» строение [Солодовник В. Д., 1986].

В качестве примера углеродных наночастиц выступают фуллерены и нанотрубки (рис. 1). Главной особенностью фуллеренов – их каркасная форма, которая может стать основой не только для систем доставки, но и для нового класса лекарственных средств [Mauguana K., 2000].

Одним из важнейших классов нанопереносчиков относятся частицы неорганической природы – соединения оксида кремния. Такая модель может быть модулированной термическим воздействием, а также изменением магнитного поля [Чиркова В.А., 2001].

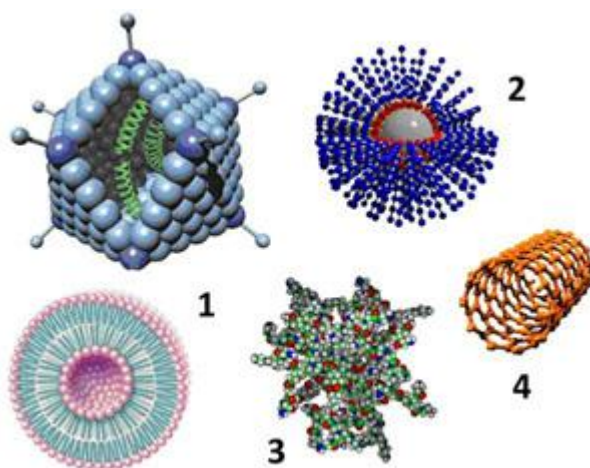


Рис. 1. Наночастицы, используемые для доставки терапевтических молекул. 1 — липосома и аденовирус; 2 — полимерная наноструктура; 3 — дендример; 4 — углеродная нанотрубка.

Полимерные наночастицы представляют собой либо наносферы, препарат в которых в форме твердого вещества распределен по всей матрице, либо нанокapsулы, в форме твердого раствора или раствора в масле [Ram B. Gupta, Uday B, 2006].

Наиболее распространенным высокомолекулярным соединением, используемым в качестве оболочки полимерных наночастиц явился полилактид, а позже полимер молочной и гликолевой кислот, применяемые в качестве биоматериалов для хирургических швов. Такие частицы получают капсулированием эмульсий [Mohsen Tafaghodi, et. al. 2007; Tafaghodi, M., Eskandari, M., Kharazizadeh et al., 2010].

Диапазон областей применения микрокапсулированных продуктов очень велик - от здравоохранения до космических исследований, в медицине - от средств противоопухолевой терапии и морфогенетических белков костной ткани до средств косметологии [Kucheryanu V.G., et al., 1996; Народицкий Б. С., 2007].

В рекламной промышленности наиболее актуальным и часто применимым является механическое разрушение оболочки микрокапсулы. [Pavan Kumar B., Sarath Chandiran I., Bhavya B. et al., 2011]. При приготовлении моющих средств чаще используют механизм растворения оболочки [Pat. WO/2011/074282 JP, 2011].

Перспективными также представляются подходы доставки нисомы внутри эритроцитов или бактерий. Особое место отводится кремнию - перспективному строительному материалу для сверхбыстрых, миниатюрных и экономичных нанокomпьютеров [Чубатова С.А., 2001].

На сегодняшний день проведены исследования по микрокапсулированию металлов, солей кислот, органических соединений.

Инертный наполнитель может явиться средой, в которой диспергируется вещество в процессе инкапсуляции [Bong-Seop Lee, ChiWoo Yoon, Arsen Osipov et al., 2011].

Форма препаратов на основе микроконтейнеров очень вариабельна: таблетки, брикеты, тампоны, губки, ткань, аэрозоли, рассыпчатый порошок и др. [Colas, J.C., Shi, W.L., Rao, V.S.N.M., Omri, A., Mozafari, M.R., Singh, H., 2007].

В фармацевтике используют микрокапсулирование лекарств с целью их пролонгированного высвобождения [Ram B. Gupta, Uday B. Kompella., 2006; Pavan Kumar B., Sarath Chandiran I., Bhavya B. et al., 2011; Thejani E. Rajapaksa, David D. Lo, 2010].

Наноконтейнеры применяют для контролируемого введения инкапсулированных биологически активных веществ - лекарственных препаратов (в том числе нерастворимых в воде или нестабильных), пептидов и белков, а также генетических конструкций, несущих гены ферментов, гормонов и цитокинов. Для целевой доставки поверхность нанокапсул может быть модифицирована специфическими антигенами, рецепторами или лигандами [Отарашвили З.А., 2007].

Новые наноструктуры могут служить в качестве искусственных тканей, которые могли бы заменить инфицированные клетки, ткани и органы; восстановить зрение, слух, создать новые искусственные конечности [Bong-Seop Lee, ChiWoo Yoon, Arsen Osipov et al., 2011].

Мембрана липосом состоит из природных фосфолипидов, что определяет ее способность при определенных условиях поглощаться клетками. Мембрана липосом может сливаться с клеточной мембраной, что приводит к внутриклеточной доставке их содержимого [Harrington K.L., Lewanski C.R., Stewart S.W., 2000].

Работы по применению липосом для улучшения фармакокинетики, позволили установить их положительный эффект и также выявить их

ориентацию на органы, ткани, клетки или даже органеллы [Dan Stendahl, 2007].

Важным недостатком существующих микрочастиц является отсутствие достоверных данных их идентификации и токсичности. Помимо этого, наночастицы слишком малы, они могут существовать в организме неограниченное время [Ram B. Gupta, Uday B., 2006; Dan Stendahl, 2007; Сидоров Л.Н., Юровская М.А., Борщевский А.Я. и др., 2005].

Микрокапсулирование лекарственных веществ в наночастицы позволяет использовать многие соединения, доставка которых в органы и ткани была сильно затруднена из-за их нерастворимости в воде или нестабильности [Torchilin V.P., 1998].

На сегодняшний день активным направлением фармакологии и медицины является липосомальная терапия [Barani, H. & Montazer, M., 2008].

Многие авторы утверждают, что использование липосом в качестве носителей активных веществ позволяет преодолевать мембранно-клеточные барьеры, снижает риск развития побочных эффектов и обеспечивает повышение терапевтического эффекта [Dakker-Woudenberg I. A. et. al., 2005; Sassunov V. et. al., 2007].

Липосома является капсулой, в которой биологически активное вещество защищено ее мембраной от действия неблагоприятных факторов и в тоже время, мембрана не позволяет токсичному (антибактериальному) препарату превысить допустимую концентрацию в биологических жидкостях организма [Forssen E.A., Ross M.E., 1994].

Уникальная особенность липосом заключается в доставке активной субстанции внутрь клеток путем эндоцитоза. Молекулы липосомы модифицируют мембрану, происходит «узнавание» органа или клетки-мишени, а после осуществляется направленная доставка [Meure, L.A., Knott, R., Foster, N.R., Dehghani, F., 2009].

Важным достоинством липосомальных препаратов является их трансдермальный путь введения [Shaw I.E., Chandrackarn S.K., 1979].

В 1999 году О.М. Ипатовым было высказано мнение о том, что трансдермальный метод введения липосом обеспечивает их адресную доставку к определенным клеточным системам организма с сохранением их свойств.

Липосомы способны проникать в глубокие слои кожи, в то время как лекарственные средства и косметические крема задерживаются между клеток рогового слоя [Скрипкин Ю.К., Шарапова Г.Я., 1985; Mezei M., Culasekharam V., 1980; Stozek T., Krowczynski L., 1983].

В.В. Мухин (1990) проводил испытания эффективности применения липосом, содержащих анатоксин синегнойной палочки на ожоговую поверхность кожи. Исследования доказали, что липосомальное введение активного вещества способствует увеличению терапевтического эффекта от шести до восемнадцати раз по сравнению с нативной формой препарата.

Л.М. Кузякова (1999) отметила более выраженное иммунногенное действие липосомальных препаратов, содержащих фитопрепарат (экстракт донника и лавра).

На фармацевтическом рынке пользуются популярностью липосомальные гели, содержащие гидрофильную вытяжку из женьшеня, подорожника и солодки, обладающие противовоспалительными и антицеллюлитными свойствами [Андреева И.Н., 1998].

Исследования V.B. Patel (2000) по применению липосомального геля третиноина на пациентах с акне в течение трех месяцев показали регрессию камедонов [Schafer-Korting M. et. al., 1994; Patel V.B. et. al., 2000].

Использование бензоилпероксида в липосомальной форме способствует более выраженной антибактериальной активности к пропионебактериям, микрококкам и эффективен в отношении папул [Fluhr J.W., et. al., 1999].

Липосомальные формы антибиотиков, (в частности цефазолина), применялись для разработки лечения угревой болезни.

В липосомы можно капсулировать водные растворы лекарственных веществ, что позволяет снизить токсичность и добиться желаемой фармакокинетики для препаратов. В настоящее время разрабатываются подходы к транспорту в нанокapsулах наноструктур металлической и полупроводниковой природы, а также суперпарамагнитных наночастиц для селективного разрушения клеток при электромагнитном разогреве, что важно для лечения ряда опухолей [Colas, J.C., Shi, W.L., Rao, V.S.N.M., Omri, A., Mozafari, M.R., Singh, H., 2007].

Липосомы имеют сходство с природными мембранами клеток по своему химическому составу, в результате чего, при правильном подборе компонентов введение их не вызывает негативного воздействия на организм. Очень важным признаком также является способность варьировать их морфологическую характеристику, что позволяет расширить спектр фармакологических препаратов, переносимых ими. Такие наночастицы легко разрушаются в организме, высвобождая при этом доставленные вещества [Водовозова Е.Л., Кузнецова Н.Р., Кадыков В.А., 2008].

Важной способностью липосом и везикул также является то, что они могут включать и удерживать вещества различной природы — от неорганических ионов и низкомолекулярных органических соединений до крупных белков и нуклеиновых кислот [Le Bang Son, Kaplun A.P., Symon A.V., et al., 1998].

Липосомальные формы лекарственных препаратов позволяют активно «адресовать» их органу-мишени, что обуславливает их использование для лечения внутриклеточного паразитизма [Кобринский Г.С., 1988].

Однако все выше перечисленные достоинства липосом не смогли перечеркнуть их недостатки. В первую очередь речь идет об их нестабильности. Зарубежные исследователи утверждают, что под действием

изменений условий окружающей среды, липосома может разорваться, и инкапсулированное вещество не дойдёт до «адресата» [Lasic D.D., Papahadjopoulos D., 1995; Mozafari, M.R. & Mortazavi, S.M., 2005]. Также липосомальные формы препаратов, как и все жиры, могут окислиться и соответственно прогоркнуть. Большой перечень липосомальных препаратов имеет довольно крупные размеры, что не позволяет им проникнуть в глубину ткани [Ефременко В.И., 1998]. В связи с чем, в последние годы были разработаны их аналоги кремнийорганической природы, обладающие рядом преимуществ.

Новым звеном в развитии микроконтейнеров для переноса активных веществ явились ниосомы, которые изготавливаются на основе неионогенных поверхностно активных соединений. Ниосомы способны встраиваться в клетки, а в последствии биodeградировать [Manconi M. at all, 2002]. Мембраны наноконтейнов также содержат жирорастворимые соединения, что позволяет снизить токсичность и добиться желаемой фармакокинетики для лекарственных препаратов [Vora B., 1998; Manconi M. at all, 2003].

Ниосомы - это однослойные или многослойные пузырьки, в которые может быть включен широкий спектр гидрофильных и гидрофобных веществ, что объясняется их амфифильной структурой, они выступают в качестве растворяющей матрицы; сорбента лекарственных веществ, увеличивающего время их пребывания в роговом слое и эпидермисе [Manconi et al., 2006]; проникающих агентов или в качестве лимитирующего мембранного барьера для модуляции системной абсорбции лекарственных веществ через кожу [Schreier and Bouwstra, 1994]. Ниосомы получают из гидратированной смеси холестерина и неионных поверхностно-активных веществ, таких, как полиоксиэтиленовые эфиры моноалкила или диалкила, которые было бы интересно заменить менее токсичными,

высокобиodeградируемыми сурфактантами на основе сахаров, такими, как алкил полиглюкозидные сурфактанты [Manconi et al., 2006; Mura et al., 2007]. Прониосомы-обезвоженная форма нисом-представляют собой, с технической точки зрения интересный вариант для (1) хранения NSV [Mura et al., 2007] и (2) местного применения в условиях окклюзии [Alsarra et al., 2005; Vora et al., 1998]. Местное применение лекарственных веществ, упакованных в ниосомы, может повысить их кожную доступность и, следовательно, уменьшить дозу, необходимую для возникновения терапевтического эффекта, и дозозависимые побочные эффекты, такие, как раздражение и окрашивание [Agarwal et al., 2001; Alsarra et al., 2005; Fang et al., 2001a; Manconi et al., 2006; Tabbakhian et al., 2006].

ПАВ могут образовывать структурированные фазы молекулярных агрегатов: ламеллярные, гексагональные и кубические жидкие кристаллы, в зависимости от их концентрации в растворе [Brinon et al., 1999]. Взаимодействия носителя с кожей исследованы на примере влияния жидких кристаллов эфира полиоксиэтилен-додецила на чрескожную абсорбцию через кожу свиньи жирорастворимого (октил метоксициннамат) и водорастворимого (бензофенон-4) солнцезащитных кремов. Чрескожная абсорбция бензофенона-4 во многом зависит от природы жидких кристаллов. Включение индометацина в систему моноглицерид/полоксамер 407/вода, представляющую собой на 72% кубосомы и везикулы нанометрового размера (плюс 28% более крупных неправильных частиц), повышало константу ингибирования эритемы и коррелировало с более высоким количеством лекарства внутри пласта, по сравнению со свободной формой индометацина [Esposito et al., 2005].

Наиболее перспективными для трансдермального проникновения с целью доставки лекарственных веществ являются ниосомы кремнийорганической природы [Базиков И.А.с соавт., 2008, 2012, 2013]. Ниосомы – это нановезикулы, размером 30-80 нанометров, состоящие из оболочки в виде

нерастворимого в воде двойного слоя неионогенного эмульгатора (ПАВ), которые представляют собой группу веществ диметикон кополиолов, представляющих собой эфиры полиэтиленгликоля и полидиметилсилоксановой основы и заключенного внутри капсулы активной фармацевтической субстанции. Трансдермальный перенос активных субстанций происходит за счет способности неионогенного поверхностно-активного вещества (ПАВ) формировать двойной молекулярный слой, подобный плазматической мембране живой клетки. Наличие ковалентной связи Si-O-Si в гидрофобной части молекулы полидиметилсилоксановой основы эмульгатора, которая обладает большой эластичностью и реакционной способностью, позволяет направленно доставлять широкий спектр активных субстанций при помощи реакционноспособных участков и целенаправленно их выпускать из нановезикулы. Таким образом, диметикон кополиолы представляют собой гибрид кремния (диметикона) и углерода (полиэтиленгликоля).

CH₃ – (метильные) группы образуют «облако» вокруг атомов Si и создают реакционные участки для взаимодействия с БАВ (рис.2).

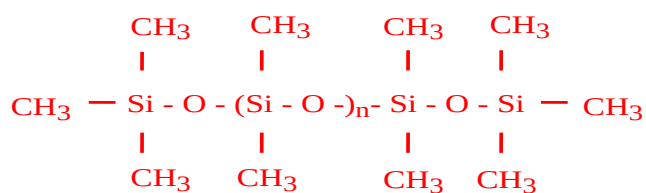


Рис.2 Молекула ПЭГ- 12 Диметикона

Длина связи Si – O длиннее связи C – C, поэтому молекула ПЭГ – 12 Диметикона эластичнее фосфолипидов, используемых при формировании везикул (липосом), и способна образовывать везикулы без значительных энергетических усилий. Длина связи Si-O 1,6 А (длина связи аналогов ПАВ C-C 1,4 А), угол связи Si-O-Si составляет 130 градусов, в отличие от 109

градусов связи C-C-C, что приводит к повышенной эластичности и стабильности (рис 3).

Связь Si - O - Si вращается и поэтому также обладает большой эластичностью. Наличие ПЕГ (полиэтиленгликолевой части) определяет стабильность в гидрофильных средах и защиту от атаки клетками ретикулоэндотелиальной системы (РЭС).

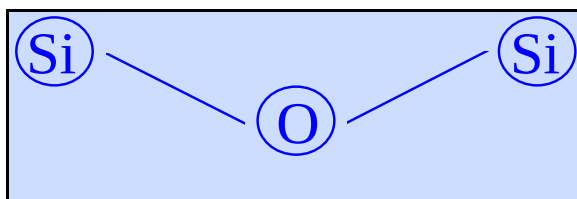


Рис.3 Связи молекул кремния и кислорода в ниосоме.

Таким образом, преимущества ниосом как нанокапсул, используемых в создании наружных препаратов для лечения акне, заключаются в следующем:

1. Кремнийорганические микрокапсулы состоят из ПЭГ-12 Диметикона, обладающего амфифильными свойствами, позволяющими ориентироваться в дисперсии водорастворимой частью (полиэтиленгликолем) в воду и жирорастворимой частью (диметиконом) – в липиды. Вследствие такой структуры легко образуются микрокапсулы при встряхивании (рис.4).
2. При обработке ультразвуком мультиламелярные микрокапсулы обретают моноламелярную структуру, иммобилизируя биологически активные вещества (БАВ). Их размер становится менее 100 нанометров.
3. Тонкая эластичная оболочка позволяет им передвигаться по межклеточным промежуткам, представляющим собой липидный матрикс.
4. Связь Si-O 1.6 ангстрем (в микрокапсулах кремнийорганической природы) длиннее связи C-C 1.4 ангстрем (фосфолипидах –

липосомах), к тому же эта связь ещё и вращается, что придаёт уникальные эластические свойства проникновения через кожу.

5. Органическая часть молекул придаёт биodeградируемые свойства.
6. Реакционноспособные участки молекул позволяют осуществлять целенаправленную внутритканевую доставку БАВ.

Двойной молекулярный слой

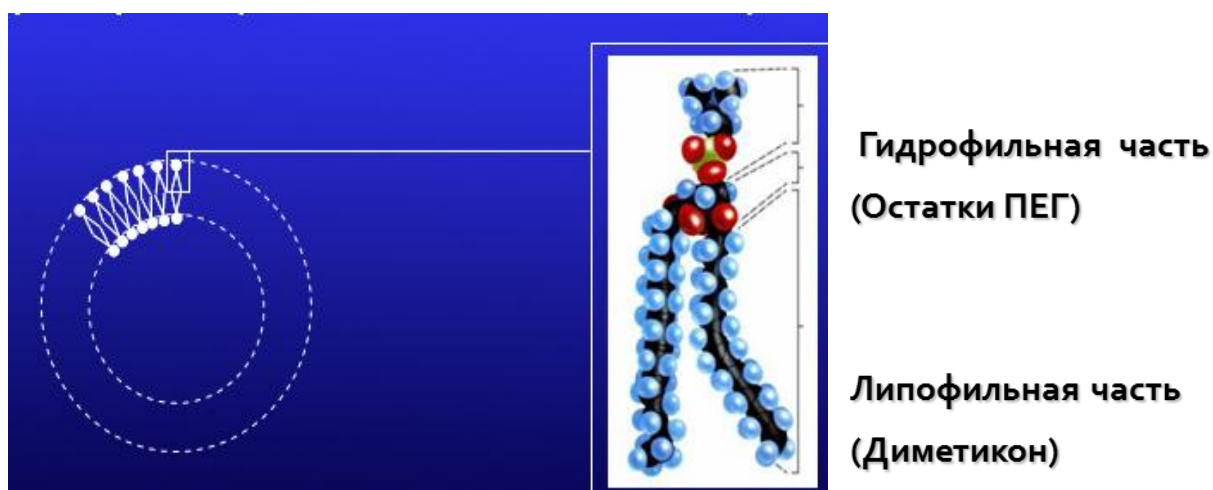


Рис.4 Формирование кремнийорганических микрокапсул из молекулы ПЕГ-12 Диметикона

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Работа выполнялась в течение 2010-2014 гг. на кафедре микробиологии и научно-образовательного центра медико-биологических проблем Ставропольского государственного медицинского университета (заведующий – профессор И.А. Базиков). Разработка технологии антимикробного трансдермального ниосомального геля проводилась на базе НПО «Клеточные технологии».

Исследование проводилось в три основных этапа. На первом - отработывали технологии экстрагирования и диспергирования растительных субстанций, обладающих антимикробным эффектом. Второй этап включал изучение микрофлоры, выделенной от больных акне и её чувствительность к растительным экстрактам. На третьем этапе работы отработывалась технология инкапсулирования биологически активных веществ в кремнийорганические нанокapsулы и разрабатывалась технология приготовления антимикробного геля. На четвёртом этапе оценивалась его безопасность и клиническая эффективность.

2.1. Бактериологические исследования

2.1.1. Методы культивирования и идентификации микроорганизмов. .

Материалом для исследования служило отделяемое из пустул и комедонов. Все полученные образцы доставлялись в бактериологическую лабораторию.

Исследование было направлено на выделение и идентификацию следующих потенциальных патогенов: грамположительных кокков (стафилококки, стрептококки, энтерококки), пропионебактерий акне.

Чувствительность к этим микроорганизмам определяли в соответствии со стандартами Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам (NCCLS 2000).

Перед культуральным исследованием образцов производилось окрашивание нативного материала по Граму. В мазке оценивались представленные морфологические типы микроорганизмов. Результаты исследования мазка, окрашенного по Граму, использовались в дальнейшем для интерпретации роста колоний микроорганизмов на чашках первичного посева.

Выделенные штаммы микроорганизмов пересекали до выделения чистых культур. Их идентификацию осуществляли с помощью определителя бактерий Берджи [Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит, С. Уильямс, 1997] и определителя грибов [Д. Саттон, А. Форенгилл, М. Ринальди, 2001].

Результаты исследования культурально-морфологических свойств, выращенных микроорганизмов учитывали визуально путем подсчета и измерением диаметра выросших колоний, а также при микроскопии мазков, приготовленных из суточных культур, выросших на плотных питательных средах и окрашенных по Граму. Биохимические свойства, выделенных молочнокислых палочек определяли по ферментативному расщеплению моносахаридов, полисахаридов, многоатомных спиртов условно именуемых «сахарами» на: альдегиды, органические кислоты и газообразные продукты (CO₂, CH₄, H₂). Конечными продуктами их расщепления являются CO₂ и H₂O [Степаненко П.П., 2005]. В исследовании использовали 15 сахаров (арабиноза, галактоза, глюкоза, дульцит, инозит, лактоза, мальтоза, манит, манноза, рамноза, раффиноза, рибоза, сахароза, сорбит и фруктоза).

Посев материала и выделение чистой культуры производились в соответствии с установленными правилами (Покровский В.И., Поздеева О.К. 1999; Isenberg H. 1992; Murray P.R. et al., 1995). Первичный посев материала, полученного от пациентов, производился количественным методом для определения диагностических титров микрофлоры. Диагностически значимыми считались выделение возбудителя в концентрации $\geq 10^6$ КОЕ/мл.

Материал, полученный из акне-элементов, засеивали на селективные среды для выделения и первичной идентификации бактерий. В частности использовали кровяной агар – основа Columbia agar (Becton Dickinson, США, bioMerieux, Франция) с добавлением 5% дефибринированной крови лошади; шоколадный агар – основа Trypticase Soya agar (Becton Dickinson, США, bioMerieux, Франция); Mannitol Salt agar (Becton Dickinson, США, bioMerieux, Франция); Enterococcosel agar (Becton Dickinson, США) или D- coccosel agar (bioMerieux, Франция); agar Endo (Becton Dickinson, США, bioMerieux, Франция). Чашки с кровяным и шоколадным агаром помещались в контейнер с генератором 3% CO₂ (BD BBLtm Gas-Pakt CO₂ System Envelopes) после чего контейнер и остальные чашки инкубировали в термостате при температуре 35,5°C в течение 18-24 часов.

На вторые сутки производился отбор характерных колоний с кровяного и шоколадного агара, а также выросших культур с селективных сред. Идентификацию микроорганизмов производили по общепринятым утвержденным методикам (Приказ № 535 МЗ СССР от 22 апреля 1985г.).

Идентификация аэробных грамположительных кокков, грамотрицательных аэробных ферментирующих бактерий производилась обычными рутинными методами на основании морфологических, культуральных и биохимических свойств микроорганизмов. Для идентификации аэробных грамотрицательных неферментирующих бактерий применялись коммерческие тест-системы Oxi/Ferm Tube Test (Becton Dickinson). Идентификацию микроорганизмов проводили до вида, при невозможности – до рода.

2.1.2. Определение чувствительности выделенной микрофлоры к растительным экстрактам.

Методика постановки и интерпретация полученных результатов определения чувствительности выделенной микрофлоры производилось при

помощи диско-диффузионного метода согласно стандартам Национального комитета по клиническим и лабораторным стандартам (NCCLS) 2000 года.

Для оценки чувствительности использовалась среда Мюллера-Хинтон, которая готовилась из сухой среды промышленного производства (Becton Dickinson, bioMerieux) в соответствии с инструкцией производителя. После автоклавирования агар разливали по чашкам Петри слоем толщиной 4мм и оставляли при комнатной температуре для застывания. Чашки использовались сразу после приготовления.

Готовилась стандартная суспензия исследуемого микроорганизма, с концентрацией $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл оптическая плотность бактериальной суспензии с такой концентрацией при визуальном контроле соответствует стандарту мутности 0,5 по МакФарланду. Для приготовления инокулюма использовали суточную культуру микроорганизмов, выросших на плотных питательных средах. Петлей переносили незначительное количество материала с нескольких однотипных изолированных колоний в пробирку с физиологическим раствором, доводя плотность инокулюма точно до 0,5 по МакФарланду. Инокулюм использовали в течение 15 минут.

Для определения чувствительности использовались стандартизированные качественные диски, пропитанные растительными экстрактами с различной концентрацией.

Стандартный инокулюм наносили пипеткой на поверхность чашки Петри в объеме 1-2мл, равномерно распределяя его по поверхности покачиванием, после чего удаляли избыток инокулюма пипеткой. Приоткрытые чашки подсушивали при комнатной температуре 10-15 минут.

Не позднее 15 минут после инокуляции на поверхность питательной среды наносили диски с антибиотиками. Аппликацию дисков производили стерильным пинцетом. Расстояние от диска до края чашки и между дисками не могло быть менее 15мм. Диски аккуратно прижимали к агару пинцетом. Непосредственно после аппликации дисков чашки Петри помещали вверх

дном в термостат и инкубировали в течение 18-24 часов при температуре 35,5° С.

По окончании инкубации чашки помешали кверху дном на темную матовую поверхность, так чтобы свет падал на них под углом 45° (учет в отраженном свете). Диаметр задержки роста измеряли прозрачной линейкой с точностью до 1мм. При изменении зон задержки роста ориентировались на зону полного подавления видимого роста.

Для каждого микроорганизма чувствительность определялась отдельно.

При определении чувствительности микроорганизмов к антибактериальным средствам диско-диффузионным методом выполнялись процедуры контроля качества исследования. Проводился контроль качества питательных сред и определения чувствительности с использованием контрольных штаммов микроорганизмов (Методические указания МУК 4.2.1890-04) с частотой 1 раз в неделю, при приготовлении новой партии агара.

2.2. Обоснование выбора лекарственных растений, обладающих антимикробной активностью

Выбор лекарственных растений, обладающих чувствительностью к микрофлоре акне элементов, проводился с учетом их противовоспалительного и антимикробного действия, а также основываясь на данные о наиболее часто применяемых лекарственных растениях в реальной клинической практике. Исходя из этого, в работе использовалось следующее растительное сырье: зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum*), ромашка аптечная (*Marticaria recutita*), конский щавель (*Rúmex confértus*) и солодка голая (*Glycyrrhíza glabra*).

Трава зверобоя обладает многосторонними фармакологическими свойствами: вяжущим, антимикробным, противовоспалительным, кровоостанавливающим, обезболивающим, ранозаживляющим эффектом.

Зверобой и зверобой содержащие препараты оказывают антибактериальное действие на грамположительную гноеродную микрофлору, обладает противовоспалительным действием, влияет на регенерацию тканей и некоторые стороны иммуногенеза (усиление фагоцитоза).

В качестве антисептического средства для лечения ран применяют ромашку аптечную. Вытяжку из ромашки часто используют в средствах для ванны и кремах, предназначенных для кожи с воспалительными элементами и поврежденным барьером.

Конский щавель обладает противовоспалительным, вяжущим, противомикробным, спазмолитическим, гипотензивным, отхаркивающим, противоатеросклеротическим, мочегонным, желчегонным, ветрогонным, слабительным, репаративным, кровоостанавливающим и седативным свойствами [Муравьева Д.А., 1991]. Наружно настой и отвары конского щавеля используются для полосканий при воспалительных заболеваниях полости рта (ангина, язвенные стоматиты и др.). В народной медицине отваром конского щавеля лечат также кожные болезни.

Некоторые авторы характеризуют солодку как дубильное сырье, так как корень ее содержит 8,4% дубильных веществ. Трава же - более 5% дубильных веществ обеих групп (пирокатехиновой и пирогалловой). Есть рекомендации к использованию стеблей для выработки волокна, общий выход его составляет 13%. Действие корней солодки обусловлено во многом глицирризиновой кислотой, в том числе ее тритерпеновым агликоном: минералокортикоидоподобный эффект, противовоспалительная активность, антидотное действие; ярко выраженный, определяемый, антиаллергический эффект и широкое антибиотическое и антисклеротическое действие. Корни солодки содержат 2,5% соединений кумариновой природы. В составе *Glycyrrhiza glabra* обнаружены ликуразид, глицирризиновая кислота, флавоноиды, слизистые и другие фармакологически активные вещества.

Глицериновая кислота является тритерпеноидным гликозидом и обладает противовоспалительным действием. Ликвиритозид – флавононовый гликозид и 2,4,4-триоксихалкон оказывают спазматическое действие. Пентациклический тритерпен – карбенексолон – ускоряет заживление.

Наружное использование вышеуказанных растительных субстратов, обладающих антимикробным и противовоспалительным действием, является обоснованием их выбора для определения чувствительности к выделенным микроорганизмам.

2.2.1. Методы приготовления растительных экстрактов

Лабораторное и производственное оборудование: микроскоп «Биолам» Р-11; микроскоп «Микмед-2» (производство ЛОМО, Россия); рефрактометр УРЛ-22 (Россия); электронные весы ВЛТ-150 (Россия); холодильники производственные и бытовые ГОСТ 26678; рН-метр с пределом допускаемой погрешности не более 0,05 ед. рН; дистиллятор; термостаты электрические для выращивания бактерий с автоматическим терморегулятором до температуры 55°C и с ценой деления 0,2°C; электроплита по ГОСТ 14919; шкафы сухожаровые КВС G-100/250; фильтрующие элементы; бумага фильтровальная ГОСТ 12026; марля ГОСТ 11109; оптический стандарт мутности с концентрацией 10 ед., изготовленные ГИСК им. Л.А. Тарасевича; пробирки стеклянные; воронки Бюхнера 3(5) ГОСТ 9147; спиртовка СЛ-1 (2) по ГОСТ 25336; флаконы вместимостью 0,1; 0,2; 0,5 л; пробирки П1-16-150ХС или П2-10-90ХС или П2Т-10ТС ГОСТ 25336; масло иммерсионное ТУ 81-05-79; колбы емкостью 0,5-1,0 л; ступка 1, 2 по ГОСТ 9147; цилиндры мерные; пипетки мерные стеклянные 0,1-50,0 мл; поплавки (трубки Дархема); стакан Н-2 (100-1000) по ГОСТ 25336; термометры жидкостные стеклянные с диапазоном температуры 0°C – 50°C и 50°C – 100°C по ГОСТ 28498 с пределом допускаемой погрешности $\pm 0,5^\circ\text{C}$ с ценой деления шкалы

0,5°C; пипетки пастеровские; бактериологические петли; чашки Петри; стекла предметные ГОСТ 9284; пипетки мерные 1 мл.

Питательные среды: агар Хоттингера, pH 7,2-7,4, приготовленный в соответствии с ТУ № 9385-004-01897080-2009 и ТУ № 9385-002-01897080-2009, приготовленные в лаборатории питательных сред для культивирования микроорганизмов I-IV групп патогенности ФГУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора, г. Ставрополь; питательный агар для культивирования микроорганизмов, ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболенск. Среда Блаурока, среды Эндо, Плоскирева, Левина, агар Клиглера, Симмона, кровяной агар, желточно-солевой агар Чистовича, селективный агар по Сланецу и Бертли, среда Вильсона-Блер (железо-сульфитный агар), среда Сабуро.

Техника приготовления экстрактов состояла из нескольких этапов:

1. Диспергирование. Цель данного процесса - путем разрушения клеточных мембран увеличить общую поверхность исходного материала. Для этого использовали АПВ гомогенизатор и приборы для воздействия ультразвуком. При помощи гомогенизатора жидкая смесь продавливалась под высоким давлением через узкие кольцевые щели или отверстия.

2. По Фармакопее VIII, жидкие экстракты готовили перколяционным способом. Экстрагентами явились вода и пропиленгликоль в концентрации. ТУ 9154-001-17444221-09 Технические условия. Пропиленгликолевые экстракты из растительного сырья. ТУ 9154-003-17444221-09 Технические условия. Водные экстракты из растительного сырья.

3. Очистка. Исходный материал экстрагировали путем осаждения, центрифугирования или фильтрации. Основная техническая задача - получить по возможности большее количество очищенного экстракта и свести до минимума потери.

Для интенсификации экстракционного процесса использовали ультразвуковое дезинтегрирование, что позволило увеличить выход

основного продукта. Экстракты готовили соответствующими методами, используя пропилен-гликоль или водный растворитель. Лекарственное растительное сырьё и растворители, которые использовали при изготовлении экстрактов, отвечали требованиям соответствующих статей Фармакопеи. Вода очищенная - ФС 42-2619-89, хлороформ - ГОСТ 20015-74.

Физико-химические показатели, определяемые для экстрактов, в соответствии с Техническими Условиями (ТУ):

1. Плотность (масса единицы объема материала. В жидких средах определялась ареометром) г/см^3 , кг/м^3 .

2. Водородный показатели (Одно из важнейших свойств водных растворов — их кислотность (или щелочность), которая определялась концентрацией ионов H^+ и OH^- . Определяется на рН-метре).

3. Показатель преломления (величина, характеризующая среду и равная отношению скорости света в вакууме к скорости света в среде (абсолютный показатель преломления). Показатель преломления зависил от диэлектрической и магнитной проницаемостей среды и длины волны света, чем объясняется дисперсия при преломлении света при определении рефрактометром).

4. Содержание воды и летучих веществ, % (дополнительно к ТУ, определяли путем высушивания (выпаривания) образца в сушильном шкафу или с помощью анализатора влаги и летучих веществ).

5. В каждом экстракте проводили исследование сухого остатка, с целью определения веществ, которые не подверглись экстрагированию, но также имеют биологическую ценность (например, нативный белок). Принцип метода основан на удалении влаги путем выпаривания исследуемого раствора и последующем высушивании остатка до постоянного веса.

Анализ проводили во взвешенной и доведенной до постоянной массы фарфоровой чашке ($d = 7 \text{ см}$), куда наливали 1 мл исследуемого образца и выпаривали его на кипящей водяной бане (при постоянном помешивании

препаратов, содержащих агар). После испарения жидкости чашку ставили в сушильный шкаф (100 ± 5)°C на 2 ч, охлаждали в эксикаторе и взвешивали на аналитических весах.

Гигиенические нормативы по микробиологическим показателям, определяли для экстрактов, в соответствии с Техническими Условиями (ТУ).

2.3. Технология приготовления антимикробного ниосомального геля.

2.3.1. Получение ниосом и инкапсулирование растительных экстрактов.

При получении ниосом кремнийорганической природы использовали физико-химические методы синтеза молекул: ультразвукового облучения, механического встряхивания, АПВ гомогенизации.

Оболочка полученных ниосом создавалась из ПЭГ-12 Диметикона [Базиков И.А. Способ доставки биологически активных веществ с помощью ниосом / И.А. Базиков, П.А. Омелянчук. Патент РФ № 2320323 от 27.03.2008].

Технология создания ниосом была основана на образовании мембраны на поверхности неорганической матрицы размером 30-80 нанометров. Процесс формирования микрокапсул совмещал в себе преимущества метода адсорбции активных субстанций внутри пористых неорганических наночастиц и формирования на их поверхности мультислойной мембраны .

Кремнийорганические микрокапсулы состояли из ПЭГ-12 диметикона, обладающего амфифильными свойствами, позволяющими ориентироваться в дисперсии водорастворимой частью (полиэтиленгликолем) в воду и жирорастворимой частью (диметиконом) – в липиды. Вследствие такой структуры микрокапсулы легко образовывались при встряхивании. При обработке ультразвуком мультислойные микрокапсулы обретали монослойную структуру. Их размер становился менее 100 нанометров. Такая тонкая эластичная оболочка в дальнейшем позволяла им передвигаться по межклеточным промежуткам, представляющим собой липидный матрикс.

В связи с тем, что экстракты занимают небольшой объем относительно других компонентов, их включение в ниосомы производилось путем добавления 2% ПЭГ-12 диметикона к раствору экстрагированных активных субстанций растительного происхождения в отдельной емкости. Включение экстрактов растительных трав в кремнийорганические везикулы (ниосомы) и последующая обработка эмульсии на гомогенизаторе высокого давления АПВ гомогенизаторе, обеспечивала эффективную пролонгированную дозированную трансдермальную доставку активных субстанций в клетки тканей, не нарушая их целостности.

После включения активных субстанций в ниосомы суспензия ниосом вносилась к другим компонентам эмульсии при комнатной температуре.

2.3.2. Отработка фаз приготовления и рецептуры ниосомального геля с растительными экстрактами

Приготовление ниосомального геля заключалось в чередовании водных и липидных фаз. Особенностью включения липидной фазы геля, содержащей 5% циклометикона в ниосомы являлось предварительное растворение в ней 2% ПЭГ-12 диметикона, перемешивание и последующее внесение в водную фазу смеси. Заключительная стадия формирования ниосом происходила при интенсивном механическом перемешивании смеси с использованием АПВ гомогенизатора. На примере гидрофильной доставляемой активной субстанции, в качестве образцов, использовали растительные экстракты в концентрации 1%, 5 %, 10%.

Первая фаза приготавливалась при комнатной температуре путем механического перемешивания компонентов в смесителе. Изготовление следующей фазы отличалось предварительным смешиванием 2% ПЭГ-12 диметикона с 5 % растительным экстрактом в отдельной емкости, и только затем добавлением дистиллированной воды. Процесс проводили при комнатной температуре и интенсивном механическом встряхивании на

шейкере, в течение 5 минут. Для стабилизации концентрации водородных ионов (рН) до 6,6-7,0 и формирования структуры геля вносили триэтаноламин в заключительной фазе. Образовавшийся в результате гель эмульгировали на АПВ гомогенизаторе APV Lab Series Homogenizers – 1000.

2.4. Экспериментальные методы исследования

Токсичность композиций на основе наночастиц кремнийорганической природы изучали в экспериментах на крысах линии Wistar весом 300-400 г., содержащихся в стандартных условиях. За 16 часов перед началом экспериментом у животных убирали корм, оставляя достаточное количество питья. Лекарственные препараты вводили внутривентрально, забор крови осуществляли из хвостовой вены.

Острую токсичность исследуемого препарата определяли в соответствии с методическими указаниями по изучению общетоксического действия фармакологических веществ [Daoud, S.S., Juliano, R.L., 1986].

Острая токсичность была изучена на 60 белых нелинейных крысах обоего пола весом 180-220 г и на 15 кроликах обоего пола весом 2,1-2,3 кг, прошедших карантин в течение 10 дней. Животные получены из питомника г. Рапполово (Ленинградской обл.), прошли двухнедельный карантин и содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении. Кормление проводилось в фиксированное время. Для питья использовались автопоилки.

Крысы были разбиты на 5 групп по 12 особей (6 самок и 6 самцов), кролики разделены также на 5 групп по 3 животных. Подопытные группы крыс получали препарат внутривентрально в различных дозах: 0,08 мл/кг (двойная ТД), 0,2 мл/кг (пятикратная ТД), 0,8 мл/кг (десятикратная ТД) и 2 мл/кг (пятидесятикратная ТД).

Кроликам вводили внутривенно 1 мл/кг (двойная ТД), 2,5 мл/кг (пятикратная ТД), 5 мл/кг (десятикратная ТД) и 25 мл/кг (пятидесятикратная

ТД). Контрольные группы животных получали эквивалентное количество физиологического раствора.

Наблюдение за опытными животными проводилось в течение 2-х недель, в первый день непрерывно. Фиксировалось общее состояние животных, особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координация движений, реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, частота и глубина дыхательных движений, состояние волосяного и кожного покрова, консистенция фекальных масс, потребление корма и воды.

Токсикологические показатели: кожно - раздражающее, кожно - резорбтивное и сенсibiliзирующее действие средства определяли согласно требованиям СанПиН 1.2.681-97 и Инструкции по экспериментально-клинической апробации (1986 г.).

Выбор доз препарата для оценки острой токсичности производили исходя из оптимального содержания ниосом в геле для достижения необходимого терапевтического действия (10%) и максимальной площади кожи, которая может быть обработана препаратом с последующей резорбцией в системный кровоток. Для крыс средняя терапевтическая доза (ТД) составляет 0,05 мл/кг, а для кроликов 0,5 мл/кг.

Для изучения путей проникновения веществ в кожу (трансдермальности), использовали гистологические методы. Основными требованиями к прижизненным красителям явились - минимальная токсичность избирательное окрашивание отдельных структурных компонентов клетки и тканей.

Учитывая необходимость определения проникающей способности ниосом, использовали 1% раствор трипанового синего. Его инкапсулировали в ниосомы, а также использовали в интактной форме.

Для определения глубины проникновения наночастиц в толщу кожи использовали крыс. На участке коже спины, площадью 20 мм² безопасной бритвой удалялись волосы. Животные, взятые в эксперимент, были разделены на четыре группы, по 10 крыс в каждой. Первой группе наносили накожно 1% раствор трипанового синего. Второй группе – гель с добавлением 1% раствора трипанового синего. В третьей группе использовался ниосомальный гель с включением 1% раствора трипанового синего. Четвертой группе наносили ниосомальную эмульсию с включением трипанового синего.

При помощи дерматомы производилась биопсия исследуемого участка кожи. Материал, полученный после биопсии, помещался в 10% раствор формалина для последующего гистологического исследования.

Для гистологического исследования взяты кусочки кожи крысы в виде полоски размерами 1,0 x 0,5 см. Кусочки брали вместе с подкожно-жировой клетчаткой. Материал фиксировали в 10 % нейтральном формалине в течение 10 дней, затем промывали и проводили через спирты возрастающей крепости. После проводки кусочки заливали в парафин, готовили срезы толщиной 0,5 – 0,6 микрон. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван Гизон.

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с правилами защиты позвоночных животных, используемых в научных целях (Руководства и рекомендации для Европейских независимых комитетов по вопросам этики, 1995, 1997; Рекомендации по этике, проводящим экспертизу биомедицинских исследований, 2000).

2.5. Анализ эффективности антимикробного ниосомального геля.

2.5.1. Характеристика группы пациентов, критерии включения

Объект исследования - пациенты с акне, находившиеся на лечении в Ставропольском краевом клиническом кожно-венерологическом диспансере.

В исследование были включены 30 пациентов, получавшие лечение в 2012-2014 гг.

Критерии включения:

- пациенты с папуло-пустулезной формой акне

Критерии исключения:

- пациенты с комедональной, конглобатной и молниеносной формой акне, гиперандрогенные акне
- пациенты, получавшие противоугревые препараты системного действия в течение 4 недель до начала исследования
- женщины в период беременности и кормления грудью

Полное клиническое и лабораторное обследование в соответствии с поставленными задачами осуществляли в первые дни пребывания в стационаре.

Обследование включало анализ жалоб больных, длительности заболевания, выявление сведений о частоте обострений и с чем они связаны, о причине госпитализации, сопутствующих заболеваниях. Обязательно уточнялся лекарственный анамнез: какие препараты пациент применял до настоящего обращения и эффективность от проводимого лечения.

Всем больным проводились общепринятые лабораторные исследования: общие анализы крови и мочи, уровень глюкозы крови, кал на яйца глистов и цисты лямблий (в первые три дня пребывания в стационаре). Микробиологическое исследование микрофлоры, и ее чувствительности к антибиотикам проводили в первый день пребывания, до назначения антибактериальных препаратов. Все пациенты были консультированы терапевтом.

2.5.2. Оценка соматических параметров.

Оценку эффективности терапии проводили до начала лечения и далее один раз в три дня до окончания лечения, путем подсчета количества папул, пустул на стандартном поле 5х5 см на щеке.

2.6. Статистическая обработка материала

Статистическая обработка результатов проведена с использованием пакета прикладных статистических программ «Statgraphics» с использованием электронных таблиц Microsoft Excel 5.0 (параметрическая статистика, корреляционный анализ), реализованные на IBM PC AT.

Полученные в эксперименте вариационные ряды, характеризовали по показателям средней арифметической величины (M), квадратическому отклонению (d), средней квадратической ошибке или ошибке средней арифметической величины (m). Достоверность различий сравниваемых показателей оценивали с использованием программы Primer of Biostatistics (Version 4.03) по критерию Стьюдента. Межгрупповые различия оценивались с помощью t -критерия Фишера-Стьюдента на уровне вероятностей $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА АНТИМИКРОБНОГО НИОСОМАЛЬНОГО ГЕЛЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АКНЕ

3.1. Определение состава основных возбудителей, участвующих в развитии акне

В исследовании приняло участие 30 пациентов с угревой болезнью. Материалом для микробиологического исследования служило отделяемое из пустул и комедонов. Выделенные микроорганизмы идентифицировали, а по характеру и частоте их встречаемости у пациентов с угревой болезнью были составлены их процентные соотношения (рис. 5). Наиболее часто выделяемыми микроорганизмами были представители семейства *Micrococcaceae*, *Staphylococcus aureus* 41,9% и *Staphylococcus epidermidis* 39,2%, реже (11,7%) встречали *Streptococcus spp.*. В 6,3% случаев у пациентов обнаружили *Enterobacteriaceae spp.*, и в 0,9% *Propionibacterium acne*.

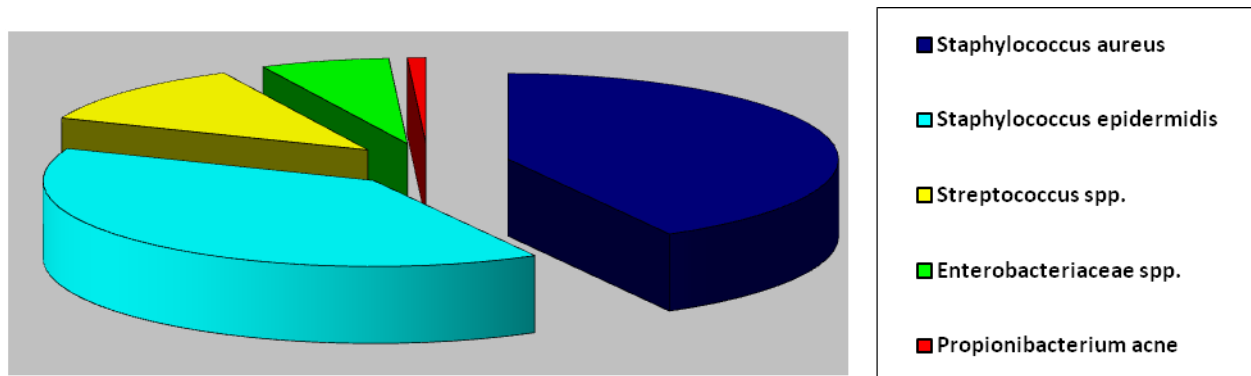


Рис.5. Процентное соотношение микроорганизмов, выделенных из акне-элементов

3.2. Отработка оптимальных методов экстрагирования ромашки, зверобоя, конского щавеля, календулы и солодки

Растительные субстанции с глубокой древности использовали как основное средство для лечения различного рода заболеваний [НИИ

фармации министерства здравоохранения и медицинской промышленности РФ, 1995]. Тщательный анализ доступной литературы позволил прийти к выводу, что препараты растительного происхождения занимают ведущие позиции на фармацевтическом рынке и в наши дни. Это связано с преимуществами растений:

- 1) в состав входят витамины, углеводы, микро- и макролементы, ферменты, гормоны;
- 2) биологически активные вещества обладают пролонгированным действием;
- 3) комплекс веществ способствует быстрому выведению токсических веществ организма, что связано с антиоксидантными свойствами;
- 4) доступность и экономическая эффективность использования [Оганесян Э.Т., Симонян А.В., Чомаева С.Х., 1992].

В настоящее время одним из основных направлений фармацевтической индустрии является усовершенствование имеющихся методов экстрагирования растительного сырья, которые позволят увеличить выход биологически активных веществ и улучшить показатели качества.

Экстрагирование – это процесс разделения веществ, который относится к массообменным методам и определяется основными законами массопередачи: молекулярной диффузией, массоотдачей, массопроводимостью [Кондратьева, Т.С., 1991].

Экстрагирование твердых материалов представляет собой процесс разделения твердого тела на растворимую и нерастворимую части и образования двух фаз: раствор вещества в сырье и раствор экстрактивных веществ в экстрагенте, омывающем сырье [Гаммерман А.Ф., 1970].

Для экстрагирования лекарственного растительного сырья в практике промышленного производства фитопрепаратов применяются, в основном, статические равновесные способы экстрагирования, отличающиеся большей

продолжительностью, поэтому применение факторов, повышающих скорость экстракции, приобретает особую значимость. В эту группу входят факторы, влияющие на гидродинамические условия процесса: характер и скорость движения жидкости, циркуляция экстрагента, воздействие центробежных сил и ультразвука, повышение температуры смеси. На процесс экстрагирования оказывает влияние характер загрузки сырья в экстракторы, выбор и способ подачи экстрагента и др. [Сироткина Е.Е., 1987].

Выбор экстрагента определяется степенью гидрофильных извлекаемых веществ. В качестве экстрагента используют разнообразные растворители, отличающиеся избирательной растворяющей способностью. Если полученное извлечение является препаратом (жидкий экстракт, настойка), то в качестве растворителя используют преимущественно спирто-водные смеси с различной концентрацией [Пшуков Ю.Г., 1985].

Повышение температуры ускоряет процесс извлечения. Из уравнения диффузии Эйнштейна следует, что увеличение температуры повышает кинетическую энергию молекул диффундирующего вещества и снижает вязкость растворителя, что повышает молекулярную диффузию в частицах сырья и жидкой фазе.

Экстрагирование растительных субстанций пропиленгликолем проводили при комнатной температуре, поскольку ее повышение увеличивает потери экстрагента, и, следовательно, вредность и опасность работы с ним.

Одним из путей оптимизации технологии экстрагирования растительных субстратов, является использование ультразвука. Применение ультразвуковых установок позволяет ускорить процесс и повысить выход основного продукта по сравнению с другими способами экстрагирования [Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е., 1990].

Ультразвуковые волны создают «звуковой ветер», знакопеременное давление и кавитацию, что способствует увеличению растворения

содержимого клеток, повышению скорости обтекания частиц растительного сырья, а также образованию вихревых потоков в диффузном слое экстрагента. Таким образом, увеличивается коэффициент внутренней диффузии.

В доступной литературе имеются сведения о сокращении времени замачивания сырья с нескольких часов до нескольких минут под действием ультразвука [Поперечный А.Н., 1984]. Использование такой установки для экстракции алкалоидов из коры раувольфии, по данным Пономарева В.Д., дает 25% экономии сырья и сокращает время экстракции со 120 часов до пяти.

Технология экстрагирования проводилась в 3 основных этапа. На первом этапе проводили подготовку сырья и экстрагента с использованием ультразвукового дезинтегрирования [Кондратьева, Т.С., 1991].

Второй этап был посвящен непосредственному контактированию твердой и жидкой фаз в экстракторе. В процессе экстрагирования производили извлечение биологически активных веществ растительного происхождения путем избирательного растворения в экстрагентах.

Для оптимизации технологии экстрагирования большое внимание уделяли выбору экстрагентов. В связи с тем, что активные вещества, содержащиеся в растительных субстанциях имеют различные физико-химические свойства для каждого конкретного растения разрабатывалась своя специфическая процедура экстракции. На основании опытов выбирали лучший растворитель, оптимальную температуру и необходимую длительность экстракции.

Влияние поверхности контакта фаз на скорость экстракции изучалась исследованиями на различных видах сырья. При этом установлено, что измельчение сырья, представляющего собой тонкие пластинки (листья, цветки) до частиц размером 5-8 мм заметного влияния на скорость экстракции не оказывает и только заметно возрастает при увеличении

дисперсности частиц до 0,25-0,5 мм. Заметнее сказывается на скорости экстракции дисперсность частиц такого сырья, как травы, представляющего собой смесь частиц цилиндрической и пластинчатой формы. Особенно важна дисперсность для такого сырья, как корни, корневища, коры, плоды, семена, частицы которых изодиаметричны. При дисперсности такого сырья в пределах 0,5-2,0 мм скорость экстракции приобретает максимальное значение.

К используемому экстрагенту применяли следующие требования:

- 1) нетоксичный;
- 2) иметь низкую вязкость;
- 3) легко подвергаться регенерации;
- 4) экономически эффективный;
- 5) индифферентный по отношению к извлекаемым веществам;
- 6) обладать хорошей растворяющей способностью;
- 7) иметь низкое давление пара при рабочей температуре.

На основании вышеизложенного были выбраны два растворителя вода и пропиленгликоль, в задачу которых входило проникновение в клеточную мембрану внутрь растительной клетки, растворение сухого вещества клетки и выход из нее в виде раствора необходимых биологически активных веществ. Биологически активные вещества, входящие в состав растительной клетки очень разнообразны. К ним относят: алкалоиды, гликозиды, сапонины, горечи, дубильные вещества, флавоноиды, витамины, органические соединения, фитонциды, лактоны, эфирные масла, минеральные соли, фосфолипиды, стеринны [Ладыгина Е.А., Морозова Р.С., 1989].

На третьем этапе проходило разделение системы твердая фаза – раствор. Исходный материал экстрагировали путем осаждения, центрифугирования или фильтрации. Основная техническая задача сводилась

к получению большого количества очищенного экстракта, и свести до минимума потери.

На процесс экстрагирования растительных субстанций большое влияние оказывает ряд факторов, которые мы учитывали при выборе условий экстрагирования. К ним относятся: степень измельчения, разность концентраций, температурный режим, длительность экстракции, природные характеристики растворителя.

Таким образом, при отработке оптимальных методов экстрагирования ромашки, зверобоя, конского щавеля, календулы и солодки была выбрана следующая технологическая схема (рис.6):

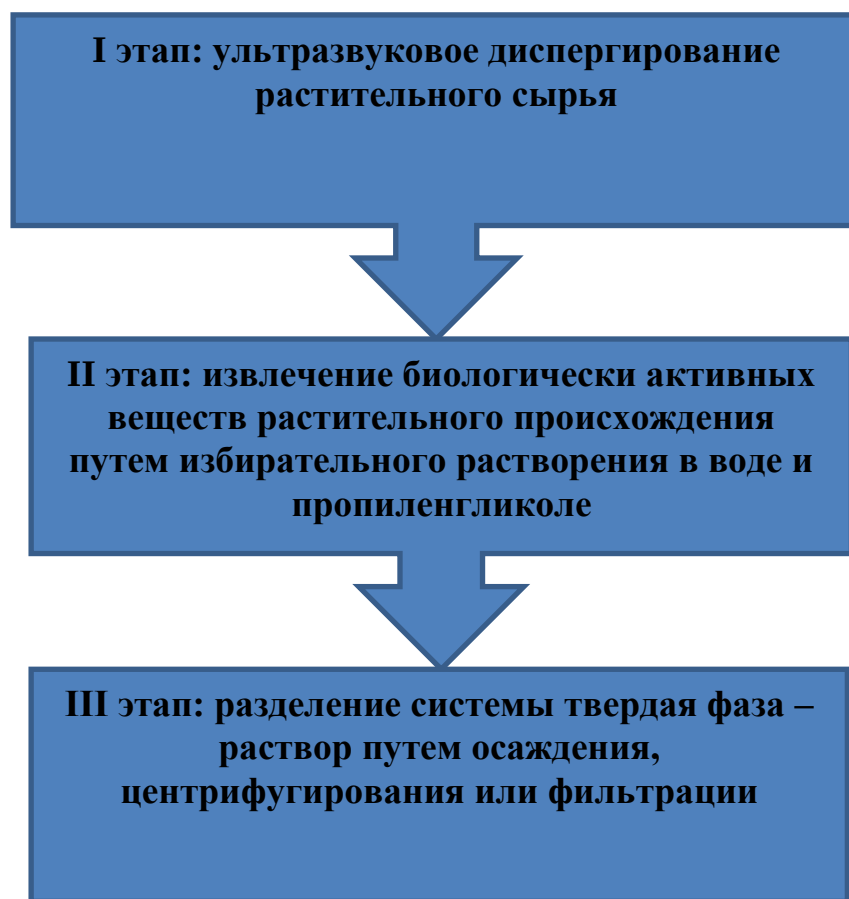


Рис.6 Технологическая схема получения антимикробных лекарственных экстрактов.

3.3. Определение чувствительности выделенных микроорганизмов к растительным экстрактам.

После идентификации микрофлоры приступили к определению ее резистентности или чувствительности диско-диффузным методом к пропиленгликолевому и водным экстрактам из корня конского щавеля, корня солодки, зверобоя продырявленного и ромашки лекарственной. Для этого чистую культуру каждого выделенного микроорганизма высевали на 8 чашек Петри с питательной средой, а после вносили 3 стерильных диска, пропитанных экстрактом в различной концентрации (1%; 5%; 10%).

Таблица 1

Исследование чувствительности *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Streptococcus spp.* диско-диффузным методом к растительным экстрактам

Название экстракта	Концентрация (%)	Диаметр зоны задержки роста микроорганизма (мм)		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
Водный экстракт зверобоя	1	-	6	8
	5	7	6	8
	10	8	8	10
Пропиленгликолевый экстракт зверобоя	1	10	12	10
	5	12	12	12
	10	16	14	12
Водный экстракт ромашки	1	-	-	-
	5	-	8	-
	10	8	9	8
Пропиленгликолевый экстракт ромашки	1	10	10	-
	5	10	10	8
	10	11	11	10
Водный экстракт корня солодки	1	-	-	-
	5	-	-	-
	10	10	10	12
Пропиленгликолевый экстракт корня солодки	1	9	-	-
	5	10	9	-
	10	17	10	10

Водный экстракт корня конского щавеля	1	7	10	9
	5	10	11	10
	10	12	11	10
Пропилен- гликолевый экстракт корня конского щавеля	1	10	10	10
	5	10	-	11
	10	-	-	12

Из таблицы 1 видно, что при выращивании представителей семейства *Micrococcaceae*: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Streptococcus spp.* на питательной среде с дисками, пропитанными водными и пропиленгликолевыми экстрактами зверобоя отмечается выраженное ингибирующее действие второго. Диаметры зон стерильности при использовании пропиленгликолевого экстракта зверобоя колеблются в пределах 10 - 14 мм (рис. 7) у всех трех наиболее часто встречаемых микроорганизмов, а повышение концентрации экстракта способствует увеличению зон угнетения роста. Несмотря на это, использование водного экстракта зверобоя также обуславливает появление зон задержки роста вышеуказанных микробов, но их диаметры варьируют от 6 до 10 мм, что также свидетельствует о чувствительности *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Streptococcus spp.* к экстракту.



Рис. 7. Зоны подавления роста *Staphylococcus aureus* с использованием дисков, пропитанных пропиленгликолевым экстрактом зверобоя в разных концентрациях.

При определении чувствительности *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Streptococcus spp.* к водному экстракту ромашки лекарственной выявлена их резистентность к самой низкой концентрации и частично (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*) к 5%, а повышение его концентрации приводит к образованию зон задержки роста у всех перечисленных микроорганизмов диаметром 8 - 9 мм.

Аналогичная ситуация обстоит и с водным экстрактом солодки. Однако концентрации 1% и 5% не оказывают ингибирующего влияния на исследуемых представителей семейства *Micrococcaceae* (рис. 8), а в концентрации 10% происходит образование зон стерильности диаметром 10 - 12 мм.

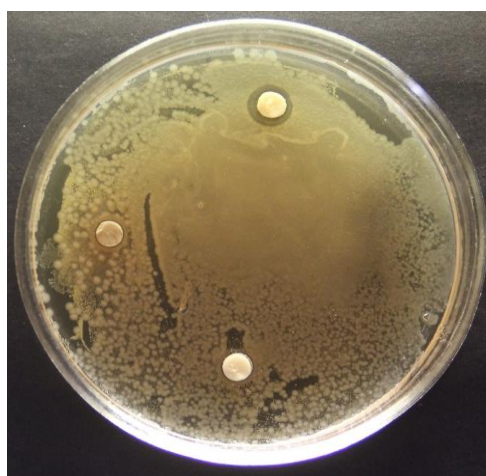


Рис. 8. Зоны подавления роста *Streptococcus spp.* с использованием дисков, пропитанных водным экстрактом из корня солодки в разных концентрациях (концентрация 10% сверху).

Пропиленгликолевый экстракт ромашки лекарственной в диско-диффузном методе при культивировании *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Streptococcus spp.* характеризуется наличием зон задержки роста всех вышеуказанным микробов. При этом для представителей рода *Staphylococcus* отмечается типичное влияние, и диаметр

их зон колеблется в диапазоне 10 – 11 мм. В то время как, представитель рода *Streptococcus* в малой концентрации экстракта является резистентным, повышение ее вызывает ингибирование его роста и появление зон в концентрации 5% диаметром 8 мм, 10% - 10 мм.

При культивировании микроорганизмов, представленных в таблице 1 с использованием в диско-диффузном методе пропиленгликолевого экстракта корня солодки отмечается выраженное ингибирующее действие в концентрации 10% на рост *Staphylococcus epidermidis*, причем диаметр зоны составляет 17 мм (рис. 9). Диаметры зон стерильности при использовании пропиленгликолевого экстракта солодки в концентрации 10% способствует также образованию зон задержки роста *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus spp.* диаметром 10 мм.



Рис. 9. Зоны подавления роста *Staphylococcus epidermidis* с использованием дисков, пропитанных пропиленгликолем экстрактом корня солодки в разных концентрациях (концентрация 10% снизу).

При определении чувствительности *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Streptococcus spp.* к водному экстракту корня конского щавеля выявлена их чувствительность к низким концентрациям (1% и 5%) и частично (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*) к 10%. Диаметр зон стерильности у *Staphylococcus aureus* (рис. 5) варьируют в пределах от 7 до 12 мм, у *Streptococcus spp.* – 9 – 10 мм, а у *Staphylococcus epidermidis* 10 – 11 мм.

Пропиленгликолевый экстракт корня конского щавеля в диско-диффузном методе при культивировании *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Streptococcus spp.* в концентрации 1% характеризуется наличием зоны задержки роста всех вышеуказанным микробов диаметром 10 мм (рис. 10). Увеличение концентрации экстракта 5% у *Streptococcus spp.* приводит к увеличению зоны стерильности до 11 мм, 10% - 12 мм, а у *Staphylococcus aureus* зона идентична концентрации экстракта 1%. Увеличение концентрации пропиленгликолевого экстракта корня конского щавеля до 5% и 10% приводит к резистентности *Staphylococcus epidermidis* и отсутствию зон задержки роста.



Рис. 10. Зоны подавления роста *Staphylococcus aureus* с использованием дисков, пропитанных водным экстрактом корня конского щавеля в разных концентрациях.

Таким образом, измерение диаметра зон стерильности выявило высокую степень чувствительности *Staphylococcus aureus* к пропиленгликолевым экстрактам из корня солодки и зверобоя. Резистентность при этом выявлена к водным экстрактам ромашки и корня солодки в концентрации 1% и 5%

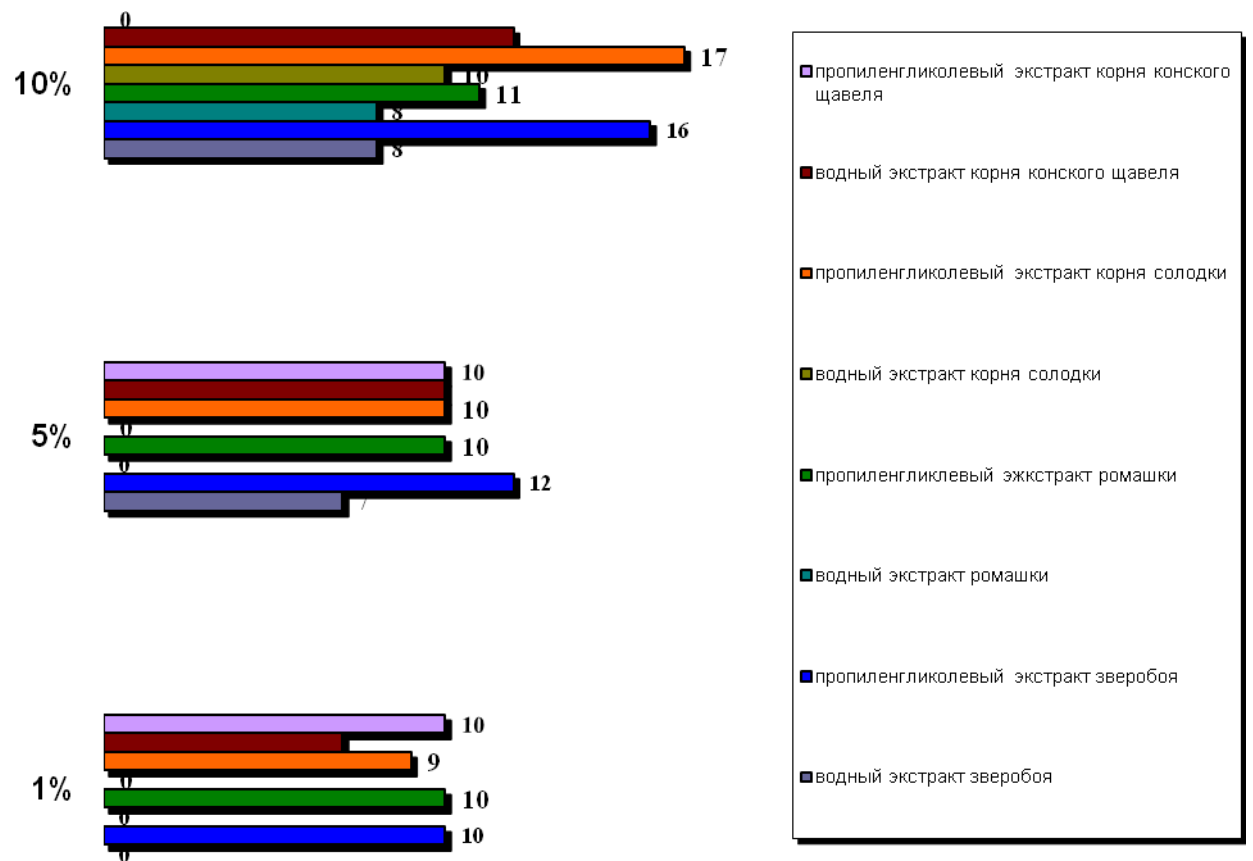


Рис. 11. Чувствительность *S. aureus* к экстрактам лекарственных трав в различной концентрации

При анализе результатов чувствительности *Staphylococcus epidermidis* к экстрактам лекарственных трав отмечена высокая резистентности к пропиленгликолевому экстракту зверобоя. Резистентность к водным экстрактам ромашки и корня солодки в концентрации 1% и 5% (рис.12).

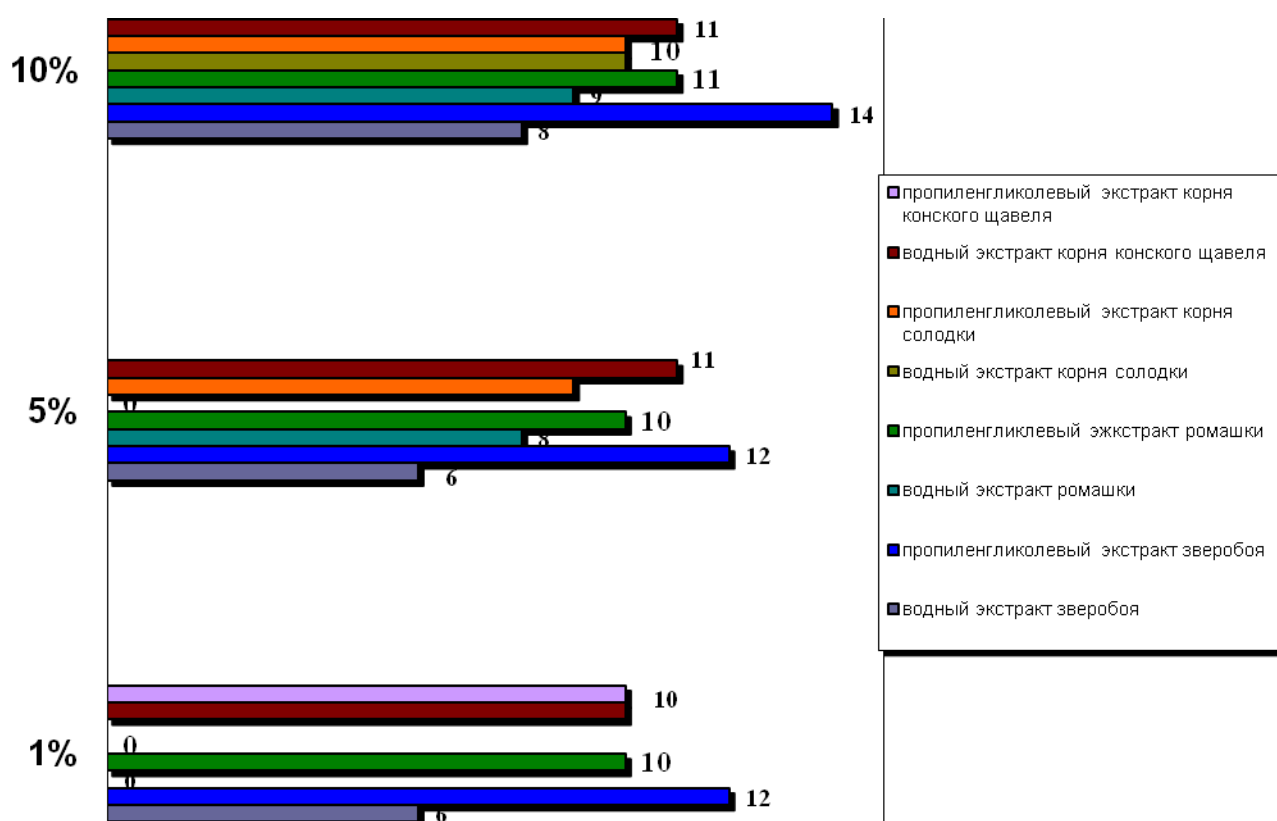


Рис. 12. Чувствительность *S. epidermidis* к экстрактам

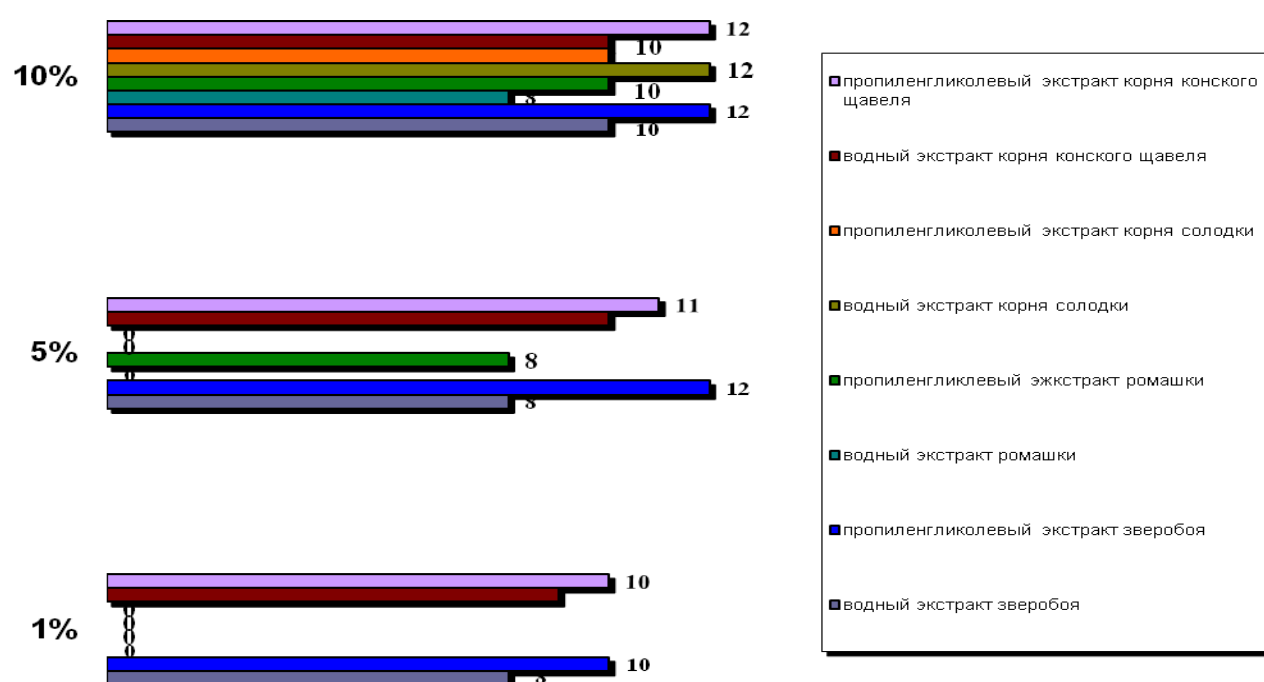


Рис. 13. Чувствительность *Streptococcus* spp. к экстрактам лекарственных трав в различной концентрации

Таким образом, на всех представителей семейства *Micrococcaceae* ингибирующее влияние оказал пропиленгликолевый экстракт зверобоя.

Экспериментально доказано, что ингибирующим действием на рост *Enterobacteriaceae spp.* обладает, пропиленгликолевый экстракт ромашки (рис. 13). При отработке ингибирующей оптимальной дозы экстракта установлено, что диаметр стерильных зон с концентрацией 5% и 10% одинаковый и составляет 13 мм.

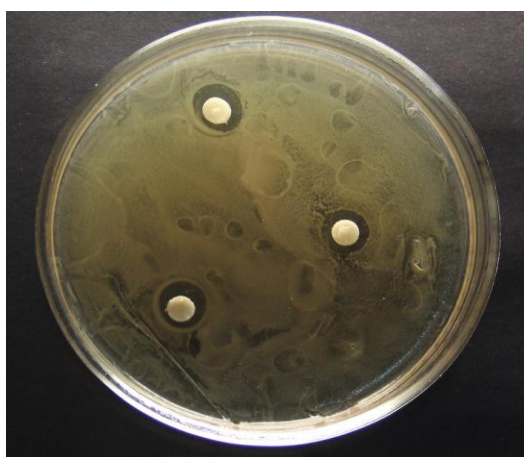


Рис. 14. Зоны подавления роста *Enterobacteriaceae spp.* с использованием дисков, пропитанных пропиленгликолевым экстрактом ромашки в разных концентрациях.

При выращивании *Enterobacteriaceae spp.* на питательной среде с дисками, пропитанными водными и пропиленгликолевыми экстрактами зверобоя отмечается выраженное ингибирующее действие первого. Диаметры зон стерильности колеблются в пределах 30-37 мм (рис. 14). При этом повышение концентрации способствует увеличению зон угнетения роста культивируемого микроба.



Рис. 15. Зоны подавления роста *Enterobacteriaceae spp.* с использованием дисков, пропитанных пропиленгликолевым экстрактом зверобоя в разных концентрациях.

На рис. 16 видно, что при выращивании *Enterobacteriaceae spp.* на питательной среде с использованием диско-диффузного метода экстрактов корня солодки выраженного визуального различия не установлено. При измерении диаметра зон стерильности, отмечено, что водный экстракт в концентрации 5% и пропиленгликолевый в концентрации 10% ингибируют рост микроба идентично и соответственно с одинаковыми показателями – 11 мм. Однако повышение концентрации водного экстракта не способствует увеличению зоны, а ее уменьшение привело к резистентности микроба.

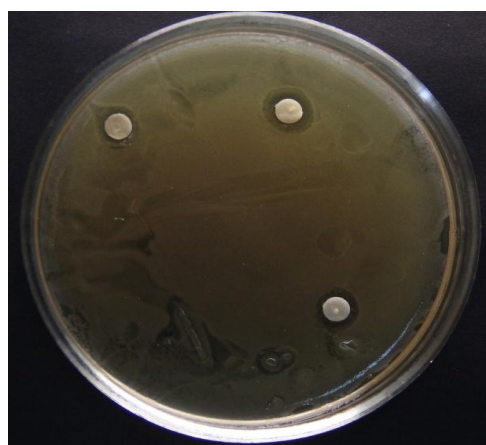


Рис. 16. Зоны подавления роста *Enterobacteriaceae spp.* с использованием дисков, пропитанных пропиленгликолевым экстрактом корня солодки в разных концентрациях.

При выращивании *Enterobacteriaceae* spp. (рис.16, рис.17) на питательной среде с дисками, пропитанными водными и пропиленгликолевыми экстрактами корня конского щавеля отмечена аналогичная чувствительность микробов к экстрактам. При этом концентрация 1% экстракта не вызывает ингибирования роста культивируемого микроорганизма. Увеличение концентрации до 5% и 10% способствует образованию зон стерильности диаметром 12 мм.

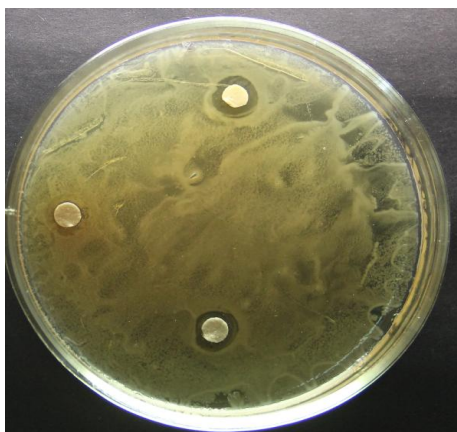


Рис. 17. Зоны подавления роста *Enterobacteriaceae* spp. с использованием дисков, пропитанных водным экстрактом корня солодки в разных концентрациях.

Propionibacterium acne (рис.18) выделялись в единичных случаях у пациентов с угревой болезнью, и, как правило, сопутствующая микрофлора ингибировала рост этих микроорганизмов. В связи с этим, проведение диско-диффузного метода для микроорганизмов этого вида явилось неуместным.

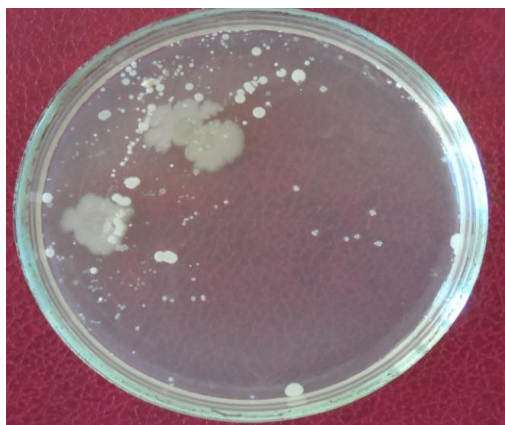


Рис. 18. Рост *Propionibacterium acne* на питательной среде.

Таким образом, в результате проведённых исследований выявлено, что наиболее высокие показатели ингибирования роста различной флоры микроорганизмов у больных акне отмечены у водного экстракта зверобоя в концентрации 10%, пропиленгликолевого экстракта корня солодки в концентрации 5% и водного экстракта конского щавеля в концентрации 5%. Эти растительные экстракты использовались в дальнейшем для получения антимикробного ниосомального геля.

При изучении возможности формирования устойчивости условно-патогенными микроорганизмами основных представителей биоценоза кожи к антимикробному действию растительных экстрактов, также установлена низкая частота образования резистентных форм, подтверждённая в дальнейшем проведёнными клиническими исследованиями ниосомального геля.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ НИОСОМАЛЬНОГО ГЕЛЯ У БОЛЬНЫХ АКНЕ.

4.1. Биотехнология приготовления ниосомального геля

На сегодняшний день одним из основных направлений фарминдустрии является подбор новых путей доставки препаратов [Manconi M. et al., 2003]. Это связано с тем, что обычные способы применения лекарственных препаратов перорально или внутривенно не всегда дают идеальное распределение биологически активных веществ в организме [Jinfang Yuan, Yali Luo, Qingyu Gao, 2002].

Новой технологией является создание трансдермальных препаратов, полученных путем инкапсулирования биологически активных веществ в нановезикулы [Nalla Dilip Reddy B., Challa Vinil Reddy, Kishore A.B., 2010]. Такой подход позволит принципиальным образом изменить свойства лекарств: сделать их более эффективными, влиять на режим их применения, придать им адресность и снизить известные побочные эффекты. Целевая доставка лекарственных средств к заданным биоместам особенно важна для применения биологически активных веществ растительного происхождения [Machado S.R.P., Evangelista R., 2010; Tabbakhian M., 2006].

Актуальным направлением в наружном лечении акне является разработка антимикробных гелей с трансдермальным эффектом. Инкапсулированные формы, содержащие фитопрепараты, обладают более выраженным действием по сравнению с нативными композициями при наружном применении в дерматологии [S.Mura et al., 2007]. В качестве доставляемых активных субстанций использовали растительные экстракты из ромашки, зверобоя, конского щавеля и солодки.

Разработанные нами ниосомы представляют собой везикулы, состоящие из оболочки нерастворимого в воде двойного слоя неионогенного эмульгатора ПЭГ-12 диметикон, по структуре подобного строения элементарных биологических мембран, и заключенного внутри капсулы и

или её стенки в зависимости от липофильности активной субстанции. Диметикон кополиолы, образующие ниосомы, представляют собой гипоаллергенные соединения кислорода, водорода, кремния и углерода.

Наличие ковалентной связи Si-O в гидрофобной части молекулы полидиметилсилоксановой основы эмульгатора, которая обладает большой эластичностью и реакционной способностью, позволяет направленно доставлять в ткани активные субстанции, полученные путем экстрагирования растительного сырья и при помощи реакционноспособных участков целенаправленно их выпускать из везикулы.

Исследование по получению ниосом осуществлялось в асептических условиях, используя на всех этапах стерильные растворы и посуду

Создание таких капсул позволило получить новые наночастицы, превосходящие липосомы по нескольким параметрам [Базиков И.А., Омелянчук П.А., Хатков Э.М., Гукасян А.Л., Сеираниду З. А., 2012].

На первом этапе конструирования трансдермального ниосомального геля получали дисперсию ниосом методом механического (ручного) встряхивания. Процесс проводили при комнатной температуре и интенсивном механическом встряхивании ПЕГ-12 диметикона на шейкере в течение 5 минут.

В дальнейшем, полученные ниосомы модифицировали ультразвуком. Этот метод легко воспроизводим и отличается простотой осуществления.

При воздействии ультразвуковых волн, мультиламеллярные ниосомы, полученные методом встряхивания, обретали моноламеллярную структуру. При этом размеры ниосом уменьшались до размера менее 100 нанометров (Нм) и становились более однородными пропорционально мощности и времени озвучивания.

Дисперсию ниосом, полученную методом механического (ручного) встряхивания помещали в сосуд для ультразвуковой обработки. Режим озвучивания: частота – 20 кГц, мощность – 150-250 Вт. Для экспозиции

использовали временные интервалы в 15, 30 и 45 минут. При этом образовывались моноламеллярные ниосомы размером менее 100 Нм с включением иммобилизируемого материала не менее 50%. Причём наибольший процент иммобилизуемых веществ был отмечен при экспозиции 30 минут (табл. 2).

Таблица 2

Содержание иммобилизуемых веществ

Временной интервал экспозиции УЗ- обработки (мин.)	Мощность озвучивания (Вт)	Количество иммобилизуемых веществ (%)
15	150	51
30	200	63
45	250	61

Содержание иммобилизуемых веществ определяли спектрофотометрическим способом.

Количество иммобилизуемых веществ, включенное в ниосомы напрямую зависило от способа получения ниосом и их размера. Соответственно, чем меньше ниосома, тем меньшее количество иммобилизуемых веществ внутри ниосомы, но одновременно маленькая ниосома способна проникнуть в глубокие слои кожи. Поэтому, интерес представляют маленькие моноламеллярные ниосомы размером менее 100 Нм, имеющие тонкую эластичную оболочку, позволяющую продвигаться по межклеточным промежуткам, представляющим собой липидный матрикс.

Размер ниосом зависил от свойства мембраны, ПЕГ-12 диметикон (PEG-12 Dimethicone), образующей бислойную структуру, что позволяло получать сверхтонкую и эластичную мембрану.

Ультразвуковая обработка дисперсии ниосом вела к повышению количества включаемых растительных активных веществ во внутренний

объем ниосом. Биологически активные вещества, обладающие тропностью к ПЕГ-12 Диметикону, иммобилизовались в ниосомы при различных режимах ультразвукового воздействия.

Ультразвуковой метод использовали в дальнейшем также и для иммобилизации в них различных экстрактов растительного происхождения.

Данную процедуру проводили при температуре 15 С для того, чтобы избежать негативного воздействия на иммобилизуемые в ниосомы вещества и ПЕГ-12 Диметикон.

В связи с тем, что экстракты занимают небольшой объем относительно других компонентов, их включение в ниосомы производилось путем добавления 2% ПЭГ-12 диметикона к раствору экстрагированных активных субстанций растительного происхождения в отдельной емкости. После включения активных субстанций в ниосомы суспензия ниосом вносилась к другим компонентам эмульсии при комнатной температуре. Особенностью включения липидной фазы геля, содержащей 5% циклометикона, в ниосомы являлось предварительное растворение в ней 2% ПЭГ-12 диметикона, перемешивание и последующее внесение в водную фазу смеси. Заключительная стадия формирования ниосом происходила при интенсивном механическом перемешивании смеси с использованием АПВ гомогенизатора (табл. 3).

Включение экстрактов растительных трав в кремнийорганические везикулы (ниосомы) и последующая обработка эмульсии на гомогенизаторе высокого давления АПВ гомогенизаторе, обеспечивала эффективную пролонгированную дозированную трансдермальную доставку активных субстанций в клетки тканей, не нарушая их целостности.

В процессе диспергирования жидкая смесь продавливалась под высоким давлением (до $3,5 \times 10^7$ Па) через узкие кольцевые отверстия сечением 10^{-4} см²; коллоидные мельницы, в которых жидкость диспергируется при прохождении через конические зазоры шириной до 25

мкм между статором и ротором, вращающимся с частотой $2 \cdot 10^4$ об/мин, смесители инжекционного типа и форсунки, работающие по принципу действия струйного насоса, высокоскоростные мешалки турбинного типа.

Таблица 3

Фазы приготовления и рецептура геля с растительными экстрактами

№п/п	Фазы приготовления и рецептура геля с растительными экстрактами	
	Наименование ингредиента	Содержание в % (по массе)
Фаза А		
Интенсивное механическое встряхивание на шейкере ПЭГ- 12 диметикона		
Фаза Б		
Ультразвуковая обработка дисперсии ниосом		
Фаза В		
Механическое перемешивание компонентов в смесителе		
1	Дистиллированная вода	до 100
2	Консервант	0,05
3	Гелеобразователь	2,5
4	Эмульсия ниосом, содержащая растительные экстракты	1, 5, 10
5	ПЭГ-12 диметикон	2
6	Циклометикон	5
Фаза Г		
7	Триэтаноламин	2,0
Фаза Д		
	Эмульгирование геля на АПВ гомогенизаторе	

На примере гидрофильной доставляемой активной субстанции, в качестве образцов, использовали растительные экстракты в концентрации 1%, 5 %, 10%.

Фаза А приготавливалась при комнатной температуре путем механического перемешивания компонентов в смесителе.

Изготовление фазы В, отличалось предварительным смешиванием 2% ПЭГ-12 диметикона с 5 % растительным экстрактом в отдельной емкости и только затем добавлением дистиллированной воды. Процесс проводили при комнатной температуре и интенсивном механическом встряхивании на шейкере, в течение 5 минут. Для стабилизации концентрации водородных ионов (рН) до 6,6-7,0 и формирования структуры геля вносили триэтаноламин в фазе Г. Образовавшийся в результате гель эмульгировали на АПВ гомогенизаторе APV Lab Series Homogenizers – 1000 (Фаза Д).

В ходе проведенных исследований по формированию гелей и эмульсий с содержанием ниосом 1; 5 и 10 %, экспериментальным путем установлено, что наибольшей стабильностью обладают композиции с 10% содержанием ниосом.

Наиболее высокий процент включения водорастворимых соединений 63%, наблюдался при концентрации активных соединений 10%.

Таким образом, система доставки биологически активных веществ, состоящая из поверхностно-активных веществ, представляла собой модифицированные силиконовые эмульгаторы – диметикон кополиолы, образующие везикулы – ниосомы, эмульгированные на АПВ гомогенизаторе для стандартизации размеров ниосом и увеличения количества включаемых активных веществ. Стабильность повышена за счет электростатической устойчивости. Наличие гидрофильных остатков полиэтиленгликоля и реакционных участков в диметиконе определили таргентность полученного геля. «Пространственная сетка» полимера полиэтиленгликоля и стандартных по размеру ниосомах позволили показать высокий процент включения активных веществ. В итоге получен антимикробный ниосомальный гель с инкапсулированными растительными экстрактами, обладающий рядом преимуществ высокоэффективной внутритканевой доставки.

4.2. Изучение противомикробной активности растительных экстрактов в различных лекарственных формах и исследование возможности образования резистентной микробной флоры

Эффективность лечения акне зависит от концентрации растительных субстанций с антимикробным эффектом. Для выбора оптимальной концентрации использовали метод диффузии в агар. Изучалась также возможность образования резистентной микробной флоры.

В эксперименте в течение 8 недель проводилось определение противомикробной активности экстракта зверобоя в водном и пропиленгликолевом растворах, а также в ниосомальном геле. Испытуемый материал разделили на две части: первую порцию хранили при температуре +25°C в светопроницаемых колбах, вторую при температуре +3-5°C в холодильнике. Один раз в 7 дней определяли противомикробную активность экстракта зверобоя в исследуемых лекарственных формах. В ходе исследования противомикробной активности экстракта зверобоя в пропиленгликолевом растворе при температуре +25° С к концу первой недели определяется ее снижение на 15% от исходной формы, к концу месяца антибактериальная активность уменьшилась до 25%, а к окончанию эксперимента она составила 67%.

При хранении водного раствора экстракта зверобоя регистрируется спад противомикробного действия на 18% к концу первой недели и незначительное понижение к концу месяца. К концу 8 недели антибактериальная активность водного экстракта понизилась на 38%.

Противомикробная активность экстракта зверобоя в ниосомальном геле снизилась на 5% к концу первой недели при температуре хранения +25°C и сохранялась неизменной до 6 недели. К концу 8 недели ее активность снизилась на 17,5% от исходного состояния (рис. 19).

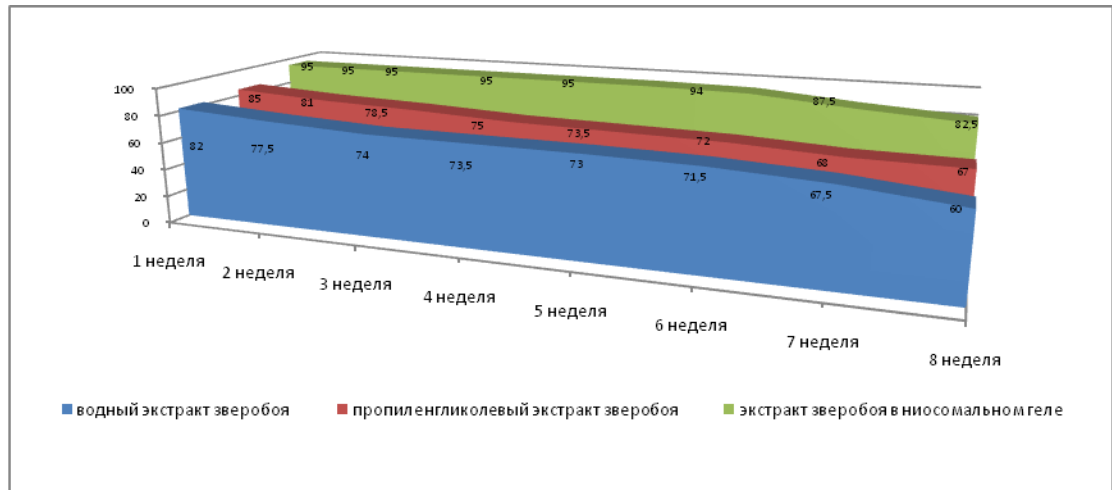


Рис. 19. Изменение противомикробной активности экстракта зверобоя в ниосомальном геле, в водном и пропиленгликолевом растворе при температуре хранения $+25^{\circ}\text{C}$

В ходе исследования по оценке противомикробной активности экстракта зверобоя в пропиленгликолевом растворе при температуре $+3-5^{\circ}\text{C}$ отмечается влияние условий хранения на показатель антибактериальной активности экстракта. При этом к концу первой недели исследования показатель снизился на 13,5%, к середине исследования на 21,5%, а к окончанию эксперимента на 37,5%.

Водный экстракт зверобоя, при хранении в холодильнике, теряет антимикробную активность аналогично пропиленгликолевому экстракту с незначительными изменениями. Так, при изучении активности установлено достоверное понижение показателя на 13,0%, а к 8 неделе понизился до 60%.

При хранении в условиях холодильника активность ниосомального геля не изменялась в течение 6 недель и к концу 8 недели снизилась на 1,5% (рис. 20).

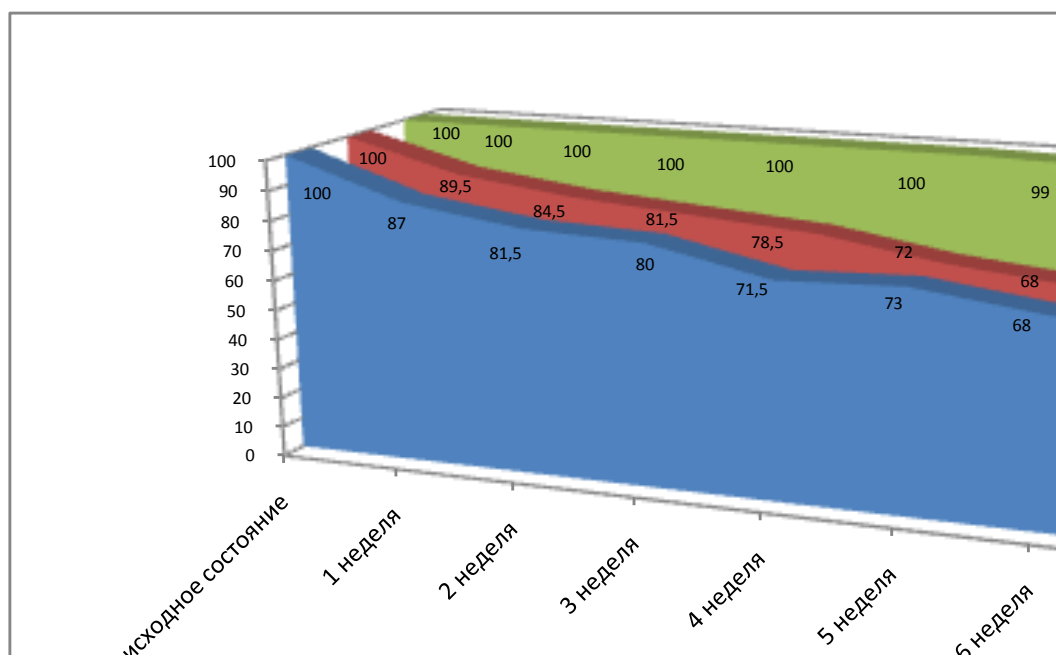


Рис. 20. Изменение противомикробной активности экстракта зверобоя в ниосомальном геле и водном растворе при температуре хранения +3-5° С

Таким образом, при сравнении антибактериальной активности экстракта зверобоя в водном растворе и в экстракта зверобоя в ниосомальном геле через 4 недели при температуре хранения +25° С установлено, что активность ниосомального геля сохраняется на $95,23 \pm 1,1\%$, в водного раствора экстракта зверобоя снижается до $73,5 \pm 0,5\%$, а в пропиленгликолевом растворе – $75,0 \pm 0,6\%$, различия активности достоверны ($\chi^2=301,992$; $p<0,001$). При хранении при температуре +3-5° С активность экстракта зверобоя в водном растворе снижается до $71,5 \pm 0,5\%$, в пропиленгликолевом до $78,5\%$, а в ниосомальном геле сохраняется на исходном уровне ($\chi^2=177,468$; $p<0,001$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что иммобилизация экстракта зверобоя в ниосомы предохраняет его от окисления, способствует длительному сохранению его противомикробной активности. Противомикробная активность ниосомальных форм экстракта зверобоя в течение 6 недель остается на исходном уровне при температуре хранения +3-5° С, а при температуре +25° С сохраняется на уровне 95%.

При изучении возможности формирования устойчивости условно-патогенными микроорганизмами основных представителей биоценоза кожи к антимикробному действию ниосомальных форм растительных экстрактов установлена низкая частота образования резистентных форм, подтверждённая в дальнейшем проведёнными клиническими исследованиями.

4.3. Экспериментальная оценка способности проникновения ниосом через дерму.

Изучение пенетрирующей способности ниосом проводили на белых нелинейных крысах, которые были разделены на 3 группы: первую группу составляли лабораторные животные, на кожу которым наносили 1% раствор трипанового синего; второй группе экспериментальных животных - гель с раствором трипанового синего, а третьей – ниосомальный гель с включением трипанового синего.

В коже контрольной группы крыс (1 группа), которым наносили только краску, при гистологическом исследовании патологические изменения не обнаружены. Эпидермис равномерной толщины, четко определяются слои эпидермиса: базальный, шиповатый, зернистый и роговой. В эпидермисе основную массу эпидермальных клеток составляют кератиноциты, встречаются меланоциты, внутриэпидермальные макрофаги. Дерма представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью обычной гистологической структуры, а гиподерма – подкожно-жировой клетчаткой.

Базальный слой эпидермиса представлен 3 рядами клеток кубической формы. Базальные эндокриноциты окрашиваются базофильно, соединены между собой десмосомами. Базальная часть клеток располагается на базальной мембране.

В шиповатом слое обнаруживаются кератиноциты полигональной формы, расположенные в 3-4 ряда. В верхних слоях шиповатого слоя они

уплощаются и располагаются параллельно кожной поверхности. В цитоплазме имеются плотные гранулы овальной формы. Между клетками имеются плотные контакты типа десмосом, обеспечивающих образование шипиков.

Десмоикин – специфический белок шиповатого слоя способствует созданию прочных клеточных контактов, при этом обладая адгезивными свойствами.

В клетках шиповатого слоя можно обнаружить также многочисленные скопления тонофибрилл, которые образуют сеть. По всей цитоплазме равномерно расположены кератициты, увеличивающие количество плотных гранул овальной формы - кератиносом (гранулы Одланда), окруженных мембраной и содержащих фосфолипиды.

Три ряда уплощенных клеток, в цитоплазме которых имеются кератогиалиновые гранулы образуют зернистый слой эпителия. В них содержится белок филаггрин. Из белкового вещества в дальнейшем образуется кератин – роговое вещество кожи. В верхних клетках зернистого слоя кератиносомы располагаются под оболочкой, из них в межклеточное пространство выбрасываются вещества, из которых формируется водонепроницаемый барьер и происходит цементирование клеток между собой. Кератиноциты зернистого слоя в верхних отделах имеют форму четырнадцатигранника.

Роговой слой эпидермиса образован из ороговевших четырнадцатигранников (корнеоцитов), между которыми располагается межклеточный «цемент». В межклеточном пространстве рогового слоя имеются мембраны, которые объединяются в многослойные пласты, которые соединены между собой и с корнеоцитами. Роговой слой образован из безъядерных, упорядоченно расположенных клеток, заключенных в межклеточное вещество. Клетки рогового слоя постоянно слущиваются.

Под базальной мембраной эпидермиса располагается дерма, которая состоит из 2-х слоев: сосочкового и сетчатого. Первый – представлен рыхлой волокнистой соединительной тканью, которая впячивается в эпидермис в виде сосочков, а второй - плотной волокнистой неоформленной соединительной тканью.

Сальные железы у крыс располагаются возле корня волоса, а их выводные протоки открываются в волосяную воронку. Это простые альвеолярно разветвленные железы.

В первой экспериментальной группе на поверхности эпидермиса видны отложения глыбок трипанового синего. В эпидермисе и дерме трипановый синий не определяется. Сальные железы имеют обычное гистологическое строение и ниосомы в них не определяются (рис. 21).

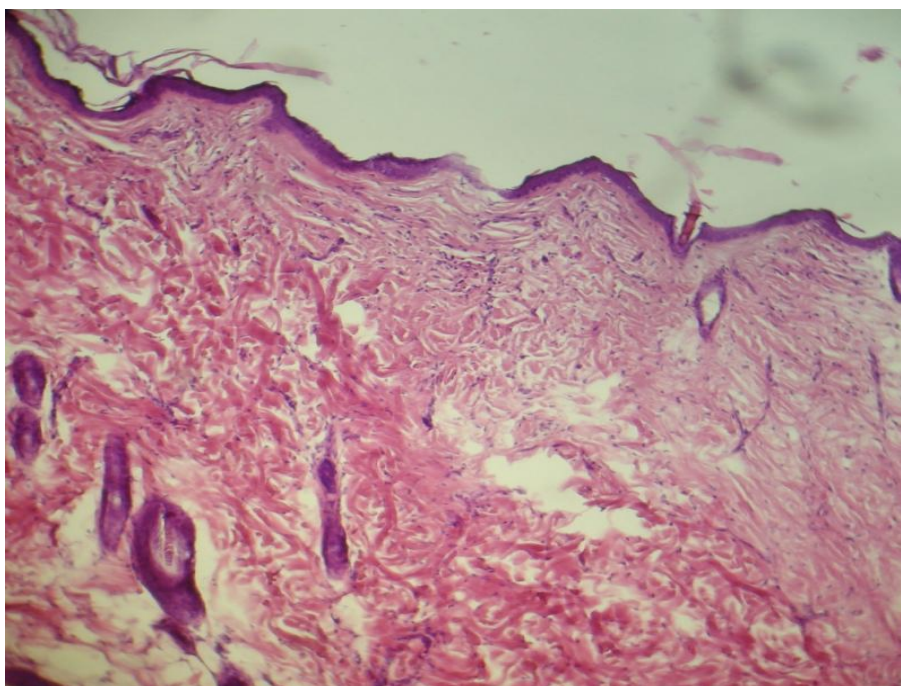


Рис. 21. Кожа крысы контрольной группы после нанесение краски

Окраска гематоксилином и эозином $\times 100$.

У второй группы животных после нанесения на кожу крысы краски вместе с гелем во все сроки эксперимента в дерме эпидермиса изменения не обнаружены и гистологическая структура не нарушена. На поверхности

эпидермиса хорошо визуализируются отложения трипанового синего, которые по сравнению с контрольной группой более массивны.

Глубьки также отчетливо видны на поверхности рогового слоя и на границе шиповатого и базального слоев эпидермиса. В более нижних слоях: эпидермиса, дермы и сальных желез гель с раствором трипанового синего не выявлены (рис. 22).

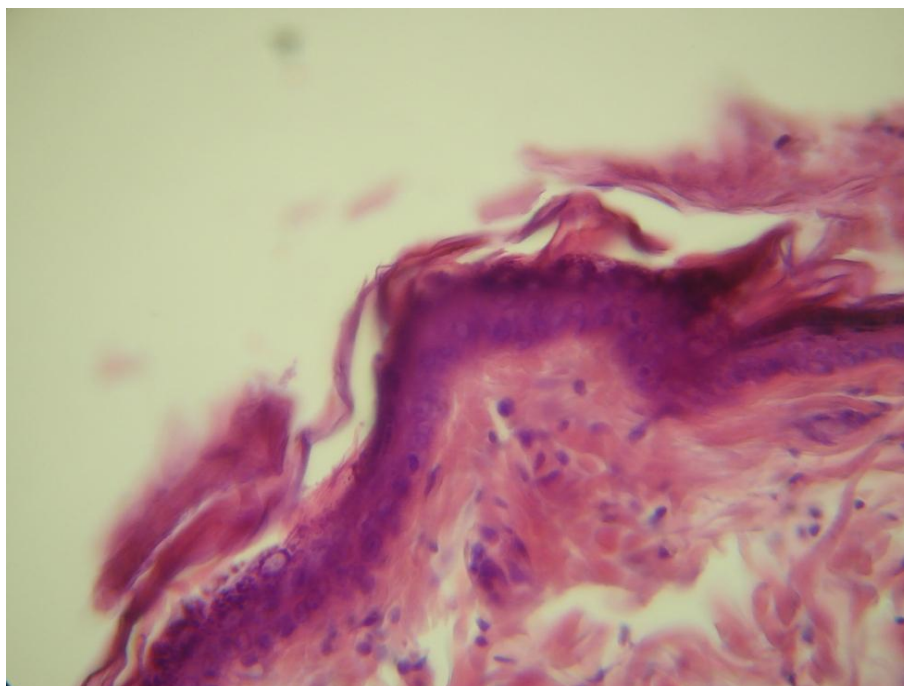


Рис. 22. Кожа крысы второй группы после нанесение геля и краски
Окраска гематоксилином и эозином $\times 100$.

В третьей экспериментальной группе животных при нанесении ниосомального геля с включением в наночастицы трипанового синего гистологическая структура кожи не нарушена. Сохранена гистоархитенктоника всех слоев эпидермиса.

В поверхностных слоях дермы четко определяются скопления ниосом, которые свидетельствуют о более глубоком проникновении ниосомального геля в третьей экспериментальной группе, по сравнению с контролем. Ниосомальный гель проникает через все слои эпидермиса, базальную мембрану, сосочковый слой дермы и накапливается в сетчатом слое. Большинство скоплений обнаружено вокруг сосудов и в сальных железах.

При нанесении на кожу крысы краски с ниосомами в эпидермисе обнаружена полоса, окрашенная в темно-коричневый или почти черный цвет. Полоса распространяется на роговой, зернистый и шиповатый слои эпидермиса. В этих участках обнаружены мелкие глыбки краски черного цвета. Глубина проникновения краски составляет $2/3$ толщины эпидермиса (рис. 23).

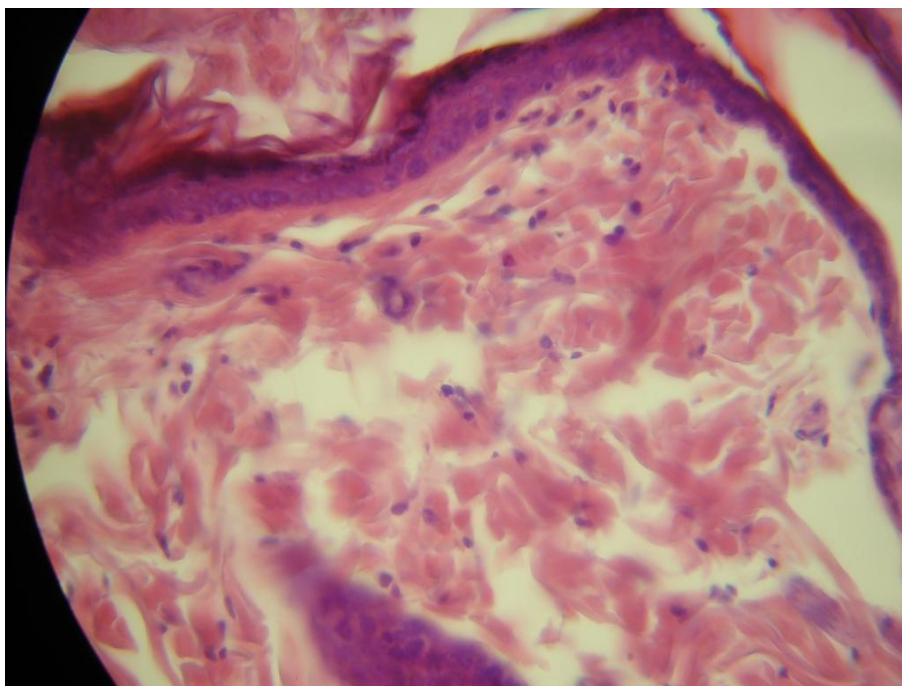


Рис. 23. Кожа крысы после нанесения краски с ниосомами. Вкрапления краски в эпидермисе. Окраска гематоксилином и эозином $\times 100$.

В подлежащих слоях дермы обнаружены скопления тканевых макрофагов-гистиоцитов, а также лимфоцитов и других клеток. В цитоплазме макрофагов определяются мелкие глыбки краски (рис. 24).

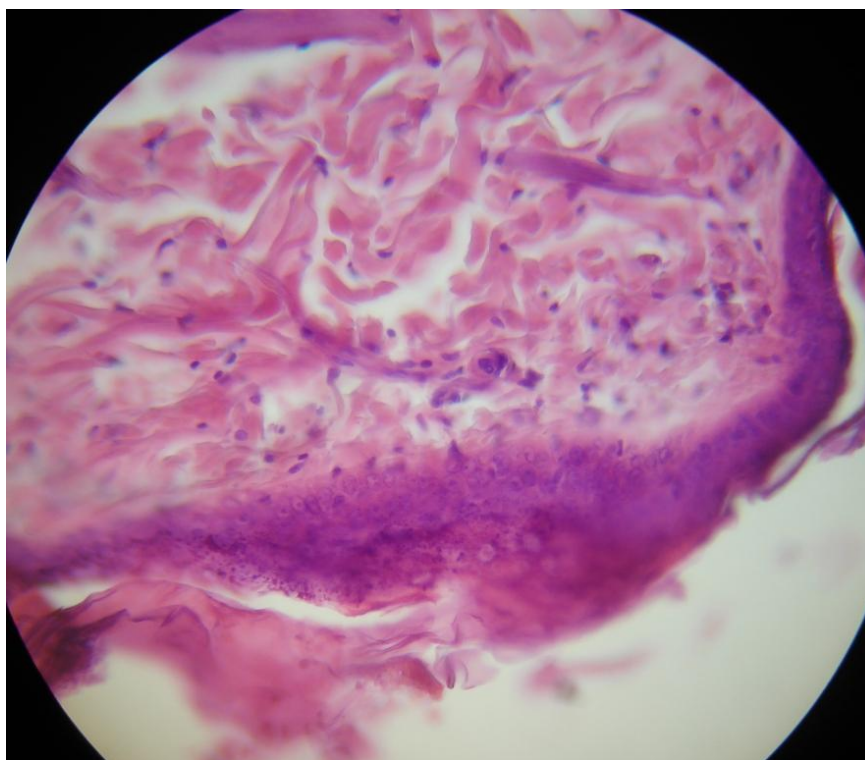


Рис. 24. Очаговые макрофагальные инфильтраты в сетчатом слое дермы.

Окраска гематоксилином и эозином $\times 100$.

Описанные изменения наблюдались через 49 часов от начала эксперимента.

На основании полученных данных можно сделать вывод о наиболее глубокой пенетирующей способности ниосом с включением трипанового синего. Наночастицы позволили провести краситель через все слои дермы и расположиться глубоко в сетчатом слое дермы. Скопления нановезикул обнаруживаются вблизи сосудов, в стенке и просветах сосудов.

4.4. Изучение эффективности разработанного антимикробного ниосомального геля для лечения акне.

Эффективность ниосомальных форм растительных экстрактов оценивалась на основании регресса морфологических элементов и возможности образования резистентной микробной флоры. Клинические испытания нового препарата проводились с максимальным соблюдением

требований международного стандарта "Надлежащая клиническая практика" (Good Clinical Practice (GCP)), который регламентирует планирование, проведение (дизайн), мониторинг, длительность, аудит, анализ, отчетность и ведение документации исследования.

В соответствии с существующим законодательством клинические испытания препарата проводились на больных, страдающих акне.

Результативность лечения оценивали при подсчете морфологических элементов до начала лечения и далее, один раз в три дня до окончания лечения. Учитывали количество папул и пустул на стандартном поле 5х5 см на щеке.

Клиническую эффективность изучали на двух группах пациентов. В основной группе, где пациенты получали лечение разработанным препаратом, наблюдался быстрый регресс акне элементов (таб.4). Так, количество пустул уменьшилось на 63,4% через неделю после начала лечения, а через 2 недели количество пустул снизилось на 87,5%. Через 3 недели число пустул сократилось на 99,1% от исходного количества, а к 24 дню от начала лечения, высыпания регрессировали у 100% пациентов.

Таблица 4. Динамика регресса папул и пустул в основной группе

Дни	Среднее количество пустул	Среднее количество папул
0	11,5±0,14	11,2±0,12
3	9,8±0,11	9,9±0,11
7	3,7±0,1	7,3±0,12
9	2,7±0,13	5,4±0,12
12	1,3±0,09	4,6±0,09
14	0,8±0,1	3,8±0,11
18	0,5±0,05	3,3±0,1
21	0,2±0,03	1,8±0,07

24	0	1,3±0,04
27	0	0,9±0,04

При изучении регресса невоспалительных элементов (папул), была получена следующая динамика: регрессом папул был менее активным, однако через неделю количество папул уменьшилось на 25,5%, а через 2 недели на 51,8%, что составляло более половины папул отначала лечения. Через 3 недели число папул сократилось на 84,9% и к концу лечения на 94,1%.

В целом, уменьшение пустул и папул наблюдалось уже с 8 дня лечения. А к 24 дню лечения разработанным препаратом все пустулы регрессировали. И только лишь 2,9% папул сохранялось на 27 день лечения.

При наружном лечении традиционным антимикробным гелем "Бензамицин" в контрольной группе больных акне через неделю регрессировало 51,6%, а на 12 день 55,3% пустул (таб.5). В дальнейшем, динамика уменьшения воспалительных элементов замедлилась, и к 15 дню число пустул снизилось на 70,8%. Через 3 недели пустулы регрессировали на 76,7%, а на 27 день отмечалось их уменьшение на 79,4%.

Таблица 5. Динамика регресса папул и пустул в контрольной группе.

Дни	Среднее количество пустул	Среднее количество папул
0	8,7±0,19	9,7±0,13
3	8,4±0,19	8,5±0,16
7	5,7±0,15	8,1±0,17
9	5,0±0,13	7,0±0,12
12	4,8±0,12	6,5±0,24
14	4,4±0,12	6,1±0,19
18	3,8±0,13	5,0±0,18

21	3,4±0,14	4,3±0,19
24	1,9±0,14	3,1±0,12
27	1,7±0,16	2,9±0,11

У пациентов контрольной группы, получавших лечение традиционным антимикробным гелем "Бензамицин", динамика регресса папулёзных элементов была медленнее, чем пустул. Эти данные коррелируют с наблюдениями за регрессом высыпаний в основной группе. С начала лечения, через неделю в группе сравнения регресс папулёзных элементов составлял 14,5%, а через 2 недели 31,8% от первоначального уровня. Через 3 недели лечения количество папул уменьшилось на 44,5%. К окончанию лечения в контрольной группе регрессировало 51,7% папулезных высыпаний.

Таким образом, к 27 дню лечения у больных в группе сравнения уменьшилось количество пустул на 79,4% а папул на 51,7%. Эти данные отражены в рисунке 24, где кривые количества пустул у пациентов основной группы и контрольной до 7 дня терапии идут параллельно. Через неделю уменьшение количества пустулёзных элементов в основной группе шло более динамично, и к 24 дню наблюдался регресс всех пустул.

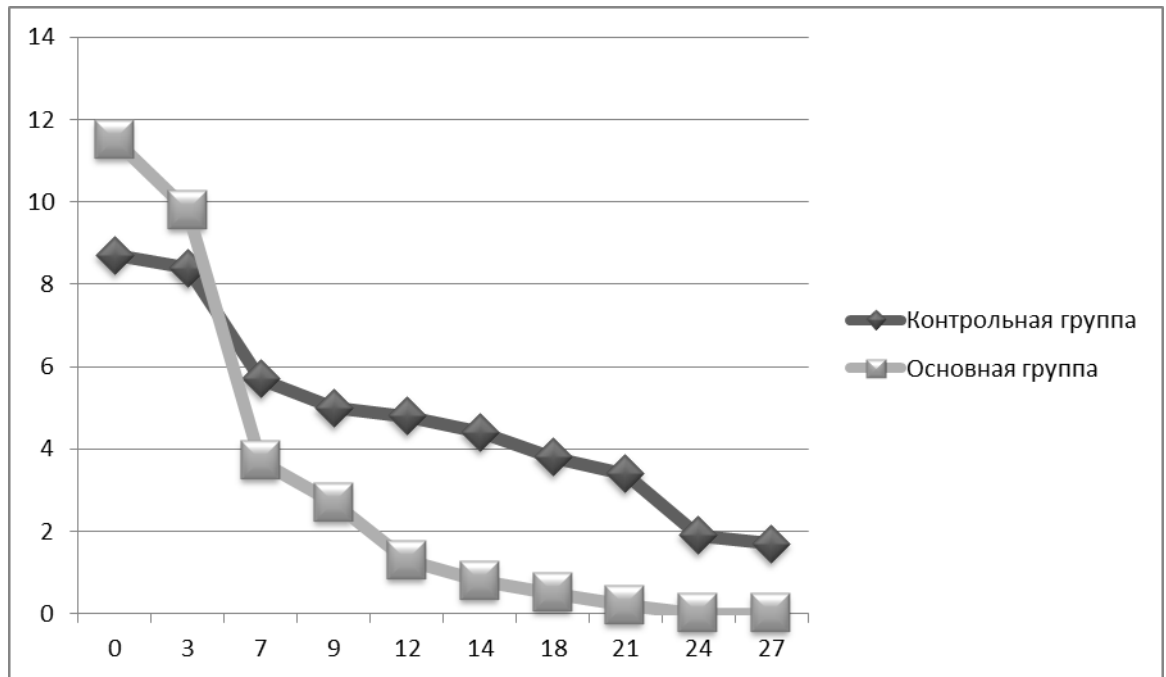


Рисунок 25. Динамика регресса пустул у пациентов основной и контрольной групп

* $p < 0,001$

В контрольной группе с 9 по 24 день регрессировало 78,5% пустул, а к 27 дню 83,9%.

Эти данные свидетельствуют о том, что антимикробный ниосомальный гель обладает более выраженной клинической эффективностью по сравнению с антимикробным гелем "Бензамицином».

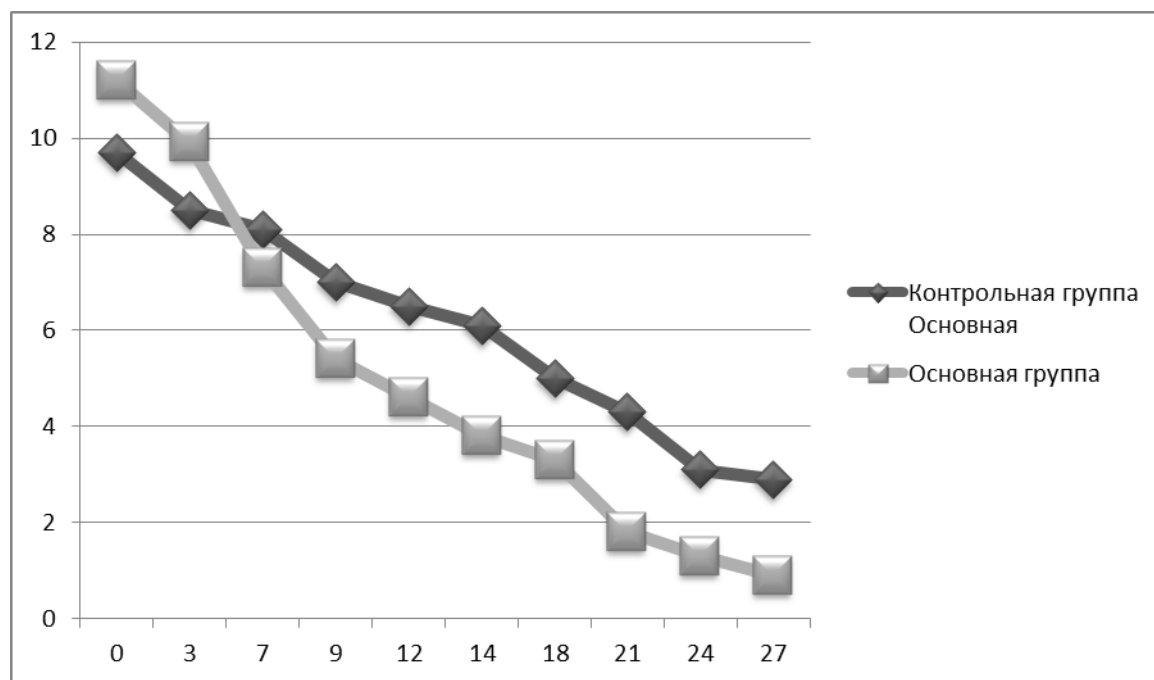


Рисунок 26. Динамика регресса папул у пациентов основной и контрольной групп.

* $p < 0,001$

Как видно из рисунка 26, с 3 дня наружного лечения кривые количества папулезных элементов в основной группе и контрольной группе начинают расходиться. Через 2 недели в основной группе регрессировало более половины папулезных элементов (53,2%), а в контрольной около трети (27,8%). К 27 дню у пациентов основной группы, получавших антимикробный ниосомальный наногель, среднее количество папул составило 10,9%. У пациентов контрольной группы, получавших гель "Бензамицин", на 27 день регрессировало 47,7% папул.

Таким образом, можно сделать вывод о клинической эффективности разработанного антимикробного ниосомального геля не только в отношении воспалительных элементов (пустул), но и в отношении невоспалительных элементов (папул). Это свидетельствует о том, что на регресс папул влияют не только антимикробные растительные экстракты, но и ниосомы, а точнее кремнийорганические соединения, входящие в их состав и обладающие также антимикробным действием.

Анализ полученных данных показал, что в сравнении с традиционными наружными средствами разработанный препарат обладает более выраженным клиническим эффектом. По сравнению с гелем «Бензамицин», ниосомальный гель обладает лучшей переносимостью, не обладает токсичностью и экономически более выгоден.

Проведённые клинические исследования подтвердили низкий уровень образования микробных форм, резистентных к антимикробному действию растительных экстрактов зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum*), ромашки аптечной (*Marticaria recutita*), конского щавеля (*Rúmex confértus*) и солодки голой (*Glycyrrhíza glabra*), что свидетельствует о перспективе их использования для терапии акне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Акне является одним из самых распространённых заболеваний кожи. Для лечения заболеваний кожи микробной этиологии широко используют не только антибиотические препараты, но также настои и экстракты лекарственных растений, обладающих антимикробным действием. Это связано с тем, что прием антибиотиков, как правило, носит затяжной характер, это негативно влияет как на резистентность патогенных микроорганизмов, так и на нормофлору организма в целом.

Создание лекарственного препарата растительного происхождения, содержащего комплекс экстрактов, способных ингибировать рост патогенных микроорганизмов, позволит решить ряд задач в сфере борьбы с акне.

Новой технологией является создание трансдермальных препаратов, полученных путем инкапсулирования биологически активных веществ в нановезикулы [Nalla Dilip Reddy B., Challa Vinil Reddy, Kishore A.B., 2010]. Такой подход позволит принципиальным образом изменить свойства лекарств: сделать их более эффективными, влиять на режим их применения, придать им адресность и снизить известные побочные эффекты. Целевая доставка лекарственных средств к заданным биомешам особенно важна для применения биологически активных веществ растительного происхождения [Machado S.R.P., Evangelista R., 2010; Tabbakhian M., 2006].

Наиболее изученными переносчиками в области лекарственной терапии являются липосомы и ниосомы. С 1990-х годов, неионогенные везикулы ПАВ – ниосомы, рассматриваются в качестве более успешной альтернативы липосомам как носители лекарств (Manconi et al., 2006).

В связи с этим, разработка технологии получения трансдермального наногеля является весьма актуальной задачей, решение которой позволит совершенствовать лечение акне.

При определении состава основных возбудителей, участвующих в развитии акне приняло участие 30 пациентов. Материалом для микробиологического исследования служило отделяемое из пустул и комедонов. Выделенные микроорганизмы идентифицировали, а по характеру и частоте их встречаемости у пациентов с акне были составлены их процентные соотношения. Наиболее часто выделяемыми микроорганизмами были представители семейства *Micrococcaceae*, *Staphylococcus aureus* - 41,9% и *Staphylococcus epidermidis* - 39,2%, реже (11,7%) встречали *Streptococcus spp.*. В 6,3% случаев у пациентов обнаружили *Enterobacteriaceae spp.*, и в 0,9% *Propionibacterium acne*. Полученные данные коррелируют с традиционными данными о составе микрофлоры, выделяемой из акне элементов.

С целью создания трансдермального ниосомального геля для лечения акне, в качестве биологически активных веществ, подбирались лекарственные растительные субстраты, обладающие антимикробным, противовоспалительным действием. Наиболее эффективными для лечения акне являются экстракты ромашки, зверобоя, конского щавеля, календулы и солодки. Использовались два растворителя: вода и пропиленгликоль, в задачу которых входило проникновение в клеточную мембрану внутрь растительной клетки, растворение сухого вещества клетки и выход из нее в виде раствора необходимых биологически активных веществ. При отработке оптимальных методов экстрагирования была выбрана следующая технологическая схема:

1. Ультразвуковое диспергирование растительного сырья.
2. Извлечение биологически активных веществ растительного происхождения путем избирательного растворения в воде и пропиленгликоле.
3. Разделение системы твердая фаза путем осаждения, центрифугирования или фильтрации.

После получения пропиленгликолевых и водных экстрактов из корня конского щавеля, корня солодки, зверобоя продырявленного и ромашки, определяли их резистентность или чувствительность диско-диффузным методом к идентифицированной микрофлоре. В результате проведенных исследований выявлено, что наиболее высокие показатели ингибирования роста различной флоры микроорганизмов у больных акне отмечены: у водного экстракта зверобоя в концентрации 10%, пропиленгликолевого экстракта корня солодки в концентрации 5%, и водного экстракта конского щавеля в концентрации 5%. Растительные экстракты, в дальнейшем, были инкапсулированы в кремнийорганические нановезикулы (ниосомы) для получения антимикробного ниосомального геля.

Во внутренний объем ниосом инкапсулировали активные субстанции – диспергированные с помощью АПВ гомогенизатора растительные экстракты. Оработаны фазы приготовления и рецептура антимикробного ниосомального геля с растительными экстрактами. На первом этапе конструирования геля получали дисперсию ниосом методом механического (ручного) встряхивания. Процесс проводили при комнатной температуре и интенсивном механическом встряхивании ПЕГ-12 диметикона на шейкере в течение 5 минут. В дальнейшем модифицировали полученные ниосомы ультразвуком. При воздействии ультразвуковых волн мультиламеллярные ниосомы, полученные методом встряхивания, обретали моноламеллярную структуру. Размеры ниосом уменьшались до размера менее 100 нанометров (Нм) и становились более однородными пропорционально мощности и времени озвучивания. При этом образовывались моноламеллярные ниосомы размером менее 100 Нм с включением иммобилизируемого материала не менее 50%. Причём наибольший процент иммобилизуемых веществ (64%) был отмечен при экспозиции 30 минут. Включение экстрактов растительных трав в кремнийорганические везикулы (ниосомы) и последующая обработка эмульсии на гомогенизаторе высокого давления АПВ гомогенизаторе. Это

позволяло, в дальнейшем, осуществлять эффективную пролонгированную дозированную трансдермальную доставку активных субстанций в клетки тканей не нарушая их целостности.

Изучалась противомикробная активность растительных экстрактов в различных лекарственных формах. При сравнении антибактериальной активности экстракта зверобоя в водном и пропиленгликолевом растворе с экстрактом зверобоя в ниосомальном геле через 4 недели при температуре хранения $+25^{\circ}\text{C}$ установлено, что активность ниосомального геля сохраняется на $95,23 \pm 1,1\%$, в водного раствора экстракта зверобоя снижается до $73,5 \pm 0,5\%$, а в пропиленгликолевом растворе – $75,0 \pm 0,6\%$, различия активности достоверны ($\chi^2=301,992$; $p<0,001$). При хранении при температуре $+3-5^{\circ}\text{C}$ активность экстракта зверобоя в водном растворе снижается до $71,5 \pm 0,5\%$, в пропиленгликолевом до $78,5\%$, а в ниосомальном геле сохраняется на исходном уровне ($\chi^2=177,468$; $p<0,001$). Полученные данные свидетельствуют о том, что иммобилизация экстракта зверобоя в ниосомы предохраняет его от окисления, способствует длительному сохранению его противомикробной активности. Противомикробная активность ниосомальных форм экстракта зверобоя в течение 6 недель остается на исходном уровне при температуре хранения $+3-5^{\circ}\text{C}$, а при температуре $+25^{\circ}\text{C}$ сохраняется на уровне 95%.

При изучении возможности формирования устойчивости условно-патогенными микроорганизмами основных представителей биоценоза кожи к антимикробному действию ниосомальных форм растительных экстрактов установлена низкая частота образования резистентных форм, подтверждённая в дальнейшем проведёнными клиническими исследованиями.

Была проведена экспериментальная гистологическая оценка способности проникновения ниосом через дерму. Одними из основных показателей возможности трансдермального переноса, являются размер и

электростатическая устойчивость ниосом. На основании полученных данных можно сделать вывод о наиболее глубокой пенетирующей способности ниосомального геля с включением трипанового синего. Ниосомы позволили провести краситель через все слои дермы и расположиться глубоко в сетчатом слое дермы. Скопления ниосом с красителем обнаруживаются вблизи сосудов, в стенке и просветах сосудов, а также в сальных железах.

На заключительном этапе у пациентов с акне проводилось сравнительное изучение эффективности разработанного антимикробного ниосомального геля и традиционного геля «Бензамицин». Оценку эффективности наружной терапии проводили до начала лечения и далее один раз в три дня до окончания лечения, путем подсчета количества папул, пустул на стандартном поле 5х5 см на щеке. Динамика разрешения пустулезных и папулезных элементов в основной и контрольной группах позволяют сделать вывод о клинической эффективности ниосомального геля, причём не только в отношении воспалительных элементов (пустул), но и в отношении невоспалительных элементов (папул). Этот факт на наш взгляд представляется достаточно интересным. Можно предположить, что на регресс папулезных элементов влияет не только антимикробный растительный экстракт, за счет подавления воспалительной реакции в коже, но и сами ниосомы, а точнее кремнийорганические соединения, входящие в их состав.

ВЫВОДЫ:

1. Наиболее часто выделяемыми микроорганизмами от больных акне были представители семейства *Micrococcaceae*, *Staphylococcus aureus* - 41,9% и *Staphylococcus epidermidis* - 39,2%, реже (11,7%) встречали *Streptococcus* spp.. В 6,3% случаев у пациентов обнаружили *Enterobacteriaceae* spp., и в 0,9% *Propionibacterium acne*. Полученные данные коррелируют с традиционными данными о составе микрофлоры, выделяемой из акне элементов.
2. Высокоэффективными для лечения акне являются экстракты ромашки, зверобоя, конского щавеля, календулы и солодки. Разработанная схема экстракции позволила выявить их чувствительность к идентифицированной микрофлоре диско-диффузным методом.
3. Высокие показатели ингибирования роста различной флоры микроорганизмов у больных акне отмечены: у водного экстракта зверобоя в концентрации 10%, пропиленгликолевого экстракта корня солодки в концентрации 5%, и водного экстракта конского щавеля в концентрации 5%.
4. При изучении возможности формирования устойчивости условно-патогенными микроорганизмами основных представителей биоценоза кожи к антимикробному действию ниосомальных форм растительных экстрактов установлена низкая частота образования резистентных форм, подтверждённая проведёнными клиническими исследованиями.
5. Использование ниосом кремнийорганической природы для инкапсулирования растительных экстрактов, позволило разработать фазы приготовления и рецептуру антимикробного ниосомального геля для лечения акне.
6. Изучение противомикробной активности растительных экстрактов в различных лекарственных формах показало, что иммобилизация растительного экстракта в ниосомы предохраняет его от окисления, способствует длительному сохранению его противомикробной активности в

течение 6 недель на исходном уровне при температуре хранения $+3-5^{\circ}\text{C}$, а при температуре $+25^{\circ}\text{C}$ сохраняется на уровне 95%.

7. Экспериментальная гистологическая оценка пенетирующей способности ниосомального геля с включением трипанового синего продемонстрировала способность ниосом провести краситель через все слои дермы и расположиться глубоко в сетчатом слое дермы. Скопления ниосом с красителем обнаруживались вблизи сосудов, в стенке и просветах сосудов, а также в сальных железах.

8. Сравнительная оценка клинической эффективности наружной терапии пациентов с акне антимикробным ниосомальным гелем и традиционным гелем «Бензамицин», показала более высокую динамику разрешения пустулезных и папулезных элементов разработанным гелем.

Практические рекомендации:

1. Для лечения папуло-пустулезной формы акне целесообразно использовать лекарственные наружные препараты растительного происхождения с ярко выраженными антимикробными свойствами.
2. Учет индивидуальной чувствительности патогенов к противомикробным растительным средствам повышает эффективность лечения акне.
3. Инкапсулирование выделенных антимикробных биологически активных веществ растительного происхождения в ниосомы позволяет принципиальным образом изменить свойства наружных препаратов и сделать их более эффективными: влиять на режим их применения за счёт пролонгированного эффекта, придать им адресность и снизить известные побочные эффекты за счёт целевой таргентной доставки.
4. Перспективность средств наружного применения на основе биологически активных веществ растительного происхождения инкапсулированных в

ниосомы связана с низкой себестоимостью ниосом и растительных экстрактов.

6. Технология инкапсулирования не требует использования дорогостоящего оборудования и уже отработана на предприятии НПО «Клеточные технологии».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Адаскевич, В.П. Акне и розацеа / В.П. Адаскевич. – СПб, 2000. - 94-97с.
2. Адаскевич, В.П. Диагностические индексы в дерматологии / В.П. Адаскевич. - М., 2004. - 165с.
2. Аджмал М.Х. Роль андрогенов и их рецепторов в патогенезе acne vulgaris и лечение Роаккутаном. Дисс...канд. мед. наук. 1996.
3. Андреева, И.Н. О методологии создания многокомпонентных фитопрепаратов в виде современных лекарственных форм / И.Н. Андреева, Э.Ф. Степанова, А.М. Сампиев // Материалы междунар. конф. – Харьков, 1998. - С.25-31.
4. Аравийская, Е.Р. Акне / Е.Р. Аравийская, Т.В. Красносельских, Е.В. Соколовский // Кожный зуд. Акне. Урогенитальная хламидийная инфекция. – СПб.,1998. – С.68-110.
5. Арешидзе, Д.А. Методы статистической обработки данных в биологии / гидролизаты в производстве питательных сред: производство и применение продуктов микробиологических производств / В.И. Артюхин, А.П. Шепелин, Н.В. Кисселев // Обзор. инфо. – М.: 1990. – Вып. 9-10. – 52 с.
6. Арзуманян, В. Г. Оценка стафилококковой и нелипофильной дрожжевой микрофлоры кожи у больных с кожной патологией при контактном способе посева / В. Г. Арзуманян Е. В. Зайцева Т. И. Кабаева Р. М. Темпер // Вестник дерматологии и венерологии №6. – 2004.
7. Арзуманян В.Г., Зайцева Е.В., Темпер Р.М. и др. Определение кокковой и дрожжевой микрофлоры кожи у больных с кожной патологией. Пособие для врачей. М 2004.

8. Базиков И.А. Способ доставки биологически активных веществ с помощью наноносителей / И.А. Базиков, П.А. Омелянчук Патент РФ № 2320323 от 27.03.2008.
9. Базиков И.А. Изучение нанокапсул кремнийорганической природы, используемых для трансдермальной доставки активных субстанций/ И.А.Базиков, П.А.Омелянчук, Э.М.Хатков, А.Л.Гукасян, З.А.Сеираниду. Вестник Российской Академии Естественных наук. 2012.- №1, с.81-83.
10. Базиков И.А. Оценка размеров и стабильности везикул кремнийорганической природы, используемых для трансдермальной доставки активных субстанций/ Базиков И.А., Аксененко В.А., Хатков Э.М., Гукасян А.Л., Сеираниду З.А. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2012. Т. 25. № 1. С. 81-82.
11. Базиков И.А. Применение клеточных и нанотехнологий для разработки новых препаратов/ И.А.Базиков, И.В.Климанович, Н.И.Пенькова, М.М.Магонов, Т.А.Авакова, Л.В.Лысогора, Э.М.Хатков, З.А.Сеираниду, А.Л.Гукасян, М.А.Деряженцева, Н.И.Калинкина, Ф.И.Базиков. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2013. Т. 29. № 3. С. 14-18.
12. Базиков И.А. Определение микробной чувствительности к растительным экстрактам, используемым для лечения акне. И.А.Базиков, Э.М.Хатков, Н.И.Пенькова. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2014. Т. 9. № 1. С. 74-79
13. Бородина Т. Н. Получение и исследование биodeградируемых полиэлектролитных микрокапсул с контролируемым выходом белков, ДНК и других биоактивных соединений / Дис. доктора биол. н. - Москва, 2008. - 119 с.

14. Вилесова М.С. Разработка микрокапсулированных и гелеобразных продуктов и материалов для различных отраслей промышленности // Российский химический журнал. - 2001. - № 5–6. - С. 125–135.
15. Водовозова Е.Л., Никольский П.Ю., Михалев И.И. и др. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 548.
16. Водовозова Е.Л., Евдокимов Д.В., Молотковский Юл.Г. // Биоорганическая химия. 2004. Т. 30. С. 663.
17. Водовозова Е.Л., Кузнецова Н.Р., Кадыков В.А. // Рос. нанотехнологии. 2008. Т. 3. С. 162.
18. Гаммерман А.Ф. и др. Лекарственные растения научной медицины СССР, не включённые в фармакопею. А.Ф. Гаммерман И.А. Дамиов, М.О. Каршев, Р.Л. Яковлев - Ашхабад, 1970. - 185 с.
19. Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. – Новосибирск: Наука. Сиб. отделение, 1990. – 333 с.
20. Гомболевская, С.Л. Гиперандрогенная дерматопатия при синдроме поликистозных яичников: автореф. дис. ...канд. мед. наук / С.Л. Гомболевская. – М., - 1997. - 21 с.
21. Государственная фармакопея СССР XI издание - М.: Медицина, 1989. - Вып. 2. Лекарственное растительное сырьё. - 400 с.
22. Давыдов А. Б. Микрокапсулирование / А. Б. Давыдов, В. Д. Солодовник // Энциклопедия полимеров; Ред. коллегия: В. А. Кабанов (глав. ред.) [и др.]. — Т. 2.: Л-И. — М.: Советская энциклопедия, 1974. — С. 247—258.
23. Данилова, А. А. Акне / А.А. Данилова, М.Н. Шекелакова // Рус. мед. журн. – 2001. - № 11. - С.452-456.
24. Донецкая С.В. Обоснование тактики лечения вульгарных угрей на основании изучения индивидуальных особенностей корреляции общего и местного иммунитета. Дис... канд. мед. наук. – М., 1997. – 113 с

25. Дранов А.Л., Дудниченко А.С., Бутенко К.А., Краснопольский Ю.М. (1994) Вестн. фармации, №3-4, С. 88-92.
26. Дранов А.Л., Дудниченко А.С., Мезин И.А., и др. (1996) Бюлл. exper. биол. мед., № 8, 85-89.
27. Дудниченко А.С., Краснопольский Ю.М. (1996) Бюлл. exper. биол. 18, 125-129.
28. Дудниченко А.С., Краснопольский Ю.М. (1996) Бюлл. exper. биол. 18, 392-396.
29. Ефременко, В.И. Методы приготовления липосом. Иммобилизация в липосомы различных веществ, стерилизация и лиофилизация липосом / В.И. Ефременко, Т.В.Таран, Л.М. Кузякова. - Ставрополь, 1988. - 76с. - Деп. в ВИНТИ 11.12.98, №3636-В98.
31. Жданов Р.И. Куценко Н.Г. Федченко В.И. (1997) Вопр. мед. химии 43, 3-12.
32. Жаммал А. Исследование роли микробного и гормонального факторов в возникновении и развитии вульгарных угрей и лечение данного заболевания. Дисс...канд. мед. наук. 1987.
34. Иванов А.А. Микроэкология кожи человека и ее взаимосвязь с иммунным статусом организма // Мат. науч.-практ. конф. "Микрофлора кожи человека — клинико-диагностическое значение".— М., 1989.— С. 3—11.
35. Ипатова, О.М. Фосфолипидная система доставки лекарственных веществ / О.М. Ипатова, А.И. Арчаков, А.С. Иванов // Человек и лекарство : тез.докл. VI Рос. нац. конгр. - М., 1999. - С. 412 - 414.
36. Каламкарян А.А., Бухарович А.М. Хроническая стафилококковая инфекция кожи. Киев 1990; 45–7.
37. Качук, М.В. Угревая болезнь / М.В. Качук, А.П. Музыченко // Материалы IV съезда дерматологов и венерологов Республики Беларусь. – Минск, - 1999. – С.248-251.
38. Ковалев В.М. Угревая сыпь. Киев 1991; 145.

39. Колесниченко С.А. Изучение показателей липидного обмена, концентрации цинка в сыворотке крови, и методы лечения у больных комедональной и папуло–пустулезной формой *acne vulgaris*. Дисс...канд. мед. наук. 1999.
40. Клемпарская Н.Н. Изменение микрофлоры кожи при действии на организм экзогенных и эндогенных факторов /Мат. науч.-практ. конф. "Микрофлора кожи человека — клинико-диагностическое значение".— М., 1989.— С. 12—23.
41. Кобринский, Г.Д. Липосомы - транспортеры лекарств / Г.Д. Кобринский. - М., 1989. - 49с.
42. Ковалев В.М. Методы комплексной терапии угревой болезни в свете новых данных о патогенетической роли нарушений содержания простагландина Е 2 и циклического 3, 5–аденозинмонофосфата., 1983, Дис... к.м.н.
43. Ковалев, В.М. Угревая сыпь.— К.: Здоров'я, 1991.— 144 с.
44. Козлов А.М., Корчагина Е.Ю., Водовозова Е.Л. и др. // Бюлл. экспер. биол. мед. 1997. Т. 123. С. 439.
45. Колисниченко, С.А. Комплексная этиопатогенетическая терапия больных акне с учетом показателей липидного обмена и уровня цинка в сыворотке крови : автореф. дис. ...канд. мед. наук / С.А. Колисниченко. - М., 1999. – 42с.
46. Кондратьева Т.С., Иванова Л.А., Зеликсон Ю.И. и др.; Под ред. Кондратьевой Т.С. Технология лекарственных форм: Учебник в 2-х томах. Том 1. – М.: Медицина, 1991. – 496 с.
47. Коротяев, А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А.И. Коротяев, С.А. Бабаичев, - 1998, - «Специальная литература». – 592 с.

48. Корчак И.В., Проценко О.А., Гриценко Л.З. Использование зинерита и пимафуцина в комплексном лечении угревой болезни // Журн. дерматологии и венерологии.—1998.— № 2(6).— С. 67 — 68.
49. Кохан, М.М. Новые технологии в терапии себореи и угрей / М.М. Кохан // Материалы. респ. науч.-практ. конф. – Сочи, 2001. – С.74-77.
50. Кубанова, А.А. Современные особенности патогенеза и терапии акне / Ж. «Вестник дерматологии и венерологии» // А.А. Кубанова, В.А. Самсонов, О.В. Забненкова, №1, 2003 г.
51. Кутач В.В., Никульшина Н.И., Ищенко В.И. Лекарственные формы флавоноидов: Обзор // Хим. – фармац. журн. – 1988. – Т. 22, №8. – С 1018 – 1025.
52. Кузякова, Л.М. Создание липосомальных косметических средств, предотвращающих старение кожи / Л.М. Кузякова, И.Н. Андреева, В.И. Ефременко // Тез. докл. I Рос. съезда геронтологов и гериатров. – Самара, 1999. - С.453-454.
53. Кутасевич Я.Ф. Внедрение отечественных лекарственных препаратов наружного применения для лечения дерматологических больных // Журн. дерматологии и венерологии.— Специальный выпуск.— №1(7).— Харьков, 1999.— С.49 — 54.
54. Кутасевич Я.Ф., Маштакова И.А., Багмет А.Н., Шаповалова О.В. Микробиоценоз кожи у больных угревой болезнью и пути его коррекции. Український журнал дерматолог, венеролог, косметолог. №1, березень 2003.— 43–47
55. Кушлинский, Н.Е., Самсонов В.А., Саламова И.В. Современные подходы в оценке гиперандрогенемии у больных обыкновенными угрями / Н.Е. Кушлинский, В.А. Самсонов, И.В. Саламова // Терапевтический архив 1994; Д–24311.
56. Лавренов В.К., Лавренова Г.В. Полная энциклопедия лекарственных растений. –СПб.: Олма-пресс, 1999. – Т.1. – С. 371-634.

57. Ладыгина Е.А., Морозова Р.С. Лекарственные растения в медицине и в быту - Ставрополь: Ставропольское книжное изд. - во, 1989. - С. 104-105.
58. Литвиненко В.И., Максютин Н.П., Колесников Д.П. Флавоноидные соединения солодки голой./ЖОХ. – 1963, №2. – С. 4012 – 4018.
59. Мальцева, П.П. Нанотехнологии. Наноматериалы. Наносистемная техника. Мировые достижения. - 2008 год: Англо-русский терминологический словарь по микро-наносистемной технике./ Сборник под ред. д.т.н., профессора П.П. Мальцева. - Москва: Техносфера, 2008 - 432 с.
60. Масюкова С.А., Вахнина Т.Е., Коликова Т.Г. Антибиотикограмма больных конглобатными угрями. Актуальные проблемы научной и практической дерматологии и венерологии 1994; 5: 32–3.
61. Машкиллейсон А.Л., Гомберг М.А. Роаккутан в клинике кожных болезней. Вест. дерматол. венерол. 1996; 5: 33–6.
62. Машковский М.Д. Лекарственные средства - М.: Медицина, 1993. - Т. 2. - С. 29-30.
63. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков.— М.: МЗ СССР, 1983.—№2675_83.— 28 с.
64. Микробиологическая диагностика дисбактериозов: Метод. рекомендации.— К.: МЗ УССР, 1986.— 30 с.
65. Муравьева Д.А. Фармакогнозия - М.: Медицина, 1991. - 416 с.
66. Мурзина Е.О. Пути коррекции микробного биоценоза кожи при atopическом дерматите // Сборник научных работ сотрудников КМАПО им. П.Л. Щупика.— К., 2000.— Выпуск 9.— С. 331 — 335.
67. Народицкий Б. С., Ширинский В. П., Нестеренко Л. Н., Шляхтин О. А. Нанотехнологии. Наноматериалы. Наносистемная техника. Мировые достижения. - 2008 год: Англ.-рус. термин. словарь по микро-наносистемной

технике./ Сборник под ред. д.т.н., профессора П.П. Мальцева. - Москва: Техносфера, 2008 - 432 с.

68. НИИ фармации мин-ва здравоохранения и мед. промышленности РФ. «Современные аспекты изучения лекарственных растений». Научные труды, том XXXIV. Москва – 1995.; И.И. Сидоров, Н.А. Турышева,

69. НИИ фармации министерства здравоохранения и медицинской промышленности РФ. «Современные аспекты изучения лекарственных растений». Научные труды. Том XXXIV. Москва – 1995.

70. Никифоров, В.А. Медицинская микробиология (общие и эколого-эпидемиологические аспекты) / В.А. Никифоров, В.В. Шкарин. –Н. Новгород: Изд-во Нижегородской гос. мед. академии, - 2000. – 248 с.

71. Нобл У.К. Микробиология кожи человека.— М.: Медицина, 1986.— 496 с.

72. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений.— М.: МЗ СССР.— Приказ №535 от 22 апреля 1985 г.— 127 с.

73. Оганесян Э.Т., Симонян А.В., Чомаева С.Х. Новые лекарственные препараты из растительного сырья и отходов его переработки // Российский национальный конгресс. – М., 1992. – С.212.

74. Олисова, О.Ю. Угревая болезнь / О.Ю.Олисова, Н.И. Галиуллина // Натуральная фармакология и косметология. – 2004. - № 1. - С.6-10.

75. Определение чувствительности стафилококков к антибактериальному действию хлорофиллипта: Метод. рекомендации.— Харьков, 1981.— 10 с.

76. Определитель бактерий Берджи. В 2_х т.: Пер. с англ./ Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др.— М.: Мир, 1997.

77. Пономарев В.Д. Экстрагирование лекарственного сырья. – М.: Медицина, 1976. – 202 с.
78. Поперечный А.Н. Интенсификации процесса экстрагирования эфирномасличного сырья // Совершенствование теории и практики экстрагирования. - Киев, 1984. - С. 41.
79. Потекаев, Н.С. К терапии угревой сыпи у женщин препаратом «Диане » / Н.С. Потекаев, Е.Б. Мареева, Мухамед Нази Зидан Тауфик // Вестн. дерматологии. и венерологии. – 1993. - № 6. – С.48-51.
80. Проценко Т.В. Угревая болезнь (лекция для врачей).— К., 2001.— 15 с.
81. Проценко Т.В., Кондратенко И.В. Опыт лечения больных угревой болезнью // Новости медицины и фармации.—2002.- №9 -10.— 4 с.
82. Пшуков Ю.Г. Теоретические основы производства жидких экстрактов методом реперколяции с законченным циклом. - Пятигорск, 1985. - 48 с.
83. Рекомендации Комитетам по этике, проводящим экспертизу биомедицинских исследований. – Женева, 2000.
84. Руководства и рекомендации для Европейских независимых комитетов по вопросам этики // Европейский форум по качественной клинической практике. – Брюссель, 1995, 1997.
85. Самгин, М.А. Новые возможности в терапии розацеа и заболеваниях сальных желез / М.А. Самгин, А.Н. Львов, С.Н. Потекаев // Рос. журн. кожных и венерич. болезней. – 2002. № 3. – С. 60-64.
86. Самгин, М.А. Новые возможности в местной терапии акне / М.А. Самгин, С.А. Монахов // Вестн. эстетич. медицины. – 2002. – №2. – С.164-166.
87. Самгин, М.А. Новое в патогенезе и местной терапии угревой сыпи / Ж. Вестник дерматологии и венерологии // М.А.Самгин, С.А.Монахов. - №2, 2003 г.

88. Самцов, А.В. Новые возможности в лечении угревой болезни с помощью скинорена / А.В. Самцов, Н.Л. Шимановский // Рос. журн. кожных и венерич. болезней. – 1999. - № 3 – С.64-66.
89. Сидоров Л.Н., Юровская М.А., Борщевский А.Я. и др. Фуллерены // изд. «ЭКЗАМЕН». – 2005. – 688 с.
90. Скрипкин, Ю.К. Кожные и венерические заболевания / Ю.К. Скрипкин, Г.Я. Шарапова.- М., 1985. - 270с.
91. Скрипкин Ю.К., Кубанова А.А., Самсонов В.А., Чистякова И.А. Скинорен в терапии акне // Вестн. дерматологии и венерологии.— 1993.— №6.— С. 13—14.
92. Скрипкин Ю.К., Кубанова А.А., Самсонов В.А., Чистякова И.А. Синтетические ретиноиды – новый этап в лечении тяжелых дерматозов. Вестн. дерматол. венерол.1994; 2: 3–6.
93. Сметник, В.П. Неоперативная гинекология : руководство для врачей./ В.П. Сметник, Л.Г. Тумилович. – М., 1997. – 592с.
94. Соколовский, Е.В. Лечение акне / Е.В. Соколовский, Т.В. Красносельских, Е.А. Аравийская // Новости фармакотерапии. - 1998. - № 5-6. – С.87-96.
95. Солодовник В. Д. Микрокапсулирование. — М.: Химия, 1980. — 216 с.
- Айсина Р. Б., Казанская Н. Ф., Микрокапсулирование // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. — Т. 6. — М.: Наука, 1986. — С. 6-52.
96. Степанова Э.Ф. Изучение возможности безотходного использования солодки // III симпоз. по изучению и использованию солодки в народном хоз. СССР. – Ашхабад, 1988. – С. 112 – 113.
97. Страчунский, Л.С. Современная антимикробная химиотерапия: руководство для врачей / Л.С. Страчунский, С.Н. Козлов. - М., 2002. – 436с.
98. Суворова, К.Н. Гиперандрогенная дерматопатия у женщин / К.Н. Суворова, С.Л. Гомболевская // Учебное пособие. М. 1996.

99. Тараховский Ю.С., Иваницкий Р.Г. (1998) Биохимия. 63, 723-736.
100. Ткаченко Е.И. Питание, микробиоценоз и интеллект человека / Е.И. Ткаченко, Ю.П. Успенский. – СПб.: СпецЛит, 2006. – 590 с.
101. Усенко Г.Д. Современные подходы к лечению угрей // Журнал практического врача.— 1997.— №2.— С. 34 — 36.
102. Фельдман Ю.М., Миханева Л.Г., Шапиро А.В., Кузьменко В.Д. Количественное определение бактерий в клинических материалах // Лаб. дело.— 1984.— №10.— С. 616—619.
103. 0 Хатков Э.М. Создание трансдермального ниосомального геля для лечения акне/ Хатков Э.М., Базиков И.А., Чеботарёв В.В. - Сборник статей XXXII Международной Научно-Практической Конференции «Современная Медицина: Актуальные вопросы», - г. Новосибирск, 11 июня 2014 г.,- с.84-91.
104. Шиханова, Е.Н. Микробиоценоз акне-элементов у пациентов с угревой болезнью и его изменение под влиянием липосомальных форм антибиотиков: Автореф. дис. ... на соискание научной степени канд. мед. наук. – Ставрополь. - 2008. – 18 с.
105. Шекари Язды. Роль микотической инфекции в патогенезе акне и себорейного дерматита. Дисс...канд. мед. наук. 1996.
106. Юрасов В.В., Подгорный Г.Н., Кучеряну В.Г., и др. (1996) Бюллетень эксперим. биол. мед., 122, 614-617.
107. Юрасов В.В., Кучеряну В.Г., Кудрин В.С., и др. (1997) Бюллетень эксперим. биол. мед., 123, 150-153.
108. Яковлев Г.П., Челомбитко В.А. Ботаника: Учебник для фармацевтических институтов и фармацевтических факультетов мед. вузов / Под ред. И.В. Грушвицкого. - М.: Высшая школа, 1990. - С. 237 - 292.

109. Калюжная Л.Д., Вовк О.Б. Ефективність використання місцевих засобів при лікуванні вугрової хвороби слабкої та помірної тяжкості // Журн. дерматологии и венерологии.—1999.— №2(8).— С. 66—71.
110. Лабораторна діагностика гнійно_запальних захворювань, обумовлених аспорогенними анаеробними організмами: Метод. рекомендації.— К., 2000.— 22 с.
111. Adapa P., Karunakaran C., Tabil L., Schoenau G. Potential Applications of Infrared and Raman Spectromicroscopy for Agricultural Biomass // *Agricultural Engineering International: The CIGR Ejournal*. Manuscript. – 2009. – Vol. XI. – P. 56-86.
112. Akamatsu H, Nishijima S, Takahashi M, Ushijima T, Asaka Y. Effects of subminimal inhibitory concentrations of erythromycin, tetracyclin, clindamycin and minocycline on the neutrophil chemotactic factor production in *Propionibacterium acnes* biotypes 1–5. *J Dermatol* 1991; 18: 247–51.
113. Akamatsu, H. Effect of doxycycline on generation oxygen species: a possible mechanism of action of acne therapy with doxycycline / H. Akamatsu, M. Asada, J. Komura // *Acta. Dermatol. Venereol* (Stockh). – 1992. – Vol.72. – P.178-179.
114. Alessandro Gandini. Polymers from Renewable Resources: A Challenge for the Future of Macromolecular Materials // *Journal of American Chemical Society*. – 2008. – Vol. 41. – P. 9491-9504.
115. Alberts D.S., Muggia F.M., Carmichael J. et al. // *Semin. Oncol*. 2004. V. 31. P. 53.
116. Ali Nokhodchi, Djavad Farid. Microencapsulation of Paracetamol // *Pharmaceutical Technology*. – 2002. – P. 56-60.
117. Allico S.F. (1997) *Biochem. Pharmacol.* 54, 9-13.
118. Alsarra et al., 2005. Schreier and Boustra, 1994. Development and in vitro permeation studies of proniosomal based transdermal delivery system of Atenolol

119. Alien T.M., Brandeis E., Hansen C.B. et al. A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1237: 99–108.
120. Allaker RP, Greenman J, Osborne RH, Gowers JJ. Cytotoxic activity of *Propionibacterium acnes* and other skin organisms. *Br J Derm* 1985. - Vol.113.- P. 229–35
121. Allen T.M., Hansen C. *Biochim. Biophys. Acta*. 1991 Vol.-1068. – P. 133-141.
122. Allen T.M. *Drugs*, 54, Suppl. 1997. Vol. 4.- P. 8-14.
123. Amir Mortazavian, Seyed Hadi Razavi, Mohammad Reza Ehsani et al. Principles and Methods of Microencapsulation of Probiotic Microorganisms // *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. . – 2007. Vol.5. – P. 1-18.
124. Anil Kumar Anal, Harjinder Singh. Recent Advances in Microencapsulation of Probiotics for Industrial Applications and Targeted Delivery // *Trends in Food Science & Technology*. – 2007. – Vol.18. – P. 240-251.
125. Al-Qadi S., Grenha A., Carrión-Recio D. et al. Microencapsulated Chitosan Nanoparticles for Pulmonary Protein Delivery: In vivo Evaluation of Insulin-loaded Formulations // *Journal of Controlled Release*. – 2012. Vol. 157. – P. 383-390.
126. Barani, H. & Montazer, M. (2008) A Review on Applications of Liposomes in Textile Processing. *Journal of Liposome Research*. -2008. Vol. 18 (3) 249-262.
127. Bestman-Smith J., Gourde P., Desormeaux A., Tremblay M.J, Bergeron M.G. Sterically stabilized liposomes bearing anti-HLA-DR antibodies for targeting the primary cellular reservoirs of HIV-1. *Biochim Biophys Acta* 2000; -Vol. 1468 (1-2); 161–74.
128. Bhattacharyya A., Argillier J-F. Microencapsulation by Complex Coacervation: Effect of Cationic Surfactants // *J. Surface Sci. Technol.* – 2005. – Vol. 21. – P. 161-168.

129. Bharat Bhushan. Springer Handbook of Nanotechnology. - Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004. – 1258 p.
130. Blum G., Cevc G. Biochim. Biophys. Acta, 1990. Vol. 1029, -P. 91-97.
131. Bogner J. R., Goebl F-D. (1995) in Stealth Liposomes (Lasic D.D., Martin F.J., eds). CRC Press. 267-278.
132. Bohm B.H.L., Grau M.J., Hildebrand G.E., et al. (1998) Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 25, 956-957.
133. Bong-Seop Lee, ChiWoo Yoon, Arsen Osipov et al. Nanoprodugs of NSAIDs: Preparation and Characterization of Flufenamic Acid Nanoprodugs // Journal of Drug Delivery. – 2011. – Vol.11. – P. 1-13.
134. Bojana Bon, Boštjan Šumiga. Microencapsulation Technology and its Applications in Building Construction Materials // Materials and Environment. – 2008. – vol.55. – No.3. – P. 329-344.
135. Braun-Falco O., G. Plewig, H.H. Wolff, W.H.C. Burgdorf Dermatology, 2000. - P. 1054–1055.
136. Cargnello, A.J. Acne: what's new? / A.J. Cargnello // MJA. - 1996. - Vol.165. - P.153-158.
137. Catarina Goncalves, Paula Pereira, Miguel Gama. Self-Assembled Hydrogel Nanoparticles for Drug Delivery Applications // Materials. – 2010. – Vol.3. – P. 1420-1460.
138. Cevc G., Crit. Rev. (1996) Ther. Drug Carrier Syst., -Vol. 13, 257-388.
139. Cheng S.Y., Yuen W.M., Kan C.W. et al. Development of Cosmetic Textiles Using Microencapsulation Technology // RJTA. – 2008. - Vol. 12. - P. 41-51.
140. Colas, J.C., Shi, W.L., Rao, V.S.N.M., Omri, A., Mozafari, M.R., Singh, H. (2007) Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes

prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron* - Vol. 38:841–847.

141. Cunliff, W.J. Comedonogenesis: some new aetiological, clinical and therapeutic strategies / W.J. Cunliff, D.B. Holland, S.M. Clark // *Br.J.Dermatol.* – 2000.- Vol.142, № 6. – P.1084-1091.

142. Dakker-Woudenberg, I.A. Long-circulating sterically stabilized liposomes in the treatment of infections. / I.A. Dakker-Woudenberg, R.M. Schiffelers, G. Storm // *Methods Enzymol.* – 2005. – Vol.391.-P.228-260.

143. Dan Stendahl. Size Matters: Great Things Come in Tiny Packages // *Drug Delivery Technology.* - 2007. – Vol.2. – P. 1-3

144. Danfeg Yu. Preparation and Properties of Olive Oil Microcapsules // *Journal of Fiber Bioengineering & Informatics.* -2012. – No.3. –P. 67-76.

145. .Dass C.R., Walker T.L., Burton M.A., Decruz E.E. (1997) *J. Pharm. Pharmacol.* 49, 972-975.

146. Devine D.V., Marjan J.M. (1997) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* Vol. 14, P.105-131.

147. Dreno B, Reynaud A, Moyse D, Habert H, Richet H. Erythromycin–Resistance of cutaneous bacterial flora in acne. *Eur. J. Dermatol.* 2001. Nov–Dec; Vol.11(6): 549–53.

148. Dufresne I., Desormeaux A., Bestman-Smith J., Gourde P., Tremblay M.J., Bergeron M.G. Targeting lymph nodes with liposomes bearing anti-HLA-GR Fab' fragments. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1421 (2): 284–94. Forssen E.A., Ross M.E. (1994) *J. Liposomes Res.* – Vol. 4, - P 481-512.

149. Edith Mathiowitz. *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery.* – NY: John Wiley & Sons, 1999. - P. 493-504.

150. Elias, P.M. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation / P.M. Elias // *J. Invest. Dermatol.* – 1983. – Vol. 80. – P.44-49.

151. Fluhr, J.W. Antibacterial efficacy of benzoyl peroxide in phospholipid liposomes. A vehicle-controlled, comparative study in patients with papulopustular

acne / J.W. Fluhr, O. Barsom, W. Gehring // *Dermatology*. – 1999. – Vol.198, № 3 – P.273-277.

152. Forssen E.A., Ross M.E. (1994) *J. Liposomes Res.* – Vol.4,- P. 481-512.

153. Francesco Barbato et al. Biodegradable Microspheres of Novel Segmented Poly(ether-ester-amide)s based on polycaprolactone) for the Delivery of Bioactive Compounds // *Biomaterials*. – 2001. – Vol. 22 - P.1371-1378.

154. Gabizon A., Catane R., Uziely B., et al. (1994) *Cancer Res.* –Vol.54, P.987-992.

155. Gabizon A., Schmeeda H., Barenholz Y. // *Clin. Pharmacokinet.* 2003. V. 42. P. 419.

156. Gerd H. Woehrle, James E. Hutchison, Saim Ozkar et al. Analysis of Nanoparticle Transmission Electron Microscopy Data Using a Public- Domain Image-Processing Program // *Turk J. Chem.* – 2006. – Vol.30. P. 1-13.

157. Gibson, J.R. Rational for the development of new topical treatments for acne vulgaris / J.R. Gibson // *Gutis*. – 1996. - Vol.57. – P.13-19.

158. Gill P.S., Espina B.M., Muggia F., et al. (1995) *J. Clin. Oncol.* -Vol. 13, -P.996-1003.

159. Gilles K. Kouassi, Vinod K. Teriveedhi, Christopher L. Milby et al. Nano-Microencapsulation and Controlled Release of Linoleic Acid in Biopolymer Matrices: Effects of the Physical State, Water Activity, and Quercetin on Oxidative Stability // *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*. – 2012. – Vol. 2. - P.1-10

160. Gluck R. (1995) In *Vaccine Design: The Submit and Adjuvant Approach* (Powell M.F., Newman M.J., eds), Plenum Press. P. 325-345.

161. Gomez-Hens, A., Fernandez-Romero, J.M. (2006). Analytical methods for the control of liposomal delivery systems. *Trends Anal Chem* -Vol. 25. -P.167–178.

162. Guobao Wei, Glenda J. Pettway, Laurie K. McCauley et al. The Release Profiles and Bioactivity of Parathyroid Hormone from Poly(lactic-co-glycolic acid) Microspheres // *Biomaterials*. – 2004. – Vol. 25. – P. 345-352
163. Harrington K.L., Lewanski C.R., Stewart S.W. Liposomes as vehicles for targeted therapy of cancer/Part.2: Clinical development. *Clin Oncol* 2000; Vol. 12: P.16–24.
164. Heidi M. Mansour, MinJi Sohn, Abeer Al-Ghananeem. Dosage Forms: Molecular Pharmaceutics and Controlled Release Drug Delivery Aspects // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2010. – Vol.11. – P. 3298-3322.
165. Hirnle P. (1997) *Hybridoma*. Vol.16, -P.127-132.
166. Holland K. T., Aldana O., Bojar R.A., Cunliffe W.J., Eady E.A. *Propionibacterium acnes* and Acne. // *Dermatology*, 1998; P. 196: 67–68.
167. Huang Y.-Y., Chung T.-W. Microencapsulation of Gentamicin in Biodegradable PLA and/ or PLA/Peg Copolymer // *Journal of Microencapsulation*. – 2001. – vol.18. – P. 457-465.
168. Huang S.K., Mayhew E., Lasic D.D., et al. (1992) *Cancer Res*. Vol. 52, P.6774-6781.
169. Imai E., Isaka Y., Akagi Y., Kaneda Y. (1997) *Exp. Nephrol*. Vol.5, P.112-117.
170. Jain R.K. (1987) *Cancer Metastasis Rev*. 6, P.559-593.
171. Jang-Hyuk Ahn, Young-Pil Kim, Hak-Sung Kim. Effect of Natural Antioxidants on the Lipid Oxidation of Microencapsulated Seed Oil // *Food Control*. – 2012. - Vol. 23. – P. 528-534.
172. Ian Sage. *Thermochromic Liquid Crystals* // *Liquid Crystals*. – 2011. – Vol. 38. - P. 1551-1561.
173. Janoff A.S. (1992) *Lab. Invest*. 66, 655-658.
174. Jansen, T. *Rosacea* / T. Jansen, G. Plewing // *Pädiatrische Dermatologie*. – Berlin, 1999. - №2.-S.719-720.

175. Jayanth Panyam, Vinod Labhasetwar. Biodegradable Nanoparticles for Drug and Gene Delivery to Cells and Tissue // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2003. – Vol.55. – P. 329-347.

176. Jinfang Yuan, Yali Luo, Qingyu Gao. Self-assembled Polyion Complex Micelles for Sustained Release of Hydrophilic Drug // *Journal of Microencapsulation*. – 2011. – Vol. 28. – P. 93-98. Kennet A. Arndt, Kathryn E. Bowers. *Manual of Dermatologic Therapeutics*. LWW, 2002.p.3–20.

177. Khan S.A., Ahmad M., Murtaza G. Development of a Single Combined Microencapsulated Formulation of Allopurinol and Nimesulide and Investigation of Their Release Behaviours // *ARS Pharamaceutica*. – 2010. – Vol. 51. – P. 105-115.

178. Kirpotin D., Park J.W., Hong K. et al. Sterically stadilized anti-HER2 immunoliposomes: desin and targeting to human breast cancer cells in vitro. *Biochemistry* 1997; 36: 66–75.

179. Klibanov A.L., Maruyama K., Torchilin V.V., Huang L. (1990) *FEBS Letters*., 268, 235-237.

180. Kucheryanu V.G., Yurasov V.V., Kryzhanovsky G.N., et al. (1996) *Progress in Drug Delivery Systems*. Biomedical Research Foundation, Tokyo, Eds. Sadao Hirota, 5, 179-182.

181. Kuznetsova N., Kandyba A., Vostrov I. et al. // *J. Drug Deliv. Sci. Technol*. 2009. V. 19. P. 51.

182. Lasic D.D., Papahadjopoulos D. // *Science*. 1995. V. 267. P. 1275.

183. Lasic D.D., Papahadjopoulos D. *Liposomes revisited: Science*. 1995; 267: 1275–6.

184. Le Bang Son, Kaplun A.P., Symon A.V., et al. (1998) *J. Liposome Research*. 8, 78.

185. Leeming J.P., Holland K.T., Cunliffe W.J. The microbial colonization of inflamed acne vulgaris lesions. *Brit. J. Derm.*, 1988, 118 (2), 203–8.

186. Leyden, J.J. Current issues in antimicrobial therapy for the treatment of acne / J.J. Leyden // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. – 2001. – Vol.15, № 3. – P.51-55.

187. Lopes de Menezes D.E., Pilarski L.M., Belch A.R., Alien T.M. Selective targeting of immunoliposomal doxorubicin against human multiple myeloma in vitro and ex vivo. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1466 (1-2): 205–20. Maeda H., Matsumura Y. (1989) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, -Vol.6, -P. 193-210.

188. Lubbos, H.G. Adverse effects of spironolactone therapy in women with acne / H.G. Lubbos, S. Hasinski, L.I. Rose // *Arch. Dermatol.* – 1998. – Vol.134. - P.1162-1163.

189. Lundberg B.B., Griffiths G., Hansen H.J. Specific binding of sterically stabilized anti-B-cell immunoliposomes and cytotoxicity of entrapped doxorubicin. *Int J Pharm* 2000; – Vol. 205 (1-2). - P.101–8.

190. Machado S.R.P., Evangelista R.C. Development and Characterization of Cefoxitin Loaded D,L-PLA Nanoparticles // *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences.* – 2010. – Vol.3. – P. 193-202.

191. Manconi, M. Niosomes as carriers for tretinoin: III. A study into the in vitro cutaneous delivery of vesicleincorporated tretinoin / M. Manconi, C. Sinico, D. Valenti, F. Lai, A. M. Fadda. // *Int. J. Pharm.* - 2006, 311, pp. 11-19

192. Manconi, M. Niosomes as carriers for tretinoin. I. Preparation and properties / M. Manconi, C. Sinico, D. Valenti, F. Lai, A. M. Fadda. // *Int. J. Pharm.* - 2002, – Vol. 234. - P. 237-248.

193. Manconi, M. Niosomes as carriers for tretinoin. II. Influence of vesicular incorporation on tretinoin photostability / M. Manconi, C. Sinico, D. Valenti, F. Lai, A. M. Fadda. // *Int. J. Pharm.* - 2003, –Vol. 260. - pp. 261-272.

194. Mahmood Ahmad, Asadullah Madni, Muhammad Usman et al. *Pharmaceutical Microencapsulation Technology for Development of Controlled*

Release Drug Delivery systems // World Academy of Science, Engineering and Technology. – 2011. – Vol.75. – P. 384-387.

195. Maruyama K. In vivo targeting by liposomes. *Biol Pharm Bull* 2000; - Vol. 23. - P.791–9.

196. Massimiliano Borgogna, Barbara Bellich and Attilio Cesàro Marine. Polysaccharides in Microencapsulation and Application to Aquaculture: “From Sea to Sea” // *Mar. Drugs*. – 2011. – vol. 9. – P. 2572-2604.

197. Mozafari, M.R. & Mortazavi, S.M. (2005) Nanoliposomes: From Fundamentals to Recent Developments. Trafford Publishing Ltd, Oxford, UK.

198. Merricad M., Domingo J.C., Petriz J., Garcia J., de Madariaga M.A. Preparation of immunoliposomes bearing poly(ethylene glycol)-coupled monoclonal antibody linked via a cleavable disulfide bond for ex vivo applications. *Biochim Biophys Acta* 2000; -Vol. 1509. - P.299–310.

199. Meure, L.A., Knott, R., Foster, N.R., Dehghani, F. The Depressurization of an Expanded Solution into Aqueous Media for the Bulk Production of Liposomes. *Langmuir*. – 2009. Vol. 25. - P.326-337.

200. Meyers M.A., Ritchie R.O., Sarikaya M.B. Nano and Microstructural Design of Advanced Materials. – Elsevier, 2003. – 317 p.

201. Mezei, M. Liposomes - a selective drug delivery system for the topical route of administration. I. Lotion Dosage form / M. Mezei, V. Gulasekharam // *Life Sci*. - 1980. - Vol.26, № 18. - P.1473-1477.

202. Ming Li, Olivier Rouaud, Denis Poncelet. Microencapsulation by Solvent Evaporation: State of the Art for Process Engineering Approaches // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2008. – Vol.363. – P. 26-39.

203. Morishita R., Higaki J., Aoki M., et al. (1996) *Contrib. Nephrol.* 118, 254-264.

204. Mohsen Tafaghodi, Seyed Abolghasem Sajadi Tabassi, Mahmoud Reza Jaafari. Nasal Immunization by (PLGA) Nanospheres Encapsulated with

Tetanus Toxoid and (CpG-ODN) // Iranian Journal of Pharmaceutical Research. . – 2007. Vol.6. – P. 151-158.

205. Mozafari, M.R., Johnson, C., Hatziantoniou, S. & Demetzos, C. (2008) Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. Journal of Liposome Research. – Vol. 18 (4). - P.309-327.

206. Mozafari, M.R. & Mortazavi, S.M. (2005) Nanoliposomes: From Fundamentals to Recent Developments. Trafford Publishing Ltd, Oxford, UK.

207. Muller R.H., Ruhl D., Runge S., et al. (1997) Pharm. Res. – Vol. 14. - P. 458-462.

208. Muller R.H., Peters K., Becker R., Kruss B. (1996) Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 22, 574-575.

209. Naga Madhu, B.Bindu Madhavi, G.Arjun et al. Formulation and Evaluation of Cefotaxime Sodium Microcapsules // International Journal of Pharmaceutical Research and Development. – 2010. – Vol.2. – P. 80-86.

210. Nalla Dilip Reddy B., Challa Vinil Reddy, Kishore A.B. Vasam Mallikarjun. Formulation and in vitro Evaluvation of Erythromycin Microspheres // Journal of Global Pharma Technology. – 2010. – Vol.2. – P. 133-136.

211. Nicholas A. Peppas. Smart Drug Delivery and Bionanotechnology // 15th International Symposium on Microencapsulation, Parma (Italy). - 2005. – P. 13-15.

212. Noble, W.C. Topical and systemic antibiotics: is there a rationale? / W.C. Noble // Semin Dermatol. –1990. –Vol .9. – P.250-254.

213. Noble, W.C. The skin microflora and microbial skin disease / Ed. W.C. Noble. Cambridge univ. press. 1993;66 p.

214. Northfelt D.W., Kaplan L., Russell J., et al. (1995) in Stealth Liposomes (Lasic D.D., Martin F.J., eds). 257-266. CRC Press.

- 215/ Bazikov I.A. Nove Nanokapsle Pro Transdermalni Prunik Leciv //I.A. Bazikov J. IP and transfer technology. 2012.№4 p.12-13.
216. Ochsendorf, F. Systemic antibiotic therapy of acne vulgaris / F. Ochsendorf // JDDG Volume 4 Issue. – Page, 2006. – P.828-841.
217. Papahadjopoulou D., Allen T.M., Gabizon A., et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 11460-11464.
218. Papahadjopoulos D., Kilpotin D.B., Park J.W., Hong K., Yi Shao, Shalaby R., Colbern G., Benz C.C. Targeting of drugs to solid tumors using anti-HER2 immunoliposomes. J Liposome Research 1998; 8 (4): 425–42.
219. Park J.W., Hong K., Kirpotin D.B., Papahadjopoulos C.C., Benz C.C. Adv Pharmacol 1997; 40: 399–435.
220. Park S., Durst R.A Immunoliposome sandwich assay for the detection of Escherichia coli 0157:H7. Anal Biochem 2000; 280 (1): 151–8.
221. Patel K.R., Mukesh R. Patel, Tarak J. Mehta et al. Micriencapsulation: Review on Novel Approaches // International Journal Of Pharmacy&Technology. – 2011. – Vol.3. – 894-911
222. Pat. WO/2012/006071 US, Int. Class B01J 13/00), B01J 19/08 , C01B 33/02 , C01G 17/00, C09D 11/00. Silicon/ Germanium Nanoparticle INKS, Laser Pyrolysis Reactors For The Syntesis of Nanoparticles and Assosiated Methods. Inventors: Chiruvolu Shikumar, Altman Igor, Frey Benard et al. Published: 12.01.2012.
223. Pat. WO/2008/104717 FR, Int. Class B01F 17/14, B01F 17/42, B01F 3/08, B01J 13/00. Method for Preparing Nano-emulsion. Inventors: Bibette, Goutayer, Mathieu (FR). Published: 04.09.2008
224. Pat. WO/2011/074282 JP, Int. Class A61K8/55; A61K8/46; A61K8/81; A61K8/891. Cleansing Agent Compositions, And Method for Stabilization of Dimethylpolysiloxane. Inventors: Yano, Suguru et al. Published: 23.06.2011.

225. Pavan Kumar B., Sarath Chandiran I., Bhavya B. et al. Microparticulate Drug Delivery System: A Review // Indian Journal of Pharmaceutical Science & Research. – 2011. – Vol. 1. – P. 19-37.

226. Pat. 20110223314 US, Int. Class B05D 7/00 20060101 B05D007/00. Efficient Microencapsulation. Inventors: Zhang, Xiaoxiao, Garmire et al. Published: 15.09.2011.

227. Patricia Calvo, Teresa Hernandez, Mercedes Lozano. Microencapsulation of Extra-virgin Olive Oil by Spray-drying: Influence of Wall Material and Olive Quality // Eur. J. Lipid Sci. Technol. – 2010. – Vol. 112. – P. 852-858

228. Pat. WO/2011/143953 CN, Int. Class B01J 13/04, A61K 9/14, A61K 9/50, A61K 9/51. Method and Apparatus For Manufacturing Microspheres. Inventors: Chuanbin, Xinguo (CN). Published: 24.11.2011.

229. Pat. WO/2012/020126 EP, Int. Class C12Q 1/68. A Method For Classifying An Inflammatory Bowel Disease As A Crohn`s Disease or As An Ulcerative Colitis. Inventors: Eric (FR), Xavier (FR). Published: 16.02.2012.

230. Pat. WO/2012/034049 US, Int. Class A61L 27/54, A61F 2/02, A61L 27/34, B01J 13/00. Implantable Medical Devices Having Double Walled Microspheres. Inventors: Kokai Lauren, Marra Kacey (US). Published: 15.03.2012.

231. Pat. WO/2012/038061 EP, Int. Class B01J 13/08, A61K 8/11, A61K 8/64, A61Q 19/00, B01J 13/10. Nanocapsules Containing Microemulsions. Inventors: Josep Lluís, Raquel, Alfonso. Published: 29.03.2012.

232. Patel, V.B. Topical liposomal gel of tretinoin for the treatment of acne: research and clinical implications / V.B. Patel, A. Misra, Y.S. Marfatia // Pharm. Dev. Technol. - 2000. – Vol.5, № 4. – P.455-464.

233. Philippe Dandoy, Christophe F. Meunier, Carine Michiels et al. Hybrid Shell Engineering of Animal Cells for Immune Protection of Drug

Delivery: Towards the Design of “Artificial Organs” // Plos One. – 2011. – Vol.6. – P. 1-12.

234. Pleving, G. Acne and rosacea. 2nd edition / G. Pleving, A.M. Kligman. – Berlin, 1993. – 684 p.

235. Plewig G., Kligman A.M. Acne: Morphogenesis and Treatment. Berlin: Springer, 1975.

236. Plewig G., Kligman A.M. Acne: Pathogenesis; Morphologie; Therapie. Berlin etr., Springer, 1978, 348 p.

237. Ram B. Gupta, Uday B. Kompella. Nanoparticle Technology for Drug Delivery. – NY: Taylor & Francis Group, 2006. – 427 p.

238. Rames R.P., Okigbo R.N. Nanotechnology Importance in the Pharmaceutical Industry // African Journal of Pure and Applied Chemistry. – 2008. – Vol.2. – P. 027-031

239. Rama Dubey, Shami T.C., Bhasker K.U. Microencapsulation Technology and Applications // Defence Science Journal. – 2009. – Vol.59. – P. 82-95

240. Roland Beard, Callaghan Bradley. Self-Healing Materials // Mechanical Engeneering. - 2012. – Vol. 2. – P. 5-11.

241. Rongen H.A., Bult A., van Bennekom W.P. (1997) J. Immunol. Methods. 204, 105-133.

242. Ruimin Cui, Xiaoyan Liu, Weidong Yu et al. Preparation and Characterization of Microencapsulated n-octadecane as Phase Change Materials // Journal of Fiber Bioengineering & Informatics. – 2012. Vol.5. – P. 51-58.

243. Saurabh Jyoti Sarma, Kannan Pakshirajan, Biswanath Mahanty. Chitosan-coated Alginate–polyvinyl Alcohol Beads for Encapsulation of Silicone Oil Containing Pyrene: A Novel Method for Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. – 2011. - Vol.2. - P. 266–272.

244. Schäfer-Korting, M. Liposomal tretinoin for uncomplicated acne vulgaris / M. Schäfer-Korting, H.C. Korting // Clin Investig. – 1994. – Vol.72, № 12. – P.1086-1091.
245. Schmid M.H., Korting H.C. (1994) Crit. Rev. in Ther. Drug Carrier Syst., 11, 97-118.
246. Senior J., Delgado C., Fisher D., et al. (1991) Biochim. Biophys. Acta. 1062, 77-82.
247. Seymour L.V. (1992) Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 6, 135-187.
248. Shalita, A.R. New and optimum ways of using physical treatment / A.R. Sha-lita // JEADV. – 2001. – Vol.15. - Suppl. 2. – P.17.
249. Sharata H.H., Katz K.H. (1996) Int. J. Dermatol., 35, 761-769.
250. Shaw, I.E. Drug absorbtions. Intern. Confer / I.E Shaw.- Edinburg, 1979.-186p.
251. Shaw, J.C. Spironolactone in dermatological therapy / J.C. Shaw // J.Am.Acad.Dermatol. – 1991. – Vol.24. – P.236-243.
252. Stoughton, R.B. Percutaneous absorption of drugs / R.B. Stoughton // Annu Rev. Pharmacol. Toxicol. – 1989. – Vol.29. – P.55–69.
253. Stozek, T. Badanie wpływu zamknięcia triamcinolonu w liposomach na resorpcie przez skóre / T. Stozek, L. Krowczynski // Farm. pol. - 1983.-Vol.39, № II.-P.651-656.
254. Stryer S. (1981) Biochemistry, 213.
255. Swapan Kumar Ghost. Functional Coatings: by Polymer Microencapsulation. - Willey-VCH Verlag Gmbh & CoKGaA Weinheim, 2006. - 378 p.
256. Tabbakhian, M., Tavakoli, N., Jaafari, M.R. and Daneshamouz, S. (2006). Enhancement of follicular delivery of finasteride by liposomes and niosomes: 1. In vitro permeation and in vivo deposition studies using hamster flank and ear models. Int. J. Pharm.,323, pp. 1-10.

257. Tafaghodi, M., Eskandari, M., Kharazizadeh et al. Immunization Against Leishmaniasis by PLGA Nanospheres Loaded with an Experimental Autoclaved Leishmania Major(ALM) and Quillaja Saponins // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2010. – Vol.27. – P. 639-650.

258. Tan, H.H. Topical antibacterial treatments for acne vulgaris : comparative review and guide to selection / H.H. Tan // *Am. J. Clin. Dermatol.* – 2004. - № 5. – P.79-84.

259. Thejani E. Rajapaksa, David D. Lo. Microencapsulation of Vaccine Antigens and Adjuvants for Mucosal Targeting // *Current Immunology Reviews*. – 2010. – Vol. 6. – P. 29-37.

260. Till A.E., Goulden V., Cunliffe W.J., Holland K.T. The cutaneous microflora of adolescent, persistent and late-onset acne patients does not differ. *Br J Dermatol* 2000;142:5:885-892.

261. Tomoko Ito, Koyuki Ibe, Tomohiro Uchino et al. Preparation of DNA/Gold Nanoparticle Encapsulated in Calcium Phosphate // *Journal of Drug Delivery*. – 2011. Vol. 7. – P. 160-167.

262. Torchilin V.P., Shtilman M.I., Trubetskoy V.S., et al. (1994) *Biochim Biophys Acta*, 1195, 181-184.

263. Torchilin V.P., Klibanov A.L., Huang L. et al. Targeted accumulation of polyethylene glycol-coated immunoliposomes in infarcted rabbit myocardium. *FASEB J* 1992; 6: 2716–9.

264. Torchilin V.P., Omelyanenko V.G., Papisov M.I., et al. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, 1195, 11-20.

265. Torchilin V.P., Papisov M.I., Bogdanov A.A. et al. Molecular mechanism of liposome and immunoliposome steric protection with poly(ethylene glycol) in "Stealth Liposomes". D.Lasic, F.Martin (Eds), P.51-62. CRC Press<Boca Raton. FL. 1995.

260. Torchilin V.P. (1996) *Mol. Med. Today*, 2, 242-249.

261. Torchilin V.P. (1996) *J. Mol. Recognit.* 9, 335-346.

262. Torchilin V.P. (1998) J. Microencapsul, 15, 1-19.
263. Torchilin VP. (2006) Adv Drug Deliv Rev. 2006 Dec 1;58(14):1532-55.
266. Toyoda, M. An overview of topical antibiotics for acne treatment / M.Toyoda, M.Morohashi // Dermatology. – 1998. – Vol.196, № 1. - P. 130-134.
267. Tu, P. A comparison of adapalen gel 0,1% vs tretinoin gel 0,025% in the treatment of acne vulgaris in China / P. Tu, X.J. Zhu // J.Eur.Derm.Venereol // 2001. –Vol.15, № 3. – P.31-36.
268. Tyski S., Ciborowski P., Hryniewicz W., Jeljaszewicz J. Lipolytic and proteolytic properties of staphylococci. Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene - 1 - Abt - Originale A. Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie 1983;254:4:452-458.
269. Van Wayjen, R.J. Experience in the Long-term treatment of patients with hirsutism and/or acne with cyproteronacetate – containing preparations: efficacy, metabolic and endocrine effects / R.J. Van Wayjen, A. Van den Ende // Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. – 1995. – Vol.103. –P.241-251.
270. Vidhyalakshmi R., Bhakyaraj R., Subhasree R.S. Encapsulation “The Future of Probiotics” – A Review // Advances in Biological Research. – 2009.– Vol. 3-4. – P. 96-103.
271. Vikas Dash, Sujeet K. Mishra, Manoj Singh et al. Release Kinetic Studies of Aspirin Microcapsules from Ethyl Cellulose, Cellulose Acetate Phthalate and their Mixtures by Emulsion Solvent Evaporation Method // Sci. Pharm. – 2010. – Vol. 78. – P. 93-101.
272. Vishnu P., Ravindrababu B., Sudheer B. et al. Formulation and Optimization of Verapamil Hydrochloride Microcapsules // International Journal of Pharmacy. – 2011. – Vol.1. – P. 54-58.
273. Vodovozova E.L., Moiseeva E.V., Grechko G.K. et al. // Eur. J. Cancer. 2000. V. 36. P. 942.

274. Vora, B. Proniosome based transdermal delivery of levonorgestrel for effective contraception. / 280. Vora, B., A J. Khopade, N. K. Jain // J. Control. Rel., 1998. – Vol.54. - pp.149-165.

275. Wasfy M. Obeidat Recent Patents Review in Microencapsulation of Pharmaceuticals Using the Emulsion Solvent Removal Methods // Recent Patents on Drug Delivery & Formulation. – 2009. – Vol. 3. – P. 178-192.

276. Webster G.F. Acne vulgaris. Clinical review. B M J 2002; Volum 325: 475–9.

277. Webster, G.F. Inflammation in acne vulgaris / G.F. Webster // J. Am. Acad. Derm. – 2004. – Vol.33. – P.247-253.

278. Wiedmann T. S. DeCastro L. Wood R.W. (1997) Pharm. Res. 14, 112-116.

279. Wright S., Huang L. Advanced Drug Delivery Rev 1989; 3: 343–40.

280. Xiao Jun-xia, Yu Hai-yan, Yang Jian. Microencapsulation of Sweet Orange Oil by Complex Coacervation With Soybean Protein Isolate Gum Arabic // Food Chemistry. – 2011. – Vol.125. – P. 1267-1272.

281. Yang K., Clifton G.L., Hayes R.L. (1997) J. Neurotrauma. – Vol. 14. – P.281-297.

282. Yin-Feng Shi, Zhong Tian, Yang Zhang et al. Functionalized halloysite Nanotube-based Carrier for Intracellular Delivery of Antisense Oligonucleotides // Nanoscale Research Letters. – 2011. – Vol. 6. – P. 608-615.

283. Yogita Krishnamachari, Aliasger K. Salem. Innovative Strategies for Co-delivering Antigens and CpG Oligonucleotides // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2009. – Vol.21. – P. 205-217.

284. Yoon Yeo, Kinam Park. A New Microencapsulation Method Using an Ultrasonic Atomizer Based on Interfacial Solvent Exchange // Journal of Controlled Release. – 2004. – Vol. 100. – P. 379-388

285. Yuan F., Dellian M., Fukumura D.F. et al. // Cancer Res. 1995. V. 55. P. 3752.

284. Yuan F. (1998) Semin. Radiat. Oncol.. – Vol. 8. - P.164-175.
286. Yurasov V.V., Kucheryanu V.G., Kryzhanovsky G.N., et al. (1996) Progress in Drug Delivery Systems. Biomedical Research Foundation, Tokyo. Eds. Sadao Hirota, – Vol. 5. – P. 171-174.
287. Zenderovska D., Stafilov T., Milosevski P. High-Perfomance Liquid Chromatographic Method for Determination of Cefixime and Cefotaxime in Human Plasma // Bulletin of The Chemists and technologists of Macedonia. – 2003. – Vol.1. – P. 39-45.
288. Zimmermann H., Hillg M., Manz B. et al. Fabrication of Homogeneously Cross-linked, Functional Alginate Microcapsules Validated by NMR-, CLSM- and AFM-imaging // Biomaterials. – 2003. – Vol. 24. – P. 2083-2096.
289. Zouboulis, C. Effect of 13-cis-retinoic acid (isotretinoin) the proliferatuin, lipid synthesis and keratin expression of cultured human sebocytes in vitro / C.Zouboulis // J. Invest. Dermatol. –4. - 1996. - № 5. – P.792-797.

