

На правах рукописи



Быркина Татьяна Сергеевна

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕЧЕБНОЙ
ГИДРОГЕЛЕВОЙ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ
С УВЕЛИЧЕННЫМ СРОКОМ ГОДНОСТИ**

Специальность 05.17.06 – Технология и переработка
полимеров и композитов

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Москва – 2018

Работа выполнена на базовой кафедре «Химические нано- и биотехнологии» федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет технологий и управления имени К.Г. Разумовского (Первый казачий университет)» при ООО «Колетекс», г. Москва.

Научный руководитель: доктор технических наук, профессор **Олтаржевская Наталия Дмитриевна**

Официальные оппоненты: **Жуковский Валерий Анатольевич**, доктор технических наук, профессор кафедры наноструктурных, волокнистых и композиционных материалов им. А. И. Меоса ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна».

Пророкова Наталия Петровна, доктор технических наук, старший научный сотрудник, главный научный сотрудник лаборатории «Химия и технология модифицированных волокнистых материалов» ФБУН Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Ивановский государственный химико-технологический университет», г. Иваново

Защита состоится «17» мая 2018 г. в 10⁰⁰ на заседании диссертационного совета Д 212.144.07 при ФГБОУ ВО «Российский государственный университет имени А.Н. Косыгина» (Технологии. Дизайн. Искусство)» по адресу: 117997, г. Москва, ул. Садовническая, д. 33, стр. 1, конференц-зал (ауд. 156).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Российский государственный университет имени А.Н. Косыгина» (Технологии. Дизайн. Искусство)» и сайте университета <http://www.kosygin-rgu.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д 212.144.07, к.х.н., доцент



Кузнецов Д.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Создание изделий медицинского назначения, в том числе на полимерной основе, является сегодня одним из основных направлений в развитии отечественной фармацевтической и химической промышленности, поскольку в основе использования этих материалов – возможность помочь больным людям, облегчить их страдания, а все, что связано со здоровьем людей и улучшением качества жизни, является основополагающим в развитии нашего общества, прерогативой в действиях правительства Российской Федерации.

Увеличение объемов выпуска медицинских изделий (МИ) на биополимерной основе, появление новых производителей усиливает государственный контроль в данной области и выдвигает новые требования к показателям качества, технологическим характеристикам и методам контроля качества выпускаемых изделий.

Один из способов повышения конкурентной способности разрабатываемой продукции на рынке заключается в продлении ее срока годности и упрощении режимов хранения. Такими материалами с надежностью можно обеспечивать военно-полевые госпитали, укомплектовывать аптечки для чрезвычайных ситуаций – то есть использовать там, где условия для хранения медицинских изделий и лекарственных средств имеют определенные ограничения.

Кроме того, учитывая географические размеры нашей страны, разные погодные условия на ее территории, возможность усложнения доставки лечебных материалов в аптеки, медицинские учреждения и в отдаленные пункты, проблема увеличения срока годности и оптимизации условий хранения становится очень актуальной.

Разработанные и выпускаемые в России гидрогелевые материалы на основе альгината натрия (АН), например, торговой марки «Колегель» имеют, несмотря на высокую эффективность применения (в онкологии, урологии, гинекологии, проктологии и т.д.), недостаточный с точки зрения потребителей срок годности, а именно 1 год. Поэтому разработка лечебной гидрогелевой композиции на основе АН с увеличенным сроком годности для применения в различных областях медицины является очень актуальной задачей.

Диссертация выполнена в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» в соответствии с Приоритетным направлением развития «Медицинская техника и фармацевтика» и критическими технологиями «Биомедицинские и ветеринарные технологии», а также в рамках государственного контракта № 14.N08.11.0140 и в рамках гранта РФФИ № 15-29-04847 офи_м.

Цель работы заключалась в научно обоснованном выборе способа стабилизации лечебной гидрогелевой композиции (ГК) на основе АН, обеспечивающего сохранение её свойств в течение рекомендованного для подобных медицинских изделий срока годности – не менее 2 лет.

В соответствии с поставленной целью необходимо было решить следующие **научные задачи:**

- изучить технологию получения гидрогелевых МИ на основе АН марки «Колегель» и выявить «критические точки» производства, которые предположительно могут отрицательно влиять на качество конечной продукции и ее срок годности;
- определить пути воздействия на «критические» технологические стадии с целью уменьшения их отрицательного влияния на срок годности и качество продукции.
- провести анализ литературных данных, посвященных возможным способам увеличения срока годности МИ на биополимерной гидрогелевой основе, и экспериментально оценить целесообразность и возможность применения предлагаемых способов воздействия;
- разработать методику, с помощью которой возможно достоверно и ускоренно оценивать влияние изменения состава и технологии получения лечебной ГК на ее срок годности, а также определить технологические параметры, по которым будет оцениваться качество ГК;
- определить состав и технологию получения ГК на основе АН, стабильной в течение срока годности не менее 2 лет;
- оценить качество созданной лечебной ГК с точки зрения ее технологичности и токсикологической безопасности применения.

Научная новизна.

1. Показано, что деструкция АН, приводящая к снижению срока годности биополимерной лечебной композиции, связана с двумя процессами технологического цикла производства МИ – действием микроорганизмов (биodeградацией) на стадии изготовления и хранения до стерилизации и радиоллизом при стерилизации.
2. На основании скрининга консервирующих добавок (соединений) научно обосновано и экспериментально подтверждено использование сорбата калия и феноксиэтанола в качестве стабилизаторов композиции на основе АН, позволяющих одновременно достичь ингибирования роста и развития микроорганизмов в гидрогелевой композиции до финишной радиационной стерилизации и сохранения необходимой вязкости после ее финишной радиационной стерилизации.
3. Предложены математические модели, описывающие биodeградацию композиции, вызванную микроорганизмами, при ее получении и хранении до финишной стерилизации и снижение ее вязкости в результате деструкции АН (основа гидрогелевой композиции) при радиационной стерилизации.
4. Разработана методика ускоренного старения гидрогелевых композиций на основе АН, основанная на анализе изменения микробной обсемененности нестерильной и вязкости стерильной композиции в процессе хранения при повышенной температуре, позволяющая сократить время определения срока годности получаемого МИ.

5. Посредством моделирования процесса старения лечебной ГК на основе АН обоснованы технология получения и состав, обеспечивающие ее максимальный срок годности (2 года): введение 0,25% сорбата калия в низковязкую гидрогелевую композицию и введение 1,00% феноксиэтанола в высоковязкую альгинатную гидрогелевую композицию.

Теоретическая и практическая значимость работы. Предложено и экспериментально апробировано математическое описание (модель) процесса старения ГК из АН, на основании которого разработана методика, позволяющая в короткие сроки определять влияние вводимых в композицию добавок на ее свойства и ускоренно определять гарантийный срок годности лечебных материалов. Разработан способ увеличения срока годности медицинских гидрогелевых материалов на основе АН и предложены компоненты композиции, одновременно стабилизирующие ее вязкостные характеристики и обеспечивающие ее стерильность на протяжении 2 лет хранения, что соответствует поставленной в диссертации цели. Разработана технология получения гидрогелевого материала со сроком хранения 2 года, проведены успешные токсикологические испытания лечебных материалов и внесены соответствующие изменения в техническую документацию, регламентирующую их производство и реализацию.

Личный вклад автора состоял в поиске и анализе литературных источников по теме диссертации, постановке целей и задач исследования, выполнении эксперимента, описании полученных экспериментальных данных и написании публикаций. Основные результаты диссертации получены автором лично.

Автор благодарит к.б.н., преподавателя кафедры «Технология химико-фармацевтических и косметических средств» РХТУ им. Д.И. Менделеева Буторову И.А., при участии которой были выполнены микробиологические исследования в данной диссертационной работе, а также выражает благодарность к.ф.-м.н., доценту кафедры прикладной информатики и теории вероятностей РУДН Ловецкому К.П. за оказанную помощь в математическом описании процессов старения ГК

Достоверность результатов проведенного исследования определяется использованием современных методик исследования, сертифицированного оборудования, воспроизводимостью результатов, апробацией разработанной технологии в производственных условиях.

Апробация результатов. Материалы работы доложены на Всероссийских и международных научных конференциях: VIII Международная научная конференция «Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация как форма самоорганизации вещества», г. Иваново, 2014 г.; международная научно-техническая конференция «Инновационные технологии развития текстильной и легкой промышленности», г. Москва, 2014 г.; XII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты», г. Москва, 2015 г.; XIX Международный научно-практический форум «Физика

волокнистых материалов: структура, свойства, наукоемкие технологии и материалы (SMARTEX-2016)», г. Иваново, 2016 г.; международная научная конференция и XII Всероссийской студенческой олимпиады молодых ученых «Наноструктурные, волокнистые и композиционные материалы» г. Санкт-Петербург, 2016 г.

По итогам диссертационного исследования подана заявка на изобретение (Способ получения лечебного гидрогеля: заявка на изобретение 2017127010 Рос. Федерация; заявл. 27.07.2017; экспертиза по существу 19.09.2017.).

Степень разработанности темы исследования. Поскольку данная диссертационная работа касалась оптимизации технологии получения лечебных ГК одновременно как с точки зрения уменьшения микробной обсемененности гидрогеля на основе АН до стерилизации, так и с позиции предотвращения его деструкции в ходе стерилизации, а также достижения стабилизации данных параметров на протяжении желаемого срока годности (не менее 2 лет), возникла необходимость поиска литературных сведений об используемых в настоящий момент способах стабилизации и веществах-стабилизаторах подобных лечебных материалов, обеспечивающих эти требования. В литературных источниках последних лет имеется достаточная информация о специальных антимикробных добавках для материалов на полимерной основе; немало внимания также уделяется и вопросу деструкции различных полимеров в ходе радиационной обработки получаемых из них МИ (работы Кричевского Г.Е., Штильмана М.И., Сергиенко К.В., Олтаржевской Н.Д., Морыганова А.П., Пророковой Н.П., Жуковского В.А., Калашников В.В., Кильдеевой Н.Р., Валуевой М.И., Hai Bang Lee, P. Tomlins и др.). Однако в недостаточной степени научно разработаны вопросы, касающиеся особенностей построения технологического процесса и выбора добавок, стабилизирующих динамическую вязкость гидрогелей из природных полисахаридов после радиационной стерилизации и обеспечивающих стерильность МИ на их основе в процессе хранения.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 5 научных статьи в рецензируемых журналах из Перечня ВАК.

Структура и объем работы.

Диссертационная работа изложена на 212 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, методической части, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы из 147 ссылок. Работа содержит 33 таблицы, 52 рисунка и приложения на 15 страницах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель работы и соответствующие ей задачи, а также изложена научная новизна диссертационного исследования, его теоретическая и практическая значимость и представлены сведения о степени достоверности результатов и апробации работы.

В первой главе представлен обзор литературы, посвященной специфике получения МИ на биополимерной основе, существующим на нынешний момент

способам стерилизации таких МИ, приведен перечень требований, предъявляемых к ним. Особое внимание уделено анализу радиационного способа стерилизации медицинских материалов на биополимерной основе и путям повышения их устойчивости к воздействию финишной радиационной стерилизации (ФРС), приводящей к протеканию процессов радиолиза. Кроме того описываются микробиологические повреждения биополимерных материалов и пути борьбы с ними, в частности, использование антимикробных добавок (консервантов), позволяющих стабилизировать исходную микробную обсемененность используемых биополимеров и полупродуктов на их основе и повысить тем самым надежность ФРС изготавливаемой продукции.

Вторая глава посвящена описанию характеристик объектов исследования и вспомогательных материалов, методов исследования, используемых в работе, методик эксперимента, разработанных в том числе и с участием автора.

В третьей главе приведены результаты экспериментальной работы и их обсуждение. Установлено, что для достижения поставленной в работе цели – увеличение срока годности лечебной ГК на основе АН до 2 лет – необходимо в комплексе решать две технологические задачи: снижать обсемененность ГК до ФРС и предотвращать падение вязкости ГК после ФРС дозой 6-15 кГр. Исходя из этого в экспериментальной части изучалась возможность использования физических способов уменьшения микробной обсемененности ГК до стадии ФРС (изменение температуры хранения нестерильной ГК, предварительная ультразвуковая (УЗ) обработка ГК, радиационная обработка сырья), а также возможность частичной замены АН на другие биосовместимые полимеры, которые менее подвержены контаминации микроорганизмами. Также проанализирована целесообразность использования стабилизирующих добавок («зеленых» и синтетических); при их введении в ГК на основе АН оценивалось эффективность действия данных добавок комплексно по двум направлениям: ингибирование развития микроорганизмов в ГК до ФРС и сохранение вязкости лечебной ГК после ФРС в течение 2 лет. Выбраны математические модели, описывающие старение ГК в течение всего срока хранения, и разработана экспресс-методика определения срока годности лечебной ГК на основе АН.

В обзоре литературы (**раздел 1.1.2.**) и экспериментальной части (**раздел 3.1.**) проанализирована существующая технология получения лечебных ГК, оценены производственные факторы, которые могут отрицательно влиять на их качество. Технология получения ГК (рис.1), основывается на приготовлении раствора лекарственных веществ (ЛВ) заданной концентрации с последующим введением в него АН.

Альгинатный гидрогель проходит стадию расфасовки в первичную упаковку, а затем подвергается обязательной ФРС дозой 6-15 кГр в соответствии с существующими требованиями, предъявляемыми к МИ. Согласно такой

технологической схеме производятся два вида лечебных ГК торговой марки «Колегель»: низковязкие ГК для урологического применения, вязкость которых по медицинским показаниям должна быть 1,5-2,0 Па·с, и высоковязкие ГК, применяемые в общетерапевтической практике, онкологии, проктологии, вязкость которых должна составлять 6,0-15,0 Па·с.

В соответствии с представленной технологической схемой получения лечебной ГК на основе АН были подробно рассмотрены нижеперечисленные технологические этапы, на которых возможно ухудшение качества конечной продукции.

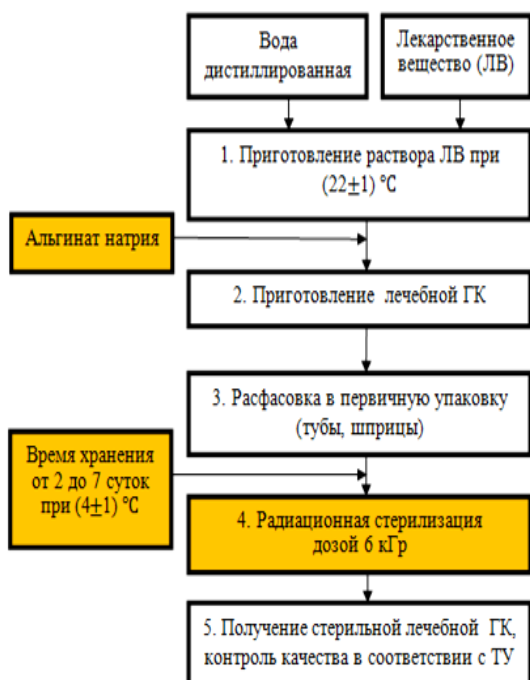


Рис.1. Технологическая схема производства ГК

1) *Использование на начальном технологическом этапе в качестве сырья природного полисахарида АН, обладающего собственной биологической активностью. АН достаточно быстро обсеменяется различными микроорганизмами, поскольку этот природный полисахарид является хорошим источником углерода для роста и развития бактерий и грибов, и, как следствие, композиции на его основе тоже имеют высокую исходную микробную обсемененность до финишной стерилизации, что подтверждается экспериментальными данными, приведенными в разделе 3.2. (табл.1).*

Таблица 1. Микробная обсемененность АН и ГК, приготовленной на его основе

Микрофлора	Количество микроорганизмов, N, КОЕ/г	
	АН	ГК (7% АН)
Грибы	$1,00 \cdot 10^3$	$2,00 \cdot 10^2$
Бактерии	$2,10 \cdot 10^3$	$1,00 \cdot 10^2$
Общая обсемененность	$3,10 \cdot 10^3$	$3,00 \cdot 10^2$

Повышенная обсемененность ГК на основе АН до финишной стерилизации, основной вклад в которую, как показали наши исследования, вносит бактериальная микрофлора, приводит к тому, что во избежание в дальнейшем недостаточного срока годности таких ГК необходимо увеличивать стерилизующую дозу, а также время стерилизационной обработки, что отрицательно может сказываться на вязкости готовой продукции из-за протекания процесса радиолита.

2) *Использование радиационной стерилизации, которая проводится γ -облучением дозой 6 кГр*, так как термическая стерилизация не подходит для ГК на основе АН ввиду его термолабильности.

Малая доза облучения 6 кГр выбиралась на основании предварительных исследований, показавших, что при большей стерилизующей дозе (15кГр) происходит деструкция ГК, характеризующаяся существенным падением ее вязкости (табл.2).

Таблица 2. Влияние дозы ФРС на вязкость стерильной ГК

Доза облучения, кГр	Вязкость ГК на основе АН (7%), Па · с
До стерилизации	50,4
6 кГр	2,3
15 кГр	0,8

Такая доза стерилизации обуславливала главное технологическое решение, используемое в данной работе, - чем менее обсемененной будет ГК до финишной стерилизации, тем эффективнее пройдет ее стерилизация дозой 6 кГр и тем больше будет срок годности, в течение которого свойства данного лечебного материала будут стабильны.

3) *Отсрочка стадии финишной стерилизации МИ до 2-7 суток из-за логистических особенностей технологического цикла*, которая может приводить к значительному увеличению исходной обсемененности ГК. В конечном счете это может снизить качество продукции из-за понижения уровня ее стерильности и срок ее годности.

Таким образом, рассмотрение этапов технологического процесса подтвердило, что основными критическими факторами, отрицательно влияющими на качество конечной продукции (ГК на основе АН) и ее срок годности, являются избыточная микробная обсемененность ГК до стадии ФРС и понижение вязкости ГК после ФРС. Для стабилизации названных параметров лечебной ГК в течение увеличенного срока годности (2 лет) в работе выбирался способ, позволяющий решить две эти задачи в комплексе (одновременно).

В **разделе 3.2.1.** произведена оценка эффективности снижения исходной микробной обсемененности ГК посредством нижеперечисленных технологических подходов.

1) Снижение температуры хранения ГК до ФРС с (21-23)°С до (3-5)°С. Экспериментально доказано, что снижение температуры в таких пределах недостаточно для уменьшения микробной обсемененности ГК. Удовлетворительное значение микробной обсемененности ГК отмечено лишь в первые сутки хранения при температуре 3-5 °С (температура, реализуемая в промышленном холодильнике), что делало данное технологическое решение малоэффективным. Сделан вывод о том, что понижение температуры хранения ГК можно использовать только в качестве

дополнительного способа ингибирования развития микроорганизмов в ГК. Установлено, что во время хранения до ФРС большой вклад в обсемененность ГК вносит бактериальная микрофлора.

2) УЗ-обработка приготовленной ГК на основе АН. Готовые альгинатные композиции, хранившиеся 1 сутки при температуре 21-23°C и 3-5°C, обрабатывали УЗ, резонансная частота которого - 22 ± 2 кГц и мощность 600 Вт. Губительное действие на микроорганизмы УЗ-обработки, по литературным сведениям, обусловлено кавитацией, возникающей в обрабатываемых объектах. Время обработки ГК составляло 10 мин, что позволяло провести обработку при повышении температуры ГК не более, чем до 35 °C и избежать ее термодеструкции. Установлено, что 10-минутная УЗ-обработка повышает вязкость ГК до стерилизации в среднем на 2,0 Па·с по сравнению с контрольным образцом, не подвергавшимся УЗ-обработке, что являлось положительным технологическим фактором, однако после стерилизации вязкость обработанных композиций практически не отличалась от вязкости контрольного образца (2,1-2,5 Па·с). Поэтому такой способ снижения обсемененности композиции до стерилизации посчитали нецелесообразным, поскольку, являясь малоэффективным с точки зрения снижения обсемененности (обсемененность снижается только на один порядок - с $2,5 \cdot 10^2$ до $4,0 \cdot 10^1$ КОЕ/г при температуре хранения ГК 3-5°C), он существенно усложнял технологию изготовления лечебных ГК и повышал их себестоимость.

3) С целью снижения исходной микробной обсемененности ГК рассматривалась предварительная радиационная обработка АН, используемого для ее производства. Обработку проводили, также как и ФРС, на стерилизующих установках двух типов: с облучателем на основе радионуклидов ^{60}Co (γ - облучением) и с облучателем на основе генератора пучка электронов (ЭЛ - обработка). Обработка контаминированного АН радиационным облучением позволила снизить уровень его микробной обсемененности в 15 раз с помощью γ - облучения и в 6 раз с помощью ЭЛ-обработки. При этом количество грибной микрофлоры снижалось в одинаковой степени при обработке как γ - облучением, так и ускоренными электронами - с $1,0 \cdot 10^3$ КОЕ/г до $1,0 \cdot 10^2$ КОЕ/г (в 10 раз). В то же время количество бактериальной микрофлоры снижалось с помощью γ - облучения с $2,1 \cdot 10^3$ КОЕ/г до $1,0 \cdot 10^2$ КОЕ/г (в 21 раз), а с помощью ЭЛ-обработки с $2,1 \cdot 10^3$ КОЕ/г до $4,0 \cdot 10^2$ КОЕ/г (в 5 раз). Это позволило сделать вывод о том, что γ - облучение является более предпочтительным способом ФРС. Несмотря на эффективность снижения микробной обсемененности АН и, как следствие, ГК на его основе, данный подход посчитали неприемлемым из-за неудовлетворительного значения вязкости стерильной ГК, приготовленной на основе предварительно облученного АН. Показано, что в случае предварительного электронного облучения АН вязкость ГК на его основе падала на 73,5%, а после ФРС данным способом и вовсе снижалась до 0,8%. Предварительное γ -облучение в меньшей степени снижало вязкость композиции, чем электронное облучение. Так,

при γ -облучении АН вязкость приготовленной из него ГК снижалась на 47,8%, после же ФРС ГК γ -облучением – на 94,8%, однако такой результат тоже оказался неудовлетворительным.

В разделах 3.2.2.-3.2.3. изучена возможность частичной замены полисахарида АН в лечебной ГК на другой синтетический биосовместимый полимер с целью понижения исходной обсемененности ГК до ФРС. Среди рассматриваемых биосовместимых полимеров (карбоксиметилцеллюлоза - КМЦ, поли-N-винилпирролидон - ПВП, поливиниловый спирт – ПВС с м.м. 45000 и 145000), основываясь на сравнительном анализе вязкости композиций на основе 7% масс. каждого из перечисленных полимеров и вязкости контрольного образца – гидрогеля на основе 7,0% масс. АН, в качестве подходящей добавки был выбран ПВС. Определено, что введение ПВС (м.м. 45000 и 145000) с исходной микробной обсемененностью менее $1,0 \cdot 10^1$ КОЕ/г в ГК на основе АН с обсемененностью $3,0 \cdot 10^3$ КОЕ/г в количестве 10% масс. от общего содержания полисахарида позволило снизить микробную обсемененность этой ГК до менее, чем $1,0 \cdot 10^1$ КОЕ/г (в течение 3 сут. хранения до ФРС). Оценка реологических параметров ГК с введением различного количества ПВС с м.м. 45000 и 145000 (рис.2,3) подтвердила, что оптимальным является введение ПВС с м.м. 145000 в концентрации 10,0% масс. от общего содержания АН, т.е. 0,7% масс.

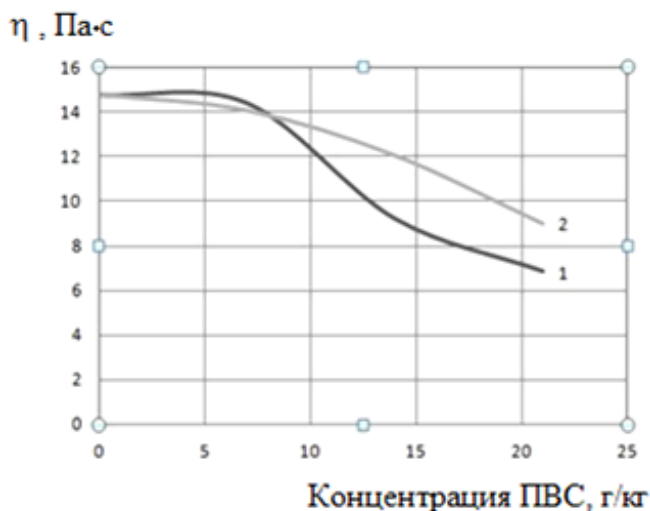


Рис. 2. Зависимость динамической вязкости ГК от содержания ПВС с различной молекулярной массой (до ФРС); 1 – ПВС 45.000, 2 – ПВС 145.000

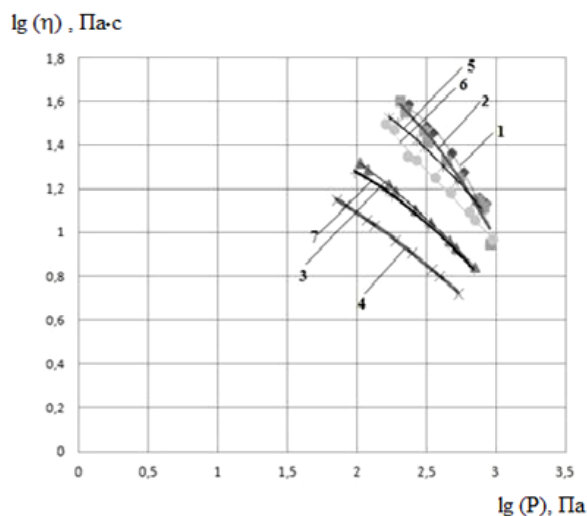


Рис. 3. Кривые течения ГК с различным содержанием ПВС 45.000 и 145.000 до ФРС (1-7% АН; 2- 0.7% ПВС 45.000, 6,3% АН; 3- 1,4% ПВС 45.000, 5,6% АН, 4 - 2,1% ПВС 45.000, 4,9% АН; 5- 0.7% ПВС 145.000, 6,3% АН; 6-1,4% ПВС 145.000, 5,6% АН, 7- 2,1% ПВС 145.000, 4,9% АН.

Изучение вязкости стерильных ГК на основе АН с добавлением ПВС после ФРС показало, что она падает, и ПВС не способствует в достаточной степени ее стабилизации. Изучение влияния ЛВ (диоксидин, димексид), используемых при производстве материалов «Колегель», на исходную микробную обсемененность ГК

(раздел 3.3.), показало, что они не оказывают ингибирующего воздействия на развитие микроорганизмов в нестерильной ГК. Поэтому далее в работе изучалась возможность введения нетоксичных, разрешенных для применения в фармацевтической и пищевой промышленности добавок (природных и синтетических) с целью одновременной стабилизации ими как микробиологических характеристик ГК на основе АН до ФРС, так и ее вязкости после ФРС.

В разделе 3.4. оценивалась целесообразность введения в ГК на основе АН «зеленых» (природных) стабилизаторов, обладающих известной антимикробной активностью и/или антиоксидантным действием, позволяющим ингибировать свободно-радикальные реакции, протекающие в течение и после ФРС и приводящие к деструкции биополимерной матрицы. В качестве «зеленых» добавок были выбраны: смесь из экстрактов ромашки и крапивы – по 1,00% масс. соответственно, экстракт куркумина - 0,25% масс., экстракт мяты-0,25% масс, серебро в форме наночастиц, стабилизированных АН (НЧС)-1,00-5,00% масс.).



Было установлено, что наибольшую эффективность при угнетении роста тест-штаммов микроорганизмов проявляет добавка НЧС, стабилизированных АН в концентрации 1,00-5,00% масс. (рис.4), однако вязкость ГК с данной добавкой после ФРС, также как и с остальными перечисленными «зелеными» стабилизаторами, практически не отличалась от вязкости контрольного образца ГК на основе АН без введения стабилизаторов (табл.3).

Рис.4. Антимикробная активность образцов ГК с дополнительно введенными НЧС в отношении золотистого стафилококка (1- альгинатный гель-концентрат с НЧС, 3-6 – альгинатный гель-концентрат с НЧС, введенный в ГК в концентрации от 1,00 до 5,00% масс. соответственно, К – контрольный образец ГК без введения НЧС)

Таблица3. Вязкость ГК с введенными «зелеными» стабилизаторами

Вводимый в ГК стабилизатор и его концентрация	Динамическая вязкость, Па · с
Смесь экстрактов ромашки и крапивы (1,00% и 1,00%, соответственно)	2,27
экстракт мяты 0,25%	2,29
экстракт куркумина 0,25%	2,25
ГК с добавлением НЧС (от 1,00% до 5,00%)	2,20-2,30
Контрольный образец без стабилизатора	2,30

Одновременная стабилизация микробиологических характеристик нестерильной и вязкостных характеристик стерильной ГК при использовании «зеленых» добавок не была достигнута, вследствие чего далее в работе производился скрининг синтетических добавок, проявляющих выраженное антимикробное действие и разрешенных для применения в фармацевтической и пищевой промышленности.

Рассматривались бензойная кислота (БК), сорбат калия (СК), их смесь; мицеллярные формы добавок на основе БК (DS 12), СК (DS 4) и их смеси (DS 44); консервант на основе феноксиэтанола (ФЭ) (раздел 3.5.). Скрининг проводился с целью выбора добавки, одновременно позволяющей снизить микробную обсемененность ГК до ФРС и сохранить вязкость ГК после ФРС.

По итогам определения общей микробной обсемененности ГК до ФРС показано, что, по сравнению с общей микробной обсемененностью контрольного образца, все изучаемые добавки способствовали подавлению развития микрофлоры в образцах, хранившихся 3 суток до ФРС при температуре 3-5 °С. Наибольшую эффективность при снижении обсемененности имели добавки DS 4 ($1,0 \cdot 10^2$ КОЕ/г), DS 44 ($1,0 \cdot 10^2$ КОЕ/г), DS 12 ($7,1 \cdot 10^1$ КОЕ/г) и ФЭ ($5,0 \cdot 10^1$ КОЕ/г). Следующим после них по эффективности являлся СК в концентрации 0,25% масс. ($1,0 \cdot 10^3$ КОЕ/г). Из перечисленных эффективных стабилизаторов СК и ФЭ наиболее экономически выгодны по сравнению с консервантами в мицеллярной форме.

Оценка остаточной вязкости ГК на основе АН после ФРС дозой 6 кГр (раздел 3.6.) показала, что наиболее выраженным стабилизирующим действием в отношении вязкости обладают добавки 0,25% масс. СК (остаточная вязкость стерильной ГК - 10,7 %) и 1,00% масс. ФЭ (остаточная вязкость стерильной ГК - 12,6%) при сравнении с остаточной вязкостью контрольного образца ГК без введения стабилизатора – 6,9%. Химическая структура данных стабилизаторов приведена ниже (рис.5).



Рис.5. Структурная формула сорбата калия (1) - калиевой соли транс-2,4-гексадиеновой кислоты и 2-феноксиэтанола (2)

На основании литературных данных выдвинуто предположение о том, что стабилизирующий эффект добавки СК обусловлен способностью калиевой соли транс-2,4-гексадиеновой кислоты, имеющей двойные связи, полимеризоваться по принципу диеновых углеводородов. В рассматриваемом случае инициаторами полимеризации выступает перекись, являющаяся одним из продуктов радиолитического распада воды, находящейся в альгинатном гидрогеле ($H_2O \rightarrow (H^+ OH^- + e^-_{aq} + H_2 + H_2O_2 + H_3O^+)$). В результате после γ -облучения в ГК на основе АН с добавлением СК образуется высокомолекулярное соединение с линейной структурой, элементарным звеном которого является остаток сорбиновой кислоты с двойной связью в транс-форме $(-CH-(CH_3)-CH=CH-CH-(COO^-)-)_n$, вследствие чего вязкость стерильной ГК увеличивается.

Возможность стабилизации вязкости ГК на основе АН после ФРС с помощью ФЭ обусловлена наличием в его структуре гидроксильной группы –ОН- «ловушки» (акцептора) свободных радикалов. Это уменьшает деструкцию биополимера, так как данные вещества участвуют в свободно-радикальных превращениях с радикальными

частицами, образующимися в процессе радиолитиза, и тем самым выводят их из реакции с АН. Исследования с введением спиртовых добавок (ПЭГ, глицерин, этанол) также подтвердили этот факт, однако полученные результаты не удовлетворили нашим требованиям к значениям вязкости.

Раздел 3.7. посвящен разработке ускоренной методики определения срока годности ГК на основе АН, которая позволила подтвердить целесообразность введения выбранных стабилизирующих добавок в ГК для увеличения ее срока годности до 2 лет. Данная методика основана на математическом описании процессов старения лечебной ГК в течение хранения, выборе температуры и длительности экспериментального хранения ГК. «Ускоренное старение» лечебных ГК (стерильных и нестерильных) с дополнительно введенными стабилизаторами (СК 0,25% масс. и ФЭ 1,00% масс.) осуществлялось при температуре $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 116 суток экспериментального хранения, что соответствовало 2 годам хранения ГК в реальном времени при температуре $3-5^\circ\text{C}$. В течение экспериментального хранения фиксировалось изменение микробной обсемененности нестерильных ГК и вязкости стерильных ГК, в качестве контрольного образца использовали ГК на основе АН без добавок. Для математического описания изменения микробной обсемененности в течение экспериментального хранения была выбрана модель Бараньи-Робертса (1), а для математического описания изменения вязкости в течение хранения использовалось модифицированное уравнение Аррениуса (2), в которое нами был введен коэффициент В, учитывающий изменение вязкости ГК в зависимости от температуры хранения.

$$y(t) = \ln x(t) = y_0 + \mu_{\max} A(t) - \ln \left(1 + \frac{e^{\mu_{\max} A(t)} - 1}{e^{y_{\max} - y_0}} \right) + B \exp \left(- \frac{C}{(t - t_{\max})^2} \right), \quad (1)$$

где $y_0 = \ln x(0)$ - значение функции, описывающей рост микроорганизмов, в начальной стадии при количестве микроорганизмов x_0 ;

$y_{\max} = \ln x_{\max}$ - значение функции, описывающей рост микроорганизмов, при максимальном количестве микроорганизмов x_{\max} ;

μ_{\max} - максимальная скорость роста микроорганизмов;

λ - величина запаздывания роста микроорганизмов, $h_0 = \lambda \mu_{\max}$;

B, C - коэффициенты, учитывающие ограниченность ресурсов для развития микроорганизмов (питательные вещества).

$$C = C_0 - t \times A \times e^{\frac{E_A + B}{R \times T}}, \quad (2)$$

где k - константа деградации препарата, $k = A \cdot e^{\frac{-E_A + B}{RT}}$;

A - предэкспоненциальный коэффициент, E_A - энергия активации процесса,

t - время экспериментального хранения, T - температура хранения, К,

B – доля потери вязкости при хранении,

R – универсальная газовая постоянная, $(8,314 \text{ Дж}/(\text{моль}\cdot\text{К}))$;

C – рассчитываемый срок годности ГК, C_0 – срок годности в реальном времени

В связи с тем, что не удалось подобрать единую модель для описания двух

интересующих процессов (возрастание микробной обсемененности до ФРС и падение вязкости после ФРС), были использованы две самостоятельные модели, приведенные выше.

По итогам сравнения кривых роста микроорганизмов в нестерильных ГК (рис.5) установлено, что в образцах со стабилизаторами развитие микроорганизмов идет с меньшей скоростью по сравнению с ростом микроорганизмов в контрольном образце, т.е. оно медленнее переходит из индукционной фазы (медленного роста) в

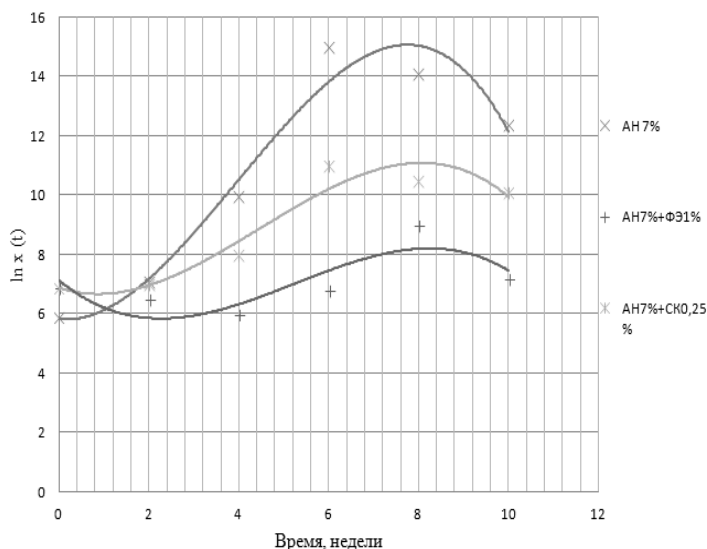


Рис. 5. Кривые роста микроорганизмов в ГК, полученные по модели Бараньи-Робертса

экспоненциальную фазу (быстрого роста), что может быть успешно использовано в технологическом цикле при отсрочке стадии ФРС.

С помощью программного обеспечения, имеющего в своей основе математическую модель (2), и используемого для ускоренного прогнозирования срока годности ГК, были построены зависимости изменения вязкости ГК с добавлением 0,25% масс. СК и 1,00 % масс. ФЭ от экспериментального времени хранения, равного 174 суткам (рис. 6,7), что составляет 3 года хранения в реальном времени (в соответствии со способом расчета времени эксперимента, приведенным в Государственной фармакопее РФ).

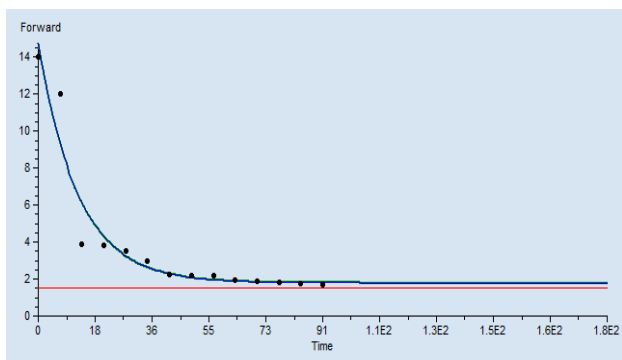


Рис. 6. Изменение вязкости во времени стерильной ГК на основе АН с СК

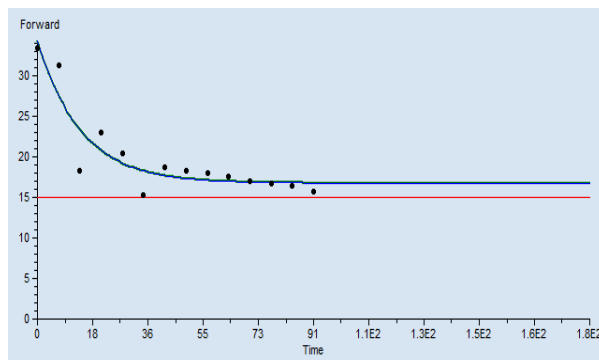


Рис. 7. Изменение вязкости во времени стерильной ГК на основе АН с ФЭ

Показано, что вязкость ГК с добавлением СК после стерилизации не опускалась ниже 1,5 Па·с в течение 174 суток (рис.6), а вязкость ГК с добавлением ФЭ после стерилизации также не опускалась ниже 15,0 Па·с (рис.7) в течение 174 суток, что соответствует 3 годам хранения в реальном времени. В связи с этим установлено, что для низковязких лечебных ГК целесообразно использовать в качестве стабилизирующей добавки СК в концентрации 0,25% масс., а для высоковязких – ФЭ в концентрации 1,00% масс, это позволит обеспечить срок годности таких композиций 3 года.

Несмотря на то, что с помощью стабилизаторов ФЭ и СК подтверждена возможность сохранения вязкости альгинатной ГК в течение 3 лет, показано, что срок ее годности может быть продлен с 1 года только до 2 лет, поскольку в условиях «ускоренного старения» изучаемых ГК, прошедших ФРС, при температуре 25 °С, в течение экспериментального хранения 116 суток, что соответствует 2 годам реального хранения, было определено, что еще один показатель качества - стерильность композиции стабилизируется данными добавками только в течение 2 лет.

Показано, что в течение 2 лет сохраняются на нужном уровне два технологических параметра – вязкость и стерильность, характеризующие эффективность и безопасность выпускаемой продукции.

В разделах 3.8.-3.10. приведены данные по отработке технологии получения лечебных композиций с выбранными стабилизирующими добавками, а также оценены их потребительские свойства (высыхаемость, атравматичность).

Проведены успешные токсикологические испытания лечебных гидрогелевых композиций с введенными в них стабилизаторами СК или ФЭ, подтверждающие безопасность их применения, и внесены соответствующие изменения в техническую документацию, регламентирующую выпуск данных медицинских изделий на территории РФ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам диссертационной работы можно сделать следующие основные выводы:

- 1.** Установлено, что для увеличения срока годности лечебной гидрогелевой композиции на основе альгината натрия до 2 лет необходимо воздействовать одновременно на 2 фактора: уменьшать микробную обсемененность гидрогелевой композиции до финишной радиационной стерилизации и предотвращать резкое снижение вязкости гидрогеля после радиационной стерилизации дозой 6 кГр, обеспечивая ее значение на необходимом уровне в соответствии с технической документацией и медицинскими требованиями (1,5-2,0 Па·с - для низковязких гидрогелевых композиций, используемых в урологической практике, 6,0-15,0 Па·с – для высоковязких гидрогелевых композиций).

2. Показано, что снижение температуры хранения ГК до финишной стерилизации с $(22\pm 1)^\circ\text{C}$ до $(4\pm 1)^\circ\text{C}$ позволяет замедлить развитие и рост микроорганизмов в ней и может использоваться как дополнительный способ стабилизации ее микробной обсемененности.
3. С целью снижения микробной обсемененности альгинатной гидрогелевой композиции исследована возможность предварительной обработки альгината натрия, используемого для ее получения, ультразвуком и радиационным облучением. Показано, что данные технологические подходы не позволяют достигнуть желаемых результатов: значение микробной обсемененности существенно не снижается, при этом значительно усложняется технология получения гидрогелевой композиции, а предварительное радиационное облучение сырья для получения лечебной композиции значительно снижает впоследствии ее вязкость.
4. Изучена возможность частичной замены в составе гидрогелевой композиции природного полисахарида альгината натрия на биосовместимые синтетические полимеры, которые менее подвержены микробной обсемененности (КМЦ, ПВП, ПВС). Установлено, что введение ПВС (м.м. 145 000) в количестве 0,7% (10% от общего содержания альгината натрия в композиции) позволяет понизить общую микробную обсемененность композиции до финишной стерилизации (до значения $<1\cdot 10^1$ КОЕ/г), но при этом не позволяет существенно предотвратить падение вязкости после радиационной стерилизации.
5. С целью одновременной стабилизации как микробной обсемененности ГК до финишной стерилизации, так и стабилизации ее вязкости после финишной стерилизации на нужном уровне произведен скрининг природных и синтетических вспомогательных веществ (добавок) для их последующего введения в альгинатную гидрогелевую композицию, токсикологически безопасных и разрешенных в фармацевтической и пищевой промышленности.
6. Показано, что введение природных вспомогательных веществ (экстракты ромашки и крапивы, куркумина, мяты) не позволяют стабилизировать микробную обсемененность нестерильной и вязкость стерильной альгинатной композиции. Определено, что серебро в форме наночастиц, стабилизированных альгинатом натрия, имеет наибольшую эффективность при угнетении роста бактериальной микрофлоры, но не оказывает стабилизирующего действия на вязкость стерильной композиции.
7. Установлено, что введение в гидрогелевую композицию синтетических добавок – сорбата калия и феноксиэтанола позволяет достигнуть одновременной стабилизации как микробной обсемененности нестерильной композиции, так и вязкости стерильной композиции на нужном уровне; определена оптимальная концентрация введения данных добавок: 0,25% масс. сорбата калия и 1,00% масс. феноксиэтанола.

8. С целью определения в ускоренном режиме срока годности лечебной гидрогелевой композиции на основе альгината натрия выбрана оптимальная температура экспериментального хранения, моделирующая условия старения гидрогелевой композиции в течение 116 суток, что соответствует 2 годам хранения в реальном времени, а также произведена оценка изменения в выбранных условиях основных технологических показателей качества композиции (обсемененность до стерилизации и вязкость после стерилизации).

9. На основании математического моделирования процессов старения лечебной гидрогелевой композиции во время экспериментального хранения в соответствии с разработанной ускоренной методикой определения ее срока годности установлено, что введение 0,25% сорбата калия в низковязкую гидрогелевую композицию, применяемую в урологической сфере, позволяет продлить этот срок до 2 лет; для продления срока годности высоковязкой гидрогелевой композиции до 2 лет необходимо введение 1,00% феноксиэтанола.

10. Проведены успешные токсикологические испытания полученных лечебных композиций с увеличенным сроком годности, подтверждающие безопасность их применения, и внесены соответствующие изменения в техническую документацию, регламентирующую выпуск данных медицинских изделий на территории РФ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК

1. Колаева А.В., Гусев И.В., Валуева М.И., Фенин А.А., Хлыстова Т.С., **Быркина Т.С.**, Олтаржевская Н.Д. Разработка технологии стерилизации гидрогелевых лечебных материалов на основе альгината натрия // Бутлеровские сообщения. 2014. Т. 38, № 4. С. 73-78.
2. **Быркина Т.С.**, Колаева А.В., Олтаржевская Н.Д. Снижение исходной микробной обсемененности альгината натрия // Российский биотерапевтический журнал. 2015. Т. 14, № 1. С. 92.
3. **Быркина Т.С.**, Колаева А.В., Олтаржевская Н.Д. Подбор консерванта для альгинатной гидрогелевой композиции // Российский биотерапевтический журнал. 2015. Т. 14, № 1. С. 66.
4. **Быркина Т.С.**, Гафурова Д.Р., Олтаржевская Н.Д., Кричевский Г.Е. Снижение микробной обсемененности композиции на основе альгината натрия // Известия высших учебных заведений. Технология текстильной промышленности. 2017. № 1. С. 341-345.
5. **Быркина Т.С.**, Олтаржевская Н.Д. Способы стабилизации микробиологических и реологических показателей лечебной композиции «Колегель» // Вестник Санкт-Петербургского государственного университета технологии и дизайна. Сер. 1, Естественные и технические науки. 2016. № 3. С. 44-48

Публикации в других изданиях:

6. **Быркина Т.С.**, Олтаржевская Н.Д., Колаева А.В. Способы обеспечения стерильности лечебных материалов направленного действия «Колегель» // VIII Международная научная конференция «Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация как форма самоорганизации вещества»: тез. докл. Иваново, 2014. С. 271-272.
7. **Быркина Т.С.**, Олтаржевская Н.Д., Колаева А.В. Разработка способов обеспечения необходимых микробиологических характеристик лечебного гидрогелевого материала «Колегель» // Сборник тезисов докладов Международной научно-технической конференции «Инновационные технологии развития текстильной и легкой промышленности». М., 2014. С. 192-193.
8. **Быркина Т.С.**, Колаева А.В., Олтаржевская Н.Д. Способы стабилизации микробиологических и реологических показателей лечебных депо-материалов «Колегель» // Физика волокнистых материалов: структура, свойства, наукоемкие технологии и материалы (SMARTEX-2016): XIX Междунар. науч.-практ. форум: сб. материалов. Иваново, 2016. Ч. 2. С. 51-61.
9. **Быркина Т.С.** Разработка технологии получения лечебного гидрогелевого материала на основе альгината натрия с увеличенным сроком хранения // Материалы Международной научной конференции и XII Всероссийской студенческой олимпиады молодых ученых «Наноструктурные, волокнистые и композиционные материалы». СПб., 2016. С. 11.