

На правах рукописи



Фидоровская Юлия Сергеевна

**РАЗРАБОТКА ЛЕЧЕБНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА БИОПОЛИМЕРНОЙ
ОСНОВЕ КОМПЛЕКСНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ИНФИЦИРОВАННЫХ РАН**

Специальность: 05.17.06 – Технология и переработка полимеров и композитов

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Москва – 2022

Работа выполнена на базе общества с ограниченной ответственностью «Колетекс»

Научный руководитель

доктор технических наук, профессор,
генеральный директор ООО «Колетекс»

Олтаржевская Наталия Дмитриевна

Официальные оппоненты

Одинцова Ольга Ивановна, доктор
технических наук, профессор,
заведующая кафедрой химической технологии
волокнистых материалов ФГБОУ ВО
«Ивановский государственный химико-
технологический университет»

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

Ведущая организация

ФГБОУ ВО «Ивановский государственный
политехнический университет», г. Иваново

Защита диссертации состоится 09 июня 2022 года в 12.30 на заседании диссертационного совета Д212.144.07, созданного на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина (Технология. Дизайн. Искусство)» по адресу г. Москва, ул. Малая Калужская, д.1, онлайн-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)» и на сайте университета www.kosygin-rgu.ru, а также на официальном сайте ВАК при Минобрнауки: <https://vak.minobrnauki.gov.ru>

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2022 года

Ученый секретарь
диссертационного совета Д212.144.07
канд. хим. наук, доцент

Кузнецов Д.Н.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Разработка материалов, предназначенных для лечения людей, оказания им профилактической помощи, сохранения здоровья всегда была и остается важнейшей задачей. Сегодня в медицинской практике не снижается количество больных, страдающих от различных заболеваний в т.ч. от гнойных ран. Их лечение всегда отличалось большой сложностью и длительностью, однако в настоящее время, учитывая возрастающую резистентность возбудителей инфекций к лекарственным средствам, в т.ч. к антибиотикам, проблема лечения ран становится все актуальнее. Поэтому разработка новых биополимерных материалов для лечения ран, позволяющая повысить эффективность лечения и сократить время нетрудоспособности пациентов, улучшить качество их жизни, является актуальной задачей.

Диссертация выполнена в соответствии с основными направлениями научно-исследовательской и практической деятельности ООО «Колетекс» и исследованиями по реализации плана Национальной технологической инициативы (дорожная карта «Хелстнет») в рамках задания ФГБУ «Фонд содействия инновациям» (договор № 596ГРНТИ/63447). Успешное завершение предлагаемой диссертационной работы позволяет создать новые медицинские ранозаживляющие материалы на основе гидрогелей биополимеров и текстильных материалов, способствующие очищению инфицированных ран и их заживлению.

Объекты исследования - биополимерные композиции на основе альгината натрия и гидроксипропилметилцеллюлозы с введенными активными компонентами - растительным ферментом папаином и антисептиком нитратом серебра.

Предмет исследования: состав и реологические свойства разработанной в диссертации биополимерной композиции, используемой для лечения гнойных ран, изучение протеолитической активности (ПА) фермента папаина на различных стадиях технологического процесса, влияние на ПА входящих в композицию компонентов (биополимеры, соли серебра) и определение времени их действия, особенности технологии получения гелей и лечебных салфеток с гидрогелевым покрытием.

Цель работы заключалась в разработке состава биополимерных медицинских изделий пролонгированного действия на текстильной и гидрогелевой основе для комплексного лечения инфицированных ран на I-II стадиях раневого процесса, обладающих протеолитической активностью, необходимой для I стадии (очистка раны) и антимикробными свойствами (I-II стадия), и технологического процесса получения указанных изделий.

В соответствии с поставленной целью в работе были решены следующие задачи:

- разработан научно обоснованный состав лечебной композиции, компоненты которой позволят достичь поставленной цели;
- обоснован выбор фермента и антимикробного препарата, определен способ их иммобилизации в полимерной основе и нанесения на текстильный материал для обеспечения и сохранения требуемой протеолитической и антимикробной активности;
- изучен характер взаимодействия в системе фермент - биополимер альгинат натрия (АН) и фермент-антимикробный препарат (нитрат серебра);
- оценена возможность ингибирующего действия ионов серебра на протеолитическую активность фермента, что необходимо для разработки научно-обоснованной технологии получения лечебных материалов;

-разработана технология получения стерильных форм лечебных изделий в виде гидрогеля и текстильной аппликации (салфетки) с поверхностным слоем из гидрогеля; изучено влияние радиационной стерилизации на протеолитическую активность и реологические свойства получаемых материалов;

-определены параметры и температурно-временной режим осуществления технологии получения указанных материалов;

-проведена оценка физико-химических свойств гидрогелевой композиции, свойств текстильных аппликаций, срока годности, а также санитарно-гигиенических и токсикологических показателей создаваемых медицинских изделий.

Методы исследования. С целью выбора ферментного препарата, а также для анализа влияния нитрата серебра на его протеолитическую активность использовались методики Кунитца и Ансона. Для определения реологических параметров и установления необходимого соотношения полимеров в лечебной композиции применялись методы ротационной вискозиметрии. Применение зондовой электронной микроскопии позволило установить факт образования и размер наночастиц серебра в гидрогелевой композиции альгината натрия и гипромелозы в присутствии папаина. В работе использована приборная база ООО «Колетекс», Центра коллективного пользования научным оборудованием Верхневолжского регионального центра физико-химических исследований, ИХР АН РФ им. Г.А. Крестова, ПМГМУ им. И.М. Сеченова, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. С.Н. Голикова» ФМБА, NT-MDT.

Научная новизна работы. Впервые:

-разработан и научно обоснован состав биополимерной композиции, включающий одновременно протеолитический фермент папаин и антимикробный препарат на основе нитрата серебра, что обеспечивает эффективность использования композиции на I-II стадии раневого процесса; доказано одновременное присутствие в композиции как катионов, так и наночастиц серебра, которые образуются в реакции восстановления катионов в биополимере альгинате натрия в присутствии Na_2CO_3 ;

-предложен способ сохранения активности протеолитического фермента папаина в присутствии антимикробного препарата (нитрат серебра) в биополимерной гидрогелевой композиции: предварительно активные компоненты физически иммобилизованы в гидрогелях, а именно, нитрат серебра - в альгинате натрия, папаин - в гидроксипропилметилцеллюлозе. Установлены оптимальные количественные соотношения компонентов, позволяющие сохранить необходимую вязкость композиции после радиационной стерилизации и использовать ее при получении салфеток по технологии текстильной печати;

-изучено реологическими методами и методами светорассеяния взаимодействие биополимера альгината натрия (основа гидрогелевой композиции) и фермента папаина. Впервые определено распределение по размерам частиц комплекса альгината натрия и глобул папаина;

-с целью расширения спектра биологического действия материалов обосновано использование в качестве антимикробного компонента нитрата серебра; доказано спектрофотометрически и с помощью зондовой электронной микроскопии образование наночастиц серебра при введении нитрата серебра в гидрогель альгината натрия в присутствии фермента папаина. Показано что, ведение фермента в альгинатный гидрогель не

препятствует формированию наночастиц серебра; происходит стабилизация протеолитической активности папаина за счет распределения фермента в альгинате натрия, антимикробный эффект обеспечивают наночастицы и катионы серебра.

Теоретическая значимость работы. Разработан научно-обоснованный подход к получению медицинских изделий на биополимерной основе, содержащих растительный фермент папаин и соль серебра, заключающийся в предварительной отдельной иммобилизации активных компонентов в биополимерах. Разработан способ стабилизации папаина с использованием полисахаридов

Практическая значимость работы. Разработаны ранозаживляющие материалы на основе папаина и соли серебра в двух формах - гидрогеля и лечебной салфетки и технология их получения, что позволит расширить линейку средств для купирования раневого процесса на I-II стадиях; показана перспектива их применения. Разработана научно обоснованная технология получения лечебных материалов на гидрогелевой и текстильной основе, обладающих протеолитическим и антимикробным действием. Разработан технологический регламент получения лечебных материалов (ТР 26943035-01-2021) и инструкция по их применению, проведены санитарно-гигиенические и токсикологические испытания, доказавшие безопасность разработанных материалов; получена декларация о соответствии (ЕАЭС N RU Д-RU.PA01. В.83945/22), позволяющая реализовывать разработанную продукцию.

На защиту выносятся: Технология получения лечебных изделий на биополимерной основе, представляющая собой многостадийный процесс с предварительной физической иммобилизацией активных компонентов. Состав лечебной композиции с папаином и нитратом серебра.

Способ сохранения протеолитической активности растительного фермента папаина в присутствии нитрата серебра.

Доказательство образования наночастиц серебра в присутствии восстановителя биополимера альгината натрия и фермента папаина.

Апробация и реализация результатов работы. Основные результаты работы были представлены и обсуждены на российских и международных конференциях, в частности, на XXII Международном научно-практическом форуме Smartex-2019, XXIII Международном научно-практическом форуме «Физика волокнистых материалов» Smartex-2020, XI Международной конференции «Биоматериалы и нанобиоматериалы»-2020, Национальной молодежной научно-технической конференции 2021, Всероссийском конкурсе научно-технических проектов «Легпромнаука» 2021 (1 место).

Публикации. Основные положения диссертационной работы опубликованы в 9 печатных работах, из них 3 работы опубликованы в ведущих рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК при Минобрнауки России, и 6 работ опубликованы в материалах различных научных конференций. Подана заявка на патент «Композиция для лечения инфицированных ран различного генеза и способ ее получения» (приоритет от 10.08.2021).

Структура и объем работы. По своей структуре диссертационная работа состоит из введения, трех глав, выводов по работе, списка литературы, приложения. Работа изложена на 176 страницах машинописного текста, содержит 50 рисунков и 32 таблицы. Список литературы включает 175 библиографических источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы, обозначены цели и задачи исследования, отражены научная новизна и практическая значимость работы. **В первой главе**, представленной литературным обзором, показан спектр ферментных и антимикробных препаратов для лечения гнойных ран на I-II стадиях, а также обоснованы способы иммобилизации ферментов в гелях полимеров, доказана целесообразность применения изделий на биополимерной основе. **Вторая глава** представлена методическим разделом с описанием объектов исследования, их свойств, методов анализа основных и вспомогательных компонентов, используемых в разрабатываемых медицинских изделиях. **В третьей главе** представлены полученные результаты и их обсуждение.

Результаты и обсуждение

Особенностью лечебных материалов, применяемых на I-II стадиях раневого процесса, является необходимость воздействовать на поврежденные ткани и раневой экссудат, одновременно создавая условия для регенерации (восстановления) поврежденных тканей. Для I стадии - это лизис (растворение), удаление белкового раневого отделяемого и антимикробное действие, II стадия-антимикробное действие и регенерация тканей. Поэтому каждый из компонентов состава создаваемых материалов должен обладать рядом свойств и характеристик, одновременно формируя единый лечебный полифункциональный комплекс. Для совмещения лечебных функций в одном материале и достижения максимального терапевтического эффекта при лечении гнойных ран на I-II стадии решено было разработать два вида медицинских изделий: гидрогель для глубоких ран на основе природных полисахаридов с иммобилизованным ферментным препаратом и противомикробным компонентом, а также лечебную салфетку с нанесенным на текстильную основу гидрогелевым покрытием для поверхностных ран. Обе формы медицинских изделий представляют собой депо-материал, биоактивные составляющие которых диффундируют в раны под воздействием градиента концентраций между изделием и раневой средой.

1. Выбор протеолитического фермента

В качестве активного компонента разрабатываемого лечебного изделия рассматривается протеолитический фермент, осуществляющий деструктивное воздействие на гнойное белковое содержимое ран (лизис и облегчение удаления раневого экссудата). Ввиду возможности переноса ряда заболеваний от животного к человеку и специфического отношения некоторых конфессий к сырью животного происхождения, принято решение использовать ферменты растительного происхождения (папаин, бромелаин). Кроме того, папаин обладает такими преимуществами, как активность в широком диапазоне pH (4-12ед., оптимум 5-8ед), и температуры (до 40-70⁰С).

На начальном этапе нами оценивалась протеолитическая активность (ПА) растительных ферментов папаина и бромелаина, взятых в нативной форме. Именно в этой форме они используются сегодня для лечения ран (порошок). Ферментативную активность определяли по методу Кунитца М.

Таблица 1- Протеолитическая активность (ПА) нативных ферментов до и после γ -стерилизации

Используемые ферменты	ПА нативной формы, ПЕ/мг	ПА после гамма-стерилизации, ПЕ/мг	Падение ПА после гамма-стерилизации, %
Папаин	0,33±0,05	0,13±0,01	61%
Бромелаин	0,11±0,03	0,04±0,05	64%

Учитывая факт снижения ПА нативной формы ферментов, предложено провести их иммобилизацию в геле полимера. Экспериментальные данные по химической и физической иммобилизации показали преимущества и предпочтения физической иммобилизации папаина в растворе полимера с точки зрения простоты технического исполнения и сохранения ПА (по сравнению с нативной формой). В качестве полимера для иммобилизации обоснован выбор альгината натрия – природного биополимера-полисахарида, обладающего комплексом важных для применения в медицине свойств (гемостатические, регенерационные и т.д.).

Полимер также должен соответствовать ряду требований, таких как наличие разрешения для применения в медицине, отсутствие токсических и аллергических явлений, не должен снижать активность включенных компонентов, быть биodeградируемым и биоактивным. Данным требованиям отвечает альгинат натрия. Для сравнения изучали влияние гамма-стерилизации на два вида композиций, содержащих АН с молекулярной массой 145 кДа (I) и 342 кДа (II).

Таблица 2 - Влияние γ -стерилизации на протеолитическую активность ферментов, иммобилизованных в гидрогеле альгината натрия

Состав геля	ПА до гамма-стерилизации, ПЕ/г	ПА после гамма-стерилизации, ПЕ/г	Падение ПА после гамма-стерилизации, %
Альгинат 7%, папаин 4%	3,81±0,15	2,11±0,15	45%
Альгинат 7%, бромелаин 4%	1,23±0,15	0,61±0,15	51%

Следует отметить проявление свойств АН в качестве стабилизатора активности папаина по сравнению с анализом активности в водных растворах ферментов (таб.1).

Цель физической иммобилизации фермента в полимере - сохранение его активности и пролонгации действия, что позволяет избежать частых перевязок и травмирования раны. Анализ изменения ПА папаина при его растворении в воде в концентрации 4% (рН 6,0) и введении в гель альгината натрия в том же количестве (рН 6,8) при комнатной температуре показал целесообразность физической иммобилизации с точки зрения пролонгации протеолитической активности фермента.

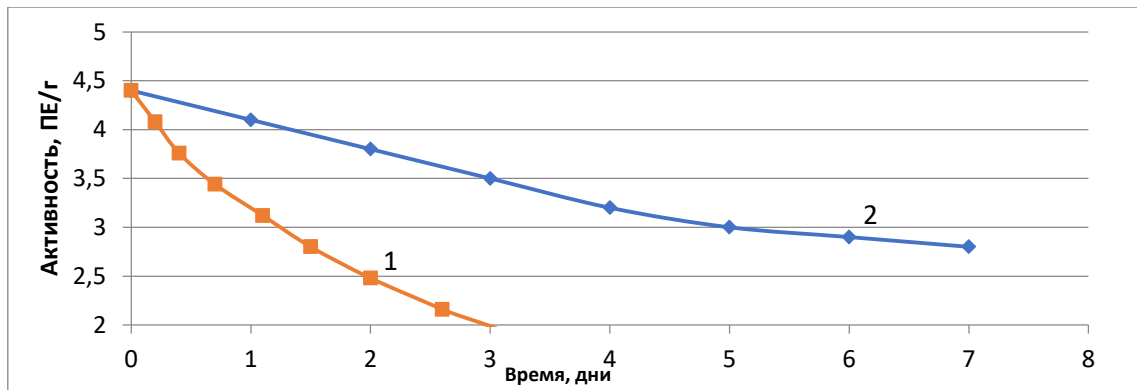


Рисунок 1 - Изменение ПА папаина в водном растворе (1) при иммобилизации в альгинатном геле (2)

ПА папаина в водном растворе в первые сутки снизилась на 32%, а в альгинате на 9%. Скорость падения ПА в альгинатном геле существенно ниже, чем в водной среде, что обеспечивает пролонгированный лечебный эффект.

При разработке технологии получения лечебных изделий учитывался опыт иммобилизации лекарственных субстанций и биологически активных веществ при выпуске медицинских лечебных изделий салфеток «Колетекс» и гелей «Колегель» на производстве ООО «Колетекс», где мы предполагаем в дальнейшем осуществлять производство разрабатываемых в данной работе материалов; в этом случае после иммобилизации субстанции лекарств в гидрогеле композицию наносят на текстильный материал по технологии плоскошаблонной текстильной печати через сетчатый шаблон.

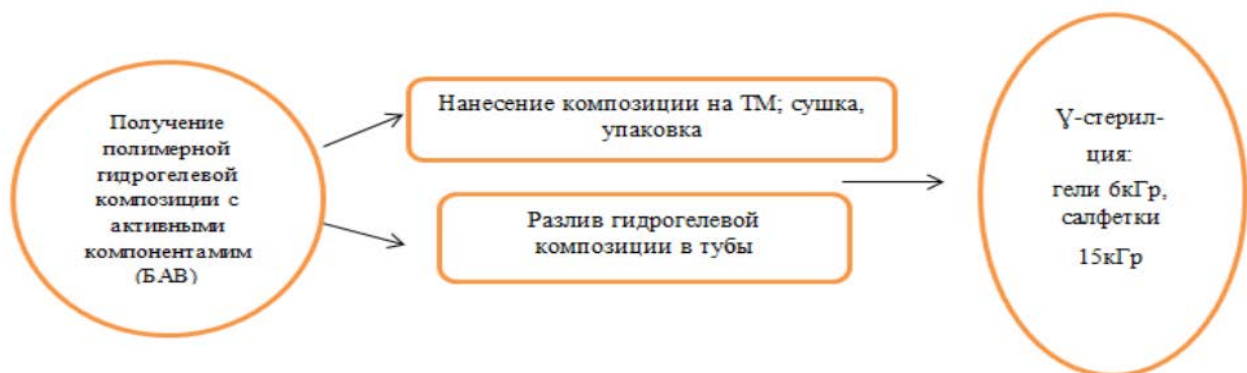


Рисунок 2-Технологическая схема производства салфеток «Колетекс» и гелей «Колегель»

Предполагается создание двух форм лечебного изделия: гидрогель для применения на глубоких гнойных ранах и салфетка для закрытия поверхностных ран. Реологические параметры полимера важны для приготовления лечебного гидрогеля необходимой вязкости с активными компонентами с целью обеспечения его равномерного нанесения на раневую поверхность и на текстильный материал при печати. При заполнении гидрогелем туб на специальном оборудовании гель также испытывает существенную деформационную нагрузку.

Создание лечебных салфеток подразумевает применение технологии печати с использованием шаблонов и ракли, что за счет возникающей нагрузки (давление при печати) может повлечь изменения в структуре гидрогеля.

Анализ тиксотропности полимерной композиции на основе АН в разных концентрациях (6-8%), показал, что данная система при всех исследуемых концентрациях альгината обладает

хорошими тиксотропными свойствами ($E = \eta_1 / \eta_2$; где η_1 - вязкость при возрастании нагрузки, η_2 - вязкость при убывании нагрузки, $E > 1$), которые проявляются в исследуемом диапазоне. Это удовлетворяет требованиям технологии производства конечного продукта.

Для анализа влияния введения фермента в гидрогель АН была проведена оценка изменения динамической вязкости при увеличении скорости сдвига.

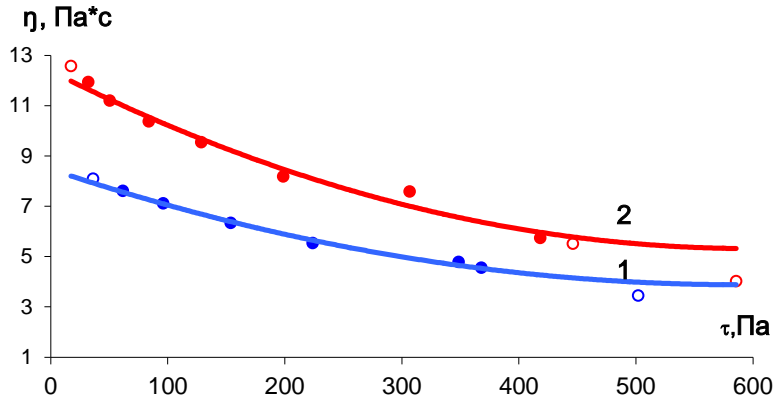


Рисунок 3 - Снижения динамической вязкости 6% альгината натрия (1) и его смеси с 4% папаином (2) при нарастании напряжений сдвига

Реологические исследования гелей альгината с добавкой папаина и без него показали, что существенных изменений в вязкость добавка фермента не вносит. Поэтому можно сделать вывод о возможности применения субстанции папаина при нанесении лечебного гидрогеля на текстильный материал методом плоскошаблонной печати, а также в ходе упаковки геля в тубы ввиду сохранения необходимых реологических параметров разрабатываемой композиции.

Значительное падение вязкости альгината натрия после обязательной операции гамма-стерилизации заставляет рассмотреть пути ее стабилизации, один из которых - введение второго полимера. Лучшие результаты получены при использовании в качестве второго полимера в композиции гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ), широко применяемой в медицине.

Увеличение исходной концентрации ГПМЦ в композиции с альгинатом позволяет сохранить остаточную после стерилизации вязкость, однако, технологические особенности приготовления полимерной композиции не позволяют использовать концентрацию раствора ГПМЦ свыше 3%. Важно оценить влияние введения ГПМЦ в гидрогель альгината натрия на активность папаина. Для анализа готовили испытуемые образцы на основе АН 6% и ГПМЦ разной концентрации (0,5%, 1%, 2%, 3%) с включением папаина в количестве 4%. Включение 1% ГПМЦ сохраняет активность папаина в 2 раза по сравнению с чистым альгинатом, тогда как 3% ГПМЦ - в 2,5 раза. Однако увеличение количества ГПМЦ значительно влияет на вязкость готовой композиции, что важно учитывать на каждом технологическом этапе производства. Было решено в разрабатываемой композиции применять 2% р-р ГПМЦ, что позволит стабилизировать активность папаина и получить необходимые реологические параметры лечебного гидрогеля после стерилизации.

Создавая двухкомпонентную полимерную основу, важно было оценить сохранение гемостатической активности (ГА) изделий, которые обеспечивает альгинат. Гемостатические исследования *in vivo* проводили на экспериментальных животных. Результаты анализа

показали, что салфетка с нанесенной композицией на основе АН при введении в состав ГПМЦ демонстрирует показатель ГА от 64% до 77%, характерный для материалов с выраженными гемостатическими свойствами.

2. Выбор антимикробного компонента

В качестве активного антимикробного компонента рассматривались препараты мирамистин, хлоргексидин, нитрат серебра. Ввиду наиболее широкого спектра активности в отношении резистентных микроорганизмов, низкой аллергенности и отсутствия нежелательных побочных явлений из указанных препаратов был выбран нитрат серебра. В результате предварительных экспериментов установлено, что концентрация нитрата серебра в щелочной среде, оказывающая необходимый эффект, подтвержденный отсутствием роста в тест-подложках с культурами *E.Coli*, *St.Aureus*, *Sal. Enterobactera*, а также в посевах на грибы/плесень и подходящий для реализации нашей разработки, составляет 0,05%.

С целью подтверждения активности гидрогелевой композиции, содержащей выбранный антимикробный агент- AgNO_3 , был проведен эксперимент на референтном штамме *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Присутствие нитрата серебра в концентрации 0,05% в композиции, нанесенной на лечебную салфетку, позволяет существенно снизить число КОЕ (колониеобразующих единиц) в экспериментальной среде на примере штамма *Staphylococcus aureus*.

Известно, что присутствие соли металла (серебра) оказывает влияние на протеолитическую активность фермента (папаина). Экспериментально проводилась оценка изменения активности фермента при добавлении стандартного водного раствора нитрата серебра к раствору папаина (1%).

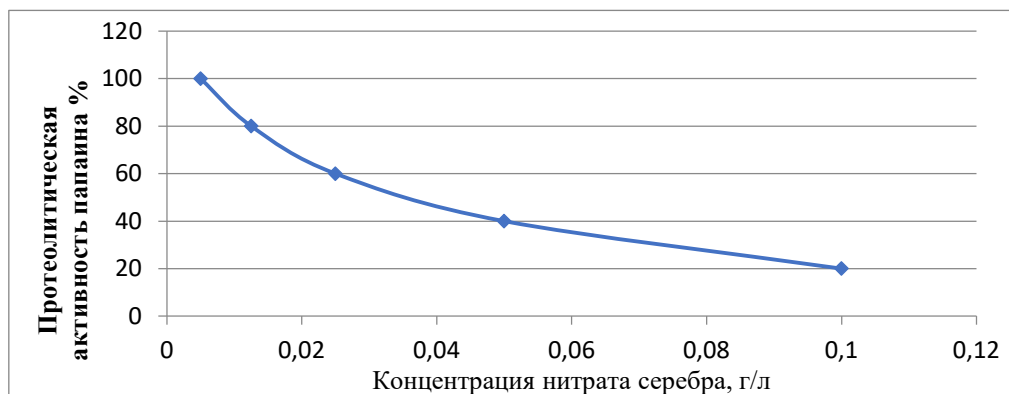
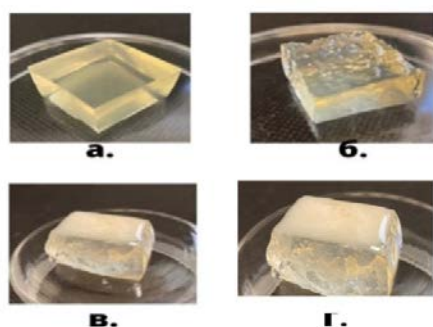


Рисунок 4 - Влияние концентрации нитрата серебра на активность папаина в водном растворе

С увеличением концентрации нитрата серебра в водном растворе происходит падение протеолитической активности папаина, что следует учитывать при разработке технологии.

Представляло интерес качественно оценить сохранение ПА папаина в ране в присутствии нитрата серебра. С этой целью нами создана модель раны. За основу был взят гидролизат животного коллагена, а чтобы приблизить состав экспериментальной модели к реальному составу раны, в разрабатываемую смесь был добавлен раствор изолята морского коллагена, аминокислотный состав которого максимально приближен к человеческому (оксипролин, глицин, пролин). Сравнивалось действие на белковый субстрат (модель) нативного папаина, папаина, иммобилизованного в альгинате натрия, и папаина при его совместном присутствии с нитратом серебра в альгинатном геле.



а. Исходная модель раны

б. Воздействие нативного фермента на модельный субстрат

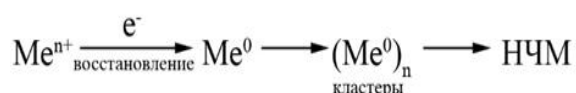
в. Воздействие папаина иммобилизованного в альгинатном геле на модельный субстрат

г. Воздействие папаина и нитрата серебра иммобилизованного в альгинатном геле на модельный субстрат

Рисунок 5 - Модель гнойной раны

Оценка результатов проводилась весовым методом. Исходный вес модельного субстрата 10г. Во всех случаях происходит разрушение и изменение веса модельной коллагеновой формы, и в наибольшей степени это происходило под действием нативной формы папаина (сухой порошок). Введение фермента в альгинатный гидрогель способствует пролонгации протеолитического действия. При воздействии альгината натрия с иммобилизованным папаином и нитратом серебра наблюдается также лизис (растворение) коллагеновой формы, что качественно подтверждает сохранение активности папаина в присутствии ионов серебра.

Создание щелочной реакции среды лечебного гидрогеля, а также салфетки с биополимерным слоем обусловлено необходимостью воздействовать на гнойное содержимое ран. Раневое отделяемое имеет слабокислую реакцию среды ($5,9 \pm 0,6$), а для эффективного лечения желателен рН 6,7-7,5. Кроме того, создание щелочной среды при применении природного восстановителя альгината натрия будет способствовать формированию наночастиц серебра, что усилит антибактериальный эффект изделия. В качестве щелочного агента выбран 1% Na_2CO_3 . Экспериментально определено, что при совместном нахождении растворов Na_2CO_3 и AgNO_3 в альгинатном гидрогеле величина рН устанавливается на уровне 7,5-7,6, что способствует образованию наночастиц с участием атомов Ag^0 :



С целью установления факта образования наночастиц серебра был проведен анализ активных компонентов разрабатываемого гидрогеля с помощью зондового микроскопа и выявление структуры образующих наночастиц серебра с помощью сканирования образцов на поверхности слюды (в качестве подложки). Оценивали следующие составы: 6% альгинат натрия с включением 0,05% нитрата серебра в среде Na_2CO_3 , и 6% альгинат натрия с добавлением 0,05% нитрата серебра и 4% папаина также в среде Na_2CO_3 . Образцом сравнения служил 6% альгинат натрия.

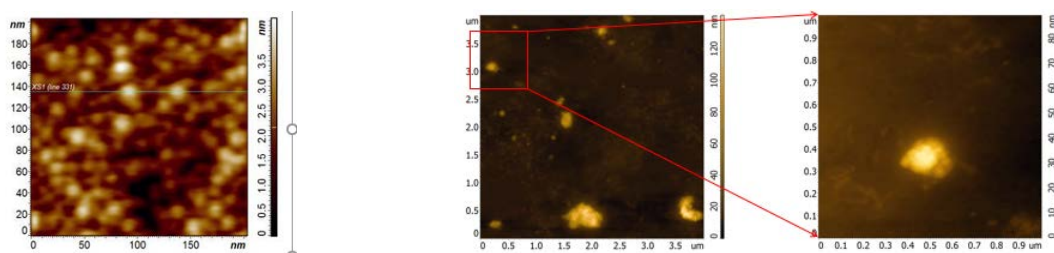


Рисунок 6 - Рельеф поверхности пленки при исследовании геля альгината натрия с добавлением AgNO_3 и Na_2CO_3 . Установлено наличие агрегатов. Размер изображения 5x5мкм

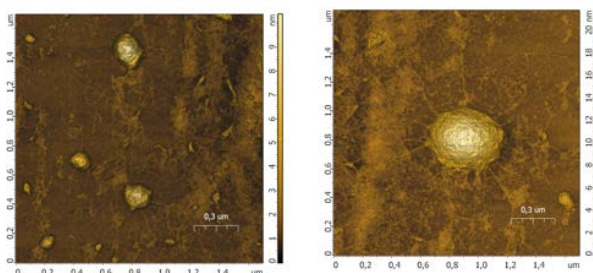


Рисунок 7 - Рельеф поверхности пленки при исследовании геля альгината натрия с добавлением AgNO_3 , Na_2CO_3 и папаина. Размер изображения 1,5x1,5 мкм

Фотографии электронной микроскопии подтверждают образование наночастиц серебра в альгинате натрия в присутствии и отсутствии папаина. При добавлении фермента в гидрогель АН отмечается изменение морфологических характеристик поверхности образца, представленное наличием среди структурированных частиц более крупных агломератов с образованием тонкой сетчатой структуры, при отсутствии подобной в остальных образцах. Можно предположить следующее изображение агломерата (Ag-NPs-наночастицы серебра).

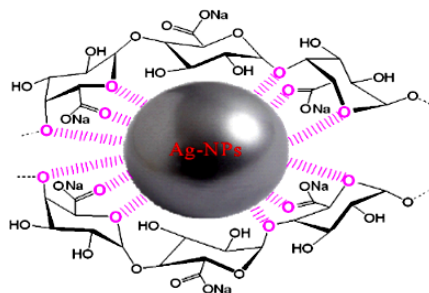


Рисунок 8 - Структурное изображение взаимодействия папаина и НЧ серебра

Предположительно, стабилизацию наночастиц восстановленного серебра обеспечивают участки маннуронатных блоков альгината натрия, которые обладают более уравновешенной внутренней структурой и обилием электроотрицательных элементов с неподелёнными электронными парами для группового формирования координационных взаимодействий с атомами Ag^0 на поверхности Ag-НЧ. Таким образом формируется устойчивая структура, которая позволяет проявлять свои свойства каждому из активных компонентов.

Для анализа взаимодействия компонентов 6% АН, 0,05% AgNO_3 , 1% Na_2CO_3 в ходе эксперимента наблюдали в течение 24 часов за изменениями спектров в УФ и видимой части. Образцом сравнения являлся 6% раствор альгината в ацетатном буфере с рН 7,5.

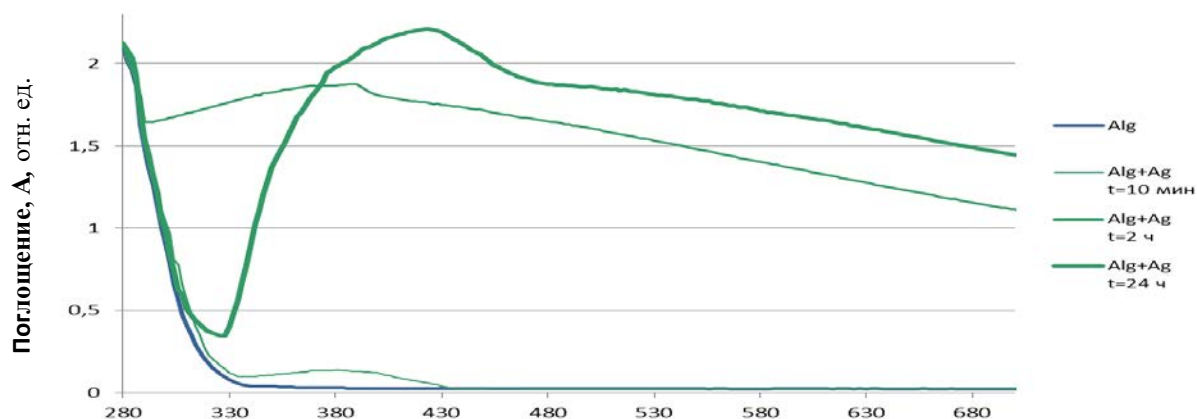


Рисунок 9 – Изменения спектров поглощения растворов альгината натрия (pH 7,5) и композиции АН+AgNO₃ при варьировании продолжительности выдержки после приготовления

Видимые изменения системы наступают спустя 10 минут, преобладающий выход наночастиц с максимумом при ~424 нм наблюдается в течение 24 часов. На стадии создания лечебной композиции её двухчасовой выдержки после введения нитрата серебра вполне достаточно для достижения стабильного состояния системы, в которой полимер обеспечивает структурное связывание серебра как в ионной форме, так и в нанодисперсном состоянии частиц металлического серебра. Эти данные учтены в разработке технологии.

3. Выбор текстильного материала для лечебных салфеток

Лечебная салфетка на текстильной основе является одной из разрабатываемых форм для лечения ран. Для достижения этой цели проведен выбор подходящего материала, разрешенного для медицинского применения, отвечающего таким требованиям, как сорбционная способность, отсутствие аллергических реакций, воздухопроницаемость, атравматичность, устойчивость к стерилизации.

Таблица 3 – Влагоемкость и рН текстильного материала (ТМ), и ТМ с нанесенной полимерной композицией

Текстильный материал	Трикотажное полотно ПФ-2	Полотно нетканое холстопршивное безниточное	Полотно холстопршивное нетканое гигроскопическое
Влагоемкость ТМ, мг/см ² *ч	373%	1051%	1120%
Влагоемкость ТМ с комп. АН и ГПМЦ мг/см ² *ч	593%	1270%	1510%
рН водной вытяжки	7,0	7,1	7,1
рН вод. вытяжки изделия ТМ с композицией из АН и ГПМЦ	7,3	7,5	7,4

В результате ряда экспериментов было выбрано полотно холстопршивное нетканое гигроскопическое с петлевым переплетением и поверхностным застилом, позволяющее равномерно высвободить активные компоненты и обеспечивающее высокую сорбцию раневого экссудата.

Процесс массопереноса белка фермента позволяет оценить свойства текстильного материала и отследить изменение активности действующих веществ.

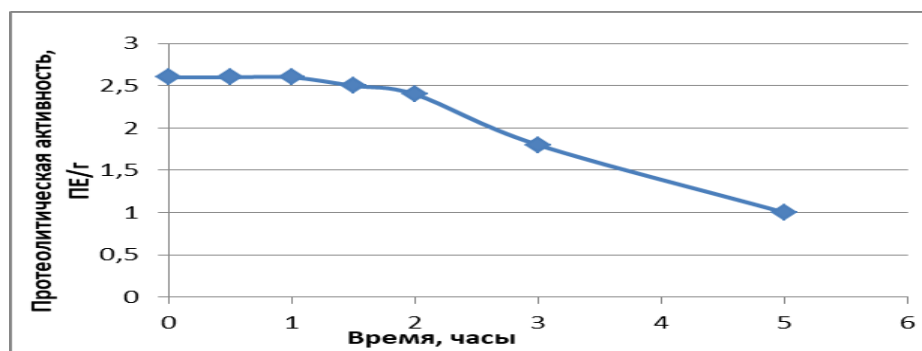


Рисунок 10 - Изменение ПА папаина в присутствии соли серебра при массопереносе в модельную среду (H_2O $M=100$, $t=20-22^{\circ}C$) из салфетки.

Максимальная протеолитическая активность фермента, перешедшего в используемую нами модельную среду, отмечается в первые два часа. Согласно литературным данным, ПА фермента, обеспечивающая эффективность лечебного изделия должна быть не менее 0,1 ПЕ/г. Учитывая в реальных условиях малый модуль раны, ($M=2\div 5$), можно ожидать пролонгацию лечебного эффекта до 36 часов.

Таблица 4 - Изменение концентрации белка при массопереносе из текстильной салфетки (среда-дистиллированная вода, $M=100$)

время	ПЕ/г	С белка, мг/мл
0,5	2,6	0,085
1,0	2,6	0,091
1,5	2,6	0,117
2,0	2,6	0,123
3,0	1,8	0,131
5,0	1,0	0,125
24	0,5	0,120
36	0,1	0,121
48	0,1	0,120

Согласно таблице 4, во внешней среде наблюдается увеличение количества белка фермента, перешедшего из текстильного материала в дистиллированную воду. Десорбция активного компонента из лечебной салфетки происходит через этап набухания полимерного слоя, далее, в зависимости от скорости набухания полимера, распределения в нем фермента и от градиента концентрации на границе текстильный материал-раневая среда фермент (белок) диффундирует во внешнюю среду. Анализ массопереноса фермента показал пролонгированный эффект более 36 часов.

Применение лечебного изделия на ТМ предусматривается на раневой поверхности, богатой низковязкими белковыми компонентами и электролитами. Важно исключить негативное влияние раневого экссудата на высвобождение фермента из лечебного изделия, что может снизить общий терапевтический эффект. С этой целью был проведен эксперимент с изучением массопереноса белка папаина из текстильного депо-материала в среду,

имитирующую раневую поверхность по показателю рН (рН 6,1-6,3), а также в среду с белковыми компонентами, воссозданную с помощью введения 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) в среду буфера (рН 6,1-6,3). Модуль ванны 100. Ниже отражено высвобождение белка во времени.

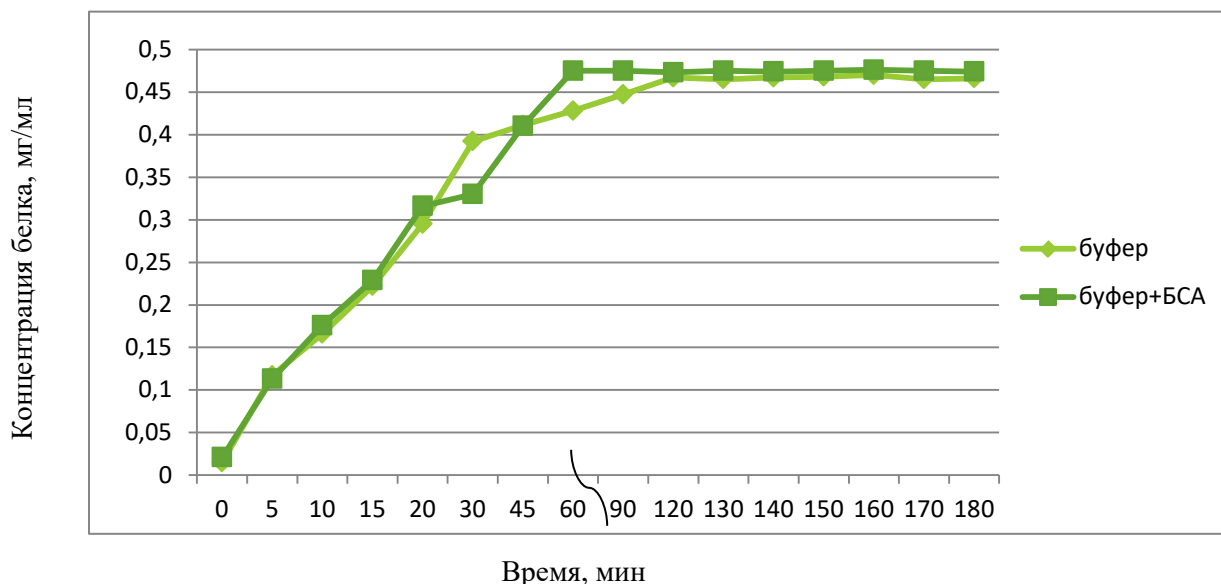


Рисунок 11 - Массоперенос белка фермента в среду буфера и среду БСА (рН 6,1-6,3)

Введение в среду белка БСА не препятствует высвобождению белка фермента из лечебного изделия в экспериментальную среду, и как следствие, на раневую поверхность в реальных условиях.

4. Технология получения лечебных гидрогелей на основе папаина и нитрата серебра

На основании представленных выше результатов с целью стабилизации свойств активных компонентов предложена научно обоснованная схема технологического процесса, предусматривающая на начальном этапе «изоляцию» фермента и нитрата серебра друг от друга и защиту их полезных свойств от возможного взаимодействия при совместном присутствии с помощью иммобилизации в различных полимерах: папаин-в ГПМЦ, а AgNO_3 – в альгинатном гидрогеле в присутствии карбоната натрия в течение определенного времени, после чего их объединяют в единой композиции.

Таблица 5 - Влияние способа получения гидрогеля на ПА папаина, ПЕ/г

№ эксперимента	Протеолитическая активность папаина в гелях, ПЕ/г				
	1.	2.	3.	4.	5.
Технология I	3,74+/-0,10	3,61+/-0,10	3,65+/-0,10	3,71+/-0,10	3,58+/-0,10
Технология II	4,33+/-0,08	4,15+/-0,08	4,35+/-0,08	4,11+/-0,08	4,45+/-0,08

Установлено, что предложенная технология (II) с разделением исходных полимеров и предварительным введением в них активных компонентов позволяет сохранить активность

фермента в итоговом гидрогеле на 13-15% выше, по сравнению с технологией (I) и единовременным введением всех компонентов.

Состав разработанной лечебной гидрогелевой композиции выглядит следующим образом:

Таблица 6- Состав разработанной лечебной композиции

Компоненты	Содержание, %
<i>Полимеры</i>	
Альгинат натрия	6,0
Гидроксипропилметилцеллюлоза	2,0
<i>Действующие вещества</i>	
Экстракт латекса папайи (папаин)	4,0
Серебра нитрат	0,05
<i>Вспомогательные вещества</i>	
Глицерин	2,0
Эуксил (феноксиэтанол)	0,5
Натрия карбонат	1,0

Разлив гидрогелевой композиции и упаковку в тубы различного объема (20, 50 и 100г.) проводили на тубонаполнительной машине UNIKO UP30P.

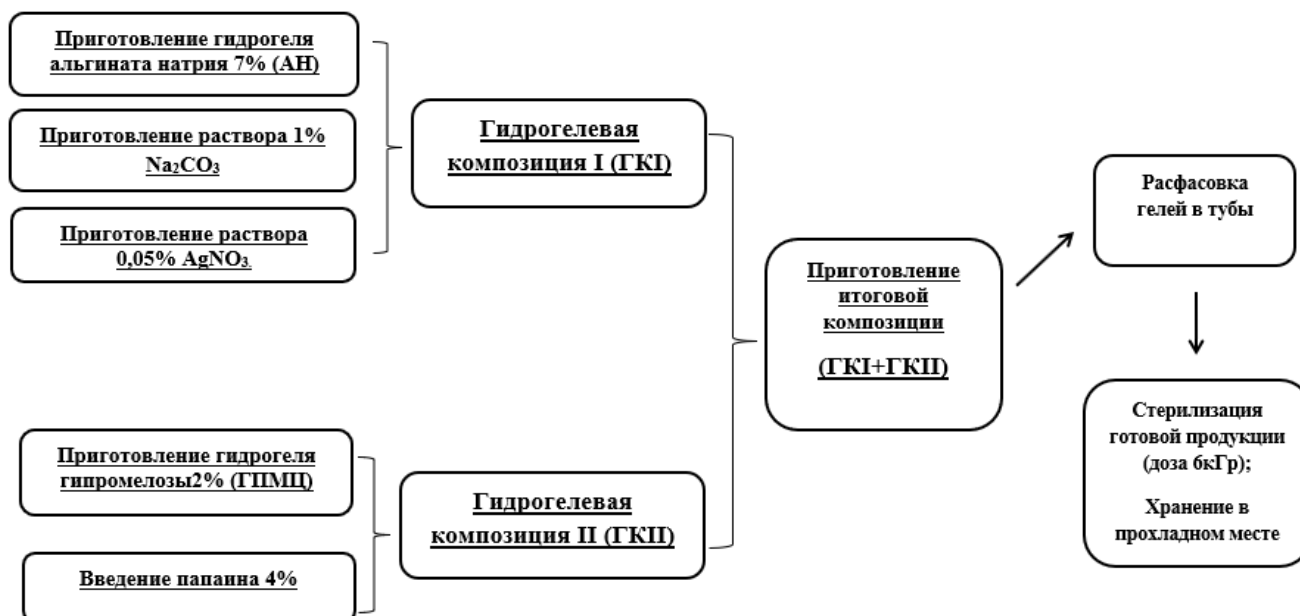


Рисунок 12 - Общая схема получения лечебных гидрогелей

5. Технология получения лечебных аппликаций (салфеток) с папаином и нитратом серебра

Производство лечебных салфеток включает набор операций (рис.13). Приготовление композиции проводили по описанному выше способу с отдельным введением активных компонентов в полимеры АН и ГПМЦ. Нанесение композиции проводили через сетчатый шаблон 20 меш на выбранное в результате ряда экспериментов текстильное полотно. Число проходов ракля установлено экспериментально и равно 6, что обеспечивает необходимую

концентрацию компонентов на текстильном материале. Сушка полотен после печати является одной из ключевых операций, влияющих на конечную ПА в изделии; проводится на специализированных вешалах. В рамках эксперимента сушка проводилась двумя способами: при комнатной температуре и при 60⁰С с обдувом горячим воздухом, что принципиально возможно для папаина. Это сокращало время полного высыхания материала.

Применение принудительного теплового обдува при 60⁰С позволило получить величину ПА фермента порядка 3,5ПЕ/г, что на 30% больше, по сравнению с ПА фермента в лечебном изделии, полученном с применением сушки при комнатной температуре, которая составляет в среднем 2,7 ПЕ/г (при пятикратном измерении).

Схема производства лечебных салфеток с ферментом папаином и антимикробным компонентом нитратом серебра выглядит следующим образом:

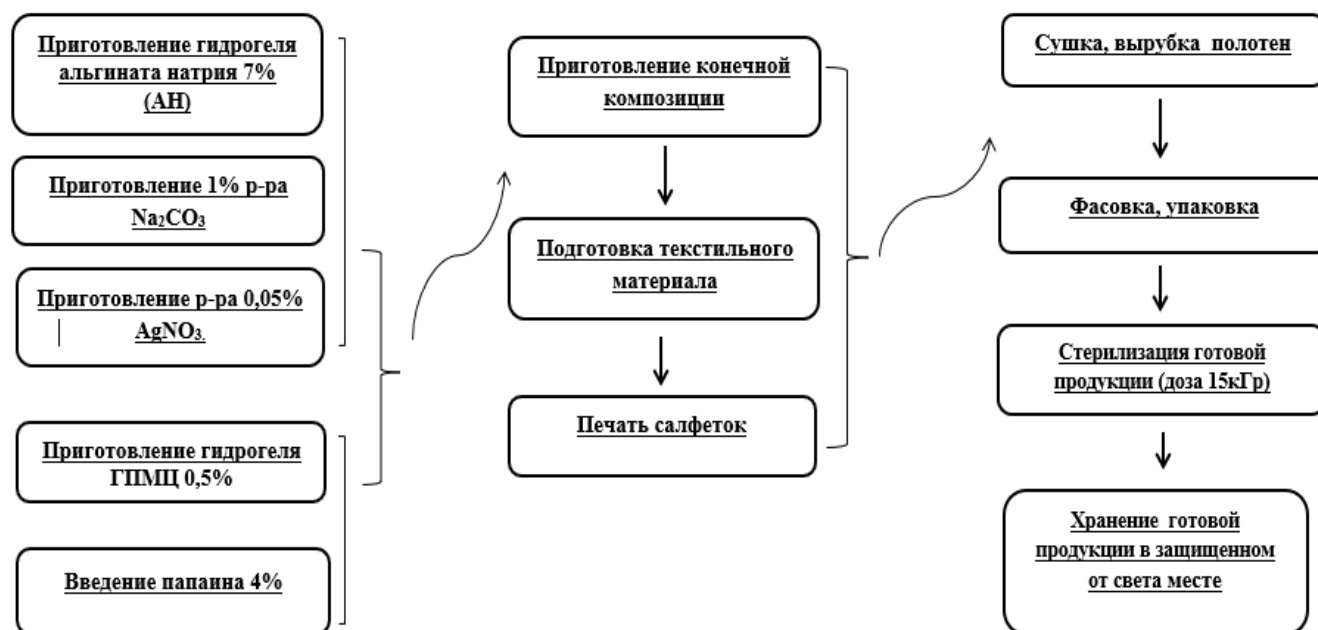


Рисунок 13-Технологическая схема получения лечебных салфеток

С целью выпуска по предлагаемой технологии готовых лечебных изделий проведены токсикологические испытания, в результате которых установлена их безопасность. Разработан технологический регламент, инструкция по применению, оформлена декларация о соответствии требованиям технического регламента Таможенного союза, дающая право на реализацию готовой продукции.

Основные выводы по работе

1. На основании изучения механизма заживления ран и экспериментальных исследований разработаны медицинские изделия для лечения инфицированных ран на I и II стадиях раневого процесса и создана технология получения двух видов материалов, обладающих одновременно протеолитической и антимикробной активностью: гидрогелевой композиции на биополимерной основе, и текстильных аппликаций (салфеток) с поверхностным односторонним нанесением биополимерной лечебной композиции.

2. Обоснован и экспериментально подтвержден выбор протеолитического фермента растительного происхождения папаина для лизиса раневого отделяемого. Предложено при создании лечебных материалов использовать физическую иммобилизацию фермента в

биополимере альгината натрия (АН). Доказано, что на стадии радиационной стерилизации физическая иммобилизация в биополимере АН позволяет сохранить на 18-20% больше протеолитическую активность фермента, чем в нативной форме в водном растворе.

3. Определены свойства АН, необходимые для осуществления технологии получения лечебных гидрогелей и аппликаций; показано, что по реологическим характеристикам (вязкость, тиксотропность) АН в концентрации 7% пригоден в качестве загустителя для нанесения композиции методом шаблонной печати при получении лечебных аппликаций. Доказаны гемостатические свойства биополимерной композиции. Показано, что АН является защитным биополимером для фермента и средой для получения наночастиц серебра из нитрата серебра.

4. Доказана целесообразность использования в качестве антимикробного препарата нитрата серебра. Методами спектрофотометрии и электронной зондовой микроскопии показано образование наночастиц серебра в присутствии восстановителя полимера-полисахарида альгината натрия в щелочной среде (средний размер частиц 15-20 нм), что обеспечивает композиции антимикробные свойства при низкой концентрации нитрата серебра (0,05%). Доказаны антибактериальные свойства композиции методом подсчета числа колониеобразующих единиц.

5. Обоснован способ сохранения протеолитической активности фермента и антимикробных свойств нитрата серебра при их одновременном присутствии в композиции, заключающийся в их отдельной иммобилизации в полимерах на стадии приготовления: в АН - нитрата серебра, в гидроксипропилметилцеллюлозе - папаина. Разработанная технология с изначальным отдельным введением компонентов в биополимеры позволяет на этапе приготовления сохранить протеолитическую активность фермента на 13-15%, больше, чем при одновременном введении.

6. Определено влияние соединений серебра на протеолитическую активность папаина и показано, что получаемые значения снижаются незначительно и обеспечивают эффективность композиции.

7. Изучено влияние технологической операции радиационной стерилизации на протеолитическую активность папаина и реологические свойства АН. Доказано, что добавление к альгинату натрия второго полимера (2% ГПМЦ) способствует сохранению при стерилизации протеолитической активности фермента на 7-10% больше, чем в АН, и получению после стерилизации на 20-23% большей остаточной вязкости композиции; показано, что введение стабилизаторов глицерина и эуксила (феноксиэтанол) обеспечивает необходимый стабильный срок годности лечебных материалов (1 год для гидрогелей, 2 года для лечебных салфеток).

8. Разработан способ получения лечебных аппликаций на текстильной основе с ферментом папаином и нитратом серебра по технологии текстильной плоскошаблонной печати с использованием в качестве загустителя биополимера АН. Определены температурно-временные параметры приготовления композиции, нанесения ее на текстильные полотна, сушки полотен (теплообдувный режим при 60°C).

9. Проведены санитарно-гигиенические и токсикологические испытания разработанных лечебных биополимерных материалов. Доказано, что созданные изделия не проявляют токсического, sensibilizing и местно-раздражающего действия, что подтверждает их безопасность.

10. Разработана нормативная (ТУ), технологическая (технологический регламент ТР 26943035-01-2021), эксплуатационная (инструкция по применению) документация на созданные медицинские изделия. Получены необходимые для реализации продукции документы, а именно, декларации о соответствии (ЕАЭС N RU Д-RU.PA01.B.83945/22) представленной продукции требованиям технического регламента Таможенного союза (ТР ТС 009/2011).

Основное содержание диссертации опубликовано в работах:

Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России:

1.Фидоровская Ю.С., Кокшаров С.А., Алеева С.В., Лепилова О.В., Кричевский Г.Е. Свойства гидроколлоидов альгината натрия при сорбционном связывании папаина// Коллоидный журнал. 2021-Т.83. №6 С.1-16.

2.Фидоровская Ю.С., Медушева Е.О., Коровина М.А., Кричевский Г.Е., Олтаржевская Н.Д. Особенности технологии получения раневых покрытий с протеолитическим и антимикробным действием//Известия высших учебных заведений. Технология текстильной промышленности. 2021. №5 (395) С.137-142

3.Фидоровская Ю.С., Медушева Е.О., Коровина М.А., Кричевский Г.Е., Олтаржевская Н.Д. Разработка композиционного материала с комплексным действием для лечения ран//Известия высших учебных заведений. Технология текстильной промышленности. 2022-№6 (396). С.153-160.

Публикации в других изданиях и материалах конференций

4.Фидоровская Ю.С., Медушева Е.О. Перспективы использования коллагеновых белков из гидробионтов в медицине и косметологии//Физика волокнистых материалов, наукоемкие технологии и материалы. Сборник материалов. Иваново. 2019. С.90-93.

5.Фидоровская Ю.С., Медушева Е.О., Щедрина М.А. Разработка медицинского изделия на текстильной основе для лечения гнойных ран//Физика волокнистых материалов, наукоемкие технологии и материалы. Сборник материалов. Иваново. 2020.С.413-418.

6.Фидоровская Ю.С. Оценка протеолитических свойств текстильных аппликаций используемых в лечении ран//Физика волокнистых материалов, наукоемкие технологии и материалы. Сборник материалов. Иваново. 2021. С.345-350

7.Фидоровская Ю.С., Швыдкова Д.А., Медушева Е.О. Создание лечебных материалов на основе природных полимеров с использованием растительных протеаз//23 Научно-практический форум. Физика волокнистых материалов, наукоемкие технологии и материалы. Сборник материалов. 2020. С.421-427

8.Фидоровская Ю.С., Олтаржевская Н.Д., Медушева Е.О. Биополимерная гидрогелевая композиция с комплексным эффектом для лечения гнойных ран.// Международная конференция «Биоматериалы и нанобиоматериалы: передовые проблемы токсикологии и экологии в области безопасности». 2020. С.24.

9.Фидоровская Ю.С., Олтаржевская Н.Д., Медушева Е.О. Использование нетканых материалов в составе раневых покрытий//Журнал Сырье и упаковка. 2021. №236 С.28-30.

Автор считает приятным долгом выразить большую благодарность профессору, доктору технических наук, заслуженному деятелю науки РФ Г.Е. Кричевскому и доктору медицинских наук Е.О. Медушевой за наставление, ценные советы и помощь при постановке задач и в процессе работы над диссертационным исследованием.