

Общество с ограниченной ответственностью «Колетекс»

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

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук

Научный руководитель: д.т.н., профессор Олтаржевская Н. Д.

Москва 2022

## Оглавление

|   |    |
|---|----|
| Введение.....   | 5  |
| Глава I. Обзор литературы.....  | 10 |
| 1.1 Современные раневые покрытия. Требования к раневым покрытиям.....   | 10 |
| 1.2 Специфика раневого процесса.....  | 14 |
| 1.3 Применение ферментных препаратов в лечении гнойных ран.....   | 18 |
| 1.3.1 Ферменты растительного происхождения.....   | 21 |
| 1.3.2 Пути стабилизации протеолитической активности ферментов.....  | 25 |
| 1.4 Использование биополимеров для производства изделий медицинского назначения.....  | 32 |
| 1.4.1 Использование природных и синтетических полимеров для иммобилизации активных компонентов при создании раневых покрытий..... | 34 |
| 1.5 Взаимодействие альгината натрия и протеолитических ферментов.....   | 45 |
| 1.6 Роль антимикробных компонентов в процессе очищения и регенерации гнойных ран.....   | 46 |
| Глава II Используемые материалы и методы .....  | 58 |
| 2.1 Методика определения протеолитической активности фермента методом Кунитца .....   | 59 |
| 2.2 Методика определения количества иммобилизованного белка методом Лоури.....  | 60 |
| 2.3 Определение протеолитической активности фермента по методу Ансона.....  | 61 |
| 2.4 Опредедение подлинности композиции по папаину.....  | 62 |
| 2.5 Методика определения рН – среды.....  | 63 |
| 2.6 Приготовление композиции на основе альгината натрия.....  | 63 |
| 2.7 Приготовление композиции на основе гидроксипропилметилцеллюлозы.....  | 63 |
| 2.8 Методика приготовления модели гнойной раны.....   | 64 |
| 2.9 Методика изучения антимикробной активности .....  | 64 |

|   |    |
|---|----|
| 2.10 Методика определения реологических свойств биополимерной композиции.....   | 65 |
| 2.11 Методика определения высыхаемости гидрогелевых композиций.....   | 66 |
| 2.12 Методика нанесения полимерной композиции на текстильный<br>Материал.....   | 66 |
| 2.13 Методика определения влагоемкости текстильного материала.....  | 66 |
| 2.14 Методика определения рН водной вытяжки.....  | 67 |
| 2.15 Определение прилегаемости.....   | 67 |
| 2.16 Методика определения привеса текстильного<br>материала.....  | 68 |
| 2.17 Методика исследования кинетики массопереноса лекарственных<br>препаратов из текстильного материала в жидкие модельные среды..... | 68 |
| 2.18 Стерилизация в промышленных условиях.....  | 69 |
| 2.19 Методика расчета ошибки эксперимента.....  | 69 |
| Глава III. Результаты и обсуждение.....   | 70 |
| 3. Разработка лечебной композиции для применения на I-II<br>стадиях раневого процесса.....  | 71 |
| 3.1 Выбор протеолитического фермента.....   | 71 |
| 3.2 Рассмотрение способов сохранения ПА ферментов.....  | 74 |
| 3.3 Химическая иммобилизация ферментов.....   | 74 |
| 3.4 Физическая иммобилизация ферментов в геле полимеров.....  | 76 |
| 3.4.1 Выбор биополимеров для физической иммобилизации ферментов.....  | 78 |
| 3.4.2 Влияние условий получения лечебного гидрогеля на активность<br>папаина.....   | 81 |
| 3.5 Влияние добавок-активаторов на протеолитическую<br>активность папаина.....  | 83 |
| 3.6 Изучение характера взаимодействия альгината натрия и фермента<br>папаина.....   | 84 |
| 3.7 Исследование реологических характеристик гидрогелей-полимеров ..  | 87 |
| 3.8. Влияние гамма-стерилизации на свойства разрабатываемой<br>композиции.....  | 93 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.9 Разработка способов стабилизации свойств гидрогелевой композиции.....  | 97  |
| 3.9.1 Стабилизация свойств лечебной композиции с помощью дополнительного введения полимеров.....   | 97  |
| 3.9.2 Изучение влияния стабилизаторов на реологические параметры разрабатываемой композиции.....   | 106 |
| 3.10 Выбор антимикробного компонента.....  | 108 |
| 3.14 Изучение влияния антимикробного препарата на массоперенос фермента в модель раны.....   | 120 |
| 3.15 Изучение взаимодействия активных компонентов разрабатываемой лечебной композиции.....   | 125 |
| 3.16 Разработка технологии получения лечебных материалов, содержащих ферментный препарат и антимикробный компонент (нитрат серебра)..... | 133 |
| 3.16.1 Технология получения лечебных гидрогелей на основе папаина и нитрата серебра .....  | 136 |
| 3.16.2 Технология получения лечебных аппликаций (салфеток) с папаином и нитратом серебра.....  | 142 |
| 3.16.2.1 Выбор текстильного материала для лечебных салфеток.....   | 143 |
| 3.16.3 Массоперенос папаина из текстильной лечебной салфетки.....  | 148 |
| Выводы .....   | 156 |
| Список сокращений и условных обозначений.....  | 159 |
| Список литературы.....   | 160 |
| Приложения .....   | 177 |

### **Актуальность темы исследования**

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, имеющих в результате различных заболеваний инфицированные, в т.ч. гнойные раны. 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 позволит создать новые медицинские ранозаживляющие материалы на основе гидрогелей биополимеров и текстильных материалов, способствующие очищению инфицированных ран и их заживлению.

### **Цели и задачи исследования**

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

Для этого следовало разработать технологический процесс получения указанных изделий, позволяющий создавать лечебные материалы с комплексом указанных свойств.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие научные и технологические задачи:

-разработать научно обоснованный состав лечебной композиции, компоненты которой позволят достичь поставленной цели;

-обосновать выбор фермента и антибактериального препарата, определить способ их иммобилизации в полимерной основе и нанесения на текстильный материал для обеспечения и сохранения протеолитической и антибактериальной активности;

-изучить характер взаимодействия в системе фермент - биополимер альгинат натрия и фермент-антибактериальный препарат (нитрат серебра);

-оценить возможность ингибирующего действия ионов серебра на протеолитическую активность фермента, что необходимо для разработки научно-обоснованной технологии получения лечебных материалов;

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

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

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

### **Научная новизна**

1. Впервые разработан и научно обоснован состав биополимерной композиции, включающий одновременно протеолитический фермент папаин и бактериостатический препарат на основе нитрата серебра, это повышает 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;

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

3. 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;

4. С целью расширения спектра биологического действия материалов обосновано использование в качестве антимикробного компонента нитрата серебра; доказано образование наночастиц серебра в композиции с альгинатом натрия, что позволяет применять нитрат серебра в меньших концентрациях для достижения антимикробного эффекта композиции;

5. Впервые 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 введение фермента в альгинатный гидрогель не препятствует формированию структурированных наночастиц серебра; происходит стабилизация протеолитической активности папаина за счет распределения фермента в альгинате натрия.

### **Теоретическая значимость**

Разработан научно-обоснованный подход в получении медицинских изделий на биополимерной основе, содержащих растительный фермент 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 антибактериальным действием;

-разработан технологический регламент получения лечебных материалов (ТР 26943035-01-2021) и инструкция по применению указанных материалов;

-проведены санитарно-гигиенические и токсикологические испытания, доказавшие безопасность разработанных материалов;

**На защиту выносятся.** Технология получения лечебных изделий на биополимерной основе, представляющая собой многостадийный процесс с предварительной физической иммобилизацией активных компонентов.

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

Установлено образование наночастиц серебра в присутствии восстановителя биополимера альгината натрия и фермента папаина.

**Достоверность результатов** проведённых исследований определяется применением современных химических и физико-химических методов исследования (реологические исследования, атомно-силовая микроскопия, ИК- и УФ-спектроскопия) и положительными результатами испытаний разработанных гидрогелей и текстильных изделий, проведенных сторонними организациями.



**Апробация результатов.** 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 «Легкпромнаука» 2021 (1 место).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 3 в научных журналах из перечня ВАК, подана заявка на патент (приоритет от 10.08.2021).

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа изложена на 176 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, методической части, обсуждения результатов, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Работа содержит 32 таблицы, 50 рисунков.

## Глава I. Обзор литературы

### 1. Современные раневые покрытия. Требования к раневым покрытиям

Лечение гнойных ран остается одной из наиболее актуальных проблем современной хирургии. Разнообразие лечебных средств и вариантов лечения обеспечивает хорошие результаты в данной области. Еще в 1956 году знаменитый советский хирург С. С. Гирголав озвучил свое мнение по данной теме: «Вряд ли для какой-либо другой цели в медицинской практике было предложено большее число как отдельных средств и их сочетаний (рецептов), так и целых методов и систем, чем для лечения ран». Классификация раневых покрытий крайне разнообразна и осуществляется по различным признакам и составу: по природе материалов, лежащих в основе, по функциональным свойствам, по способу фиксации [1,2]. Например, по целевому назначению выделяют следующие виды повязок: защитная, иммобилизирующая, гемостатическая (давящая), окклюзивная (для герметизации раны). Или по способу фиксации: безбинтовые повязки (лейкопластырная, клеевая и др.), бинтовые (спиральная и др.) [3].

В качестве основы раневых покрытий выступают текстильные тканые, нетканые полотна, сетки, пленки, гидроколлоиды и губки, а также сочетание этих материалов [4,5,6]. Однако при местном лечении лучшие результаты показывают раневые покрытия с комбинированным составом, позволяющие сохранять рану во влажном состоянии и минимизировать отрицательное воздействие при ее пересушивании.

Для создания микроклимата, благоприятствующего регенерации, часто используют комбинации материалов. Кроме того, обеспечение влажной среды ускоряет регенерацию раневой поверхности до 50%, благодаря ускорению таких процессов, как десорбция активных компонентов из лечебной поверхности изделия, активации лизиса, и абсорбции некротического экссудата из раневой области.

С давних времен повязки на текстильной основе применялись в качестве первичных перевязочных средств. Нетканые материалы из натуральных (хлопок) и искусственных (например, вискозное волокно) волокон выступают в качестве

основы текстильных раневых покрытий ввиду таких свойств, как высокая абсорбирующая способность, пластичность волокон, способность выдерживать стерилизацию, а также возможность сохранять целостность своей структуры в ходе эксплуатации [7,8,9].

Применение лечебных повязок должно преследовать основную цель, а именно, приближение состояния внутренней среды открытой раны к условиям, характерным для закрытой раны [10]. Сегодня на рынке имеется более 2500 вариантов повязок, имеющих свою специфику в отношении вида ран.

Представители FDA (Food and Drug administration, США) в лице специальной группы, по клинической оценке, заживления ран (Wound Healing Clinical Focus Group) предъявляют к повязкам следующие требования:

- отсутствие токсичности для клеток и тканей;
- низкая адгезивность, безболезненность перевязок (атравматичность)
- сведения о побочных эффектах
- совместимость с другими методами лечения
- максимальная независимость от условий хранения
- низкая цена

Так же согласно источникам [11], важны следующие требования:

- Обеспечение защиты от инфекции
- высокая сорбционная активность
- гемостатические свойства

Согласно требованиям в лечении ран и концепциям в подходе к перевязочным материалам, повязка должна обеспечивать [12]:

- стимуляцию регенерации
- очищение раны
- постоянство свойств

Согласно отечественным источникам, классификация раневых покрытий и медицинских изделий разнообразна и определяется различными критериями и признаками: природа, состав соединений, форма, целевое назначение, функциональные свойства [5,14].

Сегодня на рынке представлен большой спектр перевязочных средств разных видов по разным категориям, включающие пластырные, рулонные, сорбционные изделия.

Однако, наибольший интерес для нас в рамках представленной работы, посвященной разработке медицинских изделий для лечения гнойных ран, представляют следующие основные группы повязок:

\*на липофильной (мазевой) основе;

\*на гидроколлоидной основе;

\*включающие/не включающие в состав изделия лекарственный препарат.

Одними из атравматических видов медицинских изделий являются мазевые перевязочные средства. Данный вид применяется как для лечения острых, так и хронических ран. Покрытие защищает рану от высыхания и обеспечивают профилактику образования рубцовой ткани (Branolind, Autrauman, Германия), ВоскоПран (Россия). Однако, если в ходе приготовления мази предполагается применение липофильных жиров, не позволяющие «дышать» ране, то для открытых и мокнущих ран применение мазей нежелательно. Существует вероятность окисления мазевой основы изделия при контакте с воздухом и светом во время хранения, а также при операции гамма-стерилизации.

Эффективными перевязочными средствами с сорбционными свойствами являются гидроколлоидные повязки, (Hydrocoll, Германия), (Медисорб, Россия) применяемые с целью мягкого воздействия на раневую поверхность и удаления экссудата [2]. Так же известны лечебные изделия с неприлипающим слоем, которые изготавливаются на основе нетканого полотна с напылением  $ZnO$ ,  $Al_2O_3$  (Metalline, Германия).

Согласно как отечественным, так и зарубежным источникам, в ходе подбора подходящего лечебного изделия с целью эффективной терапии важно учитывать специфику стадий раневого процесса, в котором практически отсутствует строгое деление при переходе из одной стадии в другую. Например, избыточное количество раневого отделяемого, характерное для начальных стадий, может представлять собой механическое препятствие, мешающее заживлению,

соответственно, важны адсорбционные свойства медицинского изделия, а также возможность предотвращать полное испарение [7,15].

Наибольший интерес для нашей исследовательской работы представляет анализ лечебных покрытий, имеющих в составе гидрофильные полимеры. Например, гидрогелевые покрытия типа Hydrosorb, Hydrosorb plus, Гелепран представляют собой трехмерные сети связанных между собой гидрофильных полимеров типа полиэтиленоксида, поливинилпирролидона и полиакриамидов. Гидрогели способны удерживать до 98% воды и предназначены для лечения раны во влажной среде. Они имеют высокую сорбционную активность, обладают охлаждающим эффектом для раны, что дает дополнительный эффект обезболивания и снижает воспалительный процесс [16].

Для достижения максимального лечебного эффекта в состав повязок часто включают лекарственные средства, например, антисептик, получая тем самым комбинации полимерных носителей и активных компонентов. Примером тому служат такие изделия, как Асеплен-Д (Россия), в случае введения фурагина, диоксидина, гентамицина в качестве активного лекарственного компонента продукции фирмы Колетекс, а также Гелепран с мирамистином. Влажная среда способствует быстрому очищению раневой поверхности, активизируя раневые протеазы и способствуя эпителизации.

С целью усиления регенерационных процессов активно разрабатывают и применяют изделия на основе коллагена, представляющие собой коллагеновые губки с высокой сорбционной способностью (например, Белкозин, Россия), в которых непосредственно коллаген формирует экзогенную матрицу, что способствует регенерации и уменьшению площади хронических ран [17,18], а также комбинированные препараты (Гентацикол, Россия), содержащие в полимерной основе сульфат гентамицина. Так же, в отношении терапии гнойных ран разработаны комбинированные лечебные изделия, содержащие в своем составе протеолитические ферменты, такие как трипсин, лизоцим, террилитин. К таким вариантам изделий относятся Дальцекс-трипсин (Россия), Теральгин (Россия). На сегодняшний день большую известность имеют покрытия на основе

альгинатного геля. Широко применяемый лечебный материал «Колетекс», получаемый по технологии печати, представляет собой салфетку с нанесенным лечебным гидрогелевым слоем в котором альгинат натрия выступает и в качестве активного компонента, пролекарства, и в виде матрицы для инкорпорированных в полимере действующих веществ [19,20].

Широкого применения достигли лечебные материалы на основе хитозана, которые способствуют процессам очищения раны и регенерации (Коллахит, Россия).

Целью нашей исследовательской работы является создание медицинского изделия для комплексной терапии гнойных ран, с одновременным очищением от гнойно-некротического отделяемого, уменьшением кровоточивости и антимикробным воздействием, что крайне важно на I-II стадии раневого процесса. Роль матрицы (носителя) успешнее всего может выполнить природный полимер, наделенный уникальными свойствами и способностью к регенерации, с импрегнированными активными компонентами, которые окажут литический эффект на гнойное содержимое раны, а также антимикробный препарат с широким спектром действия и отсутствием резистентности в отношении устойчивой патогенной микрофлоры. Это обеспечит максимальный эффект на каждой из стадий раневого процесса. Поэтому важное внимание необходимо уделить выбору каждого из компонентов разрабатываемой системы.

## **1.2 Специфика раневого процесса. Особенности течения раневого процесса на I и II стадии.**

Нами отмечалось, что на сегодняшний день лечение ран и раневой инфекции является одной из самых актуальных проблем в современной медицине, требующей большого внимания. Порядка 40% случаев хирургического направления составляют пациенты с гнойными ранами [21]. Именно такие хирургические осложнения, связанные с инфицированием, считаются самыми серьезными как по течению, так и по сложности терапии.

Очевидно, что гнойное поражение мягких тканей на фоне возрастания резистентности к противомикробным препаратам и частоты развития осложнений

влияет непосредственно на продолжительность лечения, затрагивая, таким образом, системное состояние всего организма, а также приводит к экономическим проблемам у пациента, лечебных заведений, оказывая влияние на систему здравоохранения в целом [22].

Целью данного исследования является создание лечебного изделия, применяемого местно на I-II стадии раневого процесса, которое одновременно способствовало бы очищению раны, проявляло антибактериальный эффект, и тем самым, ускоряло бы регенерацию поврежденной ткани. Состав основы такого изделия должен обеспечивать как удержание и равномерное распределение активных компонентов [23], так и своевременное высвобождение их в область раневой поверхности, сохраняя при этом максимальную активность каждого.

Чтобы создать новые материалы, важно проанализировать существующие варианты лечения гнойных ран, уделить внимание особенностям механизма раневого процесса. Динамика раневого процесса отражает связь между характером последовательных изменений, происходящих в ране, и состоянием организма, его функциональными возможностями и реакциями со стороны органов и систем.

По своему определению ранами или открытыми повреждениями принято называть нарушение целостности кожных покровов, слизистых оболочек, подлежащих тканей и поверхности внутренних органов, возникшее в результате механического или иного воздействия [23,24].

Начиная с момента возникновения раны происходит ее инфицирование, причем различными, не всегда определенными агентами поэтому, уже на начальных этапах лечения желательно вести борьбу как с удалением гнойного отделяемого, так и с инфекцией, т.е. использовать местно антибактериальные препараты. Желательно иметь уточненные данные по характеру, природе инфекции, однако, это не всегда возможно. В этом случае можно ожидать более быстрого и выраженного эффекта в лечении пациентов.

Раневой процесс - сложный комплекс последовательных реакций воспаления, разделенный на стадии, каждая из которых имеет свои особенности и характер

течения. Считается, что каждая случайная рана является инфицированной. Однако, для развития гнойного процесса необходим ряд способствующих факторов. Таковыми являются состояние и степень повреждения тканей, наличие патогенных микроорганизмов. Для развития инфекционного процесса в ране необходима концентрация микроорганизмов  $10^5$  (100000) микробных тел на 1 грамм ткани. По современным данным согласно отечественной [25] и международной [26] классификациям принято условное деление раневого процесса на фазы: I-фаза воспаления, характеризующаяся сосудистыми изменениями, II-регенерации с новообразованиями капилляров и грануляционной ткани, и III-организации рубца и эпителизации. Строгое деление между I и II фазами отсутствует: в области дефекта продолжают активный воспалительный процесс, очищение раны от нежизнеспособных тканей, одновременно происходит миграция фибробластов, образование коллагеновых волокон, ангиогенез, развитие грануляционной ткани. Постепенно происходит уменьшение экссудации и отека. При переходе II фазы в III так же отсутствует четкое деление, наблюдается краевая эпителизация с ростом грануляционной ткани. Однако, развитие процесса в инфицированной ране имеет свои особенности, такие как наличие гноя и некротических тканей, токсинов и отечности, что требует подключения соответствующих препаратов и манипуляций в рамках терапии. За последнее время с учетом влияния ряда факторов, например, избирательного действия антибиотиков, произошли изменения в этиологии раневого процесса [27,28]. Среди возбудителей выделяют: стафилококки *S. aureus*, *S. Epidermidis*; стрептококки; семейство *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Citrobacterspp.*, *Klebsiellaspp.* и др.); анаэробные микроорганизмы (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Peptococcus*).

Классификация раневого экссудата включает в себя несколько параметров. Например, фибриновый представляет собой один из вариантов экссудата, чаще обогащенный высокомолекулярным белком фибрином. Геморрагический содержит большое количество эритроцитов ввиду сосудистой проницаемости; собственно гнойный, содержащий гной, а также смешанный тип. Основные клетки, образующие гнойную патологическую жидкость, — это лейкоциты (а



именно, нейтрофилы), белки, мертвые клетки. Отсюда следует широкий спектр средств для лечения и воздействия на гнойную рану.

Важными естественными внешними факторами, определяющими заживление раны, являются показатель рН среды и влажность раны. Следует учитывать, что создание влажной среды за счет медицинской повязки позволяет через естественные процессы диффузии корректировать дисбаланс в раневой поверхности, удалять низкомолекулярные компоненты и способствовать регенерации [29]. Эффективное заживление раны является результатом комплекса биохимических реакций, в которых рН имеет большое значение. Данный показатель является характеристикой кислотности среды, в которой скорость реакции может увеличиваться или уменьшаться [30,31,32]. Например, рН области ожога варьируется от 7,9-8,5 [33]. В случае хронических гнойных ран зачастую происходит смещение рН в сторону ацидоза ( $\text{pH} < 7$ ). По мере заживления ран происходит смещение рН среды в щелочную сторону, что создает благоприятные условия для проявления активности фибробластов, клеток, участвующих в репарации поврежденной ткани и требующих значения рН от 6,9 до 7,8 [35,36,37]. У больных сахарным диабетом, напротив, изначально отмечается защелачивание раны [34], сохраняющееся на всех стадиях раневого процесса [38], связанное с микроциркуляторными и дистрофическими расстройствами, что, естественно, требует системного, комплексного воздействия в рамках терапии данного заболевания. Именно поэтому данный параметр важно учитывать в ходе исследования и разработки медицинского изделия для лечения гнойных ран, обеспечивая с их помощью нейтральную или слабощелочную среду.

Важно сказать, что применение одних только антисептических и дезинфицирующих наружных средств не всегда может глубоко воздействовать на гнойное содержимое ввиду формирования резистентности, и часто в качестве дополнительного компонента необходимо воздействовать щелочным агентом. Он помогает растворить густой и липкий гной, что ускоряет очищение раны [39,40]. Одновременно с щелочными агентами при лечении гнойных ран воздействуют раствором перекиси водорода. При локальном взаимодействии с гноем

происходит щелочное омыление белково-липидных комплексов, а гной за счет фермента каталазы «включает» в растворах выделение газа кислорода из перекиси водорода, что обеспечивает размягчение густого гноя, быстрое внедрение в гнойную массу и физическое разрушение плотной структуры за счет внутритканевого холодного кипения вследствие быстрого выделения пузырьков газа [41,42]. Однако, данный способ ввиду ряда факторов, таких, как краткосрочность действия, необходимость в повторении манипуляций и неудобство воспроизведения не позволяет рассматривать его как основной способ терапии гнойных ран.

Таким образом, наличие вязкого гнойного отделяемого в ране формирует необходимость в воздействии ферментными препаратами для достижения максимального литического эффекта, и, как следствие, очищения раны, что ускорит регенерационные процессы. Следовательно, выбор ферментного препарата и его концентрации является важнейшим этапом в нашем исследовании.

### **1.3 Применение ферментных препаратов в лечении гнойных ран**

Применение хирургической обработки гнойных ран является важнейшим этапом в лечении, однако данный способ не всегда позволяет полноценно очистить рану и требует дополнительных манипуляций и средств. Лишь у 70% больных можно провести полную обработку гнойной раны и в 35% случаев после этого можно наложить первичные швы [4]. Кроме того, благоприятный исход терапии гнойных ран зависит как от своевременности начала лечения, так и от последующих мер, направленных на обеспечение регенерационных процессов [43]. Поэтому хирургическое лечение в большинстве случаев невозможно без местного применения биологически активных препаратов. Актуальность создания таких препаратов и лечебных материалов была и остается сегодня т.к. не снижается госпитальная раневая инфекция, идет процесс привыкания все к большему количеству антибиотиков, мало меняются традиционные подходы к лечению ран. Общеизвестным считается, что в основе очищения ран лежат

эндогенные ферментативные процессы, происходящие за счет аутолиза некротических тканей, а также важная роль отводится протеазам, продуцируемых лейкоцитами. Во время течения раневого процесса активируется фагоцитоз бактерий и компонентов некротических тканей [22]. Но данный механизм регуляции воспаления за счет эндогенных протеаз является недостаточным и требует дополнительного внешнего воздействия. Поэтому естественно, что последние годы среди применяемых лечебных средств при лечении гнойно-некротических ран стала активно применяться энзимотерапия. Вводимые в рану ферменты действуют одновременно с эндогенными протеазами [44,45]. Однако сегодня для лечения хирургических больных со сложными гнойными и плохо заживающими ранами все больше возникает необходимость комплексного подхода к составу используемых перевязочных лечебных средств, комбинированных композиционных материалов, обладающих одновременно некролитическими, сорбционными, антибактериальными свойствами. Примерами такого подхода могут служить материалы, (которых, к сожалению, на данный момент немного), содержащие в матрице из модифицированной целлюлозы (диальдегидцеллюлоза) трипсин, лизоцим и инсулин, а в хитозане - лидокаин, мирамистин, химопсин, о которых говорилось выше [65].

Объясняется это рядом факторов, преобладающими из них являются физиологические процессы в тканях и отсутствие четкого деления I-II фаз в ходе развития гнойного раневого процесса, что формирует сложность в выборе лекарственного препарата с прицельным действием на мишень (гнойную рану), а также, в подборе эффективной дозировки.

Учитывая специфику лечения гнойных ран на I-II стадиях процесса и сложную ситуацию на фармацевтическом рынке еще раз укажем, что разрабатываемый нами лечебный гидрогелевый материал предназначен для очищения инфицированных ран от гнойно-некротических масс на I-II стадиях и одновременного купирования воспалительного процесса. Данная цель подчеркивает необходимость использования протеолитических ферментов, способствующих расщеплению белков раневого отделяемого и их эвакуации из

раны [46,47]. Однако, останавливаясь в данном разделе на выборе ферментов, мы учитываем, что они будут применяться в комбинации с антисептиками (это будет рассмотрено далее) и их совместное использование может негативно сказаться на свойствах каждого из компонентов, что требует особого технологического подхода.

В рамках нашей работы по созданию лечебного изделия для лечения гнойных ран большое внимание уделялось анализу различных групп ферментных препаратов. Среди широкого спектра применяемых энзимов в данном направлении наиболее активное применение получила группа протеолитических ферментов [48]. По своему действию, протеазы делятся на экзопептидазы, расщепляющие внешние связи в белках, к ним относится карбоксипептидаза А, В, ферменты кишечного сока, а также эндопептидазы (расщепляют пептидные связи внутри макромолекулы), включающие в себя такие важные ферменты, как пепсин, химозин, трипсин, химотрипсин, эластаза. В зависимости от строения активного центра все протеазы делятся на сериновые, треониновые, цистеиновые, аспартильные, металлопротеазы, глутаминовые.

Принимая во внимание область применения разрабатываемого лечебного изделия, важно отметить среди специфических свойств протеаз следующее:

характерной особенностью протеаз является щадящее воздействие на неповрежденные участки вокруг раны при одновременном мощном литическом эффекте на белки раневого отделяемого. Кроме того, протеазы обладают выраженным противовоспалительным эффектом [49].

Среди данной группы ферментов наибольший интерес представляет класс ферментов, которые и будут нами рассмотрены далее, а именно протеазы животного происхождения (химопсин, химотрипсин) и ферменты растительного происхождения (папаин, бромелаин). Начиная с 19 века ферменты поджелудочной железы такие как трипсин и химотрипсин стали широко применяться для заживления мягких тканей, а также для лечения гнойных ран [50,51]. Далее рассмотрим строение и свойства основных протеолитических ферментов.

**Химопсин** – комплексный ферментный препарат протеолитического действия, включающий трипсин и химотрипсин, полученные из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Воздействие производится на пептидные связи в белковой молекуле. Трипсин гидролизует пептидные связи, содержащие остатки аргинина и лизина; химотрипсин расщепляет пептидные связи с остатками ароматических аминокислот - тирозина и триптофана [52]. Данные ферменты являются наиболее известными представителями протеиназ, активный центр которых включает серин [53]. Кроме того, представители некоторых религиозных конфессий негативно относятся к их использованию.

Однако, ввиду происхождения данных ферментов, а именно, получение препарата из поджелудочной железы крупного рогатого скота и свиней, сохраняется вероятность возникновения аллергических реакций и риск передачи определенной группы заболеваний человеку. Несмотря на все предпринимаемые меры безопасности и многостадийность очистки ферментов, остается риск заражения препарата патогенной микрофлорой [54].

### **1.3.1 Ферменты растительного происхождения**

Вторая группа ферментов, которая представляет для нас интерес с целью применения в качестве активного компонента — это растительные протеазы. Они активно применяются в пищевой промышленности, входят в состав лекарственных препаратов для нормализации функции желудочно-кишечного тракта (Вобэнзим, Флогэнзим), антикоагулянтных препаратов.

Широкое применение растительные протеазы получили в лечении гнойных ран. Данная группа ферментов гидролизует белки кожи, такие как коллаген I типа, а также омертвевшие и некротические ткани [55]. По сравнению с ферментами животного происхождения, растительные протеазы воздействуют на любые пептидные связи и обладают большей способностью к расщеплению белков по сравнению с большинством протеаз животного и бактериального происхождения, и одновременно с этим, обладают более щадящим фибринолитическим действием на неповрежденные ткани вокруг раны.

Папаин и бромелаин относятся к классу цистеиновых протеаз, имея в активном центре тиоловые группы остатка цистеина. Функциональная активность ферментов во многом зависит от их пространственной структуры, которая обеспечивает характерное взаимодействие с субстратом. Особенности строения молекулы бромелаина позволяет взаимодействовать с активным центром через одну «полость» в молекуле, тогда, в свою очередь, таких «полостей» в молекуле папаина – три, что позволяет проявлять папаину большую активность по сравнению с бромелаином [56,57].

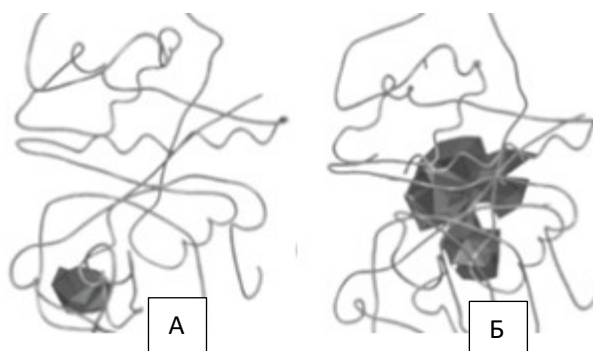


Рисунок 1- Расположение «полостей» в молекуле бромелаина (А) и молекуле папаина (Б).

**Бромелаин** – протеолитический фермент, содержится преимущественно в сердцевине и стебле ананаса. По своим свойствам ускоряет очищение и заживление ран, трофических язв, а также участвует в ингибировании воспалительных процессов, влияя на метаболизм арахидоновой кислоты. Проявляет свойства, по сравнению с протеазами животного происхождения, при более широком диапазоне рН но, способен расщеплять субстраты при рН меньшем, чем папаин, а именно в диапазоне от 5,5 до 8,5 [58, 59]. Бромелаин активно используется в составе зубных паст для отбеливания зубов, т.к. воздействует на белковые части зубного налета [60]. Так же, благодаря его депротеинизирующим и коллагенолитическим свойствам бромелаин широко используется в стоматологии [61]. Широкое применение он получил и в качестве пищеварительного препарата для заместительной терапии при коррекции

ферментной дисфункции поджелудочной железы, а также известно о результатах успешного лечения язвенных колитов [62,63]. Растительные протеазы, в частности бромелаин, обладают выраженной противогельминтной активностью, воздействуя на кутикулу нематод. Указывается его доказанная эффективность в отношении *Heligmosomoides polygyrus* по сравнению с синтетическими препаратами, к которым часто формируется резистентность [64]. Из литературы известно о протеолитической активности бромелаина и эффективности терапии болезни Дюпюитрена при его воздействии на пораженные области и коллагеновые контрактуры, и одновременном сохранении здоровой соединительной ткани.

**Папаин** – содержится в латексе папайи, по характеру ферментативного действия его называют «растительным пепсином», и, по сравнению с большинством протеаз животного и бактериального происхождения, способен расщеплять белки до аминокислот и проявлять свои свойства в диапазоне рН от 4 до 12 ед., что очень важно при лечении гнойных ран. Представляет собой комплекс латекса папайи, включая в состав такие ферменты, как химопапаин, лизоцим, папаин, карикаин [66,67]. Комплекс латекса папайи активно применяется в пищевой, консервной промышленности, при обработке мясных изделий, при изготовлении тонизирующих напитков, входит в состав зубных паст, а также применяется в гастроэнтерологии (Юниэнзим) [68,69].

В источниках указывается, что лизоцим в составе комплекса из латекса папайи отличается от лизоцима в составе белка куриного яйца, имеет большую молекулярную массу (приблизительно 25000 кДа) и отличный аминокислотный состав [68].

Папаин, как представитель цистеиновых протеаз содержит в составе активного центра S-Н группу, выступающую в роли нуклеофила.

Вообще, активный центр фермента (АЦ) – уникальная для каждого фермента совокупность функциональных групп аминокислотных остатков, строго ориентированных в пространстве за счет третичной или четвертичной структуры фермента. Что очень важно, в АЦ различают субстратный и каталитический

участки. Субстратный участок обуславливает субстратную специфичность фермента, т.е. сродство фермента к субстрату. Считается, что точного соответствия между ферментом и субстратом нет, оно возникает в процессе взаимодействия фермента с субстратом (теория вынужденного соответствия). Субстратная специфичность бывает абсолютной, относительной и стереохимической. Абсолютная специфичность – когда фермент действует только на один субстрат, например, сахараза действует только на сахарозу, аргиназа только на аргинин и т.п. Относительная специфичность, когда фермент действует на группу субстратов, у которых одинаковый тип связи. Стереохимическая специфичность – это способность фермента действовать только на один из возможных стереоизомеров субстрата. Второй участок в АЦ – каталитический. Он обуславливает специфичность действия фермента, т.е. тип ускоряемой реакции.

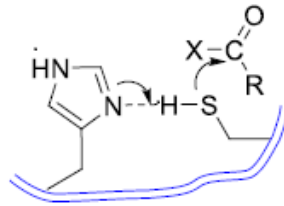


Рисунок 2- Цистеиновые протеазы

При изучении структуры папаина установлено, что полипептидная цепь молекулы папаина содержит 212 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 23,5кДа [70]. Полипептидная цепь содержит два домена R и L, в структуре между ними имеется щель, в которой связывается субстрат.

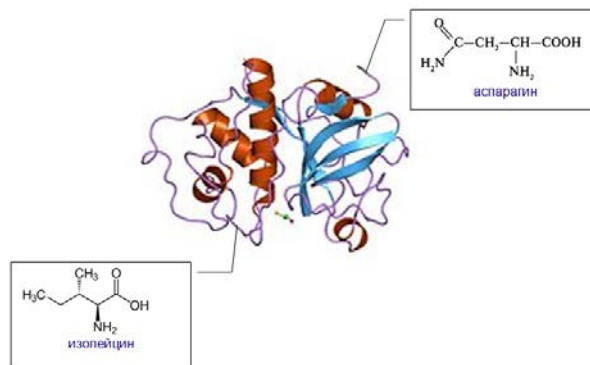


Рисунок 3- Химическое строение молекулы протеолитического фермента папаин



Папаин ускоряет процесс распада белка фибриногена и белков некротизированных тканей до пептидов и аминокислот, способствуя лизису некротических тканей и очищению раны. Каталитическую активность папаина проявляет по разным данным при рН от 3 до 12 единиц, а максимум проявляется при 7,5 ед. [59,71]. Диапазон температур, при котором растворимый папаин функционирует, представляет 40-70°C, а максимальная активность проявлена при 37° С [34,59]. Эти параметры делают папаин очень интересным и перспективным препаратом для наших целей.

Известно об успешном использовании папаина совместно с «усилителями» свойств, такими как мочевины, активатором сульфгидрильных групп, который обеспечивает дополнительный эффект в качестве увлажнителя, содействуя денатурации белковых масс, тем самым делая некротические ткани более восприимчивыми к действию протеолитика. Также возможно усилить активность папаина при его совместном применении с цистеином, непосредственно донором сульфгидрильных групп [66].

Однако, несмотря на множество положительных результатов применения энзимотерапии, имеется ряд недостатков в ходе использования нативных протеаз. Например, кратковременность действия кристаллических форм, что требует частого обновления достаточно дорогостоящего препарата, чувствительность к факторам инактивации раневой среды (кровь, экссудат), также указанные ферменты подвергаются автолизу. Кроме того, применение дополнительных манипуляций при очищении раны от остатков некротических тканей и частая замена препарата создает риск травматизации раны. Поэтому, создавая лечебный материал, содержащий ферменты, необходимо рассмотреть различные пути по стабилизации ферментной активности, учитывая, в том числе, совместное применение протеаз и антисептиков для терапии гнойно-некротических ран.

### **1.3.2 Пути стабилизации протеолитической активности ферментов**

Ранее неоднократно указывалось, что применение ферментов вследствие их протеолитического действия способствует очищению раны, однако в большом числе случаев ферменты применяются в нативной форме («засыпаются» в рану

или используются в виде водного раствора). К сожалению, как указывалось выше, действие нативных форм ферментов очень ограничено по времени из-за недостаточной стабильности, подверженности автолизу, инактивации ингибиторами крови, и, кроме того, очень дороги. Необходимость частого введения нативных ферментов приводит к травмированию раны пациента и экономическим сложностям. Поэтому очень важен компромиссный вариант, обеспечивающий как стабильность и пролонгированность действия ферментов, так и контакт с субстратом, замедленную диффузию в рану. Этого можно достигнуть путем иммобилизации ферментов используя в качестве среды, матрицы для иммобилизации полимеры [72,73,74]. Иммобилизация может происходить как за счет создания химической связи активных групп полимера-фермент, так и физической (Ван-дер-Ваальсовой, ионной и т.д.).

Оценивая иммобилизацию ферментов как способ сохранения их активности, и, соответственно, пролонгации действия лечебного материала, в состав которого они входят, необходимо отметить, как положительный факт, что это еще и способ снижения концентрации фермента без уменьшения его активности, что важно экономически, и с этих позиций делает его предпочтительным перед использованием нативных ферментов. Иммобилизация протеаз за счет образования ковалентной связи с молекулой полимера подразумевает наличие в полимере функциональных групп. Химической модификации могут подвергаться как природные полимеры, чаще всего целлюлоза, так и синтетические, например, путем изменения соотношения исходных мономеров.

Наиболее часто для получения биологически активных полимерных матриц используют производные целлюлозы, например, диальдегидцеллюлозу (ДАЦ) [65,75]. Проведены большие исследования по использованию влияния фермента трипсина на некротизированные ткани. В гнойно-некротическом содержимом все молекулы благодаря броуновскому движению находятся в хаотичном движении, ввиду чего, вероятность взаимодействия фермента и мишени формируется из вероятности их столкновения. По мере очищения раны увеличивается частота автолиза некротизированных (мертвых) клеток и тканей ввиду содержания и

действия в ране как собственных гидролитических ферментов, так и дополнительно введенных. Высокоактивный фермент трипсин способен расщеплять как пептидные связи денатурированных белков раны, так и живых клеток, однако очень важно, что «умная» живая клетка способна вырабатывать ингибитор протеаз в количестве, нейтрализующем избыток трипсина на границе-некротизированная - здоровая ткань. Таким образом, экзогенный трипсин не создает дополнительной нагрузки на организм на границе раны, защищая ее от дальнейшего инфицирования, ускоряя ее очищение, расщепляя и инактивируя белковую молекулу гнойного отделяемого в ране.

При химической иммобилизации трипсина между носителем и живыми клетками раны находится толстый слой детрита, с которым взаимодействуют химически присоединенные молекулы фермента. К моменту очищения раны салфетка не нужна и далее удаляется с раны. Из сказанного очевиден экономический эффект от химической иммобилизации. По данным [65] количество химически иммобилизованного фермента должно быть в десятки раз меньше, чем при использовании нативной формы. Недостаток предлагаемого способа иммобилизации заключается в ее очень сложном технологическом исполнении, многостадийности и длительности технологического процесса как активации целлюлозного полотна до образования диальдегидцеллюлозы, так и проведении самой химической реакции присоединения фермента.

Отметим, что когда лечебный материал с химически иммобилизованным ферментом попадает в гнойную рану, то для начала работы фермента должен произойти разрыв ковалентной связи, удерживающей фермент, после чего он приобретает подвижность. Однако специфичность действия ферментов заключается в возможности протекания сразу нескольких реакций (в зависимости от условий, например, pH), которые могут в том числе проходить с менее энергетически значительным взаимодействием фермент-субстрат, физически иммобилизуя фермент за счет сорбции. Это хорошо показано в [65] на примере ферментного комплекса лизоамидаза, состоящего из нескольких фракций с различной субстратной специфичностью. Соотношение ферментативной

деятельности фракций в зависимости от условий иммобилизации и образующейся связи фермент-модифицированный текстильный носитель приведено в таблице.

Таблица 1- Зависимость бактериологической и протеолитической активности лизоамидазы от рН и характера связи с носителем (носитель-модифицированная медицинская марля).

| №  | рН и состав раствора для иммобилизации и | Бактериологическая активность лизоамидазы, ЛЕ/г |           | Протеолитическая активность лизоамидазы, ПЕ/г |           |
|----|--|---|-----------|---|-----------|
|    |  | Хим.связь+сорбция                               | Хим.связь | Хим.связь+сорбция                             | Хим.связь |
| 1. | 4,5 (фосфатный буфер)                    | 16,10   | 6,00      | 0,87  | 0,46      |
| 2. | 6,0(фосфатный буфер)                     | 19,30   | 7,00      | 1,60  | 0,50      |
| 3. | 7,0(фосфатный буфер)                     | 14,40   | 6,50      | 1,20  | 0,32      |
| 4. | 8,0(фосфатный буфер)                     | 10,20   | 5,40      | 0,82  | 0,28      |
| 5. | 9,0(фосфатный буфер)                     | 8,20  | 5,00      | 0,65  | 0,22      |
| 6. | H <sub>2</sub> O(фосфатный буфер)        | 18,20   | 7,00      | 1,70  | 0,60      |

Из приведенных данных видно, что для иммобилизации наиболее предпочтительным является использование фосфатного буфера, рН 6,0 и дистиллированной воды. Что касается связи между ферментом и носителем, то можно убедиться в положительном влиянии сорбированного белка на литическую активность полученного препарата, и такой материал обладает большим лечебным эффектом при лечении гнойных ран. Это однозначно говорит об эффективном действии физически иммобилизованного фермента.

Условия иммобилизации влияют и на протеолитическую активность препарата. По ФС на Дальцекс-трипсин, действие которого обеспечивается протеолитической активностью, она должна быть не ниже 0,1 ПЕ/г материала

[65]. Как видно из результатов эксперимента, ферментный комплекс лизоамидаза обладает значительно более высокой протеолитической активностью по сравнению с трипсином. Характер связи белка с носителем также имел влияние на протеолитическую активность полученного препарата. Таким образом, действие физически иммобилизованного фермента достаточно для проявления нужного лечебного фермента.

Подобный подход говорит о целесообразности рассмотрения физической иммобилизации как способа закрепления фермента на текстильном носителе с целью сохранения активности. Вопрос о целесообразности (или нецелесообразности) прочной фиксации фермента на полимерном носителе многие годы является предметом дискуссии. Ферменты, имеющие длинные цепи, ковалентно присоединенные к полимерному носителю и лишенные подвижности, могут проявлять свою активность [76]. Прочное присоединение фермента приводит к повышению его стабильности. Однако, тканевые белки-это высокомолекулярный и не всегда растворимый субстрат, контакт с которым у иммобилизованного фермента затруднен, т.е. требуется при создании материала компромиссное решение, обеспечивающее как повышение стабильности и пролонгированного действия, так и хороший контакт с субстратом, т.е. замедленную диффузию в рану. Необходим правильный научно-обоснованный подбор фермента, носителя и способа их совмещения.

В тех же исследованиях для получения высокоактивных изделий [77] рекомендуется физическая иммобилизация, например, коллагенолитических протеаз на носитель с высокими сорбционными свойствами, в т.ч. на текстильный материал из целлюлозных волокон (в частности, марлю). Такой способ технологически существенно проще, чем ковалентное связывание, и мы предполагаем именно им воспользоваться в своих исследованиях.

Кроме того, в ходе химической иммобилизации происходит ковалентное связывание фермента с полимерной матрицей или используется сшивка молекулы фермента с носителем, что в результате может привести к существенным

изменениям свойств активного компонента и негативно повлиять на итоговый результат разрабатываемой системы [78].

Сравнение сорбционных свойств ферментсодержащих лечебных материалов со свойствами их носителей показало [77], что химическая иммобилизация трипсина снижает сорбционные свойства целлюлозы как по воде (на 46%), так и по модели экссудата (на 81%). Из источников известно об аналогичной разработке ранозаживляющего изделия на основе полимера альгината натрия, но с добавлением фермента террилитина, обладающим узким температурным и pH диапазоном. Частичная химическая сшивка биополимера альгината натрия протеолитиком террилитином тоже уменьшило сорбцию почти в два раза, в то время как физическое включение протеазы в гелевин (поливиниловый спирт) практически не изменило свойств изделия (сорбция в воде снизилась на 5%, а экссудата на 30%). Сорбция раневого отделяемого – очень важный фактор, существенно влияющий на полноту и скорость удаления гнойного отделяемого и некротических тканей. Это еще раз говорит о возможности и целесообразности использования при создании ферментсодержащих изделий физической иммобилизации фермента полимерным носителем (в виде гидрогеля или волокнистого материала).

Если в качестве физического носителя для иммобилизации фермента используют водорастворимый полимер, то скорость массопереноса фермента в раневую среду можно регулировать путем изменения набухания и растворимости этого полимера. Например, изменяя его молекулярную массу (ПВС), а также введением в композицию дополнительного полимера, способного к образованию полиэлектролитных комплексов с макромолекулами белка. В качестве такого полимера возможно использовать натриевую соль альгиновой кислоты. В своей работе мы предполагаем этот прием, опираясь на исследования [79,80,81,82]

Таким образом, можно выделить ряд преимуществ в ходе применения данного метода иммобилизации ферментов. Физическая иммобилизация позволяет обеспечить сохранение активного центра фермента, и как следствие, снижает потерю активности фермента и увеличивают пролонгацию необходимого

терапевтического эффекта, защищает фермент от инактивирующих факторов, присутствующих в раневой среде ввиду химической стойкости [83,84], а также возможность стабилизировать молекулярную структуру самого фермента во время гамма стерилизации.

Известно, что ферментсодержащие изделия могут иметь различные формы выпуска. Они могут быть на тканевой основе в виде салфеток (трикотажные, марлевые полотна), содержащих химически иммобилизованный фермент (например, Дальцекс-трипсин, Пакс-трипсин) или гидрогель с физически иммобилизованным ферментом, иметь форму корпии (высоко окисленный измельченный материал) и порошка (профезим-порошок протосубтиллина, химически связанный с аминоэтилцеллюлозой, лизосорб-фермент террилитин и поливиниловый спирт и т.д.). Порошкообразные формы наиболее применимы в послеоперационный период, позволяя хирургу в первые сутки после операции корректировать лечение, однако такие формы препарата трудно удалять и вымывать из раны. Наиболее применимы изделия на текстильной основе. Целесообразность использования именно волокнистых носителей для иммобилизации ферментов обусловлена высокой удельной поверхностью волокон; могут быть использованы практически любые типы волокон: чаще всего-гидрофильные целлюлозные и гидратцеллюлозные, ПВС, нетканые материалы [85,23]. В свою очередь, при создании аппликаций с ферментами очень важен выбор текстильной атравматичной матрицы, обладающей хорошими сорбционными, дренирующими свойствами. Например, применение марли вызывает приостановку действия дренажа и, следовательно, закупорку раны. Поэтому, нам, проводя работу, необходимо научно-обосновано подойти к выбору текстильного материала в качестве основы для лечебных салфеток (аппликаций) с ферментами, применяемых для сорбционно-аппликационной терапии гнойных ран. Принимая во внимание, что в предлагаемом исследовании рассматривается разработка двух форм лечебного материала: гидрогелей для заполнения глубоких ран и текстильной аппликации с нанесенным на ее поверхность гидрогелевым покрытием для закрытия и лечения поверхностных и вялотекущих ран и ожогов,

следует более подробно остановиться на выборе полимера для иммобилизации фермента и антимикробного препарата, являющегося основой создаваемого гидрогеля.

#### **1.4 Использование биополимеров для производства изделий медицинского назначения**

Создание полимерных средств доставки лекарственных препаратов, способных обеспечить длительное (продолгованное по медицинским показаниям) поступление и одновременное снижение его суточной дозы, является важной и всегда актуальной проблемой. Все большее внимание при создании лечебных материалов с улучшенными фармакологическими и фармакокинетическими свойствами уделяется полимерам, и в частности, биополимерам, которые могут являться средством для обеспечения направленной доставки в рану введенных в них лекарств [86].

На сегодняшний день применение полимеров является одним из наиболее перспективных направлений в области создания раневых покрытий. За счет своих свойств многие полимеры могут являться не только средством доставки, но и пролекарствами, т.е. оказывать профилактический или лечебный эффект [87,88,173].

Свойства биополимерной композиции должны быть адаптированы к разнообразию форм материалов, используемых для лечения ран различной этиологии (гидроколлоиды, текстильные, гелевые повязки, пленки и т.д.). Следует учитывать, что кроме доставки импрегнированных препаратов и БАВ в очаг поражения биополимерные компоненты могут способствовать достижению противоположного направленных эффектов. Например, альгинаты и смесовые композиции могут способствовать осушению раны, поглощению избытка раневой жидкости, либо увлажнять и поддерживать физиологически влажную среду. Полимеры могут извлекать из раны метаболиты, продукты распада тканей, могут регулировать массоперенос в рану из полимерного «депо» импрегнированных БАВ и субстанций лекарств, могут повышать стабильность ферментов, тем самым обеспечивая противовоспалительное и регенерационное действие. Все сказанное



следует учитывать при выборе состава полимерной композиции-основы лечебного материала.

Учитывая основную цель данной работы, выбор полимера будет производиться в пользу такого варианта, который может обеспечить создание лечебного изделия в двух видах: как лечебный гидрогелевый материал для более глубоких гнойных ран, а также изделие на текстильном материале для наложения на раны более поверхностные. В своей структуре он обязан будет удерживать два активных компонента: фермент, обеспечивающий литический эффект для последующего удаления гнойного экссудата, и противомикробный препарат, проявляющий активность в отношении резистентных штаммов микроорганизмов. Помимо этого, важно обеспечить «удержание» в композиции нужной для пролонгированного действия концентрации препаратов и их своевременное, пролонгированное высвобождение в рану.

Полимер следует рассматривать как матрицу, в которой распределено лекарство, необходимое для лечения конкретного поражения. Этот вариант, когда с помощью полимера можно доставить импрегнированное в нем лекарство непосредственно к очагу поражения, относится к так называемой «направленной» или «адресной» доставке, очень важной для лечения ран, позволяющей подводить препарат местно, а не инъекционно или перорально, снижая дозную лекарственную нагрузку на больного, причем, лечебные свойства и полимера, и самого лекарства могут обеспечить синергизм их лечебного действия и материала в целом. Например, указанными свойствами обладает салфетка гемостатическая Колетекс-ГЕМ эффективна как кровоостанавливающее средство за счет действия биополимера-полисахарида альгината натрия и как антисептик, что обеспечивает импрегнированный препарат фурагин. Механизм действия гемостатических салфеток «Колетекс» связан с кровоостанавливающими свойствами природного биополимера альгината натрия,  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты, приводящих к активации форменных элементов крови. Салфетка оптимально моделирует раневую поверхность в случае плотного прилегания. Соприкасаясь с кровью, альгинат натрия набухает и образует вязкую структуру, благодаря чему в

текстильном материале отфильтровывается жидкая часть крови, задерживаются и активируются форменные элементы крови;  $\epsilon$ -аминокапроновая кислота, обладающая специфическим гемостатическим эффектом, тормозит переход плазминогена в плазмин, образуется сгусток, происходит агрегация тромбоцитов и образование локального тромба. Присутствие фурагина в структуре геля надежно обеспечивает антимикробные свойства за счет массопереноса фурагина из набухающего полимера в рану. Перечисленные факторы дают эффект синергизма, выражающийся в минимальном времени остановки кровотечения.

Время остановки капиллярно-паренхиматозного кровотечения 60-75 сек. Выше указывалось, что при введении лекарственной субстанции в гель полимера предпочтение предполагается отдать его физической иммобилизации и наличию собственной биологической активности. С этих позиций далее нами проводился выбор полимеров как депо для введения препаратов.

#### **1.4.1 Использование природных и синтетических полимеров для иммобилизации активных компонентов при создании раневых покрытий**

Современные тенденции в разработке раневых покрытий направлены на применение как синтетических полимеров, так и полимеров природного происхождения в форме гидрогелей, пленок, которые служат основой при изготовлении раневых покрытий и средством доставки импрегнированных в них препаратов. Наличие трехмерной полимерной структуры наделяет гели необходимыми свойствами (способность сохранять форму в раневой поверхности и одновременно текучесть, пластичность и способность к деформации) [89]. В последние 20 лет многие разработки сосредоточены на создании лечебных изделий с локальной доставкой лекарств и активных инкорпорированных компонентов к раневой поверхности. Применение такого пути в использовании полимеров открывает возможность к контролю длительности высвобождения компонентов к мишени [90].

Принципиально при создании материалов для лечения ран в качестве «депо» для лекарств могут использоваться синтетические полимеры, особенно обладающие высокой устойчивостью к различным воздействиям (температура, pH

среды, механические деформации и др.). Они в большей степени применимы при создании имплантов, т.е. при необходимости достижения длительной стабильности свойств. Известны медицинские изделия, использующие полимеры как матрицы для включения лекарств, в частности, поливиниловый спирт (в форме геля) при производстве перевязочного материала Гелевин, а также полиакриламидный гель. Гели на основе поливинилового спирта и полиакриламида не подвергаются полноценной биodeградации. Это объясняет применение их производных в области имплантационной хирургии, а также в качестве основы для раневых покрытий и включения в его структуру антисептических компонентов, создавая благоприятную среду для регенерации [91].

Положительным моментом в использовании данного полимера является его стабильность при воздействии радиационной стерилизации, которая, забегаая вперед, будет рассмотрена в соответствующей главе как один из важных этапов разрабатываемого нами технологического процесса. Однако, согласно источникам, имеются данные о токсическом действии акриламида как продукта распада полиакриламида, который, в рамках применения лечебного изделия при контакте со слизистой может вызвать аллергическую реакцию [92]. Одновременно с этим и другая отрицательная сторона в его использовании, такая, как отсутствие максимально необходимой биodeградации в случае использования геля на его основе. При его нахождении в раневой полости (или в рамках применения в качестве импланта) существует вероятность его дефрагментации на малые доли, которые, затем, формируют уплотнения и микрокапсулы в ткани. Этот факт имеет значительное влияние и требует внимания при анализе сырья для разработки лечебного изделия из полимеров. Наиболее применимы для наших целей полисахариды.

Группа полисахаридов, по своим свойствам относящаяся к структурным, (целлюлоза, хитин, альгинаты, каррагинаны и др.), от природы наделена уникальными свойствами, обеспечивая клетки и организмы в целом необходимыми армирующими, эластичными свойствами, а также способностью

защищать от пересыхания. Данные полимеры имеют наибольшее применение при создании перевязочных материалов для медицины. Являясь в силу своей природы БАВ, они обладают в большей или меньшей степени набором лечебных свойств, способностью к биоразложению, отсутствием токсичности. Природные полимеры, биodeградирующие в организме, выполняют важную функцию временного депо (матрицы) для лекарств, высвобождая их в нужном месте по необходимому для лечения концентрационному профилю.

В настоящее время целлюлоза и ее производные широко используются как носители (матрица, депо) для иммобилизации биологически активных веществ и лекарственных субстанций. Целлюлоза активно применяется в тех случаях, когда требуются материалы, имеющие хорошие дренирующие и сорбционные свойства, что способствует быстрому очищению области раны от экссудата [93]. Целлюлоза является структурным полисахаридом, содержащим до 10 000 глюкозных остатков, соединенных между собой  $\beta$ -гликозидными связями.

Характерной особенностью целлюлозы является наличие в каждом звене трех гидроксильных групп при втором, третьем и шестом углеродных атомах, благодаря чему целлюлоза обладает свойствами многоатомных спиртов и вступает в реакции, характерные для этих соединений.

Целлюлоза в модифицированной форме (окисленной) используется не только как матрица, но и как действующий компонент. Структурная модификация целлюлозы позволяет получить продукт с новыми ценными свойствами. Наличие реакционноспособных альдегидных групп в молекуле полисахарида позволяет существенно расширить диапазон его химических превращений. Например, разработаны биоразлагаемые материалы на основе целлюлозной ткани, окисленной с помощью азота до монокарбоксицеллюлозы, на которой иммобилизован цитостатический препарат цисплатин. Материал локально, направленно воздействует на опухолевые клетки, при наложении лечебной ткани на пораженные участки (операционное поле) пациента [94]. В литературе описано много вариантов иммобилизации различных лекарственных препаратов, в т.ч. ферментов, на производных целлюлозы: Дальцекс-трипсин, представляющий

собой трипсин, иммобилизованный на текстильном материале из диальдегидцеллюлозы; Профезим, протосубтилин, химически связанный с аминоэтилцеллюлозой и т.д.

Важнейшим условием получения препаратов с иммобилизованными биологически активными веществами является участие в образовании связей в т.ч. ковалентных с носителем тех функциональных групп действующего вещества, которые не являются ответственными за его специфическую биологическую активность, иными словами, не входят в состав активного центра и не располагаются в непосредственной близости от него.

Активный центр биологически активного вещества, например, фермента, остается интактным и фермент проявляет выраженную специфическую активность в отношении субстрата, происходит так называемое фермент-субстратное взаимодействие.

Выше отмечалось, что наряду с целлюлозой в качестве носителя для иммобилизации ферментов широко используется производное целлюлозы - диальдегидцеллюлоза (ДАЦ). Она является наиболее удобным объектом для получения терапевтически активных производных. Получают ДАЦ в результате окисления целлюлозы перйодатом натрия [95]. В результате формируются реакционноспособные альдегидные группы, к которым впоследствии присоединяются функциональные группы биологически активного вещества того или иного класса, например, аминогруппы боковых цепей фермента.

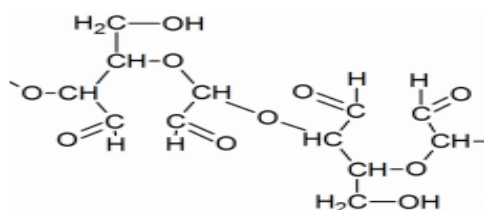


Рисунок 4- Структурная формула диальдегидцеллюлозы (ДАЦ).

Модификация целлюлозы (ДАЦ) улучшает санитарно-гигиенические свойства носителя ввиду того, что в результате возникает дополнительный механизм

активной сорбции субстратов раны за счет химического взаимодействия альдегидных групп с фрагментами денатурированных белков.

Различные режимы окисления целлюлозы позволяют создать широкий спектр изделий в различных лечебных формах. На основе современных технологических решений возможно получать из волокнообразующих полимеров требуемую структуру. Такое дифференцирование основано на изменении прочностных характеристик в процессе роста степени окисления целлюлозы. Это позволяет использовать ее в качестве основы для химической иммобилизации лекарственных средств, например, мексидола, с одновременным присутствием фермента в лечебной среде изделия [65] для дальнейшего применения в области лечения гнойных ран, что является целью нашей разработки.

Один из вариантов использования целлюлозы после модификации-заключается в применении гидроксипропилметилцеллюлозы.

Гидроксипропилметилцеллюлоза (гипромелоза, ГПМЦ) представляет собой модификацию щелочной целлюлозы [96]. Хорошие гелеобразующие свойства и отсутствие токсичности позволяют ее выбрать в качестве стабилизатора и загустителя композиции. ГПМЦ - это волокнистый или гранулированный порошок без вкуса и запаха, используется в медицинской, пищевой промышленности в качестве эмульгатора и пленкообразователя.

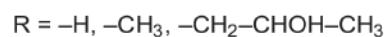
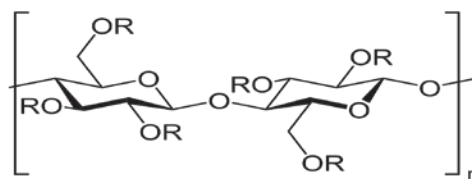


Рисунок 5- Структурная формула гидроксипропилметилцеллюлозы

Возможность сохранения активного центра фермента и свойств инкорпорированных в ГПМЦ лекарств позволяют рассмотреть ее в качестве основы для физической иммобилизации. Объем иммобилизации можно контролировать путем изменения молекулярной массы полимера,

растворимостью активного вещества, введением вспомогательных компонентов [97].

Среди большого разнообразия применяемых полимеров-полисахаридов можно отметить декстран и его производные. Декстран - разветвленный полимер глюкозы, широко применяемый в медицине. Например, фосфаты декстрана благодаря способности к биodeградации, низкой токсичности и одновременно высокой сорбционной емкости (фосфаты декстрана получают этерификацией смесью ортофосфорной кислоты и мочевины) в форме гидрогеля являются матрицей для физической иммобилизации субстанций проспидина и цисплатина. Высокая реакционная способность декстрана в реакциях алкилирования, окисления и этерификации позволяет получать многочисленные производные заданного состава и свойств.

Указанные гидрогелевые формы лекарственных препаратов, применяемые местно, обладают пролонгированным действием. Высвобождение цитостатиков из пространственной сетки гидрогеля (регулируется рН) и не связанных с функциональными группами модифицированного полисахарида происходит на первой стадии использования, затем скорость массопереноса субстанции препаратов снижается, т.к. во внешнюю среду диффундируют цитостатики, связанные с функциональными группами декстрана водородными и донорно-акцепторными связями, также массоперенос определяется скоростью набухания и деструкции полисахарида. Эти процессы зависят от рН и, соответственно, ими можно управлять, создавая материал с заданными по медицинским показаниям свойствам [98].

Активно используется в медицине природный полисахарид- **хитозан**. По своей структуре это линейный аминополисахарид, 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкан, продукт деацетилирования хитина под действием концентрированной щелочи при температуре 120°C. В природе он служит основой скелета ракообразных.

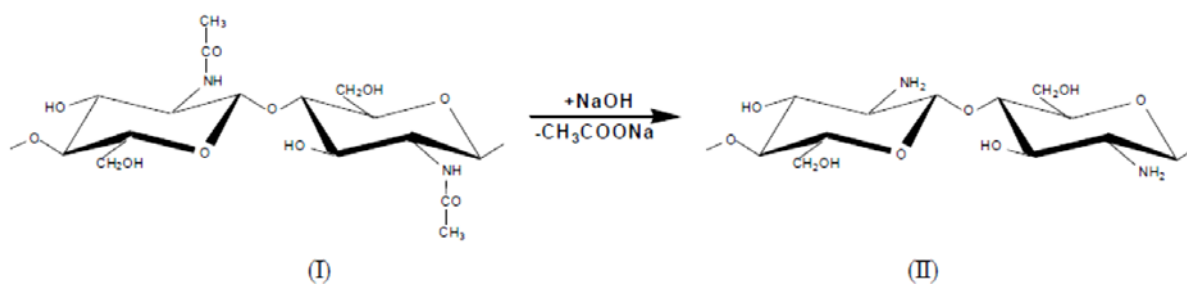


Рисунок 6- Схема получения хитозана (II) из хитина(I).

Водорастворимые и кислоторастворимые препараты хитозана дают соответственно вязкие растворы и гели. Хитозан является поликатионом, он обладает адгезией к клеточным стенкам и увеличивает их активность. В его составе два типа реакционноспособных OH- и NH<sub>2</sub> групп, за счет чего возможно получение его различных модификаций; растворимость в воде обеспечивается протонированными (в кислой среде) аминогруппами.

Среди свойств данного полимера отмечаются биосовместимость, биodeградируемость, а также нетоксичность. Благодаря этому хитозан активно применяется в медицине, в том числе в области лечения ран различного происхождения, так же используется в составе раневых покрытий, гелей, губок, обеспечивая защиту и усиливая процессы регенерации [99, 100, 101]. Хитозан может образовывать водородные и гидрофобные связи при взаимодействии со многими органическими веществами. Обладает выраженной способностью к взаимодействию с другими полимерами, а также к образованию комплексов, что расширяет его спектр применения [102,24,175]. В хитозан можно включать различные виды веществ, как биологически активных (клетки, гормоны), так и лекарственные субстанции, максимально сохраняя, при этом, их биологические свойства [103]. Известно, что благодаря пролиферации и синтезу коллагена и стимуляции роста коллагеновых волокон («модулирующий эффект»), хитозан способствует росту фибробластов, минимизирует образование рубцов в процессе ранозаживления, что позволяет успешно применять его в области регенеративной медицины. Хитозан как энтеросорбент хорошо известен в медицине. Обладает



бактерицидным действием, гели на его основе обеспечивают детоксикационный эффект, достигаемый при пероральном применении.

На основе хитозана могут быть получены наночастицы, находящие применение в медицине. Для этого хитозан как поликатион модифицируют сшивающими агентами за счет электростатических взаимодействий. Например, сшивка хитозана триполифосфатом и полифосфатом используется для создания систем с контролируемой доставкой лекарств [151]. Сшивка может осуществляться и с помощью высокомолекулярных веществ, например, альгината натрия и декстран сульфата натрия. В этом случае наночастицы формируются между хитозаном и полианионным полимером декстраном, а также за счет электростатического взаимодействия. В зависимости от особенностей протекания ионной сшивки, выбора сшивающего агента, рН и температуры возможно получать различные материалы для медицины, в т.ч. для направленной доставки различных лекарств. Исследования проводились с 5-фторурацилом, диоксидином, инсулином, ацикловиром и т.д.

Современным разрабатываемым направлением является тканевая инженерия на основе материалов из хитозана, сшитых ионными сшивающими агентами для регенерации тканей, в том числе и за счет клеточных технологий, создание скаффолдов (матриц), обеспечивающих пролиферацию клеток и последующую биодеградацию матрицы.

Для данной работы интересен анализ способов получения комбинированных многокомпонентных фармацевтических средств на основе хитозана, например, для заживления гнойных ран, содержащих фермент (для лизиса гнойного отделяемого) и антисептик (например, мирамистин). Существуют варианты такого материала, однако его получение технологически очень сложно, он существенно дезактивируется при стерилизации и хитозан не защищает протеолитический фермент от указанного негативного воздействия (при обязательной стерилизации); кроме того, за счет хитозана рН композиции сдвинут в кислую сторону, что нежелательно для эффективного заживления гнойных ран.

Полисахариды морских водорослей отличаются своим структурным многообразием и уникальными физико-химическими свойствами, гелеобразующей способностью, а также комплексной физиологической активностью. Им находят все большее применение и выявляют существенные преимущества при создании различных лекарственных форм, при введении субстанций препаратов в структуру полисахаридов [104,105,106].

**Альгинат натрия** (АН) – полисахарид, получаемый путем щелочной экстракции бурых водорослей. По своей структуре представляет полимерную цепь, которая состоит из остатков полиуроновых кислот (М-маннуроновой и Г-гулууроновой), связанных 1.4-β - связями.

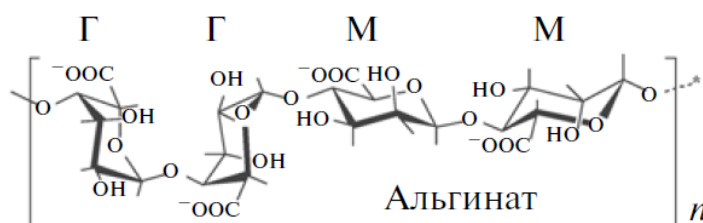


Рисунок 7- Структурная формула альгината натрия

Данный полимер обладает огромным спектром полезных свойств и, как было отмечено ранее, находит широкое применение в самых разных областях. Применение альгинатов основано на их способности к гелеобразованию и к структурированию растворов, а также стабилизации эмульсий. Благодаря своему уникальному микроэлементному составу, физико-химическим свойствам, хорошим связующим способностям АН широко используется медицинской практике как биологически активное вещество.

Альгинаты получают из бурых водорослей северных морей. Соотношение между мономерами меняется в широких пределах в зависимости от источника получения; а от соотношения мономеров и их распределения внутри цепи зависит структура альгинатов. Например, вязкость определяется количеством блоков полиманнуроновой кислоты, связывание двухвалентных металлов зависит от блоков гулууроновой кислоты. Альгинаты и альгиновые кислоты обладают рядом

свойств, объясняющих их широкое применение в медицине; отметим эти свойства:

- выраженный регенеративный и цитопротективных эффект для повреждения тканей;

- высокая сорбционная и дренирующая активность;

- ионнообменные свойства, лежащие в основе защиты организма от солей тяжелых металлов, способность элиминировать радионуклиды [107,108];

- противоаллергическое и иммуномодулирующее действие, способность стимулировать секрецию иммуноглобулина А, повышать барьерную функцию кожи и слизистых оболочек, оказывать местную специфическую защиту;

- способность восстанавливать функциональную активность макрофагов, обеспечивая их антимикробную и противовирусную активность;

- способность восстанавливать и стимулировать перистальтику желудка, оказывать обволакивающее действие на желудочно-кишечный тракт.

Кроме того, альгинат богат минеральными веществами (йод, кальций, магний, железо), обладает противоопухолевой активностью и противовоспалительным действием. Эти и другие свойства сделали альгинат одним из наиболее применимых в биотехнологии и медицине природным полисахаридом, используемым как при создании лекарств для перорального использования, так и медицинских изделий, в частности для направленной доставки введенных в него лекарств, причем позволяют рассматривать их не как вспомогательные субстанции, и как пролекарства [109].

Альгинаты применимы во всем мире: например, только в Англии используют в качестве раневых покрытий 20 различных вариантов альгината в 70 госпиталях; они разрешены для применения в США, в медицинской и пищевой форме выпускаются в России [87].

Учитывая активные регенерационные свойства, способность усиливать эпителизацию тканей, альгинат натрия активно применяется в создании раневых покрытий [110,111]. При контакте с раневой поверхностью, экссудатом, а также при смачивании лечебных изделий, содержащих альгинат натрия, полимерный

слой превращается в гидрогель, обеспечивая тем самым безболезненность перевязок и необходимый микроклимат в ране. Благодаря своему уникальному микроэлементному составу, альгинат стимулирует регенерационные процессы, а также обеспечивает пролонгирующий эффект для инкорпорированных в него активных компонентов. Важнейшим свойством альгинатов является гемостатическая активность, объясняемая наличием карбоксильных групп. Благодаря этому свойству известны такие препараты, как «Сорбалон», «Хамальган» и др., имеющие действие, подобное коллагену, образуя ячеистую структуру, на которой оседают форменные элементы крови, защищая, так же, рану от гиперрубцевания.

Альгинат используется в изготовлении лечебных покрытий для различных этапов регенерации ран на I, II, III стадиях раневого процесса, но каждый раз покрытия содержат различные лекарства и БАВ. В ООО «Колетекс» совместно с ООО «НПО «Текстильпрогресс» разработаны и успешно выпускаются лечебные полифункциональные средства «Колетекс» и «Колегель», содержащих в качестве основной полимерной субстанции альгинатный гидрогель, а в качестве лекарственных добавок-анальгетики, антисептики и др. препараты [112, 113,114]. При получении указанных изделий биополимер альгинат натрия выполняет функцию матрицы, «контейнера»-носителя лекарств, местно, направленно доставляемых к очагу поражения (рана, опухоль и др.), способствуя пролонгации их действия в требуемом месте. При этом проявляется возможность подвести к очагу поражения нужную по медицинским показаниям концентрацию лекарств. Отметим, что технологам достаточно легко варьировать вязкость альгинатной композиции и, соответственно, время биodeградации полимера. При этом в гидрогеле можно иммобилизовать очень широкий спектр препаратов, в том числе, малорастворимых, не снижая их активность. Показано, что в гидрогеле из альгината натрия можно физически иммобилизовать протеолитические ферменты (трипсин, лизоамидазу), практически не снижая их активность [65]. Это очень важные сведения для выполнения данного исследования, т.к. в нем предполагается разработать многофункциональную композицию, содержащую

как протеолитические ферменты, так и антисептики. К сожалению, в указанной работе нет данных по поведению физически иммобилизованных в альгинатном гидрогеле ферментов во время операции гамма-стерилизации. Обязательность этой операции требует специального изучения изменения свойств композиции под действием ионизирующего излучения.

Анализ природных полисахаридов с целью их использования для иммобилизации лекарств и создания «депо» для местного пролонгированного воздействия на рану на различных стадиях ее развития показывает, что все они не лишены недостатков. Это связано с различными факторами: значением pH, не всегда оптимальным для раневого процесса, технологическими проблемами при получении из них материала, экономикой и т.д. Учитывая сложность поставленной задачи – одновременного воздействия и на I, и на II стадию, вытекающую из этого многокомпонентность композиции, предпочтение следует отдать альгинату, как полимерной основе для дальнейшей работы.

Введение в альгинатный гидрогель лекарственных препаратов сможет обеспечить эффективное очищение гнойной раны, а также полноценную и эффективную регенерацию хронических ран [89]. Ввиду высокой регенерационной активности, а также антиоксидантных, иммуномодулирующих и физических свойств, можно рассматривать полимеры-полисахариды на основе альгината натрия как наиболее перспективную матрицу в отношении создания новых видов раневых покрытий с одновременным протеолитическим и антимикробным действием [115].

### **1.5 Взаимодействие альгината натрия и протеолитических ферментов**

Обязательным вопросом при разработке лечебной композиции является изучение возможного взаимодействия между компонентами, оценка влияния компонентов друг на друга. Разрабатывая лечебную полимерную композицию с ферментом папаином, необходимо проанализировать его возможное взаимодействие с альгинатом натрия, которое мы предполагаем использовать как основу композиции и «депо» для фермента папаина [116].

Существуют разные мнения относительно механизма взаимодействия альгината натрия и ферментов. В источниках указывается, что несшитый гидроколлоид

альгината натрия обеспечивает адсорбцию ферментного препарата протеаза С за счет координационных и водородных связей [117]. Для ковалентного связывания папаина и трипсина необходима модификация альгината (например, глутаровым альдегидом), карбонильная группа которого реагирует с аминогруппой фермента [118]. Авторы говорят о химической сшивке папаина в гранулах альгината, что вероятно, принимая во внимание сведения о ковалентных взаимодействиях между хитозаном и пектином с аналогичным участием амино- и карбоксильных групп полимеров [119,120,121].

Однако, общепринятым является мнение, что ассоциация между альгинатом и белковыми молекулами происходит за счет электростатического взаимодействия между противоположно заряженными аминокислотами и анионными макромолекулами полисахаридов. В глобуле папаина концевые фрагменты расположены диаметрально на поверхности разных ее частей, между которыми находится аминокислотная группировка активного центра. На N-конце молекулы аминокислотой является изолейцин, на С-конце – аспарагин. При этом оба конца молекулы папаина содержат аминокислоты, но поскольку они разнесены на разные стороны белковой глобулы, следует ожидать, что фермент может одновременно реагировать с двумя частицами альгината, которые в свою очередь могут через молекулу фермента объединяться в многозвенные укрупненные агрегаты [70]. Вероятно, особенность расположения реакционноспособных аминокислот оказывает большое влияние на поведение папаина в альгинате.

Стоит принять во внимание ранее указанный факт того, что реакция среды гнойного раневого отделяемого имеет кислую реакцию среды, и смещение параметров разрабатываемой гидрогелевой композиции в щелочную сторону позволит ускорить процессы лизиса, очищения и регенерации раневой поверхности. Очевидно, что при создании лечебной композиции на основе альгината натрия с иммобилизацией в нем папаина стоит рассмотреть особенности процесса сорбции фермента в структуре полисахарида и его зависимость от pH, что необходимо для научно обоснованного подхода к выбору состава композиции.

## **1.6 Роль антимикробных компонентов в процессе очищения и регенерации гнойных ран**

Держа во внимании основную цель данной научно-исследовательской разработки, а именно, создание комбинированного лечебного изделия на полимерной основе с ферментным препаратом и противомикробным компонентом, важно для правильного, обоснованного выбора препарата уделить внимание анализу средств, наиболее часто применяемых с этой целью.

Современный рынок раневых покрытий представлен большим спектром комбинированных изделий на полимерной основе с различными противомикробными компонентами [122]. Они имеют выраженное определенное действие, а именно, подавление роста патогенной микрофлоры, основными представителями которой являются бактерии семейств *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Niesseriaceae*, *Pseudomonadaceae* и др. Данная группа, безусловно, имеет ряд преимуществ, а именно, возможность местного введения большого количества препарата, по сравнению с системным применением, возможность снижения системных побочных эффектов, простоту в применении [123].

Однако, наряду с вышеуказанными положительными моментами, существует ряд весомых недостатков в применении противомикробных препаратов в составе местно используемых лечебных изделий. К ним относятся: риск развития местных аллергических реакций, возможность агрессивного воздействия на окружающие рану ткани, сложность в выборе и подведении необходимой дозировки, а также формирование резистентности к активным компонентам [124].

На сегодняшний день согласно протоколам Минздрава РФ при лечении гнойных ран активно используют хлоргексидина биглюконат (в основном, применяется в виде растворов различных концентраций); он является местным антисептиком, с преимущественно бактерицидным действием. Хлоргексидина биглюконат по химической структуре является дихлорсодержащим производным бигуанида. Механизм действия основан на его способности изменять свойства клеточной мембраны микроорганизма. Под действием препарата происходит

разрушение цитоплазматической мембраны бактерии и нарушение её осмотического равновесия, вследствие чего наступает гибель бактерии. Препарат оказывает сильное бактерицидное действие на грамположительные и грамотрицательные бактерии. Действие водной формы препарата является кратковременным, поэтому в последнее время стал активно применяться в иммобилизованной форме [125].

Однако, при длительном применении и большой вероятности накопления в раневой поверхности, хлоргексидин способен вызывать местнораздражающее действие, что важно учитывать в рамках лечения хронических, гнойных ран, требующих определенного времени.

Еще один широко используемый препарат, мирамистин – бензилдиметил [3-(миристоиламино) пропил] аммоний хлорид моногидрат. Он обладает выраженным антимикробным действием в отношении грамположительных (*Staphylococcus*, *Streptococcus*) и грамотрицательных (*Shigella*, *Pseudomonasaeruginosa*) бактерий, грибов, сложных вирусов, простейших, аэробной, анаэробной флоры, включая полирезистентные штаммы к лекарственным препаратам. Мирамистин относится к препаратам с низкой токсичностью, не обладает местно-раздражающим, аллергизирующим действием. В основе действия мирамистина лежит его прямое влияние на мембраны клеток микроорганизмов. В качестве преобладающего механизма выступает гидрофобное взаимодействие его молекулы с липидными мембранами, приводящее к фрагментации и разрушению микробной оболочки. При этом часть молекулы мирамистина «погружается» в гидрофобный участок мембраны микробной клетки и разрушает надмембранный слой, разрыхляет мембрану и повышает ее проницаемость для крупномолекулярных веществ [126,127].

Наряду с широким спектром противомикробных препаратов довольно часто используется Диоксидин. Форма его выпуска представляет собой раствор, в том числе, для местного, наружного применения. Диоксидин имеет выраженное действие в отношении синегнойной палочки, клебсиеллы, стафилококков, однако большая активность у него проявляется в анаэробных условиях. Механизм его



действия основан на нарушении синтеза ДНК микробной клетки. Известно о применении данного препарата в составе лечебного гидрогелевого материала «Колегель» с диоксидином и лидокаином, а также салфеток «Колетекс-АДЛ», которые применяются в рамках хирургических обработок ран с целью профилактики и уменьшения риска инфицирования, так же лечебных изделий фирмы «Все заживет». Существенным фактором в рамках разрабатываемой технологии получения лечебного изделия являются физические свойства активных компонентов, и, в данном случае, плохая растворимость диоксидина в воде затрудняет рассмотрение его на роль антимикробной субстанции. Кроме того, влияние высокой устойчивости некоторых штаммов бактерий, участвующих в формировании гнойного содержимого хронических, вялотекущих ран не позволяют сделать выбор в пользу данного препарата.

Рассмотрим общую схему механизма биоцидного действия антимикробных препаратов широкого спектра химического строения. Эта схема справедлива по отношению ко всем биоцидам, т.е. препаратам, которые затормаживают развитие патогенных микроорганизмов (бактерий, вирусов, грибов) или «убивают» эти патогены. Биоцид должен встретиться с мишенью (клетки патогенов), а также иметь сродство к функциональным группам на поверхности мембраны клетки микроорганизмов. Он должен иметь способность нарушать целостность стенки мембраны клетки патогена и проникать внутрь и химически реагировать с основными компонентами клетки патогена, воздействовать на компоненты (ДНК, РНК и др.), отвечающие за репликацию и размножение [128].

Для всех препаратов данной группы характерно проявление токсичности, что связано с их способностью взаимодействовать с клетками любой природы (микроорганизмы, онкоклетки). Для достижения эффекта биоцидности и снижения активности подбирают концентрации и условия применения.

Среди большого спектра противомикробных препаратов, количество и разнообразие которых увеличивается с каждым годом, одновременно растет и резистентность по отношению к ним. Учитывая этот факт, все больше внимания привлекают соединения серебра, которые проявляют свою максимальную

активность в отношении широкого спектра микроорганизмов [129,174]. Наиболее часто применяется в качестве бактерицидного и бактериостатического агента нитрат серебра. Его активное применение начинается с XX века, после установления мощного противомикробного эффекта 1% раствора нитрата серебра. Антибиотикотерапия имеет свое значимое место в рамках лечения гнойных ран (например, гентамицин), но при длительном или повторном применении данной группы препаратов существует высокая вероятность формирования резистентности. На сегодняшний день альтернативой являются препараты серебра, в том числе нитрат серебра - это препарат широкого спектра действия, активность которого проявлена к более чем 500 патогенов, в отношении антибиотико-резистентных, аэробных и анаэробных микроорганизмов [130].

Серебро – природный, экологически чистый компонент, не загрязняющий природу. Являясь сильным биоцидом для микробов и вирусов, ионы серебра, в отличие от других металлов, гораздо менее токсично для многоклеточных организмов. В отличие от многих антимикробных компонентов, к которым сформировалась резистентность, ионы серебра убивают многих возбудителей на 100%, не давая им мутировать и размножаться. Наиболее известны препараты на основе катионного серебра в составе солей (нитратов, сульфатов), а также в составе оксида серебра.

Согласно данным, активные свойства серебра определяются действием ионов, образующихся при диссоциации соли в водной среде. Механизм действия заключается в воздействии на пептидогликаны клеточной мембраны, ввиду чего клетка теряет жизнеспособность. Под воздействием серебра происходит ингибирование трансмембранного транспорта  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , нарушаются жизненно важные функции клетки, вследствие чего она гибнет. [131,132,133]. Также, при взаимодействии с карбоксильными и аминогруппами пептидогликанов идет образование металлопротеиновых комплексов. Как следствие, происходит нарушение транспорта кислорода внутрь бактериальной клетки, ведущее к гибели. Как антисептик сегодня наиболее применим нитрат серебра.



Рисунок 8- Воздействие ионов серебра на клеточную стенку

Все вышеуказанные положительные стороны соли нитрата серебра как антимикробного агента, позволяют его рассматривать в качестве основного компонента нашей разрабатываемой лечебной системы, применяемой в отношении гнойных ран. На сегодняшний день на рынке присутствует большой выбор лечебных препаратов и изделий с серебром, например, повязки Atrauman Ag (Германия), крем Аргосульфан (Польша) и т.д., однако, в их составе отсутствует ферментный препарат.

Принимая в качестве активного противомикробного компонента металл, в виде соли серебра, важно учитывать, согласно литературным данным, его ингибирующую способность в отношении ферментов [161]. Механизм данного действия связан как с конкурентным взаимодействием с субстратом в отношении активного центра, так и вероятностью взаимодействия с группами в составе фермента, тем самым снижая его активность. Учитывая данный факт, представляется необходимым в нашей исследовательской работе найти такие пути решения задачи, чтобы каждый из активных компонентов разрабатываемой лечебной системы не снизил, а сохранил свою специфическую активность.

Однако, из источников, так же, известно о синергическом эффекте металла и фермента в ходе лечения гнойных ран, с использованием ионов серебра в качестве комплексообразователя, в качестве лиганда - фермента [26,134]. Эти данные нам следует принимать во внимание на этапе изучения взаимодействия активных компонентов, а также дальнейшей разработки технологической схемы получения лечебного изделия с ферментом и нитратом серебра.

С целью получения наночастиц применяются разные способы, основанные на использовании восстановителей ионов металла [135].

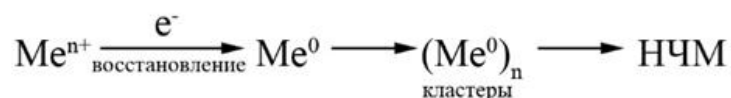


Рисунок 9- Схема получения НЧМ

Среди таковых используют биологически активные вещества, например, флавоноиды (кверцетин). Наряду со многими способами химического синтеза применение кверцетина делает синтез более безопасным [137]. Со временем данный способ был усовершенствован одновременным применением обратных мицелл наряду с флавоноидами [138]. Однако в данном способе для синтеза используют органические растворители, когда как для применения в медицине, это нежелательно, очень сложно, т.е. требуются водорастворимые формы. Также известно об использовании в качестве восстановителя глюкозы или цитрата, но несмотря на положительный факт - отсутствие токсичности данных компонентов, они обладают низкими восстановительными свойствами, что обеспечивает сравнительно низкий выход синтезированных наночастиц.

Существует несколько способов производства (синтеза) наночастиц благородных и тяжелых металлов: физические, химические, физико-химические. Все эти методы имеют недостатки. Физические и физико-химические методы очень дорогие и требуют использования специального оборудования (лазеры, вакуум, высокие температуры). В химических методах используют токсические вещества. Все большую актуальность набирает «зеленый» биосинтез наночастиц серебра с использованием растительных компонентов, водорослей, бактерий, в качестве биовосстановителей, превращая ионы неорганических металлов в структурированные частицы [139,140,141]. Одним из таких примеров является применение экстракта кожуры папайи. При увеличении концентрации экстракта кожуры происходит увеличение размера структурированных частиц серебра. Наличие аминогруппы и карбоксильной группы в реакционной смеси способствуют восстановлению ионов серебра до наночастиц. Указывается о

подтверждении антибактериальной активности полученных структурированных частиц в отношении двух бактериальных штаммов: *E.coli* и *S. Aureus* [142,143].

Из источников так же известно об успешном применении наночастиц серебра с высоким противомикробным эффектом и низкой токсичностью, полученных на основе природных полисахаридов [83,84]. Данный способ представляется наиболее актуальным и целесообразным для более детального рассмотрения в рамках нашей исследовательской работы.

Ввиду стремительного развития нанотехнологий, в активном изучении и применении находится наноформа серебра. Известно, что форма серебра в виде наночастиц может проявлять большую бактерицидную активность ввиду увеличенной площади своей активной поверхности для взаимодействия в среде при меньшей токсичности, чем у катионного серебра [144]. В сравнении с ионным серебром проявляют стойкую антибактериальную активность и более пролонгированный эффект [145]. Существуют различные способы получения наночастиц серебра, среди которых фотолиз, химическое восстановление, радиационные способы, однако, им присуще такие недостатки, как нестабильность и окисление полученных наночастиц во время хранения. Применение биоактивных полисахаридов морских водорослей ввиду их восстановительной активности становится популярным и перспективным методом получения структурированных частиц серебра [146]. В литературе указано об их противомикробной активности и доказательствами явных преимуществ наночастиц серебра, полученных на основе альгината натрия, в сравнении с добавкой в лечебную композицию лекарственного антимикробного препарата диоксида [147].

Принимая во внимание данные источников [139] относительно получения стабилизированных форм наночастиц серебра, в первую очередь следует отметить вариант взаимодействия ионов серебра с функциональными группами СОО- и ОН- альгината натрия при влиянии щелочной среды.

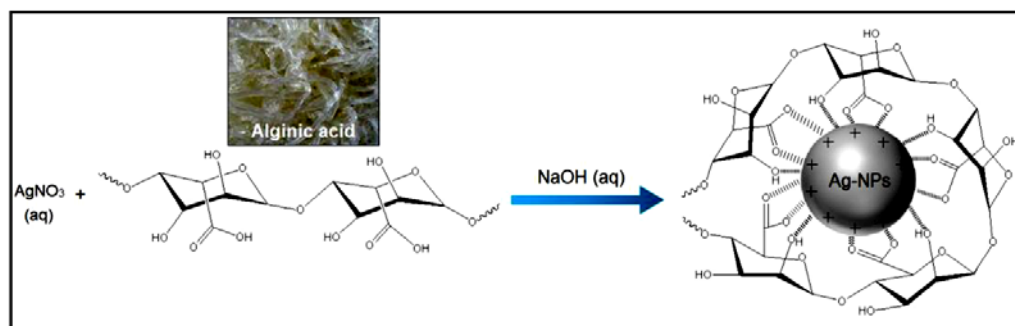


Рисунок 10- Схематичное изображение взаимодействия альгината натрия и нитрата серебра в щелочной среде.

Показатель pH важен с той позиции, что, обеспечивая в разрабатываемой полимерной лечебной композиции на основе полисахаридов необходимую реакцию среды (6-7,5 ед), тем самым создаются необходимые условия для усиления восстановительных свойств полимера (АН), что, как следствие, способствует увеличению количества наночастиц серебра [140].

Существует ряд факторов, воздействуя на которые мы можем добиться целей, поставленных в данной исследовательской работе, способствуя тем самым эффективности терапии гнойных ран [148, 149]. О необходимости создания влажной среды для эффективного лечения говорилось ранее. Поддержание микроклимата раны возможно за счет полимерной матрицы-основы лечебного изделия. Однако, важная роль рядом авторов отводится как показателю pH среды раневой поверхности, так и pH компонентов, которыми будут оказывать лечебное воздействие [30,31].

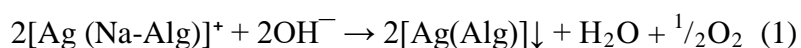
В рамках разработки технологии получения лечебного изделия на полимерной основе для терапии гнойных ран на I-II стадии, создание необходимой реакции среды (щелочной) будет способствовать достижению сразу нескольких целей. Во-первых, это создание благоприятной среды для усиления лизиса некротического содержимого раневой поверхности, что ускорит регенеративные процессы. Во-вторых, сдвиг pH в щелочную сторону в присутствии восстановителя АН способствует образованию структурированных частиц серебра, присутствие которых одновременно с ионами серебра, а также с формирующимися металлокомплексами фермента, усиливает общий антимикробный эффект изделия.

Таким образом, воздействуя на рН в области раневой поверхности с помощью непосредственно лечебной гидрогелевой композиции на основе полисахаридов (в случае глубоких ран), а также применяя лечебное изделие на ТМ для ран более поверхностных, достигая нужного значения рН полимерной основы на этапе приготовления композиции, мы можем варьировать (увеличить) скорость лизиса некротических тканей и очищать рану от экссудата, способствуя регенерационным процессам.

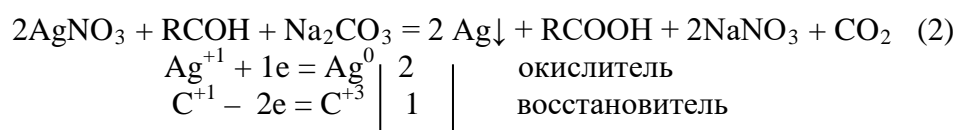
Вопрос лечения гнойных ран с применением иммобилизованного фермента и противомикробного компонента серебра изучался так же рядом авторов. Сообщается об успешном изучении и применении в рамках терапевтической программы текстильных металлохелатов, где в качестве лиганда выступает трипсин, а ионами комплексообразователями служат серебро и медь [136]. Также сообщается об успешно проведенных испытаниях на крысах и собаках с обоснованием эффективности применения металлокомплексов трипсина при иммобилизации на текстильной матрице. Полученные результаты подтверждают синергический эффект фермента и серебра, что позволяет получить активность каждого из компонентов, снизив при этом их количество. Чувствительность к данному комплексу в рамках данного исследования продемонстрировали порядка 80-89% штаммов тест-культур и микроорганизмов. Многокомпонентность предлагаемой нами композиции требует для своего технологического воплощения изучения особенностей поведения в реальных условиях всех составляющих и оценки их возможного влияния на свойства друг друга.

Вопрос взаимодействия всех основных компонентов системы полимер (альгинат натрия)-фермент (папаин) – серебро нами рассматривался и будет изучаться в представленном исследовании как с точки зрения влияния на построение технологического процесса получения лечебного гидрогелевого материала, так и эффективности его использования. Получение наноразмерных форм ноль-валентного серебра и их стабилизация в растворах альгината натрия изучалось многими исследователями, объясняющими проявление альгинатом восстановительных свойств наличием в макромолекуле большого количества

карбоксильных (-COO) и гидроксильных (-OH) функциональных групп: при этом считалось, что стабилизация происходит посредством образования Ван-дер-Ваальсовых сил между отрицательным зарядом гидроксила и ацетильными группами, присутствующими в молекулярной структуре альгината с положительным зарядом, стабилизированная наночастица обозначена как Ag-NPs [137,138]. По мнению [137,138,139] образование стабилизированной наночастицы в результате взаимодействия комплекса  $[Ag(NaAlg)]^+$  с гидроксилами и восстановление ионов серебра происходит по схеме



Это мнение не разделяют авторы [140-143], предполагающие, что в присутствии восстанавливающих олиго-и полисахаридов- синтез коллоидного серебра осуществляется в результате окислительно-восстановительной реакции с участием альдегидной группы, расположенной на редуцирующем конце молекулы



Реакция легко фиксируется по появлению коричневой окраски раствора, что нами и наблюдается экспериментально. Для наших целей важна кинетика формирования структурированных частиц Ag-NPs под действием восстановителей и, в частности, альгината натрия, и влияние на этот процесс щелочной среды, что должно учитываться при построении технологического процесса получения лечебной композиции. Считается, что в присутствии сильных восстановителей формирование частиц Ag-NPs происходит не мгновенно, а через ряд промежуточных стадий [144,145], где кластер  $Ag_8^{2+}$  оказывается достаточно устойчивым:

$$Ag_2^+ \rightarrow Ag_3^{2+} \rightarrow Ag_4^{2+} \rightarrow Ag_8^{2+} \quad (3)$$

и для превращения  $Ag^+$  в Ag-NPs требуется определенное время (например, в присутствии глюкозы требуется не менее 48 часов) [146]. Эти вопросы, как и возможность взаимодействия серебра и папаина, требуют рассмотрения в рамках создания технологии получения лечебных материалов для использования на I-II стадиях раневого процесса.



## Глава II. Используемые материалы и методы

Ниже приведены данные о материалах и объектах, которые выбраны нами для разработки лечебных материалов.

Таблица 2 - Ферменты, используемые в работе

| Объекты исследования, химическое строение | Техническая характеристика, область применения  | Производитель, техническая документация                   |
|---|---|---|
| Папаин                                    | Полипептид, протеолитический растительный фермент. Протеолитическая активность от производителя: не менее 600 TU/mg Мелкодисперсный порошок от белого до кремового цвета, с характерным запахом. Водорастворим. | ООО «Натуринг»<br>Соответствие требованиям ТР ТС 021/2011 |
| Бромелаин                                 | Полипептид, протеолитический фермент ананаса. Аморфный порошок светло-желтого цвета, слегка своеобразный запах. Активность от производителя: не менее 600 TU/mg Водорастворим.                                  | ООО «Натуринг»<br>Соответствие требованиям ТР ТС 021/2011 |
| Химопсин                                  | Смесь трипсина и химотрипсина. Белый порошок с желтоватым оттенком. Ферментный препарат протеолитического действия.   | ООО «Самсон-Мед»<br>ЛС-000130                             |

Таблица 3 - Полимеры и материалы, используемые в работе

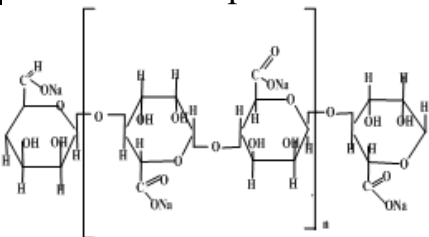
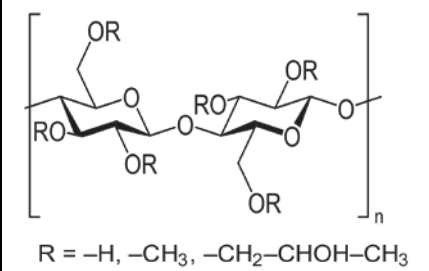
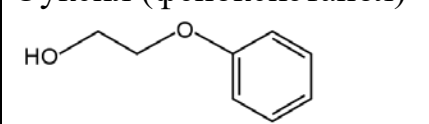
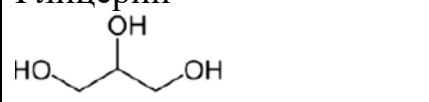
| Объекты исследования,<br>химическое строение  | Техническая<br>характеристика,<br>область применения  | Производитель,<br>техническая<br>документация   |
|---|---|---|
| <p>Альгинат натрия</p>   | <p>Пластинки с кремовым или сероватым оттенком. Биосовместим, биоразлагаем. В воде происходит набухание полимера и образование гидрогеля.</p>                             | <p>ОАО<br/>«Архангельский опытный водорослевый комбинат»<br/>ТУ 10.89.19-007-4169896-2019</p> |
| <p>Гидроксипропил-метилцеллюлоза</p>  <p>R = -H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>3</sub></p> | <p>Белый или с желтоватым оттенком кристаллический порошок; без запаха Растворим в воде; растворимость в органических растворителях превосходит растворимость в воде.</p> | <p>Сертификат анализа<br/>№20190831</p>   |
| <p>Серебро азотнокислое<br/>AgNO<sub>3</sub></p>  | <p>Кристаллы белого цвета, легко растворяются в воде.</p>   | <p>ГОСТ 1277-75</p>   |
| <p>Эуксил (феноксиэтанол)</p>    | <p>Бесцветная жидкость с характерным запахом. Ограничено растворим в воде. Хорошо растворим в спиртах, эфирах, кетонах.</p>   | <p>Сертификат анализа 3.1<br/>EN 10204</p>  |
| <p>Глицерин</p>    | <p>Бесцветная вязкая гигроскопическая жидкость без запаха и цвета.</p>  | <p>Гост 6259-75</p>   |

Таблица 4 - Текстильные материалы, используемые в работе

| Объекты исследования   | Техническая характеристика, область применения | Производитель, техническая документация |
|--|--|---|
| Полотно трикотажное поли-функциональное ПФ-2 комбинированное с эффектом поверхностного застила | Полотно комбинированное из хлопкоэфирных нитей | ТУ 17-09-14-375-91                      |
| Полотно холстопрощивное нетканое гигроскопическое  | Полотно комбинированное из хлопкоэфирных нитей | ТУ 17-14-283-87                         |

## 2.1 Методика определения протеолитической активности фермента методом Кунитца

Данный метод является модификацией метода Кунитца. Основан на гидролизе казеина по Гаммерстену анализируемым ферментным препаратом до пептидов и аминокислот с последующим их определением.

В три пробирки объемом 10 мл. приливают 2,0 мл 0,067М фосфатного буферного раствора с рН=8,0 и 2,0 мл 2 % раствора казеина по Гаммерстену. Пробирки закрывают пробками и помещают в термостат при температуре 37°C. По истечению 10 мин в опытные пробирки добавляют анализируемый раствор. Реакцию останавливают через 25-30 минут (точное время отмечают по секундомеру) добавлением в опытные пробирки по 4 мл 10 % р-ра ТХУ. Через 15 мин раствор центрифугируют течение 15 минут при 14000 оборотах/мин. В фильтрате СФМ определяют оптическую плотность при длине волны 280 нм (кювета толщиной 10 мм). В контрольную пробирку добавляют 4 мл 10 % раствора ТХУ, затем анализируемый раствор.

Протеолитическую активность  $X$  вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(A_1 - A_2) \times V \times V_1}{a \times K_T \times V_0 \times t} \text{ (ПЕ)} \quad (4)$$

$A_1$  - оптическая плотность испытуемого раствора при 280 нм;  $A_2$  - оптическая плотность контрольного раствора при 280 нм;  $V_1$  - объем испытуемого раствора, мл;  $V$  - объем реакционной смеси в пробирке, мл;  $V_0$  - объем аналитической пробы субстанции, мл;  $a$  - навеска субстанции, в г;  $K_T$  - тирозиновый коэффициент - 1,20;  $t$  - время реакции, мин.

## 2.2 Методика определения количества иммобилизованного белка методом Лоури

Расчёт содержания белковых веществ  $P$  (мг/л), проводили по формуле (5)

$$P = C * N, \text{ (5)}$$

Где  $C$  - концентрация белка, установленная по калибровочному графику, мг/дм<sup>3</sup>,  
 $N$  - разведение раствора.

Содержание низкомолекулярных белковых веществ определяли модифицированным методом Лоури предварительным осаждением белков и высокомолекулярных пептидов 50%-ной трихлоруксусной кислотой. Расчет содержания низкомолекулярных белковых веществ, не осаждаемых 50%-ной ТХУ,  $PP$  (мг/дм<sup>3</sup>), проводили по формуле (6):

$$PP = 2 * C * N, \text{ (6)}$$

где  $C$  - концентрация белковых веществ, установленная по калибровочному графику, мг/л,  $N$  - разведение испытуемого раствора; 2 - разведение при добавлении ТХУ.

Для определения белка, иммобилизованного на текстильном носителе, использовали модифицированный метод Лоури (метод Лоури-Гартри). Модификация метода состоит в усилении окраски при восстановлении реактива

Фолина, когда белковый раствор инкубируется с более концентрированным медно-тарtratным раствором (реактив Фелинга) при 50°C. Это приводит к линейному соотношению между концентрацией белка и оптической плотностью развивающейся окраски. Массу иммобилизованного белка (мг) на 1 грамм носителя вычисляли по формуле (7):

$$g = \frac{C_0 \cdot \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \cdot m_{p-pa}}{g_w \cdot 0,95} + \frac{C_0 \cdot \frac{A}{A_0}}{g_w \cdot 0,95}, \text{ МГ} \quad (7)$$

где  $g$  – масса иммобилизованного фермента (мг) на 1г носителя;  $C_0$  – начальная концентрация фермента до иммобилизации, мг/мл;  $A$  – активность фермента после иммобилизации, Ед/г;  $A_0$  – активность фермента до иммобилизации, Ед/г;  $g_w$  – масса носителя после иммобилизации, мг; 0,95 – коэффициент, характеризующий влажность носителя.

### 2.3 Определение протеолитической активности фермента по методу Ансона

Метод основан на определении скорости ферментативной реакции гидролиза белка (гемоглобина). Осаждают нераспавшийся белок 10% ТХУ и в фильтрате определяют количество не осаждаемого ТХУ белка колориметрической реакцией с реактивом Фолина. Принимается, что количество не осаждаемого белка пропорционально количеству находящегося в фильтрате тирозина.

В результате реакции образуется комплексное соединение, благодаря которому раствор окрашивается в голубой цвет. Интенсивность окраски измеряли с помощью ФЭКа, длина волны 670 нм. Протеолитическую активность рассчитывали по формуле (8):

$$ПА_k = \frac{A \cdot 4 \cdot 1000}{ТЭ \cdot 10a}, \quad (8)$$

где  $A$  – оптическая плотность испытуемого раствора; 4 – объем реакционной среды; ТЭ – тирозиновый эквивалент; 10 – время гидролиза, мин;

За единицу протеолитической активности в методике принимали количество фермента, катализирующее за 1 минуту при 30°C переход в не осаждаемые ТХУ продукты гидролиза гемоглобина, соответствующем 1 мкмоль тирозина.

#### **2.4 Определение подлинности композиции по папаину**

Подлинность композиции на основе альгината натрия по папаину определяли по створаживающему действию фермента на растворы молока.

Реактивы. Кальций хлорид б/в, вода дистиллированная, кислота уксусная, натрия ацетат безводный. Молоко центрифугировали 30 мин и лиофильно высушивали. Хранили в стеклянной банке с притертой крышкой в темном, прохладном месте. Сухое обезжиренное молоко, 0,75 г растирали в ступке с небольшим количеством воды. Полученную массу переносили в цилиндр вместимостью 50 мл, добавляли 1 мл 3М раствора кальция хлорида и 5 мл 1 М ацетатного буфера (рН 5,6), доводили водой до 50 мл и перемешивали. Раствор молока готовили непосредственно перед проведением анализа.

Приготовление 1М ацетатного буфера (рН 5,6).

5,8 мл уксусной кислоты ледяной помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали. 13,6 г натрия ацетата безводного помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в воде, объем раствора доводили водой до метки и перемешивали. Смешивали полученные растворы в объемном соотношении 5,5:44,5. рН буферной смеси 5,6

Около 12 мг препарата (точная навеска) растворяли в 4 мл 0,1 М ацетатного буферного раствора (рН 5,6). В 3 пробирки вместимостью 10 мл вносили по 3 мл раствора молока и пробирки прогревали в течение 15 мин при  $(35,5 \pm 0,5)$  °С. В 2 пробирки добавляли по 0,5 мл раствора испытуемой субстанции, перемешивали и отмечали время. Конец реакции отмечали по появлению первых признаков створаживания. В контрольную пробу (3-я пробирка) к раствору молока добавляли 0,5 мл 0,1 М ацетатного буферного раствора (рН 5,6). И выдерживали в термостате 60 мин. Молоко не должно свертываться.

Створаживающая активность выражается временем, прошедшим с момента добавления субстанции до появления первых признаков створаживания молока. Время створаживания для субстанции должно быть не более 50 сек.

### **2.5 Методика определения pH - среды**

Анализ pH-среды проводили с помощью pH-метра «Рисоло», который занесен в Госреестр №14300-99. Данные pH-метры предназначены для определения степени кислотности или щелочности водной среды и могут использоваться как в лабораторных, так и в полевых условиях.

Электрод опускали в буферный раствор со значением pH, близким к рабочему диапазону, и регулировали значение подстроенным резистором компенсации (OFFSET), пока индикатор не покажет соответствующее значение.

1) Электрод погружали в буферный раствор с pH 7.01 при 25 °С и устанавливали показания при помощи подстроенного резистора OFFSET

2) Электрод погружали в буферный раствор с pH 4.01 при 25 °С (или 10,01) и устанавливали показания табло, при помощи подстроенного резистора SLOPE.

### **2.6 Приготовление композиции на основе альгината натрия.**

Состав полимерной композиции: альгинат натрия (сухой препарат), дистиллированная вода.

Навеску сухого полимера-загустителя (альгинат натрия) взвешивали на аналитических весах Sartorius CP 64 с точностью до 0,001г и небольшими порциями, при постоянном перемешивании на тихоходной мешалке 10 мин., помещали в необходимый для получения раствора нужной концентрации объем дистиллированной воды (количество вводимого полимера зависит от требуемой концентрации загустки) и выдерживали в течение 24 часов для дальнейшего набухания. Затем перемешивали с помощью тихоходной мешалки 10 мин. и выдерживали 1 час.

### **2.7 Приготовление композиции на основе гидроксипропилметилцеллюлозы**

Состав полимерной композиции: Гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) (сухой препарат), дистиллированная вода.

Полимерную композицию готовили следующим образом: навеску сухого полимера - загустителя (ГПМЦ) взвешивали на аналитических весах Sartorius CP 64 с точностью до 0,001г и небольшими порциями, при постоянном перемешивании на тихоходной мешалке 20 мин., помещали в необходимый для получения раствора нужной концентрации объем дистиллированной воды (количество вводимого полимера зависит от требуемой концентрации загустки) и выдерживали в течение 24 часов для дальнейшего набухания. Затем перемешивали с помощью тихоходной мешалки 20 мин. и выдерживали 1 час.

### **2.8 Методика приготовления модели гнойной раны**

Для приготовления модели готовили раствор, который затем, загустевал, образуя густую желированную прозрачную массу, используя два раствора: с животным и морским коллагеном. Для приготовления сухие смеси гидролизатов в соотношении 1:1 с добавлением 0,10 г. гиалуроновой кислоты оставляли на 3 часа до полного набухания в 200 мл дистиллированной воды при регулярном перемешивании (1 раз в час) ручным миксером ( $V=500$  об./мин); pH полученной композиции 5,7. Полученную смесь полимеров заливали в форму для дальнейшего застывания в холодильной камере при  $t$  5°-7° градусов Цельсия. Из полученной застывшей гидрогелевой смеси (имеющей вид желе) по специальному шаблону вырезали бруски одинаковой массы, которые дополнительно взвешивали на весах с точностью до 0,01г.

### **2.9 Методика изучения антимикробной активности**

Изучение антимикробной активности проведено на референтном штамме *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Для культивирования *S. aureus* использовали 5% кровяной колумбийский агар. Суточную агаровую культуру тест-микроорганизма смывали стерильным физиологическим раствором до концентрации  $1,2 \times 10^9$  КОЕ/мл по стандарту МакФарланда, полученную бактериальную взвесь путём десятикратного разведения в бульоне Мюллера-Хинтона до концентрации  $1,2 \times 10^8$  микробных клеток в 1 мл. Исходная концентрация приготовленного инокулюма контролировалась путём титрования и высева на плотные питательные среды. Приготовленная бульонная культура *S.*



aureus ATCC 29213 была разлита в 5 пробирок по 2мл. В пробирки №1-№4 были внесены образцы исследуемых салфеток, каждая размером 2см<sup>2</sup>.

В качестве контроля служила пробирка №5 с исходной бульонной культурой тест-штамма. Все пробы инкубировали в термостате при  $t = 35^{\circ}$ , через 24 часа - делали высевы на чашки с плотной питательной средой с последующим (через 24ч. инкубации чашек с посевами) подсчётом количества выросших колоний.

## 2.10 Методика определения реологических свойств биополимерной композиции.

Определение вязкостных свойств полимерных композиций на каждом этапе проводили с помощью ротационного вискозиметра «Brookfield RVDV-II+» и анализировали их реологические характеристики. Принцип работы вискозиметра Brookfield DV-II+PRO основан на вращении измерительного шпинделя, который погружен в тестируемую жидкость, посредством калибровальной спиральной пружины. Каждый шпиндель характеризуется двумя константами, которые используются для расчета вязкости, напряжения сдвига и скорости сдвига.



Рисунок 11 - Ротационный вискозиметр «Brookfield RVDV-II+».

В качестве контейнеров для измерения вязкости использовали стаканы Гриффина. Для выполнения измерения вязкости выбирается код измерительного шпинделя и задается скорость вращения, производится измерение.

### **2.11 Методика определения высыхаемости гидрогелевых композиций**

Образцы гидрогелей помещают в чашки Петри с постоянной площадью 10,0 см<sup>2</sup> и высотой 0,5 см. Заполняют до краев, избегая образования пузырьков воздуха, излишки удаляют стеклянной палочкой, образуя ровную поверхность испарения, определяют массу на аналитических весах. Подготовленные таким образом чашки с гелями хранят в течение 20 суток при температуре 20±2°С и относительной влажности 45-50%. Взвешивание образцов проводят ежедневно в течение первых 5 дней. Убыль в весе выражают в процентах по отношению к первоначальной массе.

### **2.12 Методика нанесения полимерной композиции на текстильный материал**

Подготовленный к печати текстильный материал фиксировали на горизонтальном, специально оборудованном печатном столе. Полимерную композицию наносили на материал с помощью резиновой ракли через сетчатый шаблон из полиамидной ткани с ситом № 23-32. Количество проходов ракли зависит от требуемой концентрации гидрогелевой композиции на текстильном материале и глубины проникновения композиции в тканевый материал. В нашем случае экспериментально установлено число проходов равное 6.

### **2.13 Методика определения влагоемкости текстильного материала**

Для определения влагоемкости текстильного материала выполняли следующие действия: взвешивали образец текстильного материала ( $w_1$ ) размером 4x2 см. Далее образец помещался в чашку Петри. Добавляли дистиллированную воду при температуре 20-25°С. Объем взятой воды определяли по формуле:

$$m = w_1 * 40, \text{ где (9)}$$

$w_1$  - масса образца до погружения в воду,

Чашку Петри оставляли на 30 минут при комнатной температуре. Забор материала проводили с помощью щипцов, и материал выдерживали 30 секунд, далее повторно взвешивали ( $w_2$ ). Влагоемкость выражали через изменение веса за счет впитывания воды, по формуле:

$$M = \frac{w_2 - w_1}{w_1} * 100\% \quad (10), \text{ где}$$

w<sub>1</sub>- масса образца до погружения в воду,

w<sub>2</sub>- масса образца после погружения в воду.

За окончательный вариант испытания принимали среднее значение результатов пяти измерений.

#### **2.14 Методика определения рН водной вытяжки**

В соответствии с ГОСТ Р ИСО 3071-2008, образец ТМ весом (2,00 ± 0,05) г, шириной 5 см, и 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды помещали в закупоренную колбу. Колбу взбалтывали в течение короткого периода времени руками, затем встряхивали механически в течение 2 ч ± 5 мин. Проводилось три параллельных испытания. Первую порцию испытуемого раствора наливали в химический стакан, в который далее погружали электрод на глубину 10 мм при помешивании стержнем до стабилизации показаний рН метра. В другой химический стакан наливали вторую порцию экстракта, быстро погружали в него электрод, не смывая оставшуюся на нем жидкость и не перемешивая, на глубину 10 мм до стабилизации значения рН. Аналогично поступали с третьей порцией экстракта. Фиксировали значения рН второго и третьего экстрактов как первое и второе измерение, разница между которыми не должна превышать 0,2 единицы рН и рассчитывали среднее значение результатов измерений.

#### **2.15 Определение прилегаемости**

Прилегаемость– способность текстильных материалов в подвешенном состоянии под действием собственного веса образовывать мягкие складки. Основным фактором, от которого зависит прилегаемость материала, является его жесткость к изгибу. Наиболее подходящий вариант определения - по методу В. Я. Евдокимова и А. К. Бухаровой,

На образцах материалов размером 400X200 мм намечали (по стороне 200 мм) точки 1, 2, 3, 4. образцы подвешивали к стойке, накалывая их по намеченным точкам определенным образом, чтобы получилось три складки, из которых

центральная была обращена к экспериментатору. Образец зажимали между пробками. В подвешенном состоянии образец оставляли на 30 минут, далее замеряли масштабной линейкой по нижнему краю образца расстояние А. При низкой прилегаемости это расстояние будет близким к ширине образца в расправленном виде. Прилегаемость (%) материалов вычисляли по формуле (11):

$$Д = 100 - 0,5А \quad (11)$$

### **2.16 Методика определения привеса текстильного материала после нанесения полимерной композиции**

С целью установления количества полимерной композиции (г), которое необходимо нанести на единицу площади ( $1 \text{ см}^2$ ) ТМ в ходе печатания применяли данную методику. Из напечатанного ТМ вырезали образцы размером ( $1 \times 1$ ) см и взвешивали с точностью до 0,0001 г. на аналитических весах. Отбор проб с нанесенной композицией проводился после печати, а также после сушки. За образец сравнения был взят исходный ТМ без композиции. Привес (П) в процентах вычисляется по формуле:

$$П = \frac{M_k - M_q}{M_q} \cdot 100, \quad (12)$$

$M_k$  - масса образца с нанесенной полимерной композицией, г.

$M_q$  - масса образца без композиции, г.

### **2.17 Методика исследования кинетики массопереноса лекарственных препаратов из текстильного материала в жидкие модельные среды**

В рамках разработки технологического режима производства лечебных изделий необходимо оценить кинетику высвобождения ферментного препарата из лечебного ТМ и проникновения во внешнюю среду (ранеую поверхность).

Участок салфетки определенной площади взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,0001 г. Помещали в коническую колбу на 100 мл, содержащую модельную среду (дистиллированную воду, буферный раствор, БСА) на необходимое количество времени. В полученных экстрактах определяли содержание белка с помощью метода Лоури.

## 2.18 Стерилизация в промышленных условиях

Производственный процесс характеризуется выпуском партий большого объема. Требуется проводить стерилизацию на промышленном оборудовании. Электронно-лучевую обработку проводили в ОАО «Научно-исследовательский институт технической физики и автоматизации» на ускорителе У-003, характеризуемом энергией электронов 5 МэВ, током ускорителя 600 мкА, током развертки пучка 10 А, согласно документам, утвержденным Росздравнадзором РФ. Регламентированной для промышленно выпускаемых лечебных салфеток «Колетекс®» является доза, которая обеспечивает показатель стерильности на срок, определенный ТУ- 15 кГр, для гидрогелевых материалов «Колегель®» – 6 кГр. Аналогичные дозы облучения (стерилизации) применялись в исследовательских целях для изучения влияния ионизирующей радиации.

## 2.19 Методика расчета ошибки эксперимента

Величины, полученные в результате эксперимента, могут неизбежно содержать погрешности, ввиду различных причин. Погрешности могут относиться к случайным и систематическим. Случайные могут появляться ввиду различных причин в ходе проведения эксперимента. Систематические могут быть учтены либо устранены (ошибки вследствие внешних условий при проведении опыта).

Коэффициент вариации служит относительной характеристикой рассеяния случайной величины  $S$  вокруг своего среднего значения  $\bar{y}$ :

$$V = \frac{S}{\bar{y}} \times 100 \quad (13)$$

где  $V$  – коэффициент вариации, %;  $S$  – стандартное отклонение;  $\bar{y}$  - среднее значение.

Среднеквадратичное (стандартное) отклонение характеризует разброс случайной величины вокруг ее математического ожидания:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}} \quad (14)$$

где  $S$  – стандартное отклонение для выборки;  $n$  – число испытаний,  $y_i$  – результат  $i$ -го испытания ( $i=1, 2, \dots, n$ );  $\bar{y}$  – среднее значение случайной величины

### Глава III. Результаты и обсуждение

Особенностью материалов, применяемых на I-II стадиях раневого процесса, является способность воздействовать на поврежденные ткани и раневой экссудат, одновременно создавая условия для регенерации поврежденных тканей. Отсюда следует, что каждый из компонентов, входящих в состав данных материалов, должен обладать рядом свойств и характеристик, формируя, в конечном счете, единый лечебный полифункциональный комплекс из текстильной основы (в случае создания салфеток), биополимеров и включенных в структуру БАВ или субстанций-лекарственных препаратов.

Создание современных эффективных лечебных материалов, в т.ч. на текстильной основе, требует точного соблюдения требований заказчиков – врачей, использующих их для лечения больных, причем каждая область медицинского использования выставляет к создаваемым изделиям свои требования, что приводит к необходимости разработки различных модификаций одного и того же изделия.

С целью достижения максимального терапевтического эффекта при лечении гнойных ран на 1-2 стадии решено было разработать два вида медицинских изделий: гидрогель для хронических глубоких ран на основе природных полисахаридов с иммобилизованным ферментным препаратом и противомикробным компонентом, а также лечебную салфетку с нанесенным гидрогелевым покрытием для длительно незаживающих поверхностных ран.

Для разработки технологии получения лечебных материалов необходимо рассмотреть несколько этапов, включающих выбор ферментного и противомикробного препарата, биополимера как основы лечебной композиции и среды для иммобилизации компонентов, текстильного материала, и непосредственно технологию получения материалов для лечения ран на 1-2 стадиях раневого процесса.

### **3.Разработка лечебной композиции для применения на I-II стадиях раневого процесса**

#### **3.1 Выбор протеолитического фермента**

Выбор протеолитического компонента для лизиса и облегчения эвакуации из раны гнойного отделяемого и дальнейшего восстановления поврежденных тканей базировался на следующих соображениях:

- фермент должен быть разрешен для применения в медицине;
- фермент должен обладать достаточной ферментативной активностью (не ниже 0,1 ПЕ/мг;
- фермент должен максимально сохранять активность в ходе технологического процесса получения медицинских изделий, а также в процессе хранения;
- фермент должен работать в широком диапазоне рН (в т.ч. в слабощелочной среде) и температуры (25-40°С);
- фермент не должен подвергаться инаktivации ингибиторами крови и тканей, а также другими компонентами композиции;
- желательно использование ферментов отечественного производства с высокой экономичностью применения.

Исходя из рассмотренных требований для использования при разработке нами лечебной композиции на основе литературных данных и анализа рынка на начальном этапе были выбраны ферменты животного происхождения -химопсин (РК ЛС – 5 № 011357), рекомендуемый для местного применения при лечении гнойных ран, и растительные ферменты: папаин и бромелаин, так же используемые для купирования гнойных процессов благодаря способности расщеплять белки. В пользу растительных ферментов папаина и бромелаина говорит их низкая аллергенность, в отличие от ферментов животного происхождения они «работают» в широком интервале рН и температуры; действуют более мягко; обладают более слабым фибринолитическим действием, что предотвращает риск возникновения кровотечений; их применение возможно пациентами с любыми религиозными убеждениями.

На начальном этапе нами оценивалась протеолитическая активность растительных ферментов папаина и бромелаина, взятых в нативной форме, и для сравнения – химопсина (животного происхождения). Именно в этой форме они используются сегодня для лечения ран. Ферментативную активность определяли по методу Кунитца М., используя в качестве субстрата казеин по Гаммерстену в 1/15М фосфатном буфере рН 8,0. Данные приведены в таблице 5.

Таблица 5- Активность протеолитических ферментов животного и растительного происхождения в нативной форме

| №  | Ферменты  | Протеолитическая активность, ПЕ/мг |
|----|-----------|------------------------------------|
| 1. | Химопсин  | 5,5±0,05                           |
| 2. | Папаин    | 0,33±0,05                          |
| 3. | Бромелаин | 0,11±0,05                          |

Эти данные помогли нам решить, какую концентрацию ферментов использовать при иммобилизации. Поскольку нативный химопсин обладает высокой протеолитической активностью, для его иммобилизации в полимерном носителе была взята концентрация 0,2%. Папаин и бромелаин, отличающиеся невысокими значениями специфической активности в нативной форме, были иммобилизованы в 4% концентрации, минимальная эффективная активность, достаточная для использования ферментов составляет не менее 0,1 ПЕ/г.

Как следует из таблицы 5, ПА химопсина выше, чем у растительных ферментов, однако, даже учитывая богатый положительный опыт применения химопсина в лечение ран [65], как и других ферментов животного происхождения (трипсин, коллагеназа и т.д.), мы приняли решение наибольшее внимание уделить изучению использования для указанных выше целей растительных ферментов. Основываясь на полученных экспериментальных данных, а также, учитывая экономический фактор, который является важным звеном при планировании производственного процесса, было принято решение рассматривать папаин как



основной активный ферментный компонент разрабатываемой лечебной гидрогелевой композиции.

Еще одним важным аргументом в применении папаина является широкий диапазон рН, при котором он проявляет максимальную активность. Следует учесть, что в ходе лечения гнойных ран требуется поддерживать рН в пределах 6,5-8,5 для максимальной эффективности лечения. Анализ протеолитической активности папаина в растворе проведен нами по стандартной методике в соответствии с ГОСТ Р 53974-2010 по скорости реакции гидролиза казеината натрия до пептидов и аминокислот с последующим фотометрическим определением их количества. Для сравнительной оценки поведения фермента папаина в составе биополимерных материалов получена зависимость показателя протеолитической активности (ПА), ПЕ/г от рН тестового раствора, которая показана на рисунке 12.

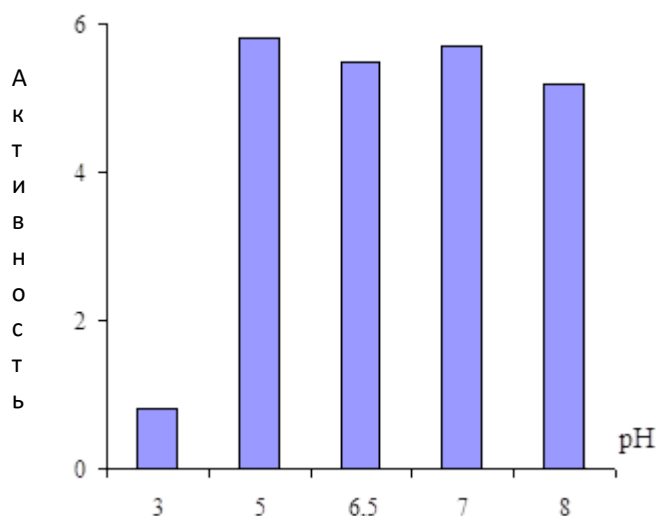


Рисунок 12- Влияние уровня рН среды на величину показателя протеолитической активности папаина в растворах

Выше указывалось, что папаин проявляет каталитические свойства в очень широком диапазоне показателя рН от 3 до 12. Экспериментально установлено, что в сильноокислых растворах (рН 3) изоэлектрическое состояние молекулы фермента может быть нарушено, что проявляется в существенном (в 7,25 раза) снижении протеолитической способности по сравнению с тестами в слабокислой или

нейтральной среде. В диапазоне рН 5-8 уровень показателя ПА поддерживается достаточно стабильно, что и требуется в рассматриваемом нами случае.

Учитывая, что как ферменты растительного, так и животного происхождения не являются системами, устойчивыми во времени, и теряют свою активность, было решено рассмотреть возможность их стабилизации с целью пролонгирования действия.

### **3.2 Рассмотрение способов сохранения ПА ферментов**

Из литературных данных следует, что для сохранения активности ферментов используется такой способ как иммобилизация, которая достигается с помощью химического взаимодействия с функциональными группами полимеров или за счет физического взаимодействия (например, ионные связи).

Возможность химической иммобилизации на полимерах-полисахаридах, в частности, целлюлозе, детально рассмотрена в работах [65,75] где предложено для достижения ковалентного связывания в начале формирования у этого полимера активных групп за счет окисления периодатом натрия, а затем достижение химической связи полимер-активные группы фермента.

### **3.3 Химическая иммобилизация ферментов**

Экспериментально подтверждено сохранение активности фермента при указанном способе химической иммобилизации. Нами для использования ферментов так же экспериментально подтверждена возможность применения данного способа, проводя иммобилизацию папаина на волокнистых целлюлозных материалах.

Важнейшим условием получения препаратов на основе иммобилизованных биологически активных веществ является участие в образовании ковалентных связей с носителем тех функциональных групп действующего вещества, которые не являются ответственными за его специфическую биологическую активность, иными словами, не входят в состав активного центра и не располагаются в непосредственной близости от него. Активный центр биологически активного вещества, например, фермента, остается интактным и фермент проявляет



стерилизации  $1,6 \pm 0,05$  ПЕ/г. Полученные данные показывают, что активность материала после стерилизации, содержащего химопсин не существенно выше, чем у других ферментов, что связано с начальным отличием в их активности. Низкие показатели ПА бромелаина подтверждают выбор, сделанный в пользу папаина для проведения дальнейшего эксперимента. Исходя из полученных данных по оценке ПА после стерилизации использование химопсина не имеет больших преимуществ перед папаином. Данные представлены в таблице 6.

Таблица 6 - ПА ферментов, химически иммобилизованных на целлюлозном носителе (ДАЦ)

| №  | Ферменты  | ПА до стерилизации, ПЕ/г | ПА после стерилизации, ПЕ/г |
|----|-----------|--------------------------|-----------------------------|
| 1. | Папаин    | $1,52 \pm 0,05$          | $0,96 \pm 0,05$             |
| 2. | Бромелаин | $1,05 \pm 0,05$          | $0,52 \pm 0,05$             |
| 3. | Химопсин  | $2,2 \pm 0,05$           | $1,2 \pm 0,05$              |

По полученным данным установлено, что потеря ПА папаина составляет 37%, у бромелаина значительно выше, на 51%, в свою очередь химопсин теряет активность на 46%. Таким образом, потеря активности существенная и более точно оценить эти результаты возможно в сравнении с другими способами иммобилизации. При этом следует учитывать сложность технологического процесса активации целлюлозного носителя и химической иммобилизации на нем ферментов.

### 3.4 Физическая иммобилизация ферментов в геле полимеров

Учитывая сложность, многостадийность и длительность проведения химической иммобилизации ферментов, что подробно рассмотрено в литературном обзоре и подтверждено указанным выше экспериментом, а также существенные потери активности при гамма-стерилизации (несмотря на наличие ковалентной связи) мы решили рассмотреть возможность физической иммобилизации ферментов в геле полимеров. Выбор этого варианта связан как с

данными, указывающими на преимущества указанного пути, так и с использованием гелей для иммобилизации лекарственных субстанций и биологически активных веществ, в частности, при выпуске медицинских лечебных изделий (салфеток) «Колетекс» и гелей «Колегель» на производстве ООО «Колетекс», («Технология «Колетекс®»»), где мы предполагаем в дальнейшем осуществлять производство разрабатываемых в данной работе материалов [148,149]. Согласно технологии «Колетекс», базирующейся на способе плоскошаблонной текстильной печати, производство указанных лечебных изделий выглядит следующим образом (рисунок 14):

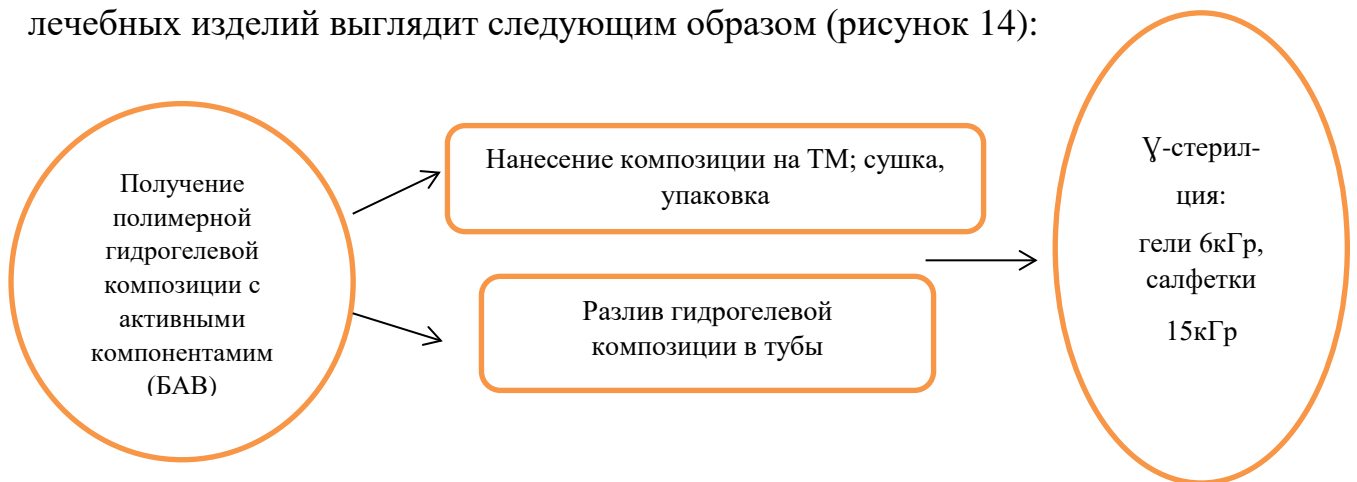


Рисунок 14- Технологическая схема производства салфеток «Колетекс» и гелей «Колегель»

Для осуществления этой схемы физическая иммобилизация ферментов предполагается в гидрогелевой композиции. Дальнейшее исследование было направлено на выбор полимера, который переводится в гидрогель, на основе которого предполагается вводить фермент, иммобилизуя его физически с целью максимального сохранения протеолитической активности. В этом случае к полимеру дополнительно к требованиям, описанным в соответствующем разделе, выставляются такие требования, как:

- наличие разрешения на применение в медицине (общие требования);
- возможность использования при выпуске продукции по технологии «Колетекс»:
- наличие необходимых реологических свойств и устойчивость к гамма-стерилизации;

- способность предотвращать или замедлять потерю протеолитической активности фермента; способность пролонгировать действие фермента;
- наличие собственной биологической активности.

Фермент вводится в гель механически, удерживается за счет физических сил, перемешивается в объеме геля. Вводимое количество субстанции не зависит от количества функциональных групп для иммобилизации. Вязкость композиции может меняться в соответствии с технологическими особенностями процесса производства и применения изделия.

С целью повышения эффективности используемых ферментов в разрабатываемой композиции была проанализирована совместная иммобилизация папаина и бромелаина с целью возможного увеличения ферментативной активности. В результате комбинированное применение папаина и бромелаина не продемонстрировало ожидаемых результатов после стерилизации композиции и показало снижение активности в альгинатной композиции на 64%. Применение в разработке бромелаина нецелесообразно ввиду низкой исходной протеолитической активности, и как следствие, низкой остаточной активности.

### **3.4.1 Выбор биополимеров для физической иммобилизации ферментов**

Выбор полимера был начат на основании анализа литературных данных, и, в частности, рассматривалось применение синтетических полимеров на основе акриловой кислоты, полиакриламида, что обеспечило бы стабильность композиции при гамма-стерилизации и хранении. Однако ввиду специфических свойств данного соединения нам не удалось получить необходимую с позиции требуемой вязкости полимерную композицию, применимую в качестве основы для иммобилизации. Макромолекулы данного соединения сшиты между собой поперечными химическими связями, что позволяет ему неограниченно набухать в водных растворах, удерживать большое количество жидкости, но не растворяться [150]. Получаемый таким способом гидрогель слишком густой, тянущийся, не пригодный для нанесения по технологии печати. Предполагается, что он может быть рассмотрен в дальнейшем как добавка к другой полимерной основе в рамках решения нашей задачи.

Так же был рассмотрен для иммобилизации фермента природный полимер-полисахарид хитозан, относящийся к глюкозаминам и представляющий собой продукт деацетилирования хитина. Хитозан биосовместим с тканями организма человека, не обладает токсичностью, ему присущ ряд полезных свойств, таких как антикоагулянтная активность, сорбционные свойства, ранозаживляющее действие, противоопухолевая активность и ряд других. Хитозан известен в качестве носителя для иммобилизации ферментов [151], при этом могут возникать различные пути взаимодействия - от агрегации на поверхности до инкапсулирования. Однако, в данном случае против использования хитозана в качестве носителя для иммобилизации фермента говорит нежелательный для гнойных, длительно незаживающих ран водородный показатель композиции, значение которого находится в кислой области, особенно, если использовать кислоторастворимый хитозан. Исходя из того, что рН гнойной раны находится в диапазоне показателей не выше  $5,9 \pm 0,1$  [3,30,38] рН композиции, применяемой в лечении гнойных ран должен находиться в диапазоне не ниже  $6,1 \pm 0,1$ .

Нами при выборе полимера для физической иммобилизации фермента рассматривалась так же широко применяемая в фармацевтике гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ). ГПМЦ является универсальной гидрофильной матрицей для фармакологически активных веществ, обладает хорошими гелеобразующими свойствами и абсолютно не токсична. В то же время ГПМЦ в нашей разработке гидрогелевой полимерной композиции может сыграть очень важную роль, а именно стать структурообразователем и модификатором вязкости всей системы. Забегая вперед, следует отметить важность этого момента на заключительном технологическом этапе – радиационной стерилизации.

Принимая во внимание специфику разрабатываемого медицинского изделия, как отмечалось ранее, полимер, взятый за основу полимерной композиции, должен соответствовать ряду требований, таких как отсутствие токсических и аллергических явлений, наличие разрешения для применения в медицине, не снижать активность включенных компонентов, быть биodeградируемым, кроме того, способствовать доставке инкорпорированных активных компонентов, в

частности, фермента и антисептика, к пораженному очагу, быть биологически активным. Анализ литературы, посвященной специфике осуществления технологии Колетекс<sup>®</sup>, основанной на модификации метода плоскошаблонной печати, привел к рассмотрению в качестве основного компонента композиции натриевой соли альгиновой кислоты - альгината натрия. Этот выбор основан на следующем:

-альгинат натрия разрешен для применения в медицине, имеет для этого необходимые выпускные формы;

-известно, что альгинат натрия является «классическим» загустителем печатных красок, обладая нужными для осуществления плоскошаблонной печати вязкостными показателями и тиксотропностью [152];

-при введении в композицию на основе альгината натрия лекарственных препаратов и БАВ он выполняет функцию защитного коллоида, препятствуя, в частности, агрегации введенных в него лекарственных субстанций;

-обладает собственной биологической активностью, способствует регенерации тканей, содержит в своем составе большое количество микроэлементов, обладает гемостатическими свойствами (за счет наличия карбоксильных групп), что важно в применении на I стадии раневого процесса;

-являясь природным биополимером, способным к гелеобразованию, альгинат натрия обеспечивает атравматичность изделиям, содержащим его в своем составе;

-альгинат натрия, будучи природным полисахаридом, не аллергенен, содержится в разрешенных для широкого применения препаратах, таких, например, как медицинский препарат Гевискон (Англия), медицинские изделия Альгимаф, Альгипор, Колетекс и другие.

Выбирая для исследования в качестве основы композиции, содержащей протеолитический фермент, альгинат натрия, нам необходимо было рассмотреть следующие вопросы:

-способствует ли альгинат натрия (или полимерная композиция на его основе с включением добавок других полимеров) сохранению протеолитической активности вводимого фермента;



-способен ли он обладать свойствами биовосстановителя в отношении катионов серебра;

-обеспечивает ли альгинат натрия реологические свойства композиции, позволяющие использовать ее в плоскошаблонной печати;

-способствует ли альгинат натрия или композиция на его основе сохранению своих реологических свойств и протеолитической активности вводимого фермента при  $\gamma$ -стерилизации.

Отметим, что мы предполагаем в дальнейшем в данной работе рассмотреть как основу композиции альгинат натрия, т.е. использовать его в роли базового полимера, но также рассмотреть его применение в сочетании с другими полимерами, используемыми как добавочные компоненты в композиции для обеспечения ею всех требуемых показателей.

### 3.4.2 Влияние условий получения лечебного гидрогеля на активность папаина

Как говорилось ранее, одна из целей физической иммобилизации фермента в полимере - сохранение его активности и пролонгация действия, что позволяет избежать частых перевязок и травмирования раны. С этой целью был проведен сравнительный эксперимент по изучению 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.

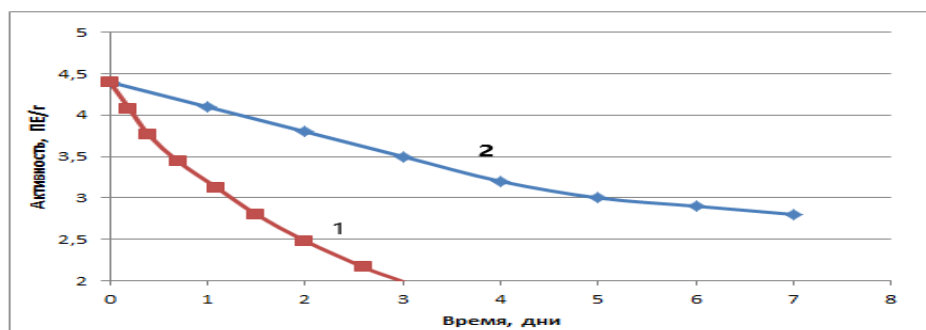


Рисунок 15 - Изменение ПА папаина 1-в водном растворе при 2-иммобилизации в альгинатном геле

В ходе эксперимента было установлено, что ПА папаина в водном растворе в первые сутки сохраняется на 69%, однако, к третьим суткам падает до нуля. Скорость падения ПА в альгинатном геле существенно ниже, чем в водной среде. Падение активности папаина в геле в первые сутки составляет лишь 9 %. Из рисунка 15 следует, что при введении одной и той же концентрации фермента в дистиллированную воду и альгинатный гидрогель ПА папаина в геле сохраняется существенно дольше, чем у нативной формы, что и являлось одной из целей данного исследования.

Таблица 7 - Изменение ПА папаина во времени

| Время, сутки | ПА папаина в водном растворе, ПЕ/г | ПА папаина в альгинатном геле, ПЕ/г |
|--------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 1.           | 3,1                                | 4,1                                 |
| 2.           | 2,5                                | 3,8                                 |
| 3.           | 0,05                               | 3,5                                 |

Альгинатный гель позволяет в большей степени сохранить ПА фермента. Из таблицы 7 следует, что в первые трое суток ПА в геле в ~1,5 раз выше, чем в нативной форме.

Основываясь на литературных данных [89] и учитывая роль альгината как защитного коллоида, можно предположить, что происходит физическое взаимодействие между карбоксильными группами альгината натрия и аминоклупами папаина, что позволяет сохранить активный центр фермента. Это способствует равномерному высвобождению активного вещества из гидрогеля в рану и возможности пролонгировать лечебный эффект. Высокая вязкость гидрогеля и, соответственно, меньшее количество воды в системе также приводит к его защите и меньшей потере активности при стерилизации и хранении.

Таким образом, применение способа физической иммобилизации выбранного фермента (папаина) позволяет нам достичь частичной защиты фермента и меньшего снижения его специфической активности, а также пролонгации лечебного эффекта в ходе применения разрабатываемого лечебного изделия.

### 3.5 Влияние добавок-активаторов на протеолитическую активность папаина

Как было ранее отмечено в литературном обзоре [66], для усиления протеолитических свойств ферментов часто используют активаторы. Одним из таких компонентов является мочевины. Было проанализировано введение 1%, 2%, 3% мочевины в гидрогелевую композицию на основе альгината натрия с добавлением 4% папаина и оценена протеолитическая активность<sup>1</sup>.

Таблица 8-Влияние мочевины на ПА папаина в композиции в зависимости от количества

| ПА \ Состав                      | АН+4% папаин | АН+4% папаин+1% мочевины | АН+4% папаин+2% мочевины | АН+4% папаин+3% мочевины |
|----------------------------------|--------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| ПА, ПЕ/г<br>Нестерильные образцы | 3,75±0,30    | 3,82±0,35                | 3,95±0,37                | 3,79±0,40                |
| Стерильные образцы               | 2,64±0,25    | 2,78±0,24                | 2,80±0,62                | 2,92±0,30                |

Полученные данные свидетельствуют, что непосредственное воздействие мочевины на протеолитическую активность папаина в альгинатной композиции практически отсутствует. Кроме того известно, что введение мочевины в альгинатный гидрогель снижает вязкость композиции, что является нежелательным [156]. Применение мочевины целесообразно для дополнительного гидратирующего воздействия непосредственно на гнойное содержимое раны для усиления денатурации некротических масс, их размягчения.

<sup>1</sup> Автор выражает благодарность за помощь в получении результатов проф. кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева Белову А.А.

### **3.6 Изучение характера взаимодействия альгината натрия и фермента папаина**

Обязательным вопросом при разработке лечебной композиции является изучение возможного взаимодействия между компонентами, оценка влияния компонентов друг на друга. Разрабатывая лечебную полимерную композицию с ферментом папаином необходимо изучить его возможное взаимодействие с альгинатом натрия. Из литературы известно [70], что в глобуле папаина концевые фрагменты расположены диаметрально на поверхности разных ее частей, между которыми находится аминокислотная группировка активного центра. На N-конце молекулы аминокислотой является изолейцин, на С-конце – аспарагин. При этом оба конца молекулы папаина содержат аминокислотные группы, но поскольку они разнесены на разные стороны белковой глобулы, следует ожидать, что фермент может одновременно реагировать с двумя частицами (макромолекулами) альгината, которые в свою очередь могут через молекулу фермента объединяться в многозвенные укрупненные агрегаты.

Оценка изменения гидрогеля при объединении их в бикомпонентных водных системах (альгинат, папаин) проведена по результатам определения размера наночастиц методом динамического светового рассеяния в сильно разбавленных растворах, предполагающих окружение частиц дисперсной фазы большим количеством молекул растворителя. Исследования выполнены индивидуально для альгината натрия и смесей 6% альгината натрия и введения 4% папаина с варьированием величины рН в интервале 2,0-8,0.

Обобщенный вид фракционного распределения числа частиц дисперсной фазы по мере нарастания их размера представлен на рисунке 16.

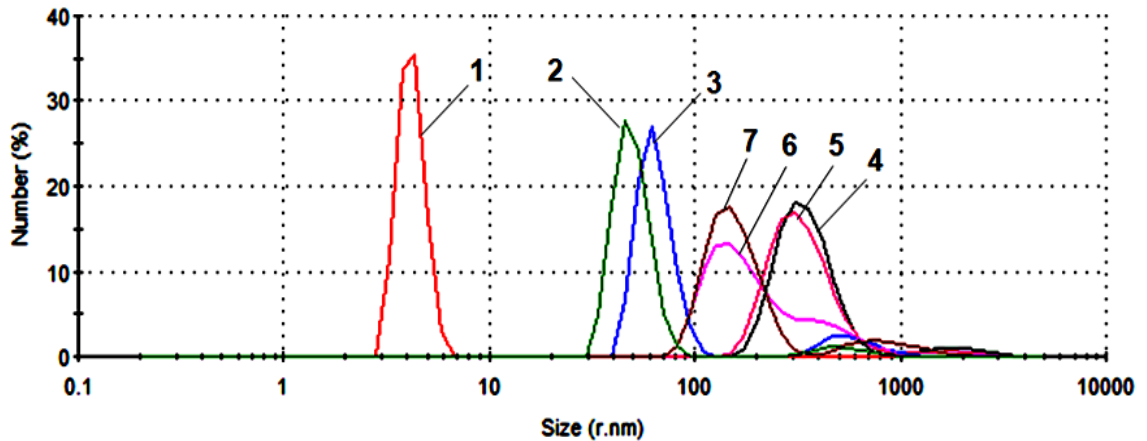


Рисунок 16- Распределение по размеру относительного числа частиц в гидрогеле биополимеров:

1 – папаин, рН 6,0; 2 – альгинат натрия, рН 6,0; 3-7 – альгинат и папаин

3 – рН 2,0; 4 – рН 5,0; 5 – рН 6,0; 6 – рН 7,0; 7 – рН 8,0.

Для раствора папаина получена зависимость распределения размера частиц, что свидетельствует о полном переводе фермента в мономолекулярное состояние. Пик основной фракции приходится на величину гидродинамического размера частиц  $r_{\max} = 4,36$  нм. Число частиц в основной фракции  $N_{\max}$  составляет 35,4 % от общего их количества в системе. При этом четыре доминирующие фракционные группы в интервале 3,25-5,05 нм объединяют 97,1 % общего числа частиц дисперсной фазы.

Зависимость распределения размера частиц альгината натрия имеет форму с параметрами основной моды (пика)  $r_{\max} = 45,6$  нм;  $N_{\max} = 27,0\%$ . В диапазоне шлейфа расположена группа укрупненных фракций с размерами частиц от 300 до 1000 нм. На их долю приходится лишь 10,4% общего числа частиц.

Распределение частиц папаина в гидрогеле альгината отражено на рисунке 17.

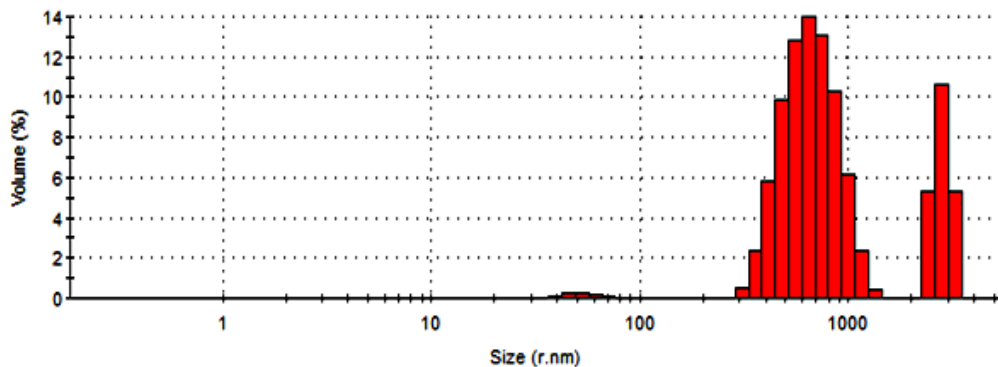


Рисунок 17-Распределение по размеру частиц папаина в гидрогеле альгината натрия.

Как видно, доля доминирующих по числу частиц малоразмерных фракций в общем объеме составляет всего лишь 0,9%. Более 75% объема формируют «сплетения» макромолекул с размерами до 1 мкм, численность которых, как отмечалось выше, составляет лишь  $\frac{1}{10}$  часть  $N_{\text{общ}}$ . При этом более 20 % относительного объема приходится на фракции 2400-3220нм, которые настолько малочисленны, что общее их количество не регистрируется на зависимости распределения числа частиц. В том числе 10 % относительного объема формирует фракция с размерами частиц от 2590 до 3000нм.

Предположительно, эффективность протеолитического действия на белковые компоненты гнойного экссудата будет обеспечивать основная масса глобул фермента, расположенных в зонах контакта между малоразмерными клубкообразными сплетениями молекул альгината, визуализация которых представлена на рисунке ниже<sup>2</sup>. Исходя из экспериментальных данных, отраженных на рисунке 17, иммобилизация папаина может быть представлена следующим образом:

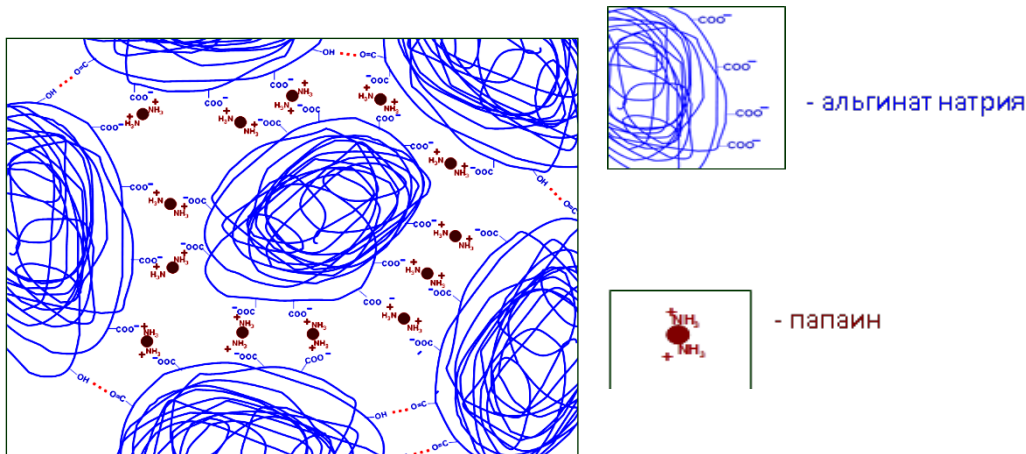


Рисунок 18 - Схема иммобилизации фермента в среде альгината натрия

Предположительно для того, чтобы максимально инициировать взаимодействия в системе альгинат натрия-папаин, необходимо одновременно обеспечить перевод карбоксильных групп полисахарида в диссоциированное

\* В работе использована приборная база Центра коллективного пользования научным оборудованием "Верхневолжский региональный центр физико-химических исследований". Автор выражает благодарность за помощь в получении и анализе результатов сотрудникам ИХР им .Г.А. Крестова д.т.н. С.А. Кокшарову и д.т.н. С.В. Алеевой

состояние и аминогрупп полипептида в протонированную форму. Первому условию способствует смещение кислотно-основного равновесия в область щелочных значений показателя рН, для второго более предпочтителен переход к использованию кислых сред. Учитывая, что лечение гнойных ран желательно проводить при рН 6,8-8,2 +/-0,2, приведенные выше данные необходимо учитывать при разработке лечебной композиции.

### **3.7 Исследование реологических характеристик гидрогелей-полимеров**

Чтобы обосновать и подтвердить выбор полимеров как для получения лечебной композиции, так и для их использования в текстильной печати для получения лечебных материалов, необходимо выделить наиболее важные технические параметры композиции, каждый из которых мы будем рассматривать далее более детально, обосновывая ее применение.

Реологические параметры являются важными, определяющими показателями основных требований к полимерам, для применения в технологии печати. К таким показателям относят вязкость и тиксотропность. Наиболее выраженное влияние на данные параметры оказывают молекулярная масса полимеров, их концентрация, наличие добавок-стабилизаторов, а также вероятность физического взаимодействия между компонентами смеси. Одним из основных критериев, характеризующих реологические параметры системы, является эффективная вязкость.

Важным критерием, влияющим на этот параметр, является концентрация полимера-загустителя. Принимая во внимание многолетний опыт компании «Колетекс» [87], проведя анализ литературных данных, а также основываясь на данных предварительных испытаний, в качестве рабочих концентраций альгината были взяты показатели от 3% до 9% по сухому веществу.

Выбор рабочей концентрации альгината натрия – это один из основных этапов в ходе разработки лечебной гидрогелевой композиции. Анализ проводился путем измерения динамической вязкости. В настоящее время на фармацевтическом рынке присутствует несколько модификаций альгината натрия, различающихся по молекулярной массе. Нами применялись альгинат

натрия, выпускаемый под фирменным названием «манукол», с молекулярной массой 145 кДа (I) и альгинат натрия производства Архангельского водорослевого комбината (далее-альгинат) (ТУ15-544-83) с молекулярной массой 342 кДа (II).

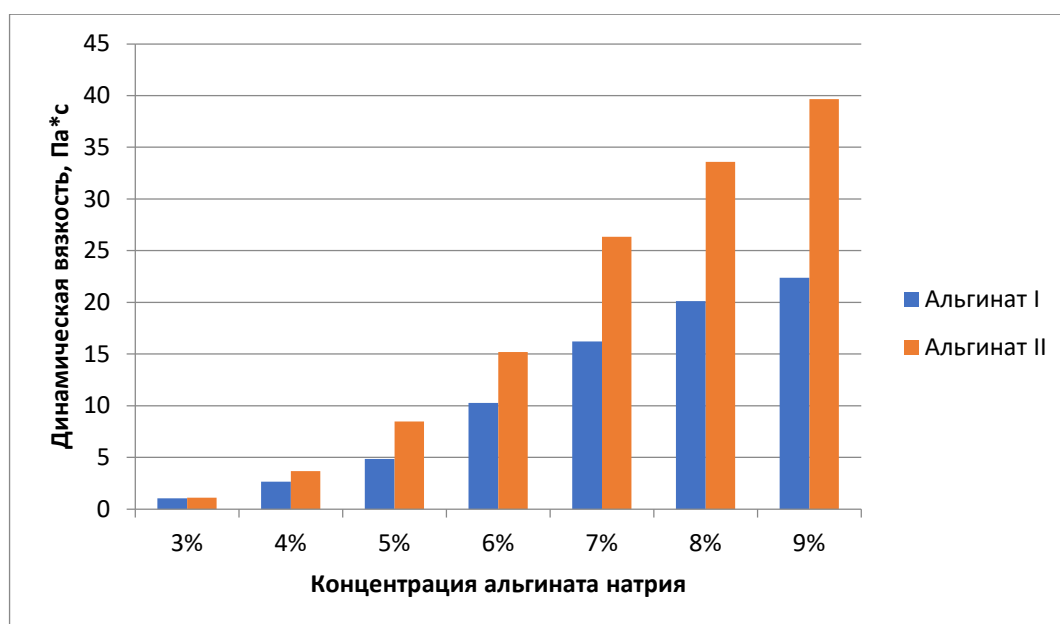


Рисунок 19 - Зависимость динамической вязкости от концентрации альгината натрия

Наиболее приемлемыми с точки зрения применения для плоскошаблонной печати и исходя из опыта ООО «Колетекс» является концентрация альгината 6-8%. Однако в дальнейшем важно оценить снижение вязкости при стерилизации и основываясь на этом уточнить нужное процентное содержание альгината в композиции.

Исходя из того, что степень структурированности исходных гелей альгината возрастает с увеличением его молекулярной массы, для создания полимерной композиции нами в дальнейшую исследовательскую работу включен альгинат с молекулярной массой 342 кДа. Это обусловлено особенностями технологии производства изделий, а также экономических параметров, поскольку для создания композиции с равным процентным содержанием потребуется почти вдвое большее количество альгината с молекулярной массой 145 кДа.

В представленном ранее материале было указано, что разрабатываемые медицинские изделия, содержащие фермент и антисептический препарат, и



салфетки на текстильной основе со слоем гидрогеля, нанесенным на их поверхность, предполагается выпускать по технологии «Колетекс».

Реологические параметры полимера-загустителя крайне важно учитывать, чтобы приготовить итоговый гидрогель необходимой вязкости с импрегнированными активными компонентами с целью обеспечить равномерное нанесение композиции.

Применение технологии печати подразумевает использование печатных шаблонов и ракли, что за счет возникающей нагрузки (давление при печати) может повлечь изменения в структуре гидрогеля ввиду разрыва связей внутри дисперсной фазы, и, как следствие, изменить свойства конечного продукта. Параметр тиксотропности характеризует возможность материала восстанавливать свою структуру после снятия нагрузки. В ходе печати при давлении ракли происходит разрушение трехмерной структуры геля и восстановление структуры после снятия нагрузки по мере завершения печати [154]. При заполнения гидрогелем тубы на специальном оборудовании гель так же испытывает существенную деформационную нагрузку.

Величину тиксотропности оценивали по методу измерения «петли гистерезиса», площадь которой характеризует тиксотропность.

Таблица 9 - Зависимость тиксотропности гидрогеля от концентрации альгината натрия

| Скорость вращения,<br>об/мин | Скорость<br>сдвига, с <sup>-1</sup> | Альгинат натрия |       |       |
|------------------------------|-------------------------------------|-----------------|-------|-------|
|                              |                                     | 6%              | 7%    | 8%    |
| 1,5                          | 0,35                                | 1,054           | 1,028 | 1,021 |
| 2,0                          | 0,49                                | 1,072           | 1,081 | 1,039 |
| 2,5                          | 0,61                                | 1,110           | 1,099 | 1,048 |
| 3,0                          | 0,64                                | 1,117           | 1,118 | 1,037 |
| 4,0                          | 1,00                                | 1,111           | 1,104 | 1,032 |
| 5,0                          | 1,25                                | 1,106           | 1,101 | 1,031 |
| 6,0                          | 1,50                                | 1,101           | 1,100 | 1,029 |
| 10,0                         | 2,50                                | 1,074           | 1,059 | 1,018 |
| 12,0                         | 3,00                                | 1,059           | 1,044 | 1,024 |
| 20,0                         | 5,00                                | 1,048           | 1,032 | 1,019 |
| 30,0                         | 6,50                                | 1,034           | 1,011 | 1,000 |

По полученным данным можно сделать вывод, что данная исследуемая система при всех исследуемых концентрациях альгината обладает хорошими тиксотропными свойствами ( $E > 1$ ), которые проявляются в данном диапазоне скоростей сдвига. Это удовлетворяет критериям технологии производства конечного продукта.

$$E = \eta_1 / \eta_2 \quad (15),$$

где  $\eta_1$ -вязкость при возрастании нагрузки,  $\eta_2$ - вязкость при убывании нагрузки,

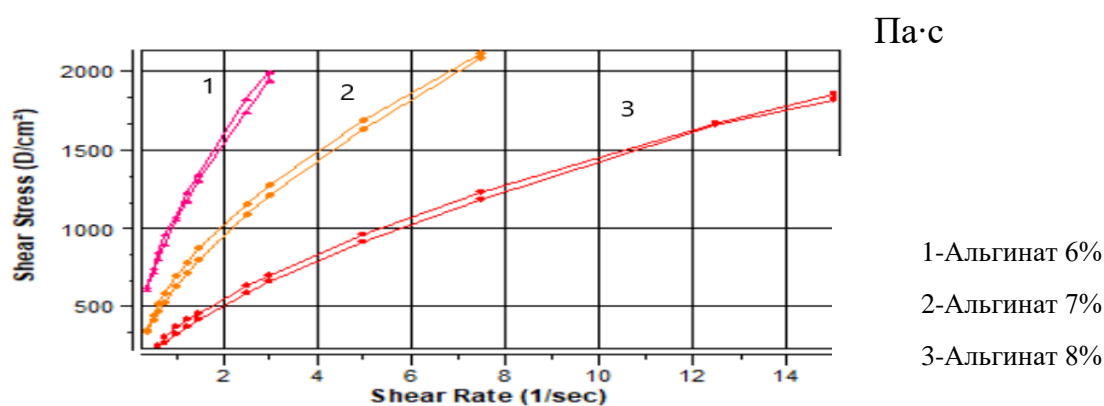


Рисунок 20 - Кинетические кривые течения растворов альгината натрия разной концентрации

Как следует из кривых на рисунке 20 кинетические зависимости вязкости для всех концентраций альгината имеют близкий характер, но отличаются количественно.

С целью обеспечения необходимых характеристик готовой стерильной гидрогелевой продукции, а также для возможности реализации технологии плоскошаблонной печати, в дальнейшей работе нами рассмотрен 6% и 7% альгинат натрия. Введение как активных компонентов, так и вспомогательных, может влиять на вязкостные характеристики гелей. Представляло интерес проанализировать влияние папаина на реологические параметры альгинатного гидрогеля. По изменению вязкостных свойств гелей при введении в их состав каких-либо веществ можно судить о характере взаимодействия между гелеобразующим полимером и добавкой.

Результаты исследования динамической вязкости 6% альгината натрия, проведенных с использованием ротационного вискозиметра Реотест-II, показаны на рисунке 21.

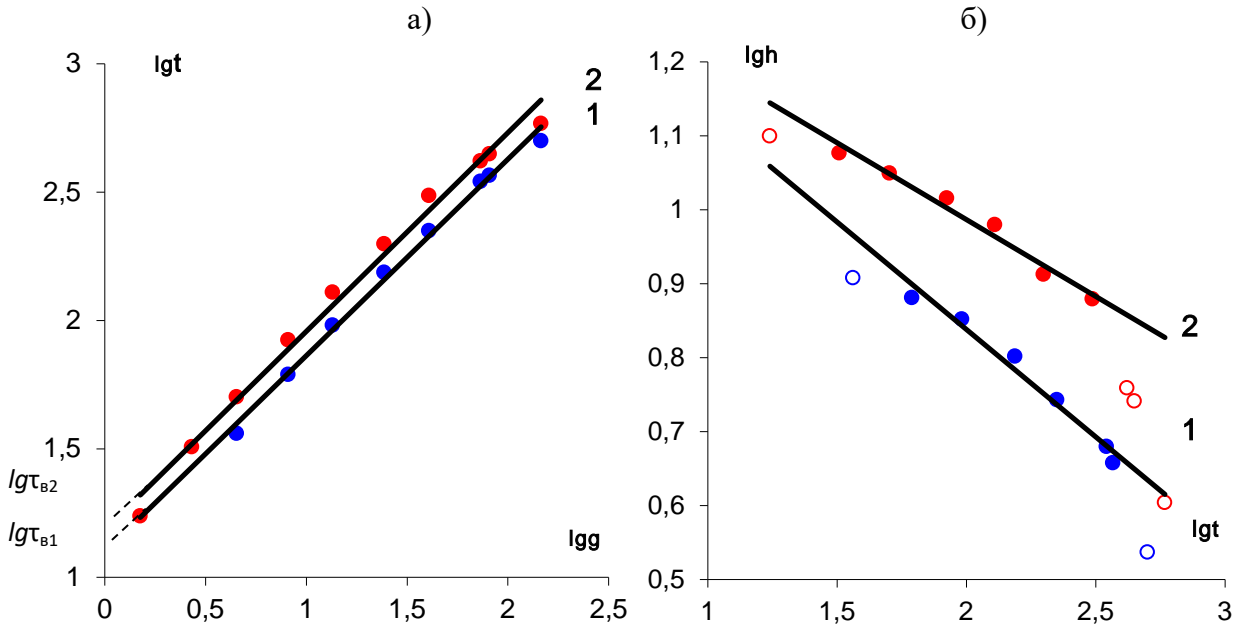


Рисунок 21- Кривые течения (а) и зависимость вязкости от напряжения сдвига (б) 6 % альгината натрия (1) и его смеси с 4 % папаином (2)

Введение папаина принципиально не меняет ход кривой течения высоковязкого раствора альгината натрия, отражающей зависимость напряжения сдвига в системе ( $\tau$ ) от скорости сдвига ( $\gamma$ ), задаваемой вращаемым цилиндром прибора. Величина параметров, представленных на рисунке «а», характеризует коэффициент упругости при сдвиге и равна тангенсу угла наклона полученных линий. Его величина меньше единицы. Это характерно для псевдопластичной жидкости и обуславливает уменьшение кажущейся (динамической) вязкости ( $\eta$ ) с увеличением скорости сдвига.

Небольшие, на первый взгляд, различия абсолютных значений напряжений сдвига между точками кривых 1 и 2 преобразуются на рисунке «б» в повышение сопротивления вязкому течению в присутствии фермента. По полученным результатам можно сделать вывод, что глобулы фермента не стали элементами, влияющими на формирование движущихся потоков.

Папаин является глобулярным белком, конформационная стабильность которого обеспечивается внутримолекулярными взаимодействиями участков полипептидной цепи [155]. Гидратация его молекул практически не влияет на реологические свойства растворителя, что важно принять во внимание, поскольку разрабатываемый лечебный гель должен обладать определенными реологическими характеристиками, которые бы обеспечили необходимое время нахождения геля в ране.

Величину кажущейся вязкости обычно определяют в привязке к значению предела текучести –  $\tau_B$ , который находят на пересечении кривой течения с осью ординат (рисунок 21а). Однако графики, представленные на рисунке 21б, демонстрируют свойственные для альгината тиксотропные свойства – кажущаяся вязкость начинает уменьшаться не мгновенно, а постепенно. В связи с этим аппроксимирующие линии построены по срединному участку без учета концевых точек. По-видимому, более корректно сравнение объектов проводить не только при одинаковом значении напряжения сдвига, но и в пределах прямолинейных участков зависимостей  $lg\eta = f(lg\tau)$ . Как показано на рисунке 22, такой зоной является диапазон напряжений сдвига от 100 до 400 Па.

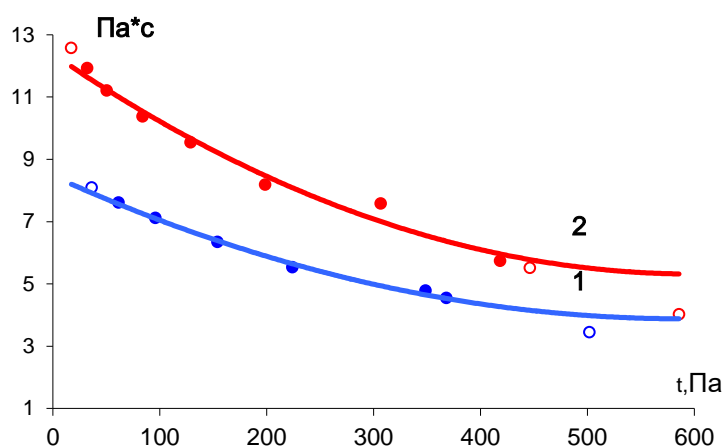


Рисунок 22 - Зависимости снижения динамической вязкости 6% альгината натрия (1) и его смеси с 4% папаином (2) при нарастании напряжений сдвига

Реологические исследования гелей альгината с добавкой папаина и без него показали, что качественных изменений в механизм течения гелей добавка

фермента не вносит. Поэтому можно сделать вывод о возможности применения субстанции папаина в технологии плоскошаблонной печати ввиду сохранения необходимых реологических параметров разрабатываемой композиции.

### **3.8 Влияние гамма-стерилизации на свойства разрабатываемой композиции**

Обязательным условием при применении медицинских изделий для лечения ран является их стерильность. Это требование необходимо при наложении салфеток и гелей на любые виды ран, как кровоточащие, хронические, так и находящиеся на стадии заживления. Стерилизация может проводиться различными методами, в т.ч. высокотемпературными, но для рассматриваемой нами продукции доступна только радиационная стерилизация, подразумевающая использование ионизирующего (проникающего) излучения. Представлялось важным оценить влияние стерилизации на ПА ферментов. Следует принимать во внимание, что радиационная стерилизация - это действие потока элементарных частиц высокой энергии на вещество. Элементарным актом при таком взаимодействии является радиолиз химических связей между атомами вещества. Если энергия элементарных частиц превышает энергию химических связей, то происходит радиолиз химической связи. Глубина радиолиза зависит от дозы радиации, от энергии связи между атомами вещества, от окружающей вещество среды. Особенно чувствительны к радиолизу органические молекулы, и в первую очередь вещества природного происхождения, к которым относятся полисахарид альгинат натрия и фермент.

На начальном этапе нами проанализированы показатели активности нативных растительных ферментов до и после стерилизации в дозе 6 Гр., стандартных водных растворов ферментов (10г/л). Данные представлены в таблице 10.

Таблица 10-Влияние  $\gamma$ -стерилизации на ПА нативных ферментов в водном растворе

| Название  | Исходная активность нативных протеаз, ПЕ/мг | Активность нативных протеаз после гамма-стерилизации, ПЕ/мг |
|-----------|---|---|
| Папаин    | 0,33+/-0,11                                 | 0,120+/-0,01  |
| Бромелаин | 0,11+/-0,11                                 | 0,068+/-0,008   |

Падение ПА папаина в водном растворе составляет 64%, тогда как бромелаин теряет 68% ПА. В целях сравнительного анализа были изучены изменения ПА ферментов в геле альгината натрия.

Таблица 11- Влияние  $\gamma$ -стерилизации на протеолитическую активность ферментов, иммобилизованных в альгинатном геле

| Состав геля                   | ПА до стерилизации, ПЕ/г | ПА после стерилизации, ПЕ/г |
|-------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Альгинат натрия, папаин 4%    | 3,81±0,15                | 2,11±0,15                   |
| Альгинат натрия, бромелаин 4% | 1,23±0,15                | 0,41±0,15                   |

Наблюдается снижение активности ферментов в альгинатном геле после стерилизации: у папаина 45%, тогда как у бромелаина падение происходит на 61%. Было также проанализировано изменение протеолитической активности после стерилизации у иммобилизованного химопсина, оно составляет порядка 54%. Таким образом, учитывая данные по влиянию гамма-стерилизации следует отметить проявление свойств АН в качестве стабилизатора активности папаина, по сравнению с анализом водных растворов ферментов. Однако учитывая данные по химической иммобилизации ферментов, полученные ранее, падение вязкости альгината натрия и ПА ферментов при физической иммобилизации под воздействием ионизирующего облучения заставляет нас рассмотреть введение дополнительных компонентов с целью стабилизации параметров гидрогелевой основы.

Известно, что под действием ионизирующего излучения может происходить как деструкция, так и сшивка макромолекул, причем полимеры, имеющие в своем мономерном звене полностью замещенные атомы углерода (что имеет место в нашем случае в ходе применения полисахаридов), подвергаются деструкции в высокой степени. В связи с этим, выбирая компоненты для лечебной композиции,

необходимо оценить влияние ионизирующего излучения на изменение свойств готового продукта (медицинского изделия).

Концентрация высоко реакционно-способных частиц, в т.ч. радикалов, образующихся под действием ионизирующего облучения, вызывающих изменения в полимерах, пропорциональна дозе облучения, однако в нашем случае используемая доза должна обеспечить стерильность изделию, причем показатель стерильности должен быть стабильным с учетом возможности и «спящего» состояния некоторого количества микроорганизмов [157].

Радикалы и молекулярные радиолитические частицы рассматриваются как активные продукты радиолита воды, представляя следующий набор частиц:  $H_2O \rightarrow (H + OH + e^-_{aq} + H_2 + H_2O_2 + H_3O^+)$ ,  $H_3O^+$ .

Посредством продуктов радиолита воды происходит разрушение макромолекул альгинатного гидрогеля на мономерные звенья [163,164].

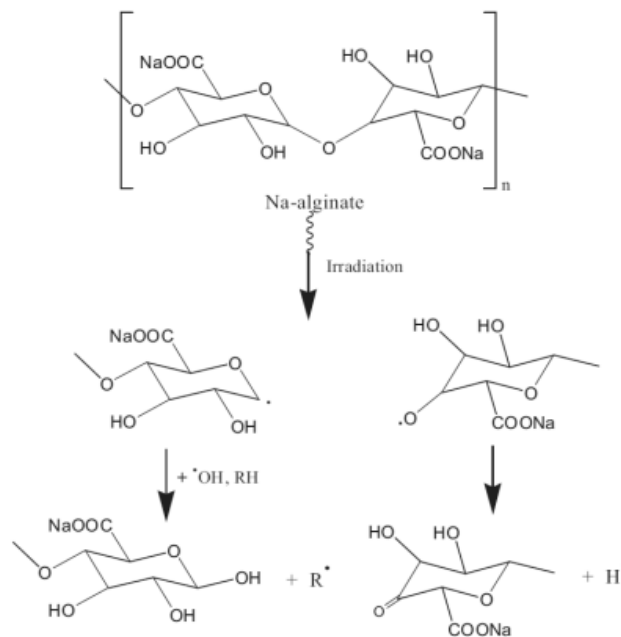


Рисунок 23 – Деструкция основной цепи альгината натрия при его облучении в водной среде

Для полисахаридов и, в частности, целлюлозы, характерно падение прочностных свойств, связанное преимущественно с протеканием процесса деструкции, причем, с повышением мощности дозы возрастает концентрация короткоживущих свободных радикалов, возрастает число их рекомбинации за единицу времени. Вид радикалов и скорость их рекомбинации зависит от

присутствия воды. Следовательно, можно ожидать существенного снижения вязкости гидрогелевой композиции на основе полисахарида альгината натрия при гамма-стерилизации. В случае гидрогелей деструкция происходит в большей степени, чем при обработке «сухих» салфеток с гидрогелевым покрытием. На основании этого возможно наметить пути для снижения указанных повреждений полимеров.

Отметим, что существенное снижение вязкости композиции в результате стерилизации является ожидаемым, хотя и нежелательным явлением. Однако, как было указано ранее, требования, предъявляемые к вязкостным характеристикам гидрогеля, наносимого на текстильную основу при получении лечебной салфетки и к гидрогелю, используемому самостоятельно (вводится в глубокие раны с помощью преднаполненного шприца или выдавливается из тубы), существенно различаются. Вязкость композиции для печати через сетчатый шаблон должна составлять порядка 1,5 Па\*сек. Композиция наносится (печатается) до стерилизации, когда имеет высокую вязкость и тиксотропность, высушивается и в сухом виде после упаковки подвергается гамма-стерилизации. Падение вязкости исходной композиции во время стерилизации текстильной салфетки не имеет в данном случае практического значения, не влияет на применимость лечебного материала, не снижает эффективность его лечебного воздействия. Что касается гидрогелей, используемых только в стерильной форме, то, достигаемая после гамма-стерилизации более низкая вязкость соответствует требованиям для их введения в полость раны. Гель должен вводиться безболезненно, заполнить полость при выдавливании из тубы или шприца. Для этого он должен иметь вязкость не ниже 1,0 Па\*сек, что определено в результате технических и клинических испытаний, основывается на опыте работы производства «Колетекс» и соответствует технической документации (ТУ9393-005-5823-785-2009).

Для сравнения изучили влияние гамма-стерилизации на два вида композиций, содержащих АН с молекулярной массой 145 кДа (I) и 342 кДа (II) На рисунке 24 отражено падение вязкости гидрогелей на основе альгината натрия после гамма-



стерилизации. Падение существенное, зависящее от концентрации полимера в геле, но характерное для обоих исследуемых полимеров.

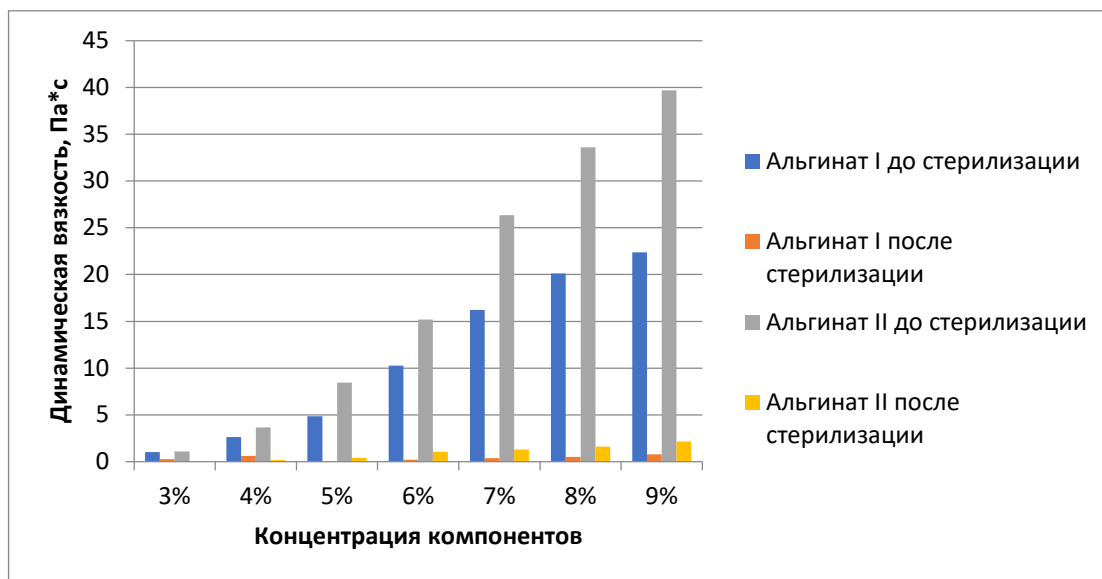


Рисунок 24 - Влияние гамма-стерилизации на реологические параметры геля альгината натрия

Для уменьшения падения вязкости, используют различные приемы: введение ловушек радикалов, сокращение количества воды в системе с целью сокращения образования радикалов, добавление многоатомных спиртов и т.д.

### 3.9 Разработка способов стабилизации свойств гидрогелевой композиции

#### 3.9.1 Стабилизация свойств лечебной композиции с помощью дополнительного введения полимеров

Этап стерилизации является заключительным и одним из ключевых, оказывающий наряду с положительной антибактериальной обработкой негативное влияние на протеолитическую активность фермента и реологические свойства полимерной композиции. Оба вопроса очень важны и требуют решения. На начальном этапе для одновременного их решения была предпринята попытка изменить (увеличить) вязкостные свойства композиции. Предполагалось, что увеличение вязкости, и, соответственно снижение содержания воды в композиции может уменьшить количество активных радикалов и одновременно, даже в случае снижения вязкости за счет стерилизации, достигнуть нужных для эффективного

использования показатели. Значительное падение вязкости альгината натрия после стерилизации позволило нам рассмотреть возможность включения в композицию дополнительного полимера-загустителя. Однако начальная вязкость должна обеспечивать нанесение композиции через шаблон при печати. Особенностью представленной работы является решение вопроса о сохранении активности полимерной композиции (загустителя), т.е. второй вводимый дополнительно полимер должен быть интактен. Один из предлагаемых путей – использование в качестве полимерной основы композиции смеси из различных биополимеров и достижения за счет этого синергического эффекта в отношении стабилизации реологических характеристик.

Лучшие результаты получены при использовании в качестве второго полимера в композиции гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ). Для молекулы данного полисахарида характерно, как и для всех полисахаридов, наличие большого количества водородных связей. Эти связи формируются как внутри макромолекулы между соседними углеводными остатками, так и между соседними молекулами, а в водном растворе еще и с молекулами воды. Производные целлюлозы высоко гидрофильны. Молекулы производных целлюлозы обладают свойством принимать расширенные конформации, которые занимают огромный объем относительно их массы, и образуют гели даже при низких концентрациях [165].

Хорошие гелеобразующие свойства и отсутствие токсичности позволяют ее выбрать в качестве дополнительного стабилизатора и загустителя композиции.

Анализ вязкости растворов полимера до и после стерилизации является наиболее информативным способом определения степени повреждения вследствие облучения. На рисунке представлены данные влияния технологического этапа гамма-стерилизации, а именно радиационного облучения в дозе 6 кГр на изменение эффективной вязкости ГПМЦ, взятой в различных концентрациях (от 1 до 5%). Они еще раз подтверждают, что самостоятельно ГПМЦ не может быть использована как основа композиции.

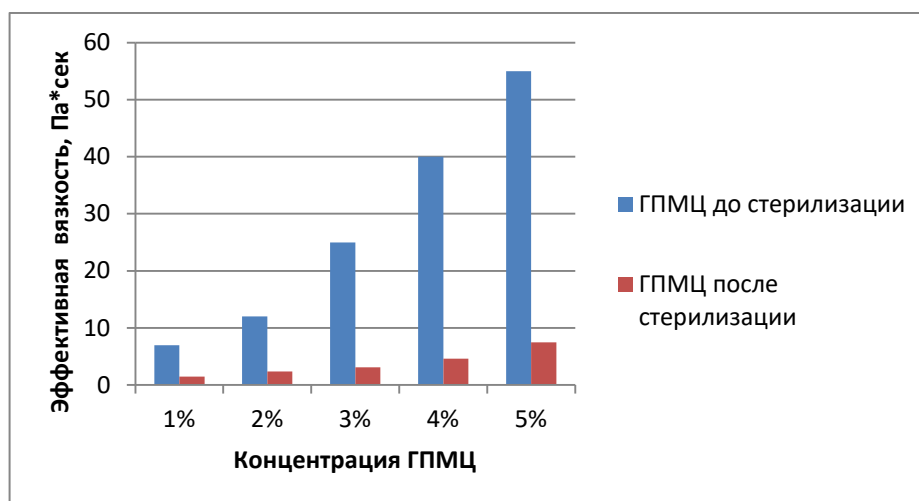


Рисунок 25 - Влияние гамма-стерилизации на вязкость геля ГПМЦ

В результате гамма-стерилизации водный раствор ГПМЦ подвергается деструкции, о чем свидетельствует значительное падение вязкости. Увеличение исходной концентрации ГПМЦ позволяет сохранить остаточную после стерилизации вязкость, однако, технологические особенности приготовления полимерной матрицы (загустки) не представляют возможным использовать концентрации растворов полимера от 3% до 5%.

Далее ключевым моментом, представляющим интерес для изучения, был анализ соотношения полимеров АН: ГПМЦ и влияние гамма-стерилизации на вязкость комбинации полимеров. Данные представлены на рисунке 26.

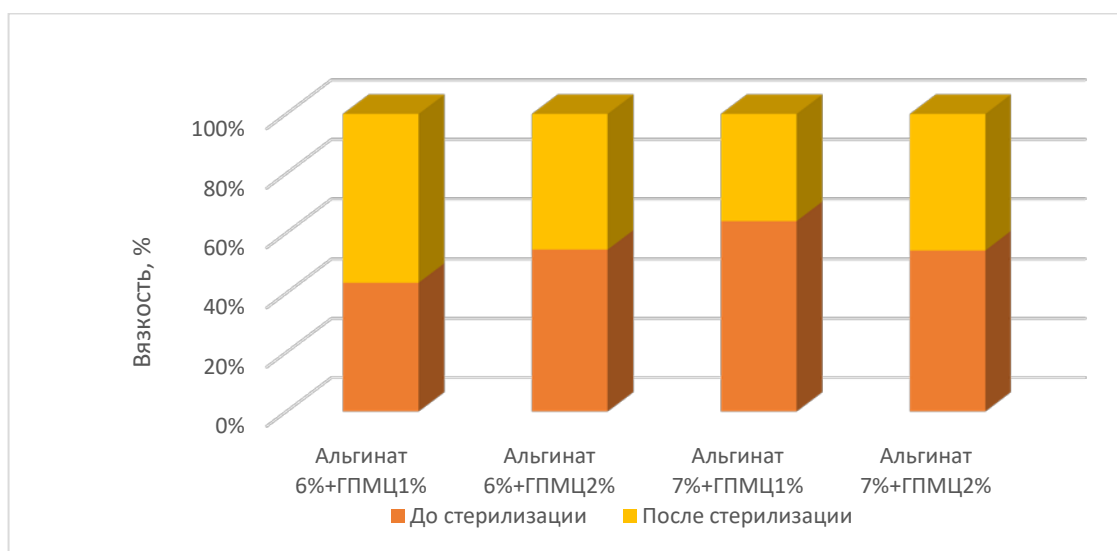


Рисунок 26 - Влияние гамма-облучения на эффективную вязкость композиции альгинат натрия - ГПМЦ

Приготовление композиции полимеров производилось путем изготовления матричных растворов альгината натрия и ГПМЦ с дальнейшим их смешением в единую композицию. Далее изучались ее реологические свойства.

Данный вариант получения полимерной композиции является наиболее оптимальным, т.к. готовая композиция характеризовалась равномерным распределением полимеров, отсутствием нерастворенных включений. Композиция пригодна для печати через сетчатый шаблон.

Из анализа полученных данных был сделан вывод, что, с учетом реологических параметров исходных растворов и особенностей технологии «Колетекс» наиболее оптимальным соотношением полимеров является альгинат натрия 6% и гипромелоза 2 %. В данном случае исходная вязкость полимеров позволяет вводить с помощью перемешивания активные и вспомогательные компоненты, а остаточная после стерилизации вязкость обеспечивает равномерное распределение геля на раневой поверхности без растеканий и потерь. На данном этапе исследовательской работы в качестве основного полимера был выбран альгинат натрия, и в качестве полимера-стабилизатора реологических параметров - ГПМЦ. Природный биополимер альгинат натрия обладает гемостатическими свойствами, антиаллергенностью и биосовместимостью, способностью к набуханию и гелеобразованию; ГПМЦ, в свою очередь, индифферентный полимер, представляющий универсальную гидрофильную матрицу для фармакологически активных веществ, обладающую хорошими гелеобразующими свойствами и отсутствием токсичности.

В данном эксперименте представляло интерес проанализировать влияние процентного содержания ГПМЦ в полимерной композиции на ПА папаина. Изготовили испытуемые образцы на основе АН 6% и ГПМЦ разной концентрации (0,5%, 1%, 2%, 3%) с включением папаина в количестве 4%. Далее была проанализирована протеолитическая активность папаина в данных композициях в течение часа после введения нативного фермента, в качестве образца сравнения выступил 4% водный раствор папаина.

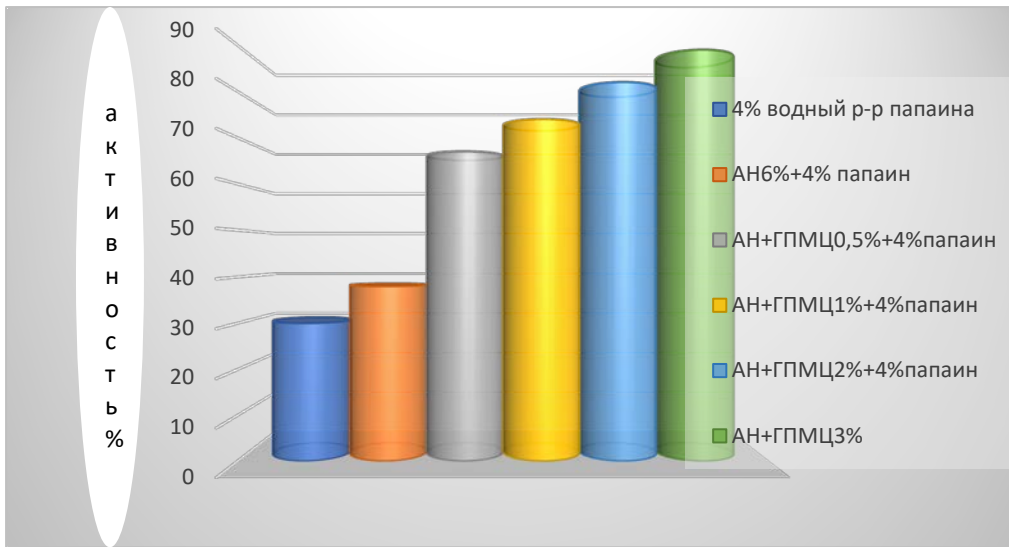


Рисунок 27 - Влияние ГПМЦ на ПА папаина, ПЕ/г (композиции)

Установлено, что ПА папаина в альгинатном геле без добавок имеет показатель в 1,7 раз меньший, чем в композиции с добавлением 0,5 % ГПМЦ, включение 1% ГПМЦ сохраняет ПА в 2 раза по сравнению с чистым АН, тогда как, в свою очередь, 3% ГПМЦ в 2,5 раза. Выше указывалось, что увеличение количества ГПМЦ значительно влияет на вязкость готовой композиции, что важно учитывать на каждом технологическом этапе производства.

Дальнейшее изучение гидрогелевой композиции на основе АН и ГПМЦ проходило с добавлением папаина на предмет сохранения ПА во времени. Это необходимо ввиду многостадийности технологического процесса, начиная с этапа изготовления гидрогелевой основы и завершая фасовкой и отправкой на стерилизацию готовой продукции; эти операции технологически могут быть растянуты по времени с учетом построения всего процесса производства. Готовили гидрогелевые композиции на основе альгината натрия 6% и папаина 4% с разным процентом включения ГПМЦ (0,5%, 1%, 2%, 3%).

Данные представлены ниже:

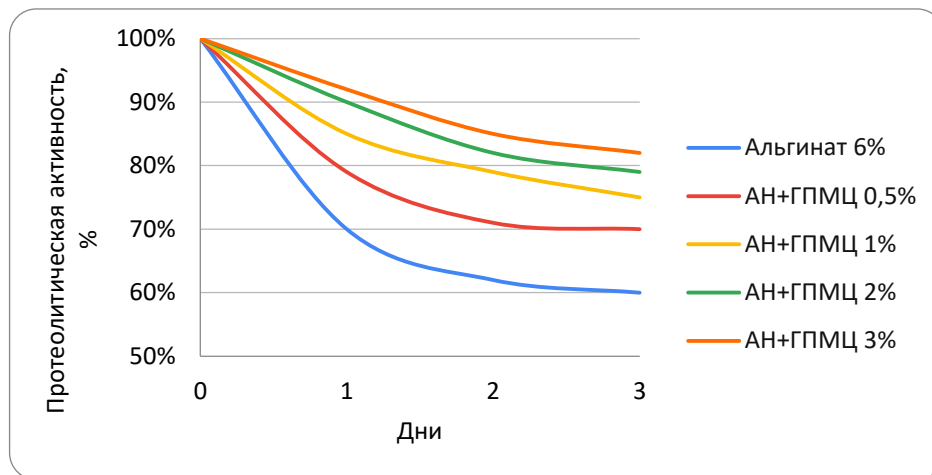


Рисунок 28 - Влияние концентрации ГПМЦ в альгинатном гидрогеле на ПА папаина во времени

Принимая во внимание, что в условиях производства максимальное время, затрачиваемое от изготовления композиции до стерилизации, составляет 1,5-2 суток, в экспериментальных образцах анализировалась ПА папаина в ходе хранения в течение трех дней при комнатной температуре, в темном месте. Было установлено, что ПА папаина в чистом альгинате натрия за первые сутки снижается ~ на 30% и ~ на 40% к третьим суткам, а при добавлении 0,5% ГПМЦ удается несколько стабилизировать ПА, и ее падение составляет 20% в первые сутки и до 30% в течение третьих суток. Увеличение ГПМЦ в композиции до 2% стабилизирует снижение на третьи сутки ПА на 21%. Максимальная стабилизации ПА происходит при введении в альгинатный гель 3% ГПМЦ, когда снижение ПА происходит на 18% от исходной активности, однако, увеличение вязкости композиции с применением данного количества стабилизатора ГПМЦ не позволяет применить его в нашей технологической схеме, предусматривающую плоскошаблонную печать.

В связи с этим в разрабатываемой гидрогелевой композиции решено было применять 2% ГПМЦ, включение которой в альгинат позволяет получить минимальное снижение ПА на 7 % в первые сутки и добиться необходимой вязкости композиции, которая была ранее проанализирована и выбрана для изготовления полимерной основы.

Принимая во внимание свойства ГПМЦ как индифферентного полимера, описанные выше, далее мы рассмотрели влияние данного компонента в роли стабилизатора ПА папаина в композиции при воздействии радиационной стерилизации в дозе 6 кГр. Данные отражены в таблице.

Таблица 12 - Влияние радиационной стерилизации на протеолитическую активность папаина в композиции на основе альгината натрия и с добавлением ГПМЦ

| Состав композиции                           | ПА до стерилизации, ПЕ/г | Остаточная ПА после стерилизации, ПЕ/г |
|---|--------------------------|--|
| 6% альгинат натрия,<br>4% папаин            | $3,81 \pm 0,18$          | $2,01 \pm 0,18$<br>52%                 |
| 6% альгинат натрия<br>2% ГПМЦ,<br>4% папаин | $3,93 \pm 0,15$          | $2,94 \pm 0,15$<br>74%                 |

Полученные данные свидетельствуют о том, что включение ГПМЦ в полимерную альгинатную основу в качестве стабилизатора при воздействии гамма-стерилизации целесообразно, т.к. позволяет сохранить ПА фермента на 22% больше по сравнению с использованием только альгината.

Несмотря на то, что ранее для нашего исследования уже был выбран папаин ввиду его более высокой протеолитической активности, представляло интерес оценить влияние добавления второго компонента в основу композиции на ПА бромелаина, чтобы понять, относится ли данный факт непосредственно к ферменту папаину или характерен и для других протеолитических ферментов и может использоваться как способ сохранения их активности.

Таблица 13 - Влияние радиационной стерилизации на протеолитическую активность бромелаина в гидрогеле АН и в композиции АН с добавлением ГПМЦ

| Состав композиции                              | ПА до стерилизации, ПЕ/г | Остаточная ПА после стерилизации, ПЕ/г |
|--|--------------------------|--|
| 6% альгинат натрия,<br>4% бромелаин            | $1,03 \pm 0,12$          | $0,43 \pm 0,12$<br>41%                 |
| 6% Альгинат натрия<br>2% ГПМЦ,<br>4% бромелаин | $1,35 \pm 0,18$          | $0,89 \pm 0,18$<br>65%                 |

Влияние ГПМЦ как защитного коллоида в обоих случаях заметно на этапе приготовления исходной композиции до стерилизации и введения фермента, предположительно, из-за снижения негативного влияния воды и образующихся свободных радикалов на ПА. При работе и с папаином, и с бромелаином после стерилизации наблюдается увеличение остаточной ПА на 22% для папаина и на 24% для бромелаина. Полученные данные подтверждают целесообразность введения ГПМЦ в разрабатываемую лечебную композицию.

Альгинат натрия выбран в качестве полимера-основы не только благодаря своему уникальному природному микроэлементному составу, регенерационным свойствам, но и в виду наличия гемостатических свойств. Область применения разрабатываемых изделий - это раны, и в ходе лечения и очищения не исключается их травмирование и возобновление кровотечений.

Поэтому, обосновывая включение в композицию ГПМЦ, необходимо было оценить гемостатические свойства лечебной композиции из альгината натрия при одновременном присутствии ГПМЦ. Гемостатические исследования *in vivo* проводили на экспериментальных животных, кроликах породы Шиншилла, которые являются стандартными объектами для доклинических испытаний и рекомендуются для данных экспериментов в нормативном документе: «Руководстве по проведению доклинических исследований», рекомендованному ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России для доклинической оценки гемостатического действия потенциальных лекарственных средств.

Основным критерием эффективности исследуемых материалов являлась гемостатическая активность (ГА) как среднее арифметическое двух показателей: ГА по времени остановки кровотечения (ВОК) и ГА по объёму кровопотери. Исследовалась салфетка текстильная с нанесенной гидрогелевой композицией на основе альгината натрия; салфетка текстильная с нанесенной гидрогелевой композицией на основе гидроксипропилметилцеллюлозы; салфетка текстильная с нанесенной гидрогелевой композицией на основе альгината натрия и гидроксипропилметилцеллюлозы. Контроль-марлевый тампон. Гемостатическая



активность по объёму кровопотери, по ВОК для марлевого тампона составляла 0%.

Таблица 14 - Интерпретационная шкала оценки гемостатической активности (ГА)

| Численное значение ГА, %    | Интерпретация  |
|-----------------------------|--|
| $-\infty < \text{ГА} < -10$ | Исследуемый образец не обладает выраженными гемостатическими свойствами или усиливает кровотечение |
| $\text{ГА} = (0 \pm 10)$    | Значения соответствуют применению марлевого тампона (значения контроля)                            |
| $10 < \text{ГА} < 50$       | Исследуемый образец обладает некоторой гемостатической эффективностью                              |
| $50 < \text{ГА} < 75$       | Образец обладает выраженными местными гемостатическими свойствами                                  |
| $75 \leq \text{ГА} < 100$   | Образец обладает уникальными местными гемостатическими свойствами                                  |

Результаты данного анализа продемонстрировали, что салфетка с нанесенной композицией на основе АН при введении в состав композиции ГПМЦ демонстрирует показатель ГА от 64% до 77% характерный для выраженных гемостатических свойств, что позволяет нам эффективно ее применять в качестве матрицы лечебных изделий и использования материала как гемостатика.<sup>3</sup>

### **3.9.2 Изучение влияния стабилизаторов на реологические параметры разрабатываемой композиции**

Анализ литературных данных [166] показал, что снижение вязкости альгинатной композиции во время гамма-стерилизации может быть уменьшено за счет введения многоатомных спиртов. Среди них для медицинских целей широко применяется глицерин. Целесообразность его использования связана с еще одним фактом, а именно, с необходимостью увеличить атравматичность изделий. Разрабатываемые нами лечебные изделия предполагается выпускать и использовать в двух вариантах исполнения: лечебный гидрогель и салфетка на текстильной основе; они должны быть максимально атравматичными, чтобы способствовать безболезненной смене повязок. С этой целью решено было также ввести в разрабатываемую гидрогелевую композицию глицерин.

<sup>3</sup> Автор выражает большую благодарность проф., зав. лаб. патологии и фармакологии гемостаза ФГБУ «НИИЦ гематологии» Минздрава РФ Белозерской Г.Г.

Согласно литературным данным, оптимальная концентрация глицерина, при которой потери ферментативной активности минимальны, составляет 2-5%, иммобилизованные препараты протеаз более стабильны при введении глицерина в сравнении с нативными [151,158].

Наилучшая концентрация глицерина в иммобилизованном препарате, которая должным образом обеспечивает атравматичность препарата в условиях наложения его на рану, составляет 5% [151], однако, добавление глицерина в количестве, превышающем 2%, может способствовать снижению ПА фермента в лечебной композиции.

Было решено проанализировать реологическую стабильность при включении в гидрогелевую композицию на основе альгината натрия 1% и 2% глицерина. Влияние стерилизации (6 кГр) на композицию альгинат-глицерин в зависимости от количества глицерина показаны на графике.

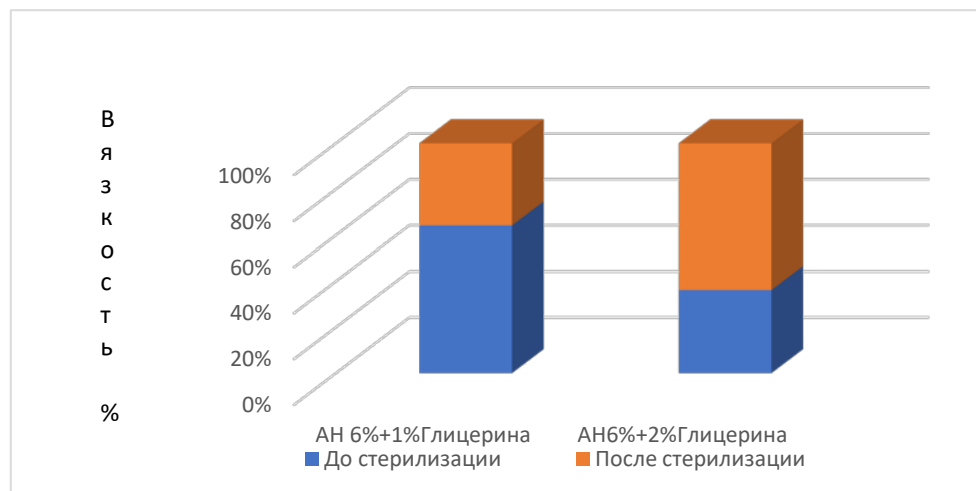


Рисунок 29 - Влияние глицерина на реологические показатели АН

По полученным данным мы видим, что при введении 2% глицерина в альгинатный гель общая вязкость композиции снижается незначительно, однако остаточная после стерилизации вязкость значительно сохраняется, что подтверждает свойства глицерина как стабилизатора гидрогелевой композиции.

Поскольку сохранение протеолитической активности папаина является важным моментом на каждом этапе данной работы, начиная с момента создания

матричной композиции, важно оценить влияние каждого из дополнительных компонентов, в том числе, 2% глицерина. Проводилась оценка ПА папаина (4%) в гидрогелевой композиции на основе альгината натрия (при трехкратном повторении эксперимента).

Таблица 15- Влияние 2% глицерина на ПА папаина в композиции на основе АН

| № опыта | АН+4% папаин до стерилизации ПЕ/г | АН+ 4% папаин после стерилизации ПЕ/г | АН+ 4% папаин+2% глицерин; до стерилизации ПЕ/г | АН+ 4% папаин+2% глицерин; после стерилизации ПЕ/г |
|---------|-----------------------------------|---------------------------------------|---|--|
| 1.      | 3,77±0,16                         | 2,21±0,35                             | 3,85±0,16                                       | 2,42±0,21  |
| 2.      | 3,80±0,24                         | 2,05±0,10                             | 3,71±0,15                                       | 2,36±0,14  |
| 3.      | 3,75±0,15                         | 2,33±0,20                             | 3,79±0,25                                       | 2,39±0,04  |

Был проведен эксперимент по оценке стабилизации ПА папаина с помощью глицерина после стерилизации. Установлено, что введение глицерина позволяет незначительно, но сохранить активность папаина в среде альгинатного геля, в среднем на 6-8%. Положительное влияние на ПА фермента позволяет использовать данный компонент с целью стабилизации реологических параметров композиции.

Важным критерием в ходе применения лечебного изделия является его атравматичность. Для гидрогелевых форм по мере высыхания в раневой поверхности возможен стягивающий эффект, что может повлечь дополнительное травмирование грануляционной ткани. Учитывая этот факт, считалось целесообразным изучить влияние введения добавки глицерина, увеличивающего время высыхания гидрогелевой композиции, и, усиливающего, тем самым его атравматичность.

Была определена высыхаемость двух гидрогелевых композиций из 7% альгината натрия. Первая композиция содержала альгинат натрия, во вторую было добавлено 2% глицерина. Измерения проводились в течение первых 5 дней.

Таблица 16- Определение изменения массы композиции с течением времени

| Дни измерений | Убыль массы композиций, г |              |
|---------------|---------------------------|--------------|
|               | Без глицерина             | С глицерином |
| 1             | 100                       | 100          |
| 2             | 90,3                      | 97           |
| 3             | 69                        | 92           |
| 4             | 58                        | 83           |
| 5             | 49                        | 77           |

На второй день измерений отмечается убыль гидрогелевой массы без глицерина на 10%, массы с глицерином на 3%, а к третьему дню убыль составила 31%. В результате эксперимента определено, что композиция с глицерином теряет меньше влаги, чем без глицерина (гидротропный агент), что ожидалось. Важно отметить, что в первые дни отмечается замедление высыхания геля, что подразумевает пролонгацию терапевтического эффекта лечебного изделия за счет сохранения влажной среды на поверхности раны, а также и увеличение атравматичности изделия при смене повязок.

В работе так же был осуществлен выбор добавки (эуксил), дополнительно стабилизирующей срок годности гидрогелевой композиции в течение необходимого времени. Данные представлены в главе, посвященной технологии получения медицинского изделия.

### 3.10 Выбор антимикробного компонента

Ранее неоднократно отмечалось, что нами поставлена задача создать медицинское изделие, где основными действующими веществами являются фермент и антимикробный компонент, который будет обладать широким диапазоном

действия, в том числе будет активным и к резистентным штаммам бактерий. В качестве антимикробного агента нами на основании литературных данных было предложено серебро, отвечающее всем предъявляемым требованиям, а именно, используемость в медицине препаратов на основе серебра обусловлена его способностью подавления жизнедеятельности микроорганизмов и относительно низкой токсичностью. Отмечалось, что интерес представляют соли серебра, в частности нитраты.

В литературе имеется много данных, подтверждающих, что высокая активность проявляется у серебра в наноформе; такая форма позволяет достигать увеличения антимикробной активности при существенно более низкой концентрации. Это связано с тем, что при переходе в наноформу усиливается биоцидный эффект за счет подвижности частиц, увеличения площади и вероятности контакта с микроорганизмами. Механизм биоцидного, антимикробного действия катионов металлов и НЧС заключается в его универсальности по отношению ко всем патогенным микроорганизмам. Катион металла или его наночастица имеют определенное сродство к гликопротеину, входящему в оболочку мембраны всех видов клеток. Катион металла при контакте с гликопротеином мембраны взаимодействует с ним, происходит деструкция оболочки мембраны, образуются дислокации (нарушения) наноразмеров. Через них катион или наночастица проникает внутрь клетки и нарушает цикл репликации, вызывая ее гибель.

Один из вариантов перехода серебра из ионной в наноформу возможен в условиях восстановления в щелочной среде. В литературном обзоре указано, что применение полисахаридов и, в частности, альгината натрия в качестве биовосстановителя основывается на том, что катион металла образует с полисахаридом комплекс (благодаря наличию карбоксильной и гидроксильной групп), после чего происходит восстановление иона  $Me$  до нейтрального атома, который затем агрегирует до наночастицы. Альгинат натрия имеет в щелочной среде за счет ионизации карбоксильных групп  $COO^-$  и гидроксильных групп  $OH^-$  отрицательный заряд, а катион серебра положительный. Между ними образуется

комплекс, который в щелочной среде восстанавливается до наночастиц серебра [144].

Учитывая, что разрабатываемая нами лечебная композиция на основе натриевой соли альгиновой кислоты имеет нейтральную или слабощелочную среду (рН), а для лечения гнойных ран предпочтительна нейтральная или слабощелочная реакция, мы предположили, что при введении соли нитрата серебра в альгинатный гель и (в случае необходимости) обеспечении его рН до 7-7,5 ед, мы можем способствовать образованию наночастиц серебра и повышению эффективности лечения.

Альгинат натрия будет одновременно выполнять функцию биовосстановителя катионов  $Me$  и стабилизатора наночастиц серебра, а также «депо» для лечебного препарата. При этом должны сохраняться такие свойства АН, как регенерационная способность, гемостатическая активность и т.д. Сложности, которые мы ожидаем, могут быть связаны со взаимодействием используемого в композиции протеолитического фермента папаина и серебра. Этот вопрос требовал от нас отдельного изучения. Известны разные варианты взаимодействия металлов и ферментов; в частности, где химотрипсин стабилизирует серебро [159]. Описаны так же и другие варианты взаимодействия.

Для сравнительной оценки антимикробных свойств  $AgNO_3$  были выбраны препараты, наиболее часто применяемые для рассматриваемых нами случаев лечения ран, а именно, мирамистин, хлоргексидин.

Мирамистин и хлоргексидин сегодня наиболее широко применяются в клинической практике при лечении ран различной этиологии и рекомендованы для этих целей в протоколах Минздрава РФ.

Чтобы определить количество нитрата серебра, которое будет целесообразно для использования в нашей разработке, был проведен эксперимент по изучению изменения обсемененности бактериальных культур *St. aureus*, *E. coli*, *Salm./Enterob.*, грибов, дрожжей в присутствии нитрата серебра и указанных выше антимикробных препаратов. Готовились тестовые образцы на основе альгината натрия с добавлением разной концентрации нитрата серебра, далее выявлялась

минимальная концентрация, проявляющая антимикробный эффект в течение 24 и 48 часов, в качестве объекта сравнения был использован образец альгината натрия без серебра. Тест проводился с применением специализированных подложек Rida Count, представляющих собой готовую систему, содержащую питательную среду, предназначенную для культивирования конкретной культуры. Далее производилась инкубация при температуре 36°C в течение 24-48 часов, оценку так же осуществляли согласно методике, изложенной в ОФС 42-0067-07 «Микробиологическая чистота» (в трехкратном повторении, “+”-рост, “-“ отсутствие роста колоний). Данные отражены в таблице 17.

Таблица 17- Влияние концентрации нитрата серебра в композиции на основе АН на антибактериальную активность

| Концентрация серебра в гидрогелевой композиции, %                                  | Культуральные среды |           |        |                |               |
|--|---------------------|-----------|--------|----------------|---------------|
|  | Общий бак.посев     | St.aureus | E.coli | Salm./Enterob. | Грибы, дрожжи |
| <b>Композиция на основе альгината натрия и нитрата серебра, инкубация 24 часа</b>  |                     |           |        |                |               |
| 0,2  | -                   | -         | -      | -              | -             |
| 0,1  | -                   | -         | -      | -              | -             |
| 0,05   | -                   | -         | -      | -              | -             |
| 0,025  | -                   | -         | -      | -              | -             |
| <b>АН 7%</b>   | +                   | +         | +      | +              | +             |
| <b>Композиция на основе альгината натрия и нитрата серебра, инкубация 48 часов</b> |                     |           |        |                |               |
| 0,2  | -                   | -         | -      | -              | -             |
| 0,1  | -                   | -         | -      | -              | -             |
| <b>0,05</b>  | -                   | +         | -      | +              | -             |
| 0,025  | -                   | +         | +      | +              | -             |
| <b>АН 7%</b>   | +                   | +         | +      | +              | +             |

Из таблиц следует, что в течение суток при введении рассматриваемых концентраций серебра роста колоний во всех экспериментальных средах не

наблюдается. По истечению 48 часов положительный эффект наблюдается при концентрациях нитрата серебра 0,2% и 0,1%.

Таблица 18-Влияние концентрации нитрата серебра в композиции на основе АН и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  на антибактериальную активность

| Композиция на основе альгината натрия, нитрата серебра и 0,1М $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , инкубация 48 часов |                     |           |        |                |               |
|---|---------------------|-----------|--------|----------------|---------------|
| Концентрации серебра в гидрогелевой композиции, %   | Культуральные среды |           |        |                |               |
|   | Общий бак.посев     | St.aureus | E.coli | Salm./Enterob. | Грибы, дрожжи |
| 0,2   | -                   | -         | -      | -              | -             |
| 0,1   | -                   | -         | -      | -              | -             |
| <b>0,05</b>   | -                   | -         | -      | -              | -             |
| 0,025   | -                   | +         | -      | +              | -             |
| АН 7%   | +                   | +         | +      | +              | +             |

Далее в альгинатную композицию был введен щелочной агент 0,1М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  для создания необходимых условий по формированию наночастиц серебра. Отметим, что при разработке оптимального состава композиции чрезвычайно важно для улучшения ее свойств использовать минимальные концентрации активных веществ, позволяющие исключить или существенно снизить токсические эффекты, и воздействие серебром в наночастичной форме непосредственно на пораженный участок позволяет подойти к решению этой задачи.

По приведенным данным эксперимента установлено, что концентрация нитрата серебра в щелочной среде, оказывающая необходимый антимикробный эффект, подтвержденный отсутствием роста в тест-подложках с культурами E.Coli, St.Aureus, Sal. Enterobacteria, так же в посевах на грибы/плесень и подходящий для реализации нашей разработки лечебного изделия, составляет 0,05%.



Важным аспектом нашего исследования является не только выбор активных компонентов, но и оценка их поведения в зависимости от технологических аспектов получения материалов, которые детально будут рассмотрены далее в соответствующей главе. Поэтому уже на этапе анализа исходных веществ важно предусмотреть возможное взаимодействие компонентов разрабатываемой системы и их влияние друг на друга. Представляло интерес проанализировать выбранные нами активные компоненты хлоргексидин и мирамистин в сравнении с нитратом серебра на антибактериальную активность в течение 48 часов, а также изучить физическую стабильность полученного гидрогеля при введении каждой субстанции.

Таблица 19-Анализ антибактериальной эффективности активных компонентов в течение 48 часов

| Состав композиции с антимикробным компонентом                                 | Обсемененность, 48 часов |           |               |        |                | Стабильность раствора |
|---|--------------------------|-----------|---------------|--------|----------------|-----------------------|
|   | Общая бак. посев         | St.aureus | Грибы, дрожжи | E.coli | Salm./Enterob. |                       |
| АН 7%+ AgNO <sub>3</sub> 0,05% (среда 0,1 М Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) | -                        | -         | -             | -      | -              | стабилен              |
| АН7%+Мирамистин р-р 0,01%   | -                        | -         | -             | -      | -              | стабилен              |
| АН7%+Хлоргексидин 0,05%   | -                        | -         | -             | -      | -              | осадок                |
| АН 7%+папаин 4%+ AgNO <sub>3</sub> 0,05% (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )   | -                        | -         | -             | -      | -              | стабилен              |
| АН 7%   | +                        | +         | +             | +      | +              | стабилен              |

Было установлено, что исследуемая гидрогелевая композиция с нитратом серебра в щелочной среде в течение 48 часов проявляет противомикробную активность в отношении всех исследуемых культур. Широко используемая субстанция мирамистина имеет существенный недостаток, проявленный в возможности

нежелательных реакций в ходе лечения, а также определенный диапазон действия, ограниченный возрастом пациентов [160]. Не смотря на его проявленную активность в отношении тестовых культур, было принято решение отказаться от данного препарата в дальнейшем исследовании.

В ходе анализа было установлено изменение состояния испытуемого образца на основе альгината натрия и хлоргексидина, а именно, выпадение осадка, что создает сложность в технологическом процессе при создании гомогенной композиции с равномерно распределенным действующим веществом. Согласно приведенным данным, введение в альгинат натрия папаина и нитрата серебра в щелочной среде обеспечивает композиции наиболее широкое антибактериальное действие.

С целью количественного определения активности выбранного антимикробного агента нитрата серебра был проведен эксперимент на референтном штамме *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Приготовленная бульонная культура *S. aureus* ATCC 29213 была разлита в 5 пробирок по 2мл. В пробирки №1-№4 были внесены образцы исследуемых салфеток, каждая размером 2см<sup>2</sup> (стерильные):

№1 – салфетка гидрогелевая: альгинат натрия, фермент, серебро;

№2 - салфетка гидрогелевая: альгинат натрия, серебро;

№3 - салфетка гидрогелевая: альгинат натрия, фермент;

№4 – материал текстильный.

В качестве контроля служила пробирка №5 с исходной бульонной культурой тест-штамма. Все пробы инкубировали в термостате при  $t = 35^{\circ}\text{C}$ , через 24 часа - делали высевы на чашки с плотной питательной средой с последующим (через 24ч. инкубации чашек с посевами) подсчётом количества выросших колоний. Результаты представлены в таблице 20.

Таблица 20 - Анализ антибактериальной активности образцов

| № пробы      | Исх. концентрация <i>S.aureus</i> ATCC 29213, КОЕ/мл | Концентрация <i>S.aureus</i> ATCC 29213 через 24ч., КОЕ/мл |
|--------------|--|--|
| №1           | $1,1 \times 10^8$                                    | $1,6 \times 10^7$  |
| №2           | $1,1 \times 10^8$                                    | $2,0 \times 10^7$  |
| №3           | $1,1 \times 10^8$                                    | $3,0 \times 10^7$  |
| №4           | $1,1 \times 10^8$                                    | $2,6 \times 10^8$  |
| №5(контроль) | $1,1 \times 10^8$                                    | $3,0 \times 10^8$  |

По полученным данным<sup>4</sup> можно сделать вывод, что присутствие нитрата серебра в концентрации 0,05% в композиции, нанесенной на лечебную салфетку, позволяет существенно снизить число КОЕ в экспериментальной среде со штаммом *Staphylococcus aureus*.

По литературным данным [161], присутствие солей тяжелых металлов, в частности, серебра, может негативно влиять на протеолитическую активность ферментов. Поэтому необходимо было оценить совместное присутствие этих компонентов, чтобы установить возможную степень инактивации папаина. Для этого готовили стандартные растворы серебра нитрата и нативного папаина (10 г/л). Исходная протеолитическая активность папаина определялась по методу Ансона и составила 0,20 ПЕ/мг. Согласно данной методике в качестве субстрата выступает гемоглобин бычьей крови. Гемоглобин является железосодержащим белком, естественным образом присутствующим в форменных элементах крови, в частности в эритроцитах. Таким образом среда исследования становится наиболее приближенной к раневой поверхности, на которой планируется применять разрабатываемое изделие. Кроме того, присутствие в белке субстрата железа снижает риск взаимодействия ионов серебра с гемоглобином, и, как следствие, уменьшает погрешность эксперимента. Анализ активности папаина проводился в

<sup>4</sup> Автор выражает благодарность за помощь в получении экспериментальных данных зав. межклинической бактериологической лаб. ПМГМУ им. И.М. Сеченова, к.м.н. Морозовой О.А. и к.м.н. Щедриной М.А.

контрольных точках с учетом увеличения концентрации нитрата серебра<sup>5</sup>. Данные представлены на рисунке 30.

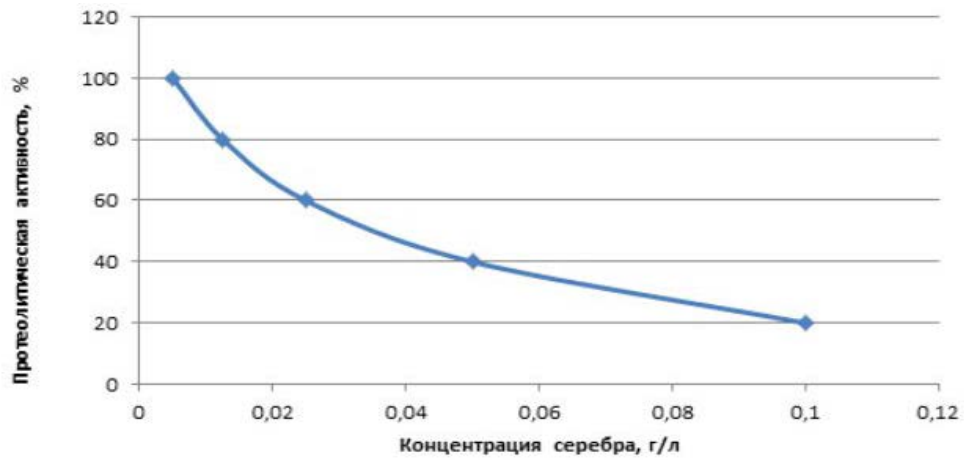


Рисунок 30- Изменение активности папаина при совместном нахождении в водном растворе с ионами серебра.

Отметим, что с увеличением концентрации нитрата серебра в водном растворе происходит падение протеолитической активности папаина, что требуется учитывать в разработке технологии получения лечебной гидрогелевой композиции; необходимо рассмотреть способы максимальной защиты как протеолитической активности фермента, так и бактерицидных свойств соли серебра.

Доказательством активного действия разрабатываемой композиции на гнойную рану следует считать эксперимент, проводимый нами на модели раны. В большей степени он носит качественный и сравнительный характер, но позволяет оценить роль основных компонентов лечебной композиции.

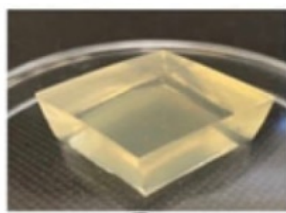
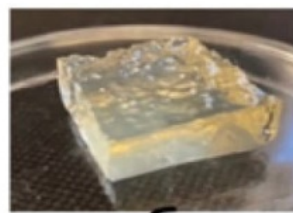
Отметим, что гной, некротическая ткань и сывороточные корки являются составляющими гнойной раны и клиническими индикаторами состояния раны, для которого характерен рН со средним значением около  $5,9 \pm 0,6$  [31]. Состав гнойной раны и рН необходимо оценить, в том числе качественно, и учитывать в нашем исследовании, чтобы доказать эффективность действия создаваемой композиции.

<sup>5</sup> Автор выражает благодарность за помощь в получении результатов зав. кафедры хим. энзимологии МГУ им. Ломоносова проф. А.П. Сеницыну и научному сотруднику Е.Г. Кондратьевой.

Для данного эксперимента необходимо было воссоздать модель гнойной раны, включающей раневое содержимое с высокой вязкостью, в основе которого находится смесь вязкого белка фибрина эксудата и электролитов.

За основу при создании модели раны был взят гидролизат животного (свиного) коллагена с добавлением солей, (магний, кальций, железо, натрий и калий). Чтобы максимально приблизить состав экспериментальной модели к ране, в разрабатываемую смесь был добавлен раствор изолята морского коллагена [162], аминокислотный состав которого максимально приближен к человеческому и включает такие аминокислоты, как оксипролин, глицин, пролин.

В ходе эксперимента изучалось воздействие папаина на моделирующий рану экспериментальный белковый субстрат, сравнивалось действие на него нативного папаина, папаина иммобилизованного в альгинате натрия и папаина при его совместном присутствии с серебра нитратом в альгинатном геле.

**а.****б.****в.****г.**

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 серебра иммобилизованного в альгинатном геле на модельный субстрат

Рисунок 31- Модель гнойной раны

Для проведения эксперимента готовили навеску в виде брусков из смеси коллагенов (рН~6.3) с равнозначными размерами и весом (а), на которые воздействовали сухим порошком нативного папаина (б), папаином, иммобилизованным в альгинатном геле, 4% (в), а также альгинатным гелем, содержащим 4% папаин и 0,05%  $\text{AgNO}_3$  (с щелочной средой 0,1М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (г). Для этого на модель наносили пробу таким образом, чтобы ее поверхность была

покрыта испытуемым образцом. Из рисунка 31 следует, что во всех случаях происходит деструкция, разрушение модельной коллагеновой формы, однако, в наибольшей степени это происходит под действием нативной формы папаина (сухой порошок). Можно сделать вывод, что введение фермента в альгинатный гель способствует пролонгации протеолитического действия. В свою очередь при воздействии альгината натрия с иммобилизованным папином и нитратом серебра наблюдается так же лизис коллагеновой формы, что качественно подтверждает сохранение протеолитической активности папаина в присутствии ионов серебра.

Для оценки результата эксперимента проводился анализ изменения массы исходных коллагеновых моделей, имеющих первоначально равную массу (10г), во времени под действием испытуемых составов на основе альгината с ферментом и серебром. Данные представлены ниже:

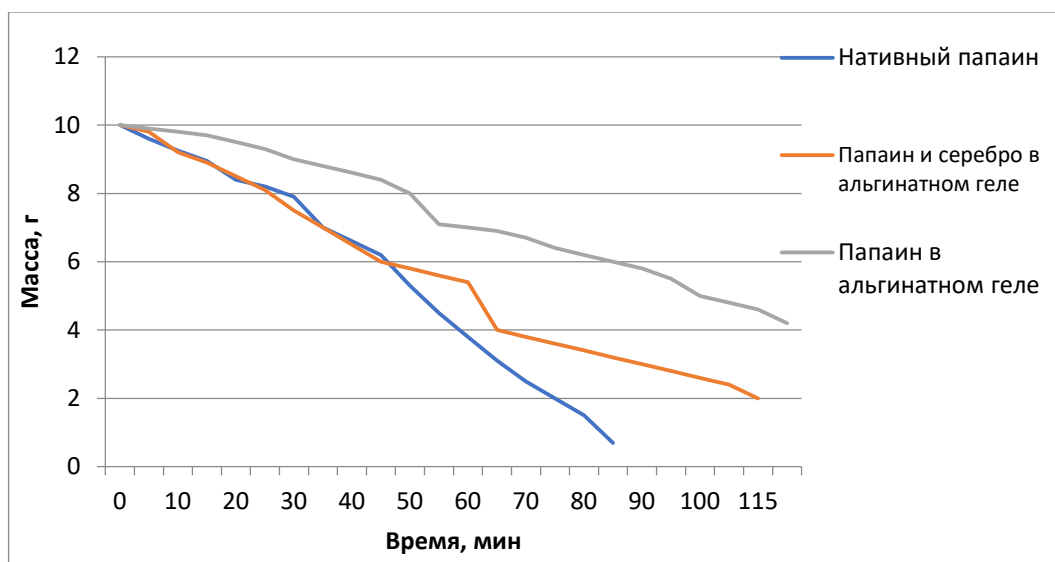


Рисунок 32- Изменение массы модели раны под воздействием нативного и иммобилизованного образцов папаина

По данным эксперимента (рисунок 32) видно, что самое активное изменение структуры и массы коллагеновой модели происходит под действием нативной формы папаина (порошок). За первые 30 минут эксперимента воздействие нативного папаина разрушает белковую структуру модели на 20 % активнее, чем папаин, иммобилизованный в геле. По истечению часа от начала эксперимента

масса белковой модели при воздействии нативного порошка папаина снизилась на 60%, а при воздействии иммобилизованного папаина в геле АН на 30%.

Наиболее медленное действие на модельный субстрат отмечается у папаина, иммобилизованного в альгинатном геле, т.е. включение в гелевую альгинатную композицию папаина позволяет обеспечить более пролонгированное и равномерное высвобождение препарата на раневую поверхность. Применительно к разрабатываемому гидрогелевому лечебному изделию важно отметить, что при одновременном присутствии в композиции с ферментом ионов серебра падение массы коллагеновой модели составило 42%, что говорит о литическом воздействии на белковые компоненты модели и проявлении ПА папаина. В качестве вывода можно отметить, что физическая иммобилизация фермента позволяет пролонгировать лечебный эффект при воздействии на белковый субстрат в ходе лечения гнойных ран, что являлось одной из задач данного исследования, и введенный в композицию антимикробный препарат не препятствует достижению этого эффекта.

### **3.14 Изучение влияния антимикробного препарата на массоперенос фермента в модель раны**

Поскольку одной из целей нашей разработки является получение лечебной аппликации на текстильной основе с заданными концентрационными характеристиками, то одной из главных задач является так же изучение десорбции активных компонентов из текстильной аппликации в рану. Изучение кинетики массопереноса фермента непосредственно из гидрогелевой композиции во внешнюю среду, моделирующую рану, представляло большие экспериментальные сложности и нами не проводилось.

Для изучения массопереноса требуется моделирование внешней среды, которая может представлять собой плотное гнойное отделяемое (белковый некротический субстрат), или быть жидкой (экссудат, лимфа, кровь). Воспроизводимость данного эксперимента является непростой ввиду малых объемов внешней среды – раны, которая, оцененная с помощью модуля ванны, и реально не превышает значений 2-5 [115]. Кроме того, эксперимент осложняется многокомпонентным составом раны и нестабильными реологическими параметрами. Более информативным было бы изучение массопереноса во внешнюю среду (рану) при использовании модели «с уносом», подразумевающим частичную замену объема внешней среды за счет обновления физиологических жидкостей и уносом части объема в лимфатическую систему. Однако мы не прибегали к указанному методу моделирования в связи со сложностью его воспроизведения; получаемые нами данные относим к сравниваемым между собой в одинаковых условиях.

На разных этапах исследований нами были рассмотрены различные варианты модельных сред, в которые десорбируют активные компоненты из лечебной салфетки. На начальном этапе в качестве модельной среды была взята дистиллированная вода (рН 6,4) с пониманием того, что она не соответствует реальным условиям, однако дает возможность получить сравнительные результаты. Необходимо было оценить влияние ионов серебра как инактивирующего фактора на изменение активности комплекса латекса папайи.



Изучали массоперенос белка фермента во внешнюю среду из лечебного текстильного изделия и оценивали изменение его ПА во времени.

Отметим, что более глубокое изучение массопереноса фермента проводилось на этапе выбора подходящего ТМ для матрицы лечебного изделия, и описано в соответствующем разделе. Анализируемая композиция наносилась на ТМ методом плоскошаблонной печати через сетчатый шаблон с последующим высушиванием получаемого материала.

Процесс массопереноса происходит во времени, и включает в себя несколько стадий, таких как десорбция активных компонентов с текстильной поверхности во внешнюю среду, диффузия из набухающей полимерной матрицы, десорбция из текстильной матрицы. В качестве подложки для гидрогеля использовали полотно холстопршивное, на поверхность которого, с одной стороны, наносится гидрогель.

Состав гидрогелевой композиции, используемой для нанесения на текстильный материал по технологии текстильной печати I: альгинат натрия 7%, папаин 4%, нитрат серебра 0,05%, карбонат натрия 0,1М. Для сравнительного анализа с целью оценки влияния ионов серебра на ПА папаина проводился параллельный эксперимент с аналогичным лечебным текстильным изделием, состав которого не содержал нитрат серебра и основывался на альгинате натрия 7% и папаине 4% (II).

Нами был рассмотрен диапазон временных интервалов исследования от 0,5 часа до двух суток, чтобы оценить время высвобождения фермента, и, как следствие, эффективного нахождения лечебного изделия на раневой поверхности и необходимость смены повязки. В течение указанного времени измерялась величина протеолитической активности (ПА) фермента и количество белка, перешедшего в модельную среду. Для эксперимента был взят модуль внешней среды ванны 100. Расчёт количества белка проводился по методу Лоури. Данные представлены в таблице.

Таблица 21-Изменение концентрации белка в модельной среде во времени (I)

| 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  | 0,120          |
| 48    | 0,1  | 0,121          |

Во время эксперимента наблюдается увеличение количества белка фермента, перешедшего из текстильного материала (салфетки) в дистиллированную воду. Десорбция активного компонента из лечебной салфетки происходит через этап набухания полимерного альгинатного слоя, далее, в зависимости от скорости набухания полимера, распределения в нем фермента и от градиента концентрации на границе текстильный материал-ранева среда фермент (белок) переходит во внешнюю среду. Унос препарата из раны в организм, как отмечалось ранее, в данном случае не учитывался, однако очевидно, что в реальных условиях переход в многокомпонентное раневое отделяемое будет производиться с меньшей скоростью, чем в используемую модель раны-дистиллированную воду при  $M=100$ . В рамках применения лечебного изделия таким образом формируется пролонгированный эффект от импрегнированного в полимере фермента.

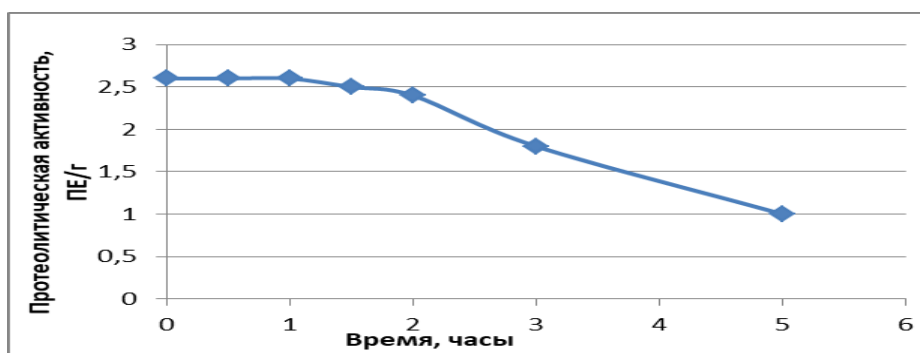


Рисунок 33- Изменение ПА папаина в присутствии соли серебра при массопереносе в модельную среду ( $H_2O$   $M=100$ ,  $t=20-22^{\circ}C$ )

По результатам, представленным на графике, видно, что максимальная протеолитическая активность фермента, перешедшего в используемую нами модельную среду, отмечается в первые два часа. Далее происходит снижение ПА фермента. Вероятно, происходит дополнительное воздействие ионов металла на фермент за счет высвобождения и диссоциации нитрата серебра. В реальных условиях под воздействием факторов среды (раневого содержимого) возможно более выраженное падение активности папаина. Ниже представлен график изменения ПА фермента перешедшего в модельную среду из образца лечебного текстильного материала, содержащего альгинат натрия 7% и папаин 4% (без ионов серебра).

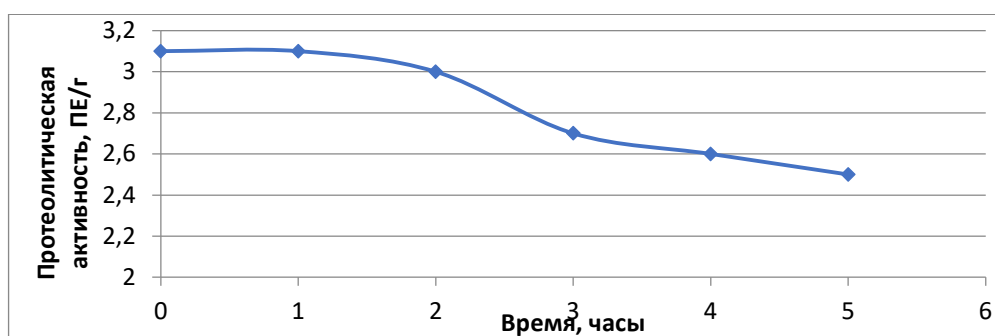


Рисунок 34- Изменение ПА папаина в ходе массопереноса в модельную среду из текстильной основы

В первые полтора часа ПА перешедшего в модельную среду фермента на 20% выше, чем в аналогичном исследовании образца с присутствием соли серебра и щелочи в составе. В обоих случаях наблюдается спад активности фермента в водной среде во времени.

Таблица 22- Изменение концентрации белка в модельной среде во времени II

| Время, часы | Протеолитическая активность папаина, ПЕ/г | Концентрация белка, мг/мл |
|-------------|---|---------------------------|
| 0,5         | 3,1                                       | 0,088                     |
| 1,0         | 3,1                                       | 0,094                     |
| 1,5         | 3,0                                       | 0,103                     |
| 2,0         | 3,0                                       | 0,113                     |
| 3,0         | 2,8                                       | 0,122                     |
| 5,0         | 2,7                                       | 0,129                     |
| 24          | 0,1                                       | 0,125                     |
| 36          | 0,05                                      | 0,119                     |
| 48          | 0,01                                      | 0,121                     |

В представленном эксперименте, сравнив полученные данные по ПА папаина в двух изделиях (с присутствием нитрата серебра и без), можно сделать вывод о минимальном влиянии ионов металла на ПА папаина в анализируемом текстильном изделии. Пик активности фермента в рамках применения изделия с нанесенным гидрогелевым слоем на ТМ наблюдается в первые 1,5-2 часа, далее наблюдается пролонгированный эффект за счет продолжительного высвобождения белка активного компонента и снижение в течение суток активности до 0,1ПЕ/г, считающейся эффективной [82]. Отметим, что имеется вероятность дополнительного нейтрализующего воздействия на фермент компонентов раневого содержимого (экссудата). Это означает, что в непредвиденных экстремальных ситуациях или при отсутствии возможности сменить повязку сложно ожидать терапевтического эффекта в течение более 48 часов. Однако в реальных условиях в медицинских учреждениях смена повязок при лечении гнойных и длительно незаживающих ран происходит через 24-36

часов, что будет учтено при создании методики применения разрабатываемого лечебного изделия.

### **3.15 Изучение взаимодействия активных компонентов разрабатываемого лечебного материала**

Разработка технологии получения гидрогелевой композиции, используемой для лечения гнойных и вялотекущих ран (I-II стадии раневого процесса), базировалась на анализе экспериментальных данных, полученных нами и ранее описанных в представленных главах настоящего исследования и литературном обзоре.

Среди факторов, которые необходимо учитывать, следует выделить:

- факт снижения ПА фермента в присутствии нитрата серебра
- факт снижения ПА фермента в результате гамма-стерилизации
- необходимость достижения нейтрального или (желательно) слабощелочного рН композиции.

Оценкой качества создаваемой композиции являются показатели протеолитической активности используемого фермента и антимикробные (антибактериальные) свойства. Кроме того, необходимо при разработке новых материалов учитывать технологичность их получения и экономичность. Выше отмечалось, что для эффективного лечения гнойных ран, характеризующихся более кислым значением рН, важно воздействовать лечебными средствами с более щелочными значениями рН, формируя сдвиг показателей в нейтральную и слабощелочную сторону и способствуя лизису некротического содержимого. Также известно, что образование наночастиц серебра происходит в щелочной среде [145]. С целью создания необходимой щелочной реакции среды возможно использовать бикарбонат натрия, карбонат натрия и гидроксид натрия, однако применение последнего неприемлемо для реальных условий эксплуатации лечебной композиции. Согласно нашим данным, значения рН 6% раствора альгината и композиции альгинат-папаин при добавках  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  соответствует слабощелочной среде.

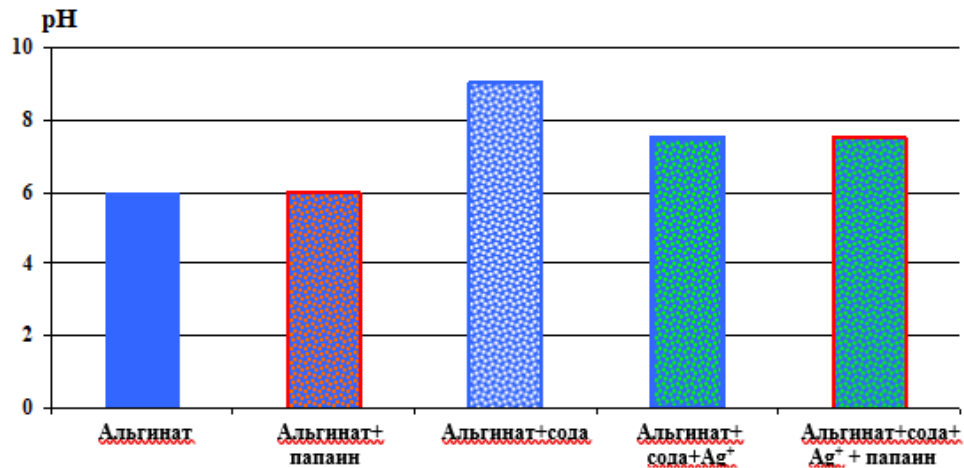
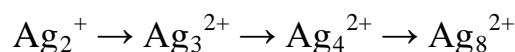


Рисунок 35- Кислотно-основные свойства 6% раствора альгината натрия в присутствии исследуемых компонентов лечебных композиций

Естественный уровень водородного показателя 6% раствора альгината натрия и pH его композиции с добавкой 4 % папаина составляет 6,0-6,5.

В присутствии 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  щелочность раствора альгината повышается до pH 8,0-8,5, что могло бы существенно повлиять на свойства лечебной гидрогелевой композиции и создаваемых на текстильном носителе изделий (лечебных салфеток). В ходе проведенных замеров экспериментально определено, что при совместном введении растворов  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и  $\text{AgNO}_3$  величина pH устанавливается на уровне 7,5-7,6. Полученные результаты имеют практическую значимость. Во-первых, нейтрализация среды подтверждает протекание реакции, обуславливающей расход карбоната натрия. Эксперименты позволили получить важную информацию для определения условий приготовления и оценки влияния добавок на исследуемые свойства раствора альгината и создаваемых материалов. Повторим, что даже в присутствии сильных восстановителей формирование наночастиц Ag-NPs происходит во времени и требуется ряд промежуточных стадий образования кластеров с участием образующихся атомов  $\text{Ag}^0$  [144,145].



Кластер  $\text{Ag}_8^{2+}$  оказывается устойчивым и время его жизни измеряется десятками минут. На УФ-спектрах наличие этого кластера регистрируется появлением полос поглощения при 290 и 325 нм, которые постепенно трансформируются в

широкую полосу при 350-370 нм и далее в полосу поглощения с максимумом при 390 нм. Считают [167], что полосу при 370 нм можно отнести к более крупным кластерам состава  $Ag_{14}^{2+}$ , а полоса при 390 нм принадлежит серебру и обусловлена поглощением света электронами проводимости [168]. Показано [169], что для достижения полного превращения  $Ag^+$  в наноструктуру (Ag-NPs) в присутствии глюкозы требуется не менее 48 часов.

На рисунке 36 приведены результаты экспериментального наблюдения в течение 24 часов за трансформацией поглощения в УФ и видимой части спектра разработанной нами композиции со следующим соотношением компонентов 6% АН, 0,05%  $AgNO_3$ , 1%  $Na_2CO_3$ . Используемую для приготовления растворов дистиллированную воду подвергали предварительному кипячению для удаления растворенного кислорода. При приготовлении композиции использовали минимальную скорость перемешивания 10 об./мин для минимизации влияния атмосферного кислорода на протекание реакции.

Образцом сравнения является 6% раствор альгината в ацетатном буфере с рН 7,5.

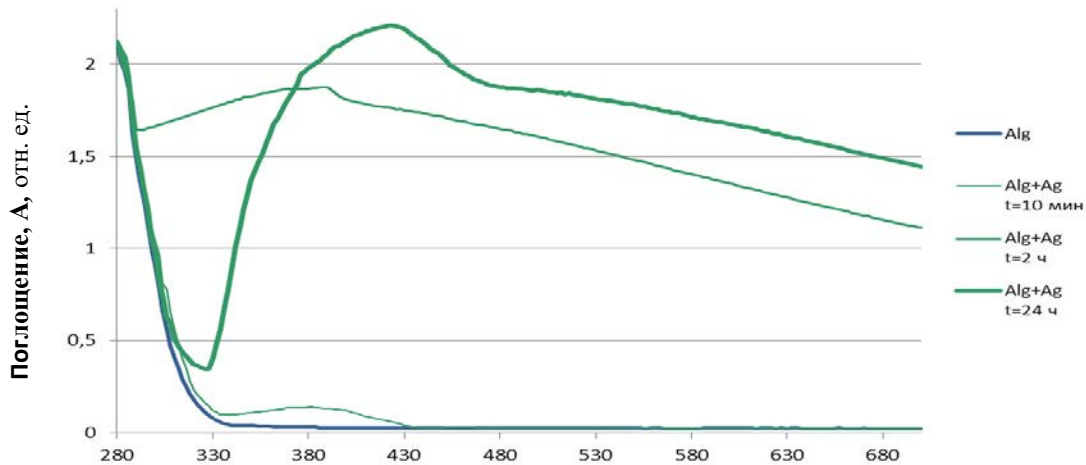


Рисунок 36 - Спектры поглощения растворов альгината натрия (рН 7,5) и композиции Alg+Ag при варьируемой продолжительности выдержки после приготовления

Обнаружено, что изменение состояния системы регистрируется уже через 10 минут после смешивания. Отрыв от спектральной кривой образца сравнения происходит при длине волны 290 нм, что свидетельствует, как показано выше, о накоплении в композиции кластеров  $Ag_8^{2+}$  в результате превращений. Как показано в табл. 1, через 2 часа прирост поглощения  $\Delta A_{290}$  в 4,5 раза превышает

стартовое зарождение устойчивых кластеров. При этом максимум величины  $\Delta A_\lambda$  при 10-минутной экспозиции приходится на 370 нм, а через 2 часа – на 390 нм, превышая на данный момент уровень поглощения в диапазоне поверхностного плазмонного резонанса, характерного для Ag-NPs<sup>6</sup>.

Таблица 23-Изменения промежуточных форм Ag<sup>+</sup> при восстановлении в растворе альгината натрия

| Время выдержки | $\Delta A_\lambda = A_{\text{Alg+Ag}} - A_{\text{Alg}}$ , (отн. ед.) при длине волны $\lambda$ , нм |       |       |        |       |       |
|----------------|---|-------|-------|--------|-------|-------|
|                | 290   | 324   | 350   | 370    | 390   | 424   |
| 10 мин         | 0,038   | 0,056 | 0,675 | 0,104  | 0,101 | 0,031 |
| 2 ч            | 0,168   | 1,616 | 1,786 | 1,8336 | 1,849 | 1,736 |
| 24 ч           | 0,070   | 0,224 | 1,326 | 1,794  | 2,032 | 2,184 |

В условиях проведения эксперимента (выдержка при температуре 25°C в закрытом керамическом стакане с периодическим перемешиванием ламинарном режиме со скоростью 10 об./мин) преобладающий выход наночастиц с максимумом при ~424 нм достигается только спустя 24 часа. При этом сохраняется достаточно высокий уровень поглощения устойчивыми формами ионных кластерных образований в интервале 350-370 нм. Следовательно, процесс синтеза наночастиц не завершен. Тем не менее, 2-часовой выдержки композиции Alg+Ag может быть вполне достаточно для достижения стабильного состояния системы, в которой полимер обеспечивает структурное связывание серебра как в ионной форме, так и в нанодисперсном состоянии частиц нольвалентного металлического серебра. Полученные результаты учтены при разработке технологических режимов приготовления гелей.

Далее на рисунке представлена совокупность фракционного распределения числа частиц по мере нарастания их размера, которая позволяет дифференцировать изменение размерных параметров образований в среде

<sup>6</sup> В работе использована приборная база Центра коллективного пользования научным оборудованием “Верхневолжский региональный центр физико-химических исследований”. Автор выражает благодарность за помощь в получении и анализе результатов сотрудникам ИХР им.Г.А. Крестова д.т.н.С.А. Кокшарову и д.т.н. С.В. Алеевой.



альгината под влиянием повышенной щелочности, необходимой для протекания реакции, а также в результате процессов комплексообразования.

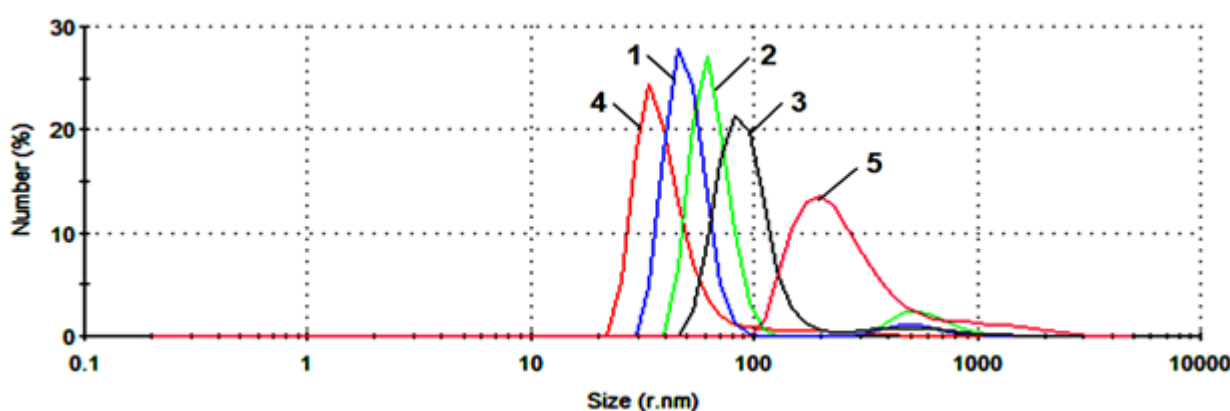


Рисунок 37- Распределение по размеру относительного числа частиц в гидрогеле:

- 1 – альгинат натрия pH 6,0; 2 – альгинат натрия, pH 7,5; 3 – альгинат натрия + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9,0;  
4 – альгинат натрия + (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+ Ag) pH 7,5; 5 – альгинат натрия + (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+ Ag) + папаин pH 7,5

Как следует из сопоставления кривых 1-3, подщелачивание гидрогеля вызывает смещение спектра в сторону увеличения размера частиц. Очевидно, это обусловлено дополнительной поляризацией диссоциированных карбоксильных группировок и расширением окружающего их двойного электрического слоя, что проявляется в усилении сил взаимного отталкивания участков полимерной цепи в структуре макромолекулярных клубков. Результаты анализа полученных графических зависимостей свидетельствуют, что при введении соды в гидроколлоид альгината размер частиц (по положению мода основного пика) увеличивается в 1,8 раза, а ширина пика – в 2,9 раза<sup>7</sup>. Это должно способствовать диффузии ионов Ag<sup>+</sup> во внутренний объем частицы, их сближению с альдегидными группами олигосахаридов, присутствующих в системе и являющихся неотъемлемым участником редокс-превращений по реакции Молекулы фермента не теряют своей каталитической активности при иммобилизации в структуре альгината. Взаимодействие его протонированных аминогрупп с ионизированными карбоксилатами полимера лишь замедляет

<sup>7</sup> В работе использована приборная база Центра коллективного пользования научным оборудованием “Верхневолжский региональный центр физико-химических исследований”. Автор выражает благодарность за помощь в получении и анализе результатов сотрудникам ИХР им. Г.А. Крестова д.т.н. С.А. Кокшарову и д.т.н. С.В. Алесовой

проявление сродства по отношению к белковому субстрату. Предположительно, локализация ионов и наночастиц серебра также не препятствует проявлению специфичности фермента.

Представляло интерес провести анализ взаимодействия активных компонентов разрабатываемого гидрогеля с помощью зондового микроскопа и выявление структуры образующих наночастиц серебра с помощью сканирования образцов на поверхности слюды (в качестве подложки) следующих составов: 6% альгинат натрия с включением 0,05% нитрат серебра в среде  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , и 6% альгинат натрия с добавлением 0,05% нитрата серебра и 4% папаина также в щелочной среде  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Образцом сравнения служил 6% альгинат натрия.

Для проведения исследования образец был подготовлен путем нанесения капли геля на поверхность свежего скола слюды. Гель растекаясь в пятно диаметром около 5 мм. Измерение проводилось после высыхания капли. Данные представлены на рисунках.

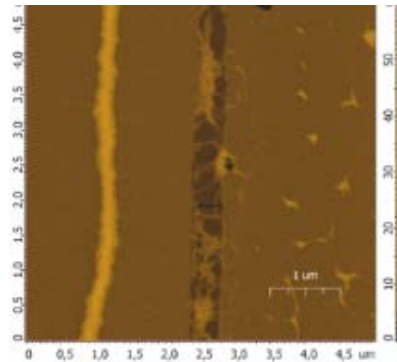


Рисунок 38- Рельеф поверхности пленки при исследовании 6% альгината натрия.

В испытуемом образце геля обнаружены нитевидные образования-молекулярные структуры альгината натрия.

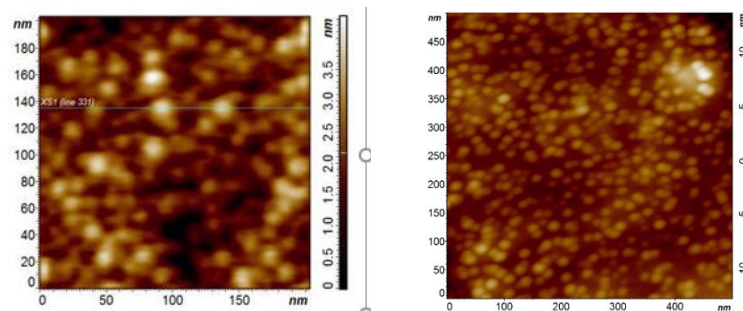


Рисунок 39 -Рельеф поверхности пленки при исследовании геля альгината натрия, с добавлением  $\text{AgNO}_3$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (при разном увеличении)

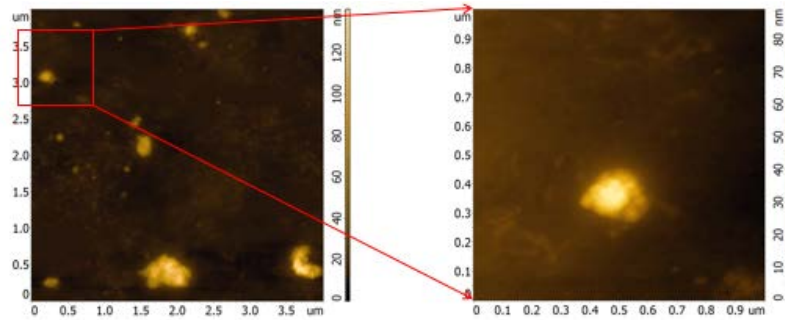


Рисунок 40 - Рельеф поверхности пленки при исследовании геля альгината натрия, с добавлением  $\text{AgNO}_3$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (при разном увеличении)

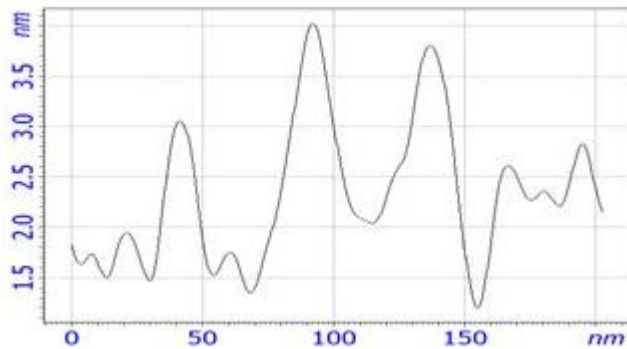
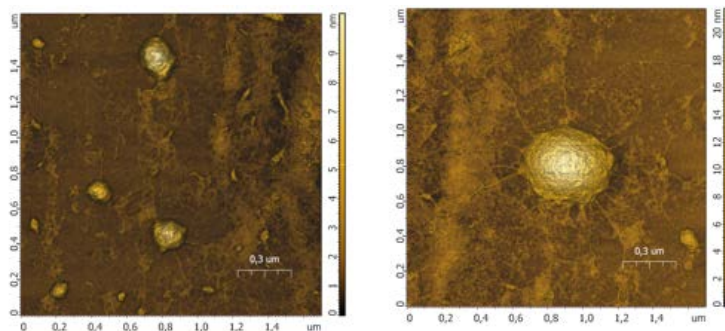


Рисунок 41 - Сечение рельефа поверхности пленки

В образце геля природного альгината натрия в рельефе отмечается, что вся поверхность образца покрыта структурированными частицами. Можно считать, что экспериментально доказано наличие наночастиц серебра в композиции. При увеличении следует отметить, что частицы серебра имеют вытянутую форму шириной 15-20 нм<sup>8</sup>.



<sup>8</sup> Автор выражает благодарность за помощь в получении результатов сотруднику ИТ-МДТ к.ф.м.н. Ю.А. Боброву

Рисунок 42- Рельеф поверхности пленки при исследовании геля альгината натрия с добавлением  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и папаина

При добавлении фермента в гидрогель АН (рисунок 42) отмечается морфология поверхности образца, которая характеризуется наличием среди структурированных частиц более крупных агломератов с образованием тонкой сетчатой структуры, при отсутствии подобной в остальных образцах. На рисунке представлено схематичное изображение полученной структуры:

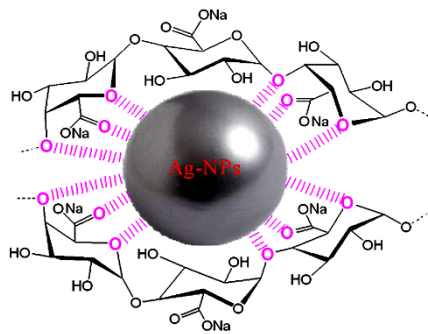


Рисунок 43-Структурное изображение взаимодействия папаина и НЧ серебра  
Анализируя взаимодействие между активными компонентами, стоит предположить, что стабилизацию наночастиц восстановленного серебра обеспечивают участки маннуронатных блоков альгината натрия, которые обладают более уравновешенной внутренней структурой и обилием электроотрицательных элементов с неподелёнными электронными парами для группового формирования координационных взаимодействий с атомами  $\text{Ag}^0$  на поверхности Ag-NP. Таким образом формируется устойчивая структура, которая позволяет проявлять свои свойства каждому из активных компонентов.

### **3.16 Разработка технологии получения лечебных материалов, содержащих ферментный препарат и антимикробный компонент (нитрат серебра).**

Нами неоднократно отмечалось, что обязательной конечной стадией при получении изделий медицинского назначения является стерилизация. Среди методов стерилизации наиболее применима стерилизация ионизирующим излучением (радиационная стерилизация), т.к. высокотемпературная (жаровая) стерилизация приведет к потере свойств изделия.

При облучении системы иммобилизованный фермент-полимерный носитель свободные радикалы образуются на макромолекулах как фермента, так и носителя. По мнению [170] волокнистые полимерные материалы являются радиопротекторами иммобилизованного фермента; даже в случае образования свободных радикалов в активном центре иммобилизованного фермента происходит быстрая миграция поглощенной энергии и ее локализация в «слабом звене» - химических связях носителя, что снижает инактивацию фермента. Согласно указанным ранее авторам, радиозащитные свойства носителей по отношению к ферментам проявляются как при ковалентном присоединении, так и при ионном связывании, но при ионной связи миграция радикалов с молекул белка на макромолекулы фермента происходит медленнее. Инактивация белка может быть сильнее. Принципиально изменение активности фермента при стерилизации всегда имеет место; эти изменения могут лишь отличаться количественно. Поскольку термическая стерилизация для ферментов неприемлема, приходится учитывать негативные последствия радиационной стерилизации и искать пути снижения этого нежелательного эффекта.

В рассматриваемых нами материалах – гидрогели на основе альгината натрия с папаином и нитратом серебра и текстильные салфетки с поверхностным слоем из гидрогеля на основе альгината натрия с теми же активными компонентами наибольшее разрушительное воздействие гамма-стерилизации следует ожидать в отношении гидрогелей. Радиозащитное действие носителей ферментов, к которым относится и альгинат натрия, и ГПМЦ, и текстильный волокнистый материал на

основе полимеров известно хорошо и детально рассмотрено в [157] причем, так же известно, что альгинат натрия обладает радиопротекторными свойствами [170]. Имобилизация ферментов, как за счет ковалентного связывания, так и включения в гель и адсорбция на поверхности носителя частично препятствует потере ПА. Это зависит от резистентности фермента, присутствия воды в облучаемом объекте, дозы облучения. Относительно дозы радиационного облучения при стерилизации можно отметить, что она была выбрана нами на основании изучения опыта гамма-стерилизации гидрогелей Колегель и лечебных салфеток Колетекс, имеющих документальное подтверждение целесообразности обработки в дозе 6кГр (гидрогели) и 15 кГр (салфетки) для достижения стерильности. При этих дозах стерилизации гидрогели Колегель и салфетки Колетекс сохраняют достаточную вязкость и стерильность. Что касается влажности, то у салфеток после сушки и упаковки остаточная влажность достигает 10%, в то время как в гидрогеле содержится большое количество воды. Воздействие света после упаковки изделий в тубы и пакеты исключается.

Согласно [170], наибольшую устойчивость ферменты проявляют при их иммобилизации в нейтральной (или близкой к ней), что имеет место в нашем случае. Ожидаемо, что потеря активности иммобилизованного фермента в гидрогеле будет выше, чем у иммобилизованного в полимерном гидрогеле, который далее нанесен на ТМ (двойное депо), т.к. свободнорадикальные процессы в водной среде будут проходить в большей степени. Для сохранения ПА папаина мы вводили в гидрогель многоатомный спирт (глицерин). Однако при введении в гидрогелевую композицию он смог обеспечить эффект стабилизации активности папаина лишь на 6-8%, в лечебных салфетках выраженного стабилизирующего эффекта при введении глицерина не установлено.

В данной работе, решая двухпараметрическую задачу, нам нужно было подобрать такие стабилизирующие добавки, которые бы формировали дополнительную защиту биополимерной матрицы и фермента от деструкции в процессе радиационной стерилизации, а также с целью обеспечения срока

годности изделия формировали консервирующий эффект совместно с противомикробным компонентом композиции.

Что касается радиопротекторных и консервирующих свойств в отношении биополимерной матрицы композиции, то применение 0,25 % сорбата калия в качестве радиопротектора было научно обосновано в работе [157], где причины радиозащитного эффекта сорбата калия объяснили наличием двойных связей в данном соединении, полярностью которых определяется реакционная способность мономера. Под воздействием гамма-облучения в молекулах ненасыщенных органических соединений непрерывно происходят процессы перемещения или осцилляции связей. В результате протекания окислительно-восстановительных процессов в системе образующимися свободными радикалами инициируется радикальная полимеризация.

Включение нами в состав композиции добавок-консервантов и выбор оптимальных соединений преследовало цель дополнительной стабилизации полученной гидрогелевой композиции в течение необходимого срока. Нашей задачей было сопоставить действие сорбата калия с применяемым для подобных целей эуксиллом.

Консервант на основе феноксиэтанола (эуксил) был выбран нами исходя из потенциальной возможности снизить с его помощью радиодеструкцию альгината натрия и тем самым предотвратить резкое падение вязкости композиции после стерилизации. Данная возможность обусловлена наличием в молекуле 2-феноксиэтанола гидроксильной группы –ОН. При этом мы исходили из того, что введение акцептора ·ОН радикала уменьшает деструкцию биополимера, поскольку данные вещества участвуют в свободно-радикальных превращениях с радикальными частицами, образующимися в процессе радиолиза и, тем самым, выводят их из реакции с биополимером.

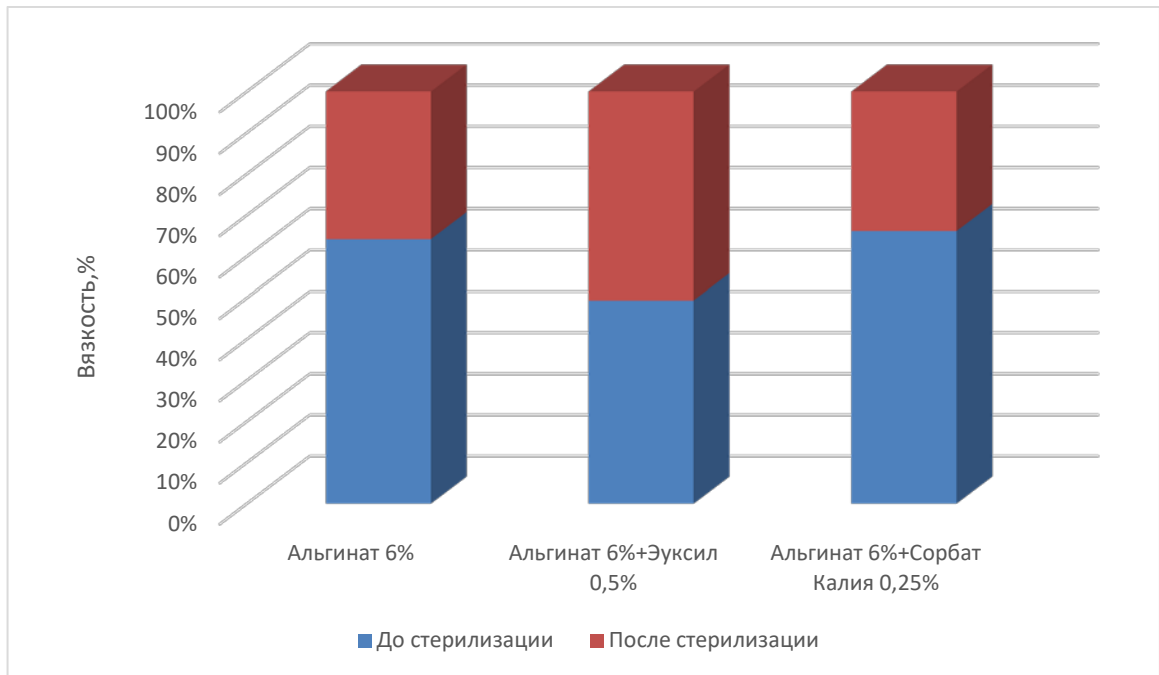


Рисунок 44 - Влияние введения добавок сорбата калия и эуксила на вязкость АН при гамма-стерилизации(6кГр)

По полученным данным было установлено, что введение консерванта эуксила стабилизирует вязкость композиции при радиационной стерилизации на 22%, когда, в свою очередь, стабилизация реологических параметров при добавлении сорбата калия лишь на 12%. Исходя из этого, в качестве стабилизатора-консерванта было решено использовать эуксил.

Исследование стабильности при хранении в течение двух лет (24 месяца) образцом лечебного гидрогелевого материала и лечебных салфеток на текстильной основе при введении в композицию стабилизатора эуксила 0.5% показало сохранение ПА папаина, подлинности по ферментному препарату и сохранение стерильности изделий. Результаты исследования стабильности представлены в приложении.

### 3.16.1 Технология получения лечебных гидрогелей на основе папаина и нитрата серебра.

Ранее полученные экспериментальные данные доказали целесообразность использования альгината натрия как восстановителя (в присутствии 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) для перевода антимикробного агента  $\text{AgNO}_3$  из катиона в наноформу. Это



позволяет увеличить его антибактериальную активность при низкотоксичной концентрации серебра; кроме того, альгинат натрия при физической иммобилизации в нем папаина выступает в роли защитного коллоида, снижая инактивацию фермента. Однако опасность снижения активности фермента в присутствии соли серебра (как и других металлов) остается, это подтверждают и наши исследования. Негативные последствия по литературным и по нашим экспериментальным данным может принести и гамма-стерилизация. Поэтому при разработке гидрогеля, содержащего фермента папаин,  $\text{AgNO}_3$ , полисахарид альгинат натрия, гидроксипропилметилцеллюлозу (для поддержания реологических параметров композиции), было принято решение разделить технологический процесс на два этапа. Цель-максимально защитить фермент от негативного влияния соли металла и процесса стерилизации и композицию в целом от потери вязкости при гамма-стерилизации. При этом следовало учитывать технологически возможное оформление процесса и его температурно-временные особенности, проистекающие как из свойств фермента, так и из технологии получения гелей и салфеток.

Для физической иммобилизации фермента папаина нами использовался полимер гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ). Выбор этого интактного полимера обоснован в данном исследовании ранее. Отмечалось, что данный полимер способствует уменьшению подвижности фермента в низковязком геле, вероятно, за счет сокращения количества воды в системе. Добавление ГПМЦ в альгинатную композицию повышает ПА папаина до стерилизации в 1,6 раз при 1% добавлении к альгинату и в 1,9 раз при 2% введении, т.е. этот полимер выполняет защитную, стабилизирующую функцию по отношению к ферменту. Кроме того, указывалось выше, что наши эксперименты показали стабилизацию вязкости гидрогелей, содержащих альгинат и ГПМЦ после гамма-стерилизации. Однако увеличение вязкости за счет одновременного введения ГПМЦ и альгината усложняет технологию приготовления композиции. Что касается поведения  $\text{AgNO}_3$  и сохранения его свойств при приготовлении лечебной композиции, то для перехода серебра из катионной в наноформу необходимо присутствие альгината

натрия как восстановителя и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  для создания нужной щелочной среды и стабилизации частиц, причем процесс происходит не одномоментно, а требует определенного времени.

Поэтому нами предложена схема технологического процесса, предусматривающая на начальном этапе «изоляцию» фермента и нитрата серебра друг от друга и защиту их полезных свойств от возможного взаимодействия с помощью иммобилизации на первом этапе в различных полимерах: папаин-в ГПМЦ, а  $\text{AgNO}_3$  – в альгинатном гидрогеле в присутствии карбоната натрия.

Технологически итоговая схема выглядит следующим образом: отдельно готовится из сухой субстанции альгината натрия 6% гидрогель; приготавливаемая композиция при температуре 35-40°C градусов подвергается перемешиванию и набуханию в течение 18-24 часов, процеживается через сито, далее вводится для создания щелочной реакции среды 1% раствор карбоната натрия. Параллельно готовится 0,05% раствор нитрата серебра и вводится в приготовленный альгинатный гидрогель. Перемешивание с помощью низкоскоростной мешалки продолжается до двух часов до наблюдения стабильного потемнения композиции (перехода к коричневому цвету).

В другую композицию на основе 2% ГПМЦ после ее набухания и перемешивания в течение 15 часов вводят субстанцию папаина и дополнительно перемешивают в течение часа при температуре 35-40°C. После чего композиции (на основе альгината натрия и ГПМЦ) соединяют и перемешивают 15-20 минут.

Дополнительно на этом этапе в композицию вводят глицерин в количестве 2% от общего объема (для придания гелю эластичности и снижения нежелательных последствий гамма-стерилизации в отношении реологических параметров) и 0,5% консерванта эуксила для обеспечения необходимого срока годности. Отмечается отсутствие нежелательного взаимодействия активных компонентов в виде образования осадка. Композиция разливается в тубы по 20-50-100г. на специальном фасовочном оборудовании (тубонаполнительной машине) или наносится односторонне через сетчатый шаблон на текстильный материал, который далее подвергается сушке при 60°C, после чего текстильные

полотна отправляются на вырубку салфеток и упаковку. Готовая продукция подвергается гамма-стерилизации: гели в дозе 6 кГр, салфетки 15 кГр.

С целью подтверждения эффективности предложенного технологического процесса был проведен дополнительный анализ ПА папаина в гидрогелях, с единовременным (Технология I) и отдельным (Технология II) приготовлением полимерной основы и введении активных компонентов (таблица 24).

Таблица 24-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 |

При анализе было определено, что предложенная технология II с разделением исходных полимеров и предварительным введением папаина в ГПМЦ позволяет сохранить повышенную активность фермента в итоговом гидрогеле. Отметим, что при единовременном смешении полимеров и действующих компонентов получаем ПА папаина, в среднем, ниже на 15%.

Представляло интерес изучить возможность регулировать ПА папаина в гидрогелевой композиции с помощью температурного фактора в рамках технологического процесса. Изучались две гидрогелевые композиции с папаином по технологии I (исходная ПА 3,71 ПЕ/г) с единовременным смешением АН и ГПМЦ, и всех активных компонентов, и по технологии II (исходная ПА 4,22 ПЕ/г), при которой нитрат серебра вводится в АН и фермент в ГПМЦ. Полученные готовые композиции в отдельном эксперименте подвергались воздействию разных температур (как фактора инактивации), и отмечалось изменение ПА папаина. Данные отражены на рисунке 45.

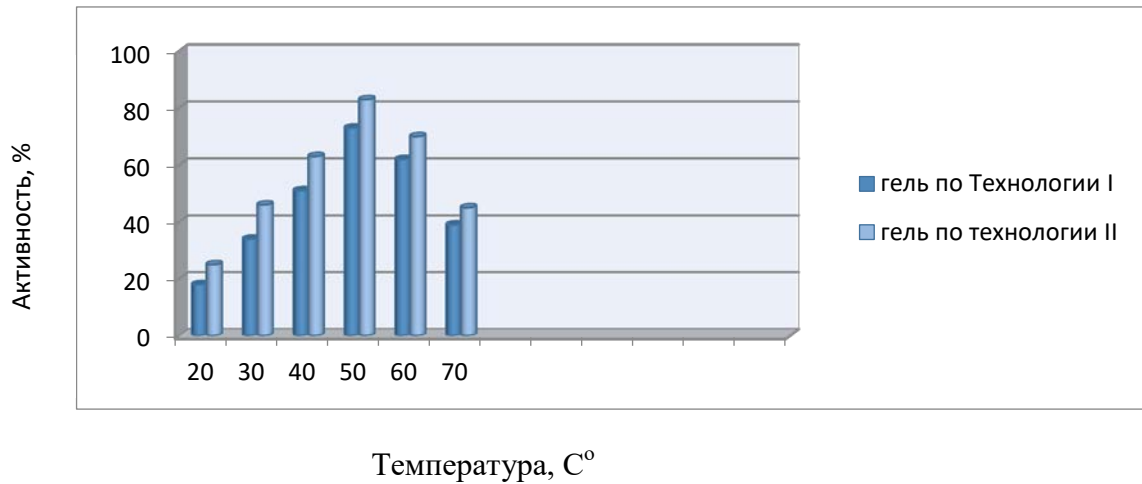


Рисунок 45- Влияние температурного фактора на ПА папина при разных вариантах технологического процесса.

В ходе эксперимента активность папаина в гидрогеле, полученном при отдельном введении нитрата серебра в альгинат натрия и папаина в гипромелозу имеет величину в среднем на 10% большую по сравнению с активностью папаина в гидрогеле, приготовленном по технологии с одновременным смешиванием полимеров для набухания и одновременным введением активных компонентов. Таким образом, разделение полимеров считается обоснованным и принято решение технологический процесс получения гидрогелевой композиции строить в соответствии с полученными данными. Расчет компонентов приведен на 1кг гидрогелевой композиции, рисунок 46.

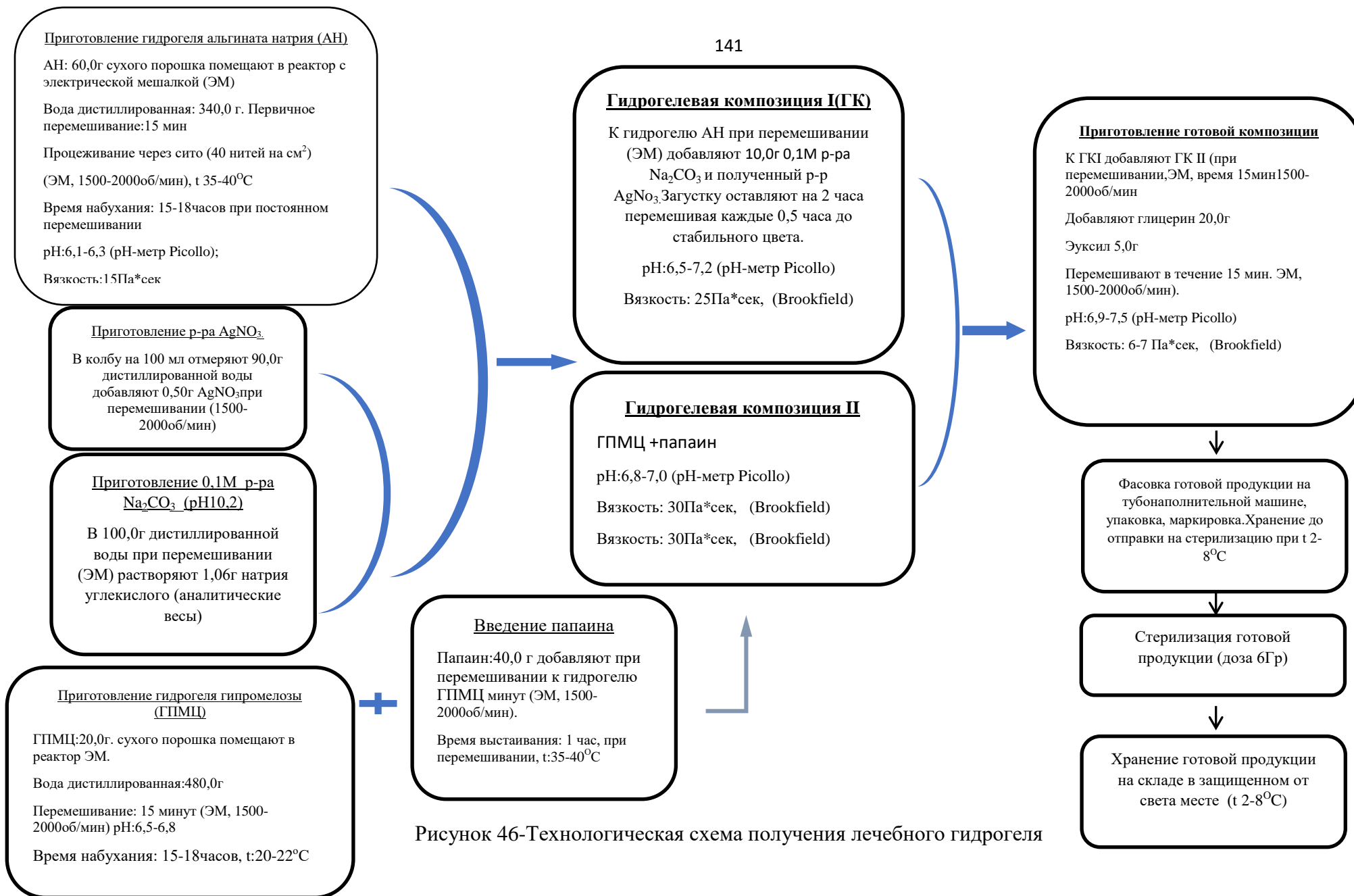


Рисунок 46-Технологическая схема получения лечебного гидрогеля

### **3.16.2 Технология получения лечебных аппликаций (салфеток) с папаином и нитратом серебра**

В данном разделе приведены результаты, касающиеся технологии получения еще одного медицинского изделия, а именно лечебных салфеток с ферментами и антимикробным препаратом. Как было сказано ранее, создаваемое нами медицинское изделие, применяемое для лечения гнойных ран на начальной стадии раневого процесса, имеет свою специфику, связанную с областью применения. Поэтому наше исследование включало разработку двух вариантов изделий: лечебного гидрогеля для лечения глубоких хронических повреждений тканей с гнойным отделяемым и салфеток с нанесенной гидрогелевой композицией для более поверхностных ран, технологии получения которых посвящен представленный раздел.

В разделе выбора полимеров-носителей было установлено положительное влияние на ПА папаина включения ГПМЦ в количестве 2%. Однако, для получения изделий на текстильной основе высокая вязкость полимерной композиции на основе альгината натрия 6% и гипромелозы 2% создает технологическую сложность. В данном случае было принято решение снизить концентрацию гипромелозы до 0,5%, что позволило осуществить технологию печати. Для усиления атравматичности текстильного изделия считалось целесообразным включение в гидрогелевую композицию глицерина 2% и для стабилизации срока годности 0,5% эуксила, что было отражено в соответствующем разделе. Глицерин и эуксил делают полимерную композицию более упругой, очевидно, за счет образования множественных, в том числе и межцепных водородных связей с альгинатом.

Была проведена оценка ПА папаина в текстильном изделии с композицией, на основе АН, включающей 0,5% гипромелозы, вспомогательные компоненты эуксил и глицерин, а также с итоговым составом, включая нитрат серебра (в щелочной среде) данные представлены ниже.

Таблица 25-Влияние добавок на ПА папаина при гамма-стерилизации лечебных салфеток на ТМ (15кГр).

| Состав  | ПА до стерилизации, ПЕ/г | ПА после стерилизации, ПЕ/г |
|---|--------------------------|-----------------------------|
| 6%АН+<br>4%папаин+0,5%ГПМЦ  | 3,5+/-0,10               | 2,9+/-0,10                  |
| 6%АН+<br>4%папаин+0,5%ГПМЦ+2%глицерин<br>+0,5%эуксил                          | 4,1+/-0,10               | 3,8+/-0,10                  |
| 6%АН+<br>4%папаин+0,05% $\text{AgNO}_3$<br>0,5%ГПМЦ+2%глицерин<br>+0,5%эуксил | 3,4+/-0,10               | 2,8+/-0,10                  |

Введение 0,5% гипромелозы в альгинатный гель при изготовлении гидрогелевой композиции для нанесения на текстильный носитель позволило стабилизировать ПА папаина. Включение в композицию стабилизаторов глицерина и эуксила помогает стабилизировать на 15% ПА протеазы. Таким образом, итоговый состав лечебной композиции, наносимой на ТМ, позволяет сохранить до 80% ПА папаина после стерилизации.

### 3.16.2.1 Выбор текстильного материала для лечебных салфеток

При выборе текстильного материала для основы лечебного изделия следует учитывать, что при свежих обширных повреждениях, сопровождающихся наличием обильного отделяемого (экссудата), повязка должна обладать защитной и дренажной функцией, предотвращая потери организмом жидкости. Когда же ситуация осложняется и имеет место гнойный процесс, то главной становится дренажная функция по отношению к гнойному отделяемому, имеющему повышенную вязкость. Очевидно, что повязка должна обладать достаточной емкостью по отношению к экссудату. Поскольку за счет применения в составе повязки протеолитических ферментов раневой экссудат по мере лечения приобретает меньшую вязкость и склонность к высыханию, атравматичность повязки становится не столь значимой, однако в дальнейшем, по мере очищения раны от гнойного отделяемого показатель атравматичности выходит на первый план, препятствуя травмированию грануляционной ткани и заживлению раны.

Таким образом, каждая из стадий раневого процесса выставляет свои требования к свойствам перевязочного текстильного материала (повязки), однако имеются общие требования, которые необходимо учитывать при выборе текстильного материала в качестве основы для медицинского изделия при комплексном лечении ран. К ним относятся:

- высокая сорбционная способность – обеспечивает необходимое время для лечебного воздействия, позволяет реже менять перевязочный материал и снижает травмирование, а также позволяет удерживать отделяемый раной экссудат;

- отсутствие аллергических и раздражающих реакций на изделие – позволяет избежать усугубления состояния пациента и увеличения срока заживления раны;

- паропроницаемость, воздухопроницаемость – для поддержания оптимального микроклимата в ране, что позволит уменьшить время заживления раневой поверхности;

- прилегаемость к поврежденной поверхности – для улучшения подведения биологически активных компонентов;

- высокая атравматичность – для наилучшего сохранения формирующейся эпителиальной ткани в ходе регенерации и снижения травмирования при перевязках;

- способность выдерживать стерилизацию, не изменяя физико-химических и механических характеристик;

Принимая во внимание указанные требования к текстильным материалам для создания лечебных салфеток в своей работе для дальнейшего анализа мы останавливаемся на следующих видах, разрешенных для применения в медицине: полотно трикотажное, полотно нетканое с плетением, нетканое полотно вискозное.



Таблица 26-Изучаемые текстильные материалы

| №<br>п/п | Текстильный материал   | ГОСТ,<br>артикул    | Состав сырья                                      | Вес<br>1м <sup>2</sup> | Область применения           |
|----------|--|---------------------|---|------------------------|------------------------------|
| 1        | Трикотаж полифункциональный ПФ-2 комбинированный с эффектом поверхностного застила | ТУ- 17-09-14-375-91 | Хлопковое волокно- 65%<br>полиэфирное волокно 35% | 210 г                  | Лечебные салфетки «Колетекс» |
| 2        | Полотно нетканое холстопршивное безниточное  | ГОСТ 9412-77        | Хлопковое волокно- 100%                           | 200 г                  | Салфетки гигиенические       |
| 3        | Полотно холстопршивное нетканое гигроскопическое                                   | ТУ 17-14-283-87     | Вискозное волокно- 60%<br>хлопковое волокно- 40%  | 210 г                  | Лечебные Салфетки «Колетекс» |

Учитывая область применения разрабатываемых изделий, следует отметить наиболее важные параметры, на которые следует обратить внимание в ходе исследования. Необходимые свойства текстильных материалов имеют прямую зависимость от химического состава и от способа их получения материалов, от плотности переплетения волокон. Если оценивать химический состав полотен, то основной вклад (кроме способа получения) вносит присутствие вискозных волокон, а также важны плотность и развес материала. Согласно опыту выпуска салфеток ООО «Колетекс», развес полотен должен быть в пределах 160-220 г/м<sup>2</sup>.

Большое значение при выборе материала для создания раневого покрытия имеет показатель рН водной вытяжки полотна и наносимой композиции. Кислая среда в ране формируется довольно быстро вследствие травмы сосудов, уменьшения притока кислорода и изменения тканевого обмена [171]. При создании лечебного материала важно учесть, как параметры кислотности самой матрицы, так и матрицы с нанесенной композицией. Это необходимо для исключения дополнительного травмирующего фактора, сопряженного как с повышением кислотности, так и с резким смещением реакции среды в ране в щелочную сторону. Анализ рН проводили в соответствии с ГОСТ 9412-93.

В данном случае рН водной вытяжки текстильного материала связан в основном с его предварительной подготовкой (беление, отварка и т.д.) в ходе производства самого полотна и должен соответствовать нормативам производства. Полученные данные представлены в таблице.

Таблица 27-Анализ рН водной вытяжки из текстильных материалов

| Показатель рН                                     | Полотно трикотажное ПФ-2 | Полотно нетканое холстопршивное безниточное | Полотно нетканое из вискозного волокна |
|---|--------------------------|---|--|
| рН водной вытяжки                                 | 7,0                      | 7,1   | 7,1                                    |
| рН вод.вытяжки изделия с композицией из АН и ГПМЦ | 7,3                      | 7,5   | 7,4                                    |

Проанализировав полученные параметры рН водной вытяжки как текстильного материала, так и материала с нанесенной биополимерной лечебной композицией, можно сделать вывод об отсутствии их негативного воздействия на состояние раны.

Показатель влагоемкости будет одним из определяющих, поскольку медицинское изделие является депо для введенного полимера и активных компонентов (БАВ) и должно обеспечивать длительное поступление биологически активного вещества (фермента) и антибактериального агента-серебра в рану, а также впитывать раневой экссудат.

Таблица 28 - Влагоемкость текстильных материалов

| Текстильный материал  | Трикотажное полотно ПФ-2 | Полотно нетканое холстопршивное безниточное | Полотно холстопршивное нетканое гигроскопическое |
|---|--------------------------|---|--|
| Влагоемкость ТМ без полимерной композиции, мг/см <sup>2</sup> *ч                      | 373%                     | 1051%                                       | 1120%  |
| Влагоемкость ТМ с композицией из альгината натрия мг/см <sup>2</sup> *ч               | 411%                     | 1148%                                       | 1235%  |
| Влагоемкость ТМ с композицией из альгината натрия и гипромелозы мг/см <sup>2</sup> *ч | 593%                     | 1270%                                       | 1510%  |

Анализ рассматриваемых материалов показывает, что трикотажное полотно, имеющее сложную структуру с петлевым переплетением на одной стороне и поверхностный застил, позволяет надежно удерживать в его структуре лечебную композицию, равномерно высвобождать включенные активные компоненты, а также увеличивает сорбцию экссудата раны. На данный параметр влияет характер и плотность плетения волокна, а также степень ворсистости, с увеличением которой растет и степень влагоемкости. Полотно холстопршивное имеет с одной стороны трикотажный застил, который препятствует прилипанию материала к раневой поверхности, однако, хаотично сформированная волокнистая структура изнаночной стороны создает необходимый объем и высокую влагоемкость, что является важным параметром при использовании в лечении гнойных ран с большим количеством экссудата.

Важный параметр - прилегаемость лечебного изделия (салфетки) к ране и неповрежденной коже. Этот параметр важен для технологического этапа упаковки салфеток в сухом виде, а также во влажном виде непосредственно для этапа применения. Не имея методики для количественного определения параметра прилегаемости к месту наложения у пациентов, мы используем параметр драпируемости как относительную характеристику для ранжирования исследуемых материалов. Измерения производились по методу Евдокимова В.Я. и Бухаровой А.К. Анализ данных показал, что нанесение композиции значительно

снижает показатель в сухом состоянии. Во влажном состоянии этот показатель соответственно увеличивается (в ~3.5-4 раз). Влияние состава наносимой композиции на данный параметр практически отсутствует.

### 3.16.3 Массоперенос папаина из текстильной лечебной салфетки

С целью окончательного выбора ТМ для производства лечебных салфеток, удовлетворяющего всем параметрам, был проведен эксперимент по анализу массопереноса активного ферментного препарата из салфеток на основе трикотажного полотна и полотна нетканого холстопршивного в буферный раствор (внешняя среда). С помощью буфера создавался показатель рН, приближенный к рН раневой поверхности, а именно 6,0-6,1. Эксперимент предусматривают анализ рН и ПА папаина в течение 48 часов, модуль ванны 100,  $t37^{\circ}\text{C}$ .

Таблица 29 - Изменение ПА папаина (ПЕ/г) и рН при массопереносе во внешнюю среду (буфер) из салфетки на основе полотна нетканого холстопршивного.

| Время | ПА, ПЕ/г | рН   |
|-------|----------|------|
| 0,5   | 3,1      | 6,11 |
| 1,0   | 3,1      | 6,24 |
| 1,5   | 3,1      | 6,25 |
| 2,0   | 3,1      | 6,25 |
| 3,0   | 2,4      | 6,25 |
| 5,0   | 1,1      | 6,22 |
| 24    | 0,5      | 6,21 |
| 36    | 0,01     | 6,21 |
| 48    | 0,01     | 6,22 |

Таблица 30- Изменение ПА папаина (ПЕ/г) и рН при массопереносе во внешнюю среду (буфер) из салфетки на основе трикотажного полотна.

| Время | ПА, ПЕ/г | рН   |
|-------|----------|------|
| 0,5   | 1,7      | 6,62 |
| 1,0   | 1,7      | 6,61 |
| 1,5   | 1,7      | 6,51 |
| 2,0   | 1,7      | 6,51 |
| 3,0   | 0,9      | 6,52 |
| 5,0   | 0,5      | 6,61 |
| 24    | 0,1      | 6,60 |
| 36    | 0,01     | 6,50 |
| 48    | 0,01     | 6,51 |

Для изучаемых полотен максимум протеолитической активности фермента, перешедшего из изделия в буферную среду, наблюдается в первые 3 часа, затем ПА сохраняется, несмотря на снижение, в течение суток, что характеризует пролонгированное действие изделия и позволяет уменьшить частоту смены повязок. Применение полотна холстопршивного ввиду большей влагоемкости позволяет увеличить количество наносимой лечебной гидрогелевой композиции при печати и благодаря этому получить большую ПА папаина в конечном готовом изделии по сравнению с полотном трикотажным. Можно ожидать, что в случае экстремальных ситуаций и отсутствии возможности смены повязок в течение 24 часов и более будет оказываться терапевтический эффект фермента и всего изделия в целом за счет его высоких сорбционных свойств. Полученные данные позволяют выбрать полотно холстопршивное в качестве основного материала для производства лечебных салфеток.

Представлялось целесообразным проанализировать влияние ионов серебра в ходе массопереноса белка фермента из лечебных салфеток на основе выбранного холстопршивного полотна. В первом варианте гидрогелевая композиция для печати содержала полный состав полимеров и вспомогательных веществ, в качестве активного компонента выступал папаин, во втором полимерная композиция включала и ферментный препарат, и нитрат серебра (с добавлением

карбоната натрия). Основа биополимерной композиции-альгинат натрия. Буферная внешняя среда для оценки массопереноса имела рН 6,0-6,2 (по указанным ранее данным, приближенная к среде раневой поверхности). Полученные данные отражены ниже на графике (рисунок 47).

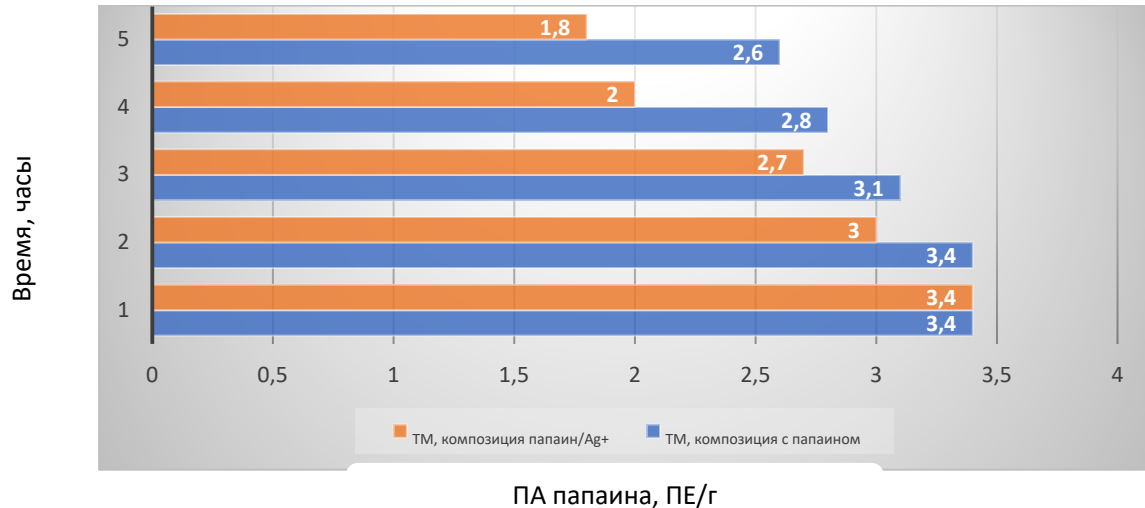


Рисунок 47 - Влияние ионов серебра на ПА папаина при массопереносе во внешнюю среду (буфер рН 6,0-6,2).

Полученные данные свидетельствуют о незначительном снижении ПА папаина при массопереносе из текстильного изделия, гидрогелевая композиция которого в своем составе содержала и папаин, и нитрат серебра. Сопоставляя экспериментальные данные следует, что в естественных условиях применения изделия при нахождении салфетки на раневой поверхности падение ПА папаина под влиянием ионов серебра составит 19%, когда в аналогичном изделии, содержащем в составе из активных компонентов только папаин, ПА в течение трех часов снизится на 10%. Данные результаты ожидаемы, однако присутствие защитного полимерного коллоида АН делает это снижение менее существенным.

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 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.

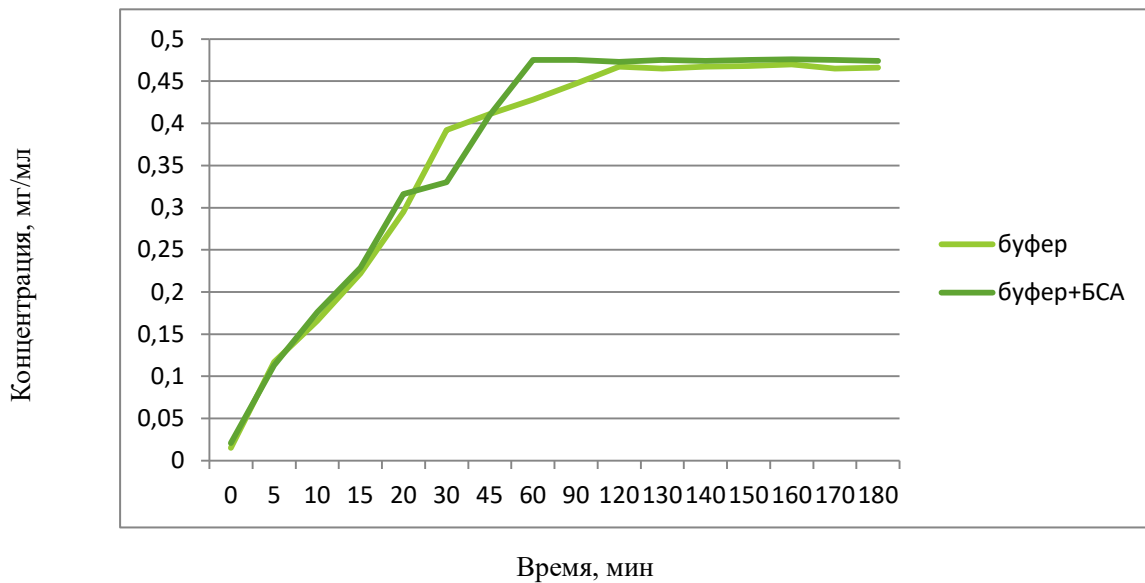


Рисунок 48 -массоперенос белка фермента в среду буфера и среду БСА

Таблица 31 - Массоперенос белка фермента в среду на основе буфера и БСА

| Время, мин | С(белка) мг/мл<br><b>Буфер</b> | С(белка) мг/мл<br><b>Буфер+БСА</b> |
|------------|--------------------------------|------------------------------------|
| 0          | 0,015                          | 0,021                              |
| 5          | 0,117                          | 0,113                              |
| 10         | 0,166                          | 0,176                              |
| 15         | 0,222                          | 0,229                              |
| 20         | 0,295                          | 0,316                              |
| 30         | 0,392                          | 0,330                              |
| 45         | 0,411                          | 0,410                              |
| 60         | 0,428                          | 0,475                              |
| 90         | 0,447                          | 0,475                              |
| 120        | 0,467                          | 0,473                              |
| 130        | 0,465                          | 0,475                              |
| 140        | 0,467                          | 0,474                              |
| 150        | 0,468                          | 0,475                              |
| 160        | 0,470                          | 0,476                              |
| 170        | 0,465                          | 0,475                              |
| 180        | 0,466                          | 0,474                              |

Проанализировав данные мы видим, что концентрации белка фермента, переходящие в среду буфера, практически идентичны с концентрациями фермента, перешедшими в среду буфера с БСА. По полученным экспериментальным данным можно сделать вывод, что 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.

Для выбора текстильной основы был также изучен привес при нанесении биополимерной композиции на разные виды материала методом плоскошаблонной печати. Были использованы экспериментальные образцы текстильных материалов размером 10x10 см. При нанесении выполнено до шести проходов ракля через шаблон с ячейей 20 меш. Данные представлены в таблице 32.

Таблица 32-Привес биополимерных композиций на текстильном материале

| Текстильный материал (ТМ)              |           | Трикотажное полотно ПФ-2 | Полотно нетканое холстопршивное (с эффектом поверхностного застила) | Полотно нетканое безниточное |
|--|-----------|--------------------------|---|------------------------------|
| Состав полимерной композиции *         |           |                          |   |                              |
| Без полимерной композиции, масса ТМ, г |           | 1,613                    | 1,933   | 1,826                        |
| Альгинат натрия, 6%                    | Масса, г  | 1,833                    | 2,208   | 2,100                        |
|  | привес, % | 13,600                   | 14,200  | 15,00                        |
| Альгинат натрия 6% и ГПМЦ 2%           | Масса, г  | 1,940                    | 2,445   | 2,230                        |
|  | привес, % | 20,200                   | 26,400  | 22,120                       |

Из данных таблицы следует, что наибольший привес композиции при одинаковом числе проходов ракля через шаблон отмечается при использовании полотна холстопршивного. Его структура и наличие плетения с одной стороны формируют больший объем по сравнению с остальными материалами.



Однако область применения разрабатываемого нами изделия не позволяет использовать текстильный материал, оставляющий частицы волокон в раневой области. На данном этапе наиболее подходящими видами материала нами определено трикотажное полотно и полотно холстопршивное.

Число проходов ракли в ходе осуществления технологии печати является важным этапом. Экспериментально оценивалось влияние данного параметра количество наносимой композиции и, следовательно, концентрацию фермента и активность в готовом текстильном изделии. Ниже отражены полученные данные.

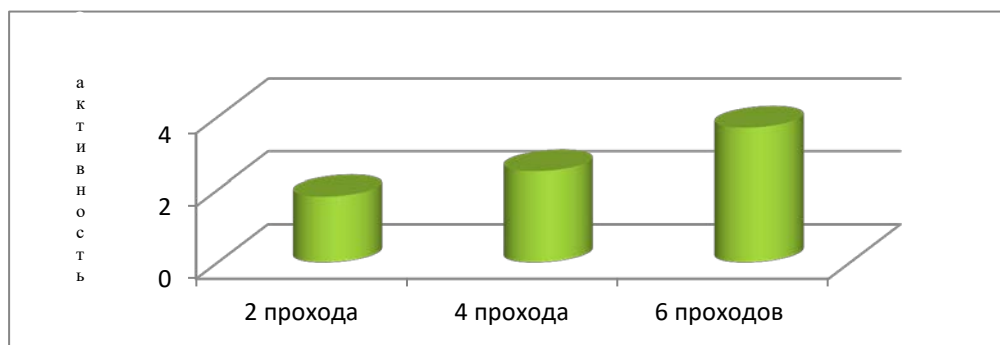


Рисунок 49 - Зависимость ПА папаина иммобилизованного в гидрогелевой композиции от числа проходов ракли при печати салфетки, ПЕ/г.

Увеличение числа проходов ракли повышает концентрацию папаина и, соответственно, ПА салфетки в итоге. При применении 6 проходов ракли в готовом изделии ПА фермента, предположительно, будет оказывать максимальный терапевтический эффект.

Производство лечебных салфеток включает разные этапы, и сушка материала после печати также является одним из ключевых, влияя на который можно менять конечную ПА в изделии. Важно было оценить влияние условий сушки на изменение ПА иммобилизованного папаина в ТМ. Сушка полотен после печати проводится на специализированных вешалах. В рамках эксперимента сушка проводилась двумя способами: при комнатной температуре и при 60°C с обдувом горячим воздухом. Это сокращало время полного высыхания материала. Применение принудительного теплового обдува при 60°C позволило получить величину ПА фермента порядка 3,5 ед., 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 ед. (при пятикратном измерении).

Производство лечебных салфеток с ферментом папаином и антимикробным компонентом нитратом серебра представлено на технологической схеме (рисунок 50) и выглядит следующим образом:

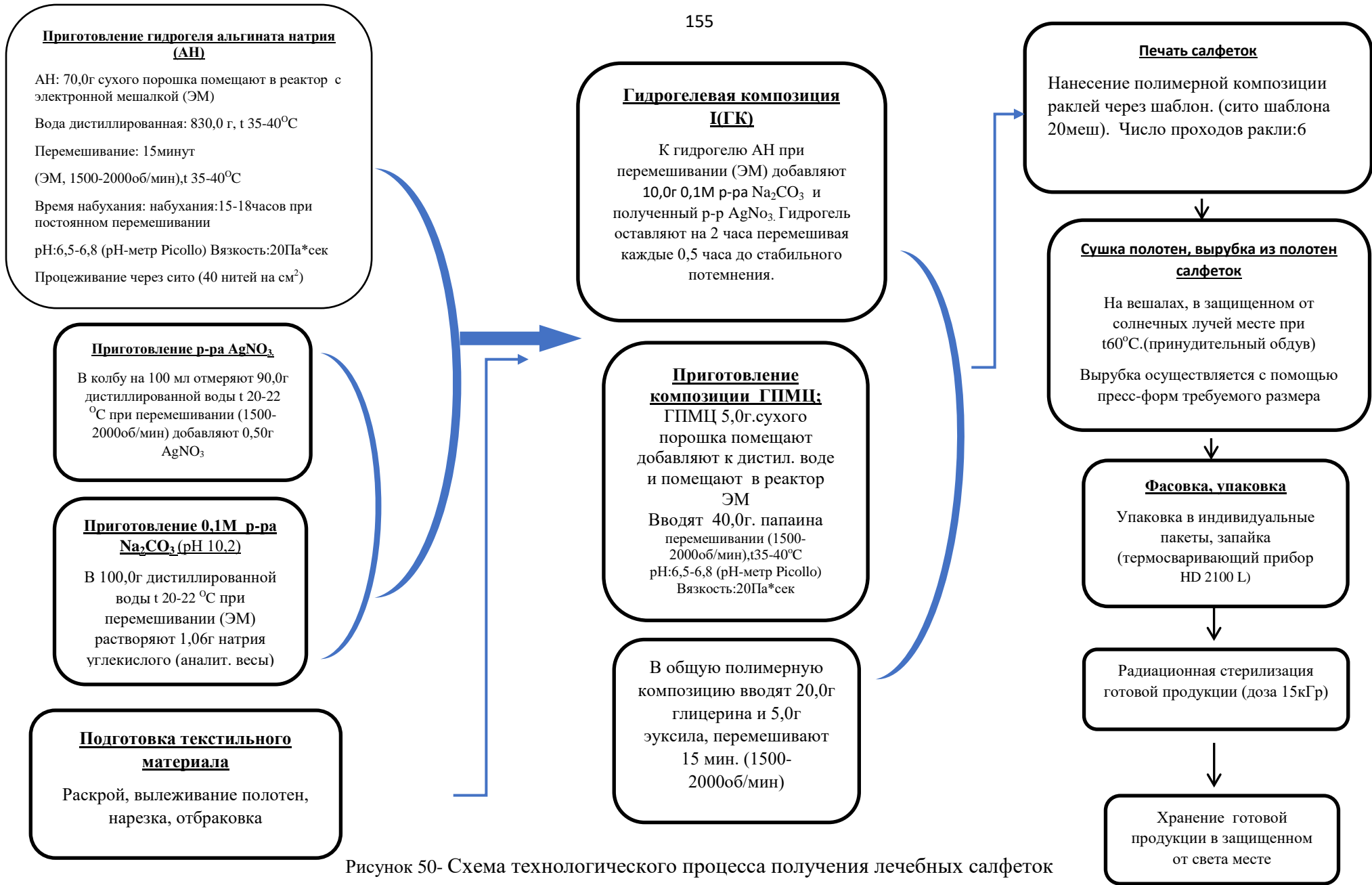


Рисунок 50- Схема технологического процесса получения лечебных салфеток

## Выводы

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 антибактериального препарата нитрата серебра. Методами спектрофотометрии и электронной зондовой микроскопии показано образование наночастиц серебра в присутствии биовосстановителя полимера-

полисахарида альгината натрия в щелочной среде (средний размер частиц 15-20 нм), что обеспечивает композиции антибактериальные 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 антибактериальных 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, получению после стерилизации на 20-23% большей остаточной вязкости композиции; показано, что введение стабилизаторов глицерина и эуксила (феноксизтанол) 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 (теплообдуваемый режим при 60°C).

9. Проведены санитарно-гигиенические и токсикологические испытания разработанных лечебных биополимерных материалов. Доказано, что созданные изделия не проявляют токсического, сенсibilизирующего 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).

## Список сокращений

- АН – альгинат натрия
- БАВ – биологически активные вещества
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ВОК – время остановки кровотечения
- ГА – гемостатическая активность
- ГПМЦ – гидроксипропилметилцеллюлоза
- ДАЦ – диальдегидцеллюлоза
- КОЕ – колонии образующие единицы
- НЧС – наночастицы серебра
- ПА – протеолитическая активность
- ПЕ – протеолитические единицы
- ТМ – текстильный материал
- ЭМ – электронная мешалка
- Ag-NPS -наночастицы серебра

## Список литературы

1. Каштанов А. Д., Васильев Ю. Л., Байрашевская А. В. Обзор современных материалов, применяемых для покрытия раневых поверхностей. Оперативная хирургия и клиническая анатомия. 2020. №4(2). С.49-56.
2. Адамян А.А. Разработка новых биологически активных перевязочных средств и методология их применения //Хирургия. 2004. С.10-14.
3. Глухов А.А., Андреев А.А., Болотских В.И. Основы ухода за хирургическими больными. Вестник экспериментальной и клинической хирургии. М. 2018. 110с.
4. Назаренко Г.И. Рана. Повязка. Больной. Современные медицинские технологии – М.:Медицина, 2002. 472 с.
5. Aramwit P. Introduction to biomaterials for wound healing. Wound Healing Biomaterials: Functional Biomaterials. 2016. №2. p.3-38.
6. Цыган В.Н. Патогенетическое обоснование применения биоактивных раневых покрытий на догоспитальном этапе медицинской помощи /В.Н. Цыган, В.И. Бадалов, К.Н. Касанов // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2013. № 4. С. 66–70.
7. Данилова М. А. Текстильная печать в производстве материалов для фотодинамической терапии онкологических заболеваний//Текстильная промышленность. 2007. № 8. С. 25-29.
8. Куринова М.А., Гальбрайт Л.С. Современные раневые покрытия// Современная медицина: актуальные вопросы №10. 2015. С.137.
9. Андреев Д.Ю., Парамонов Б.А., Мухтарова А.М. Современные раневые покрытия//Вестник хирургии. 2009.№3. С.100.
10. Young T. How research has changed wound care. Community nurse. 1997. v. 3 (10). p. 37-39
11. Беляева О.А. Профилактика и лечение инфильтратов и флегмон: дисс. канд. мед. наук. М., 1981. 196с.



12. Белоцкий С., Брейтман Р. Раны и повязки // Современные концепции и практика. М.: Букинист, 2000. 280 с.
13. Валуева, М. И. Технология получения текстильных и гидрогелевых депо-материалов с радиопротекторными свойствами: дис. канд. техн. наук: – Иваново, 2014. 242с.
14. Филатов В.Н. Биологически активные текстильные материалы. Т.1. Терапевтические системы «Дальцекс-трипсин» / В.Н. Филатов, В.В. Рыльцев. – М.: Информэлектро, 2003.248 с.
15. Куринова М.А., Гальбрайт Л.С., Скибина Д.Э. Современные раневые покрытия//Современная медицина: актуальные вопросы. 2015.№10. С.137.
16. Agren M.S. An amorphous Hydrogell Enhances Epitheliasation of wounds.- 1998. №78. p. 119-122.
17. Ricci E., Cutting K.F. Evaluating a native collagen matrix dressing in the treatment of chronic wounds of different etiologies: a case series// J. Wound Care. -2016. №25(11) p.670.
18. Силина Е.В., Ступин В.А., Габитов Р.Б. Роль коллагена в механизмах заживления хронических ран при синдроме диабетической стопы// Клиническая медицина. 2018. № 96 (2). p. 106–115.
19. Ткачев П.В., Базанов Г.А. О использовании свойств водоросли ламинарии в медицинской практике// Тверской медицинский журнал. 2017. №1. С.55-58.
20. Олтаржевская Н.Д., Левшова Н.В., Овчаров С.Э., Коровина М.А., Савилова Л.Б. Создание лечебных материалов с антиоксидантными свойствами. Неотложная помощь в клинических условиях/ Сборник научных работ, М.: 2002. С. 232-234.
21. Судаков Д.В., Стародубцева Е.В., Судаков О.В., Снопков В.Н. Оценка информативности показателей клинического обследования пациентов с сахарным диабетом 2 типа и гнойными ранами. Системный анализ и управление в биомедицинских системах. М.: Дипак, 2013. Т.12. №4. С. 1163-1165.

22. Толстых М.П., Луцевич О.Э., Медушева Е.О. Теоретические и практические аспекты заживления ран. М.: Дипак, 2007. 96с.
23. Фомина Е. В. Технология получения лечебных текстильных материалов для физиотерапии: дисс. канд. техн. наук. М. 2014. 221с.
24. Винник Ю.С., Маркелова Н.М., Шишацкая Е.И., Кузнецов М.Н., Соловьева Н.С., Зуев А.П. Современные раневые покрытия в лечении гнойных ран. // Фундаментальные исследования. 2015. № 1-5. С. 1061-1064;
25. Кузин М.И. Костюченко Б.М., Раны и раневая инфекция: Учебное пособие. 1990г. 250с.
26. Толстых П.И., Клебанов Г.Н., Шехтер А.Б., Толстых М.П. Антиоксиданты и аспекты их применения в лечении ран и трофических язв. М., 2009. 237с.
27. Шабловская Т.А. Низкочастотная ультразвуковая кавитация в комплексном лечении гнойно-некротических заболеваний мягких тканей в амбулаторной практике.- дисс. канд. мед. наук. М., 2015. 165с.
28. Оболенский, В.Н. Трофические язвы нижних конечностей – обзор проблемы / В.Н. Оболенский, Г.В. Родоман, В.Г. Никитин, М.А. Карев // Русский медицинский журнал. 2009. Т. 17. № 25. С. 1647-1662.
29. Блескина А.В. Оптимизация местного лечения гнойных ран на фоне сахарного диабета. дисс. канд. мед. наук. Красноярск, 2011.
30. Блескина А. В. Значение рН среды в динамике раневого процесса на фоне сахарного диабета. Красноярск, 2010. С. 25-30.
31. Блескина, А. В. К вопросу о влиянии кислотно-основного равновесия среды на течение раневого процесса при сахарном диабете. Москва, 2009. С. 911-913
32. Филиппова А.В., Баженова Ю.Л., Леванович Е.В. Влияние целенаправленной коррекции рН на раневой процесс при сахарном диабете. Красноярск, 2010. С. 911-913.
33. Kemble J. V. PH changes on the surface of burns // Br J Plast Surg. 1975. Vol. 28. № 3. P. 181–184.

34. Абаев Ю.К. Сахарный диабет и раневое заживление//Медицинский журнал. 2021. №1. С.107-110.
35. Богданец Л.И., Девярых Е.А., Березина С.С. и др. Венозные трофические язвы и сахарный диабет. Особенности клиники, диагностики и лечения //Медицинский вестник. 2005. №3 (23). С. 13-16.
36. Девярых Е.А. Гидрогелевые раневые покрытия в лечении венозных трофических язв: автореф. дис. канд. мед. наук. М. 2006. 25с.
37. Богданец Л.И., Девярых Е.А., Пашкин И.И. и др. Роль рН среды в заживлении венозных трофических язв. Ростов-на-Дону. 2005. С. 265.
38. Фаттахов В.Л., Винник Ю.С., Теплякова О.В., Блескина А.В. Влияние кислотно-основного состояния среды на течение раневого процесса при сахарном диабете// Сибирское медицинское обозрение. 2009. №6. С.35-38.
39. Ключин Н.М., Михайлов А.Г., Шастов А.Л., и др. Случай успешного лечения пациента с последствиями политравмы, осложненной гнойной инфекцией // Политравма. 2018. № 3. С. 76–81
40. Ураков А.Л. Растворители гноя как средства с уникальными физико-химическими свойствами// Химическая физика. 2019.№4. С.125.
41. Uraikov A, Uraikova N, Chernova L. Possibility of dissolution and removal of thick pus due to the physical-chemical characteristics of the medicines//Journal of Materials Science and Engineering B. 2013. №3(11). P.714-720.
42. Уракова Н.А., Ураков А.Л., Черешнев В.А. Гипергазированность, гипербаричность, гиперосмолярность, гипертермичность, гиперщелочность и высокая поверхностная активность раствора как факторы повышения его промывочной активности // Химическая физика и мезоскопия. 2007. Т. 9. № 3. С. 256–262.
43. Костюченко Б.М., Матасов В.М., Амирасланов Ю.А. Лечение ран в управляемой абактериальной среде // В кн.: Раны и раневая инфекция / под редакцией Кузина М.И., Костюченка Б.М. М.: Медицина, 1990. С.344-347.
44. Савельев В.С. Полиферментные препараты в гнойной хирургии. М. 2005. - 32с.

45. Гостищев В.К., Толстых П.И., Василькова З.Ф., Современная энзимотерапия гнойных ран. М. 1986. С.131-132.
46. Волосова Е.В., Безгина Ю.А., Мазницына Л.В. Стабилизация ферментов класса протеаз в структуре биополимерных материалов // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 1. 80с.
47. Бледнов А.В. «Иммобилизованные ферменты и антисептики в комплексном лечении гнойных ран». дисс. канд. мед. наук. Минск. 2007.175с.
48. Иванян А.А. Эффективное применение перевязочных материалов с биологически активными веществами, иммобилизованными в геле полимера для лечения гнойных ран // Дисс. канд. мед. наук. Смоленск. 1996. 113с.
49. Толстых М. П., Луцевич О. Э., Медушева Е. О. Теоретические и практические аспекты заживления ран. М.: Дипак, 2007. 96 с.
50. Юданова Т. Н. Полимерные раневые покрытия с ферментативным и антимикробным действием: дис. док. хим. наук. М., 2004. 329 с.
51. Ефименко Н. А., Лысенко М. В., Стернин Ю. И. Протеолитические энзимы в хирургии: исторические аспекты и современные представления о применении // Русский медицинский журнал. 2011. № 5. С.368-369.
52. Будневский С.В. Новые раневые покрытия, содержащие серотонин и трипсин, в лечении экспериментальных гнойных ран // Автореферат дисс. канд. мед. наук. М. 2006.16с.
53. Суханова С.М., Петручук Е.М., Генералов А.А. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2018. Т.18 №2. С.106-112
54. Суханова С.М., Петручук Е.М. «Свиной трипсин в производстве лекарственных препаратов. Риски и требования к безопасности», Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2018. №3. С.161-168.
55. Балакирева А.В. Протеиназы пшеницы и их активация в норме и при биотическом стрессе. - дисс. канд. биол. наук. М., 2019. 162с.
56. Сакибаев Ф. А., Холявка М. Г., Артюхов В. Г. Особенности пространственных структур молекул растительных протеаз – бромелаина, фицина, папаина// Вестник ВГУ. 2020. №3. С.57-63.

57. Mazorra-Manzano M.A., Ramírez-Suarez J.C., Yada R.Y. Plant proteases for bioactive peptides release: A review // *Critical reviews in food science and nutrition*. -2018. - Vol. 58(13). - P. 2147-2163.
58. Досадина Э.Э., Белов А.А. «Иммобилизация бромелаина на целлюлозные носители», РХТУ им. Менделеева // *Успехи в химии и химической технологии*. 2016. Т.30. №9.
59. Klein G.K. Enzymatic Debridement of Third Degree Burns in Animals with Bromelains. A Preliminary Report // *J Maine Med Assoc*. 2014. Vol. 5.- P.169–171.
60. Chakravarthy P., Acharya S. Efficacy of extrinsic stain removal by novel dentifrice containing papain and bromelain extracts // *J Young Pharm*. 2012. Vol. 4 № 4. P.245–249.
61. Dayem R.N., Tameesh M.A. A new concept in hybridization: Bromelain enzyme for deproteinizing dentin before application of adhesive system // *Contemp Clin Dent*. 2013. Vol. 4 № 4. P. 421.
62. Knill-Jones R.P. et al. Comparative trial of Nutrizym in chronic pancreatic insufficiency // *Br Med J*. 2007. Vol. 4 № 5726. P. 21–24.
63. Kane S., Goldberg M.J. Use of bromelain for mild ulcerative colitis // *Ann. Intern. Med*. 2016. № 8. P. 680.
64. Stepek G. et al. Assessment of the anthelmintic effect of natural plant cysteine proteinases against the gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, in vitro // *Parasitology*. 2005. Vol.130 № 2. P. 203–211.
65. Медушева Е.О. Разработка, экспериментальное обоснование и внедрение в хирургическую практику покрытий с комплексным некролитическим антимикробным и антиоксидантным действием. Дисс. док. мед. наук. М. 2004. 389с.
66. Пенджиев А.М., Абдуллаев А. Фармакологические особенности млечного сока дынного дерева // *Научное обозрение. Медицинские науки*. 2017. № 1. С. 36-56.

67. Филатова Л.Ю., Оксенойт Е.С., Яковлева К.С, Иванова Н.И., Клячко Н.Л. Изучение активности и стабильности папаина в различных мицеллярных системах// Вестник московского университета, сер.2 Химия. 2010. Т51. №2. С.125.
68. Пенджиев А.М., Абдуллаев А. Эффективность использования протеолитических ферментов папайи в медицинской практике//Научное обозрение. Медицинские науки. 2017.№1. С.57-72
69. Mello V.J. et al. The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis* //Phytomedicine. 2008. Vol. 15 № 4. P. 237–244.
70. Клячко Н.И., Казанков Г.М.//Механизмы ферментативного катализа//Лекции ученых МГУ. 2015. №5. С.72-76
71. Пенджиев А.М., Абдуллаев А. Биологически активные вещества дынного дерева (папайи)//Медицинские новости.2016. №2. (интернет журнал)
72. Dosadina E.E. Savelyeva E.E. Belov A.A.The effect of immobilization, drying and storage on the activity of proteinases immobilized on modified cellulose and chitosan// Process Biochemistry. 2018.№64. С.213-220.
73. Бесчастнов В.В., Юданова Т.Н., Арефьев И.Ю. Возможности использования гидрогелевых композиций лечения ран//Московский хирургический журнал. №6.2019. С.17-22.
74. Кильдеева Н.Р., Юданова Т.Н., Решетов И.В. Ферментсодержащие мембраны и волокнистые материалы для использования в хирургии. М., 2002. С.117.
75. Белов А.А. Разработка промышленных технологий получения медицинских материалов на основе модифицированных волокнообразующих полимеров, содержащих биологически-активные белковые вещества: дис. док. техн. наук. М. 2009. 393с.
76. Березин И.В., Мартинека К.М., Введение в прикладную энзимологию/Иммобилизованные ферменты. М., 1982. 384с.

77. Глянцев С.П. Повязки с протеолитическими ферментами в лечении гнойных ран//Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 1998. №12. С.32-37
78. Шереметьев С. В. Ковалентная и электростатическая иммобилизация органических реагентов к полимерной и гелевой матрицам и чувствительные элементы на их основе: дис. канд. хим. наук. М. 2006. 194 с.
79. Волосова Е.В., Безгина Ю.А., Мазницына Л.В. Стабилизация ферментов класса протеаз в структуре биополимерных материалов // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 1. С.175.
80. Красноштанова А.А., Приворотская Е.А. Получение эффективных форм иммобилизованных протеолитических ферментов//Прикладные и фундаментальные исследования. Сборник трудов. 2018. С.30-38
81. Кильдеева Н.Р. Научные основы получения волокнистых и пленочных биокатализаторов из белоксодержащих формовочных дисперсий. М., 1998. 227с.
82. Кильдеева Н.Р., Вихорева Г.А., Гальбрайт Л.С. Волокнистые и пленочные материалы для медицины и биотехнологии. Ч.1. Нерезорбируемые материалы. Монография. М., 2014. 109с.
83. Панкова С.М., Сакибаев Ф.А., Королева В.А. Поиск *insilico* возможных сайтов связывания с носителями при иммобилизации протеолитических ферментов//Медицинская биофизика и биофизическая химия. №3.2020. С.456-460.
84. Аракелян А.Г., Кочуров Д.В. Полимерные носители для иммобилизации ферментов//Проблемы науки. №11. 2018. С.9-10
85. Анисенко О. В. Синтез сорбентов с заданными свойствами и создание на их основе биопрепаратов иммобилизованных ферментов: дисс. канд. биол. наук. Ставрополь. 2005.135с.
86. Олтаржевская Н.Д. Теоретические основы и технология получения текстильных медицинских материалов с заданными свойствами. Дисс. док. техн. наук. С-Петербург. 1994. 366с.

87. Олтаржевская, Н. Д. Лечебные текстильные материалы «Колетекс» – эффективные многофункциональные депо-системы / Н. Д. Олтаржевская, Г. Е. Кричевский // Химико-фармацевтический журнал. 2005. № 3. С. 42-50.
88. Бойко А. В. Направленная доставка лекарственных препаратов при лечении онкологических больных. М.: Специальное издательство медицинских книг: М. 2013. 194 с.
89. Ching S.H., Bansal N., Bhandari B. Alginate gel particles – a review of production techniques and physical properties // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2017. V. 57. P. 1133 – 1152.
90. Бесчастнов В.В., Юданова Т.Н., Арефьев И.Ю., Погодин И.Е., Павленко И.В. Тулупов И.В., Леонтьев А.Е. Возможности использования гидрогелевых композиций в лечении ран//Московский хирургический журнал №6.2019. С.17-22.
91. Лопатин, В.В. Полиакриламидные гидрогели в медицине / В.В. Лопатин, А.А. Аскадский // М.: Научный мир. 2004. 264 с.
92. Huo M, Huang J, O/ /c. Experimental study on the toxic effects of hydrophilic polyacrylamide gel. // Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi, 2002. V.18. № 2. P. 79-80.
93. Толстых М.П., Луцевич О.Э., Медушева Е.О. Теоретические и практические аспекты заживления ран. М.: 2007. 96 с.
94. Ваккер А.В., Юркштович Т.Л., Бычковский П.М. Интраоперационная локальная химиотерапия больных раком головы и шеи пролонгированным препаратом «Цисплацел»//Сибирский онкологический журнал. 2010. №6(42) С.48-51.
95. Белов А.А., Ванюшенкова А.А, Досадина Э.Э., Ханафина А.А., Текстильные перевязочные материалы на основе биodeградируемых полимеров, содержащих протеиназы для лечения ран и ожогов. Раны и раневые инфекции. 2018.Т.5.С.26.
96. Burdock G. A. Safety assessment of hydroxypropyl methylcellulose as a food ingredient //Food and Chemical Toxicology. 2007. Т. 45. №. 12. С. 2341-2351.



97. Yartog A., Hubert P. Systematic review of the mechanisms and evidence behind the hypocholesterolaemic effects of НРМС//Food Chemistry. 2016. V 199.P.746-759.
98. Соломевич С.О., Бычковский П.М. Исследование влияния свойств полимерной сетки гидрогелей модифицированного декстрана на кинетику высвобождения противоопухолевого вещества проспидина//Журнал прикладной химии. 2016. Т.89 №8. С.17-24.
99. Кильдеева Н.Р., Вихорева Г.А., Ефременко Е.Н., Пермиров П.И. Использование хитозана и его производных для иммобилизации белков. Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. М. 2003. С.395-398.
100. Аллам А.Ф., Долганова Н.В. Хитин и хитозан: строение, свойства, применение//Вестник науки. 2016. №10. С.11-14.
101. Патент РФ № 2018116179. Фармацевтическая субстанция для лечения ран различного генеза Пятигорская Н.В., Бркич Г.Э., Бркич Л.Л., Медушева Е.О., Белов А.А.
102. Кильдеева Н.Р., Бабак В.Г., Вихорева Г.А., Гальбрайт Л.С. Новый подход к созданию высоконабухающих перевязочных средств//Вестник МГУ. 2000. Т.6. С.423-425.
103. Кильдеева Н.Р., Лозинский В.И., Филатов Ю.Н., Марквичева Е.А. Высокопористые полимерные материалы биомедицинского назначения// Первые международные Косыгинские чтения. М. 2017. Т.1.С.240-244.
104. Наумов И.А., Буркова Е.А., Канарская Е.А., Канарский А.В., Водоросли - источник биополимеров, биологически активных веществ и субстрат в биотехнологии часть 2. Биотехнологическая переработка водорослей//Вестник казанского технологического университета. 2015. С.198
105. Олтаржевская Н.Д., Коровина М.А., Кричевский Г.Е., Щедрина М.А., Егорова Е.А. Возможности применения полисахаридов при лечении ран. Раны и раневые инфекции. 2019. Т.6. С.25.

106. Олтаржевская Н.Д., Кириченко И.М., Харькова Н.А., Фролов С.В. Использование гидрогелевых лечебных композиций для направленной доставки лекарств в рино- и отохирурги//Вестник оториноларингологии. 2018. №83(5). С.68-70.
107. Claire Jouannin, Chloë Vincent, Isabelle Dez, Annie-Claude Gaumont, Thierry Vincent Study of Alginate-Supported Ionic Liquid and Pd Catalysts // *Nanomaterials*. 2012. No.2. pp. 31-53.
108. Имбс Т. И. Полисахариды и низкомолекулярные метаболиты некоторых массовых видов бурых водорослей морей Дальнего Востока России. Способ комплексной переработки водорослей: дис. канд. хим. наук. Владивосток. 2010. 119 с.
109. Олтаржевская Н.Д., Коровина М.А., Кричевский Г.Е., Щедрина М.А., Егорова Е.А. Возможности применения полисахаридов при лечении ран. Раны и раневые инфекции. Журнал имени проф. Б.М. Костюченка. 2019. Т. 6. № 2. С. 24-31
110. Claire Jouannin, Chloë Vincent, Isabelle Dez, Annie-Claude Gaumont, Thierry Vincent Study of Alginate-Supported Ionic Liquid and Pd Catalysts // *Nanomaterials*. 2012. No.2. pp. 31-53.
111. Кузнецова Т.А., Беседнова Н.Н., Усов В.Ва., Андрюков Б.Г. Биосовместимые и биodeградируемые раневые покрытия на основе полисахаридов из морских водорослей. Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2020. С.109
112. Щедрина М.А., Олтаржевская Н.Д., Коровина М.А., Решетов И.В., Гусев И.В. Возможности биополимерных композиций на основе полисахаридов для стимуляции регулируемой регенерации мягких тканей// Российский биотерапевтический журнал. 2018. Т.17. № 5. С. 84-85.
113. Корытова Л.И., Маслюкова Е.А., Олтаржевская Н.Д., Корытов О.В., Хлыстова Т.С. Профилактика лучевых реакций с помощью материала гидрогелевого на основе альгината натрия с бетулинсодержащим экстрактом

бересты у пациентов с раком молочной железы// Российский биотерапевтический журнал. 2017. №16. С.45-45

114. Олтаржевская Н.Д., Коровина М.А., Барсуков Ю.А., Малихов А.Г., Кузмичев Д.В., Татаев И.Ш. Создание и использование лечебных гелей «Колегель» для направленной доставки лекарственных препаратов при лечении больных раком прямой кишки//Российский биотерапевтический журнал. 2015. №14 С.63-68.

115. Олтаржевская Н.Д. Теоретические основы и технология получения текстильных медицинских материалов с заданными свойствами: дисс.д-р.техн.наук. Санкт-Петербург. 1995.

116. Климова Е.В. Влияние факторов на микрокапсулирование пектиназы в альгинат кальция и определение каталитической активности//Пищевая и перерабатывающая промышленность. 2020. №2. 356с.

117. Верниковский В.В., Степанова Э.Ф. Имобилизованные протеазы для очищения раневых поверхностей//Российский химический журнал. 2010. Т.54 №6. С.94

118. Flores-Maltos A., Rodriguez-Duran L.V., Renovato J.//Enzyme Resources. 2011.V.2011. ID 768183.

119. Kanbargi K.D., Sonawane S.K., Arya S.S.// Int.Journal of Food Properties. 2017. V.20. № 12. P.3215.

120. Сигаева Н.Н., Вильданова Р.Р., Султанбаев А.В., Иванов С.П. Получение и свойства гидрогелей на основе хитозана и пектина//Коллоидный журнал. 2020. Т.82. №3. С.363.

121. Bastos L. P.H., Carvalho C.W.P., Rojas E.E.G.//International Journal Biological Macromolecules. 2018. V.120. p.332.

122. Зиновьев Е.В., Лукьянов С.А., Цыган В.Н. Оценка эффективности раневых покрытий на основе бактериальной целлюлозы с фукоиданом при ожогах кожи//Вестник Российской военно-медицинской академии.2019. №65. С.148-152.

123. Самсон А.А., Кузьмин Ю.В. Местная лекарственная терапия гнойных ран//Военная медицина №4. 2018. С.35
124. Голуб А. В., Привольнев В. В. Местная антибактериальная терапия хирургических инфекций кожи и мягких тканей в амбулаторных условиях: слагаемые успеха / А. В. Голуб, В. В. Привольнев // Раны и раневые инфекции. 2014. № 1. С. 33–39.
125. Суковатых Б.С., Григорьян А.Ю. Эффективность иммобилизованной формы хлоргексидина в лечении гнойных ран// Новости хирургии. 2015. №23. С.138-144.
126. Кривошеин Ю.С., Тышкевич Л.В., Сарачан Т.А. Определение антимикробной активности эмульсий и аэрозолей, содержащих разные концентрации. 1991. С.115-117.
127. Дунаевский А.М., Кириченко И.М., «Клиническое обоснование использования препарата Мирамистин в терапии инфекционно-воспалительных заболеваний респираторной системы» Инфекционные заболевания №5. 2013. С.6-8.
128. Кричевский Г.Е. Зеленые и природоподобные технологии – основа устойчивого развития цивилизации. М. 2020. Т.3. 524с.
129. Петрицкая Е.Н., Рогаткин Д.А. Сравнительная характеристика антибактериального действия препаратов серебра. Альманах клинической медицины. 2016. №2. С.221-226.
130. Svitlana Chernousova, Matthias Epple. Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal//Angewandte Chemie. 2016. С. 2009-2014
131. Shahverdy AR, Fakhimi Ali, Minaian Sara Synthesis and effect of silver nanoprapcles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus and Escherichia coli// Nanomedicine-Nanotechnology biology and medicine. 2007. №3(2). pp.168–171
132. Abramson J.J., Trimm J.L., Weden L. et al. Heavy metals induce rapid calcium release from sarcoplasmicreticulum vesicles isolated from skeletal muscle // Proc. nat. Acad. Sci. USA. 1983. Vol.80. № 6. P.1526–1530.

133. Ю.А. Крутиков, А.А. Кудринский, А.Ю. Олейник, Г.В. Лисичкин. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы // Успехи химии. 2008. Т. 77. № 3. С. 242–269.
134. Толстых М.П. Комплексная оценка нового раневого покрытия дальцеке-трипсин-серебро в лечении экспериментальных гнойных ран: дисс. канд. мед. наук. М.: 1999. 165с.
135. Егорова Е.М., Кубатиев А.А, Швец В.И. Биологические эффекты наночастиц металлов / М.: Наука. 2014. 350с.
136. Толстых М.П. Проблема комплексного лечения гнойных ран различного генеза и трофических язв. М. 2002. Дисс. д-р мед. наук. 153с.
137. Park Y., Hong Y.N., Weyers A. et al. Polysaccharides and phytochemicals: a natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles // IET Nanobiotechnol. 2011. V. 5 N 3. P. 69-78.
138. Rafique M., Sadaf I., Rafique M.S. et al. A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications // Artif. Cells, Nanomed. Biotechnol. 2017. V. 45. № 7. P.1272-1291.
139. Balavandy S.K, Shamel K., Abidin Z.Z. Rapid and Green Synthesis of Silver Nanoparticles via Sodium Alginate Media // Int. J. Electrochem. Sci. 2015. V. 10. P. 486–497.
140. Zahran M.K., Ahmed H.B., El-Rafie M.H. Alginate mediate for synthesis controllable sized AgNPs // Carbohydrate Polymers. 2014.- V. 111.- P. 10-17.
141. Lomelí-Marroquín D., Medina Cruz D., Nieto-Argüello A. et al. Starch mediated synthesis of mono- and bimetallic silver/gold nanoparticles as antimicrobial and anticancer agents // Int. J. Nanomedicine. 2019. V. 14.- P. 2171-2190.
142. Santos S.A., Pinto R.J., Rocha S.M. et al. Unveiling the chemistry behind the green synthesis of metal nanoparticle // ChemSusChem. 2014. V.7. N 9.-P.2704-11
143. Janata E., Henglein A., Ershov B.G. First Cluster of Ag<sup>+</sup> Ion Reduction in Aqueous Solution // J. Phys. Chem. -1994. -V. 98.- № 42.- P. 10888-10890
144. Кричевский Г.Е. Зелёные и природоподобные технологии – основа

устойчивого развития цивилизации для будущих поколений. М.: 2019.Т2.  
308 с.

145. Ершов Б.Г., Ионова Г.В., Киселева А.Д. Кластеры серебра: расчеты оптических переходов, образование и свойства "магических" положительно заряженных кластеров // Журн. физ. хим. 1995. Т. 69. № 2. С. 260-270.

146. Bhagyaraj S., Krupa I. Alginate-Mediated Synthesis of Hetero-Shaped Silver Nanoparticles and Their Hydrogen Peroxide Sensing Ability // Molecules. 2020. V. 25. P. 435-444.

147. Быркина Т.С., Гафурова Д.Р., Олтаржевская Н.Д., Кричевский Г.Е. Исследование возможности снижения микробной обсемененности композиции на основе альгината натрия//Технология текстильной промышленности. 2017. №367. С.341-345.

148. Олтаржевская Н.Д., Коровина М.А., Маслюкова Е.А., Кoryтова Л.И. Профилактика и лечение лучевых реакций гелем «Колегель». Российский биотерапевтический журнал. 2017. №1 Т.15. -с.80

149. Бойко А.В., Кoryтова Л.И., Олтаржевская Н.Д. Направленная доставка лекарственных препаратов при лечении онкологических больных. М. 2013. 194 с.

150. Байдуров Т.А., Шиповская А.Б., Синтез и физ-хим.свойства полимеров акриламида. Пособие для бакалавров. Саратов. 2015. 67с.

151.Приворотская Е.А. Получение стабилизированных форм гидролитических ферментов технического и фармацевтического назначения: дисс. канд. хим. наук. М.: 2017. 170с.

152. Фомина, Е. В. Технология получения лечебных текстильных материалов для физиотерапии: дис.канд. техн. наук: М.2014. 221с.

153. Хлыстова Т. С. Влияние технологических факторов на реологические свойства биополимерных композиций на основе полисахаридов// Технологии XXI века в легкой промышленности. 2011. № 5. С. 57–67.

154. Хлыстова Т. С. Технология получения лечебных депо-материалов на текстильной и гидрогелевой основе с использованием печатных композиций из смеси биополимеров-полисахаридов: дисс. канд. техн.наук.:М., 2015.177с.
155. Кокшаров С.А., Алеева С.В., Лепилова О.В, Кричевский Г.Е., Фидоровская Ю.С. Свойства гидроколлоидов альгината натрия при сорбционном связывании папаина//Коллоидный журнал.2021. Т.83 №6.С.1-16
156. Никитенкова В.Н., Хлыстова Т.С., Влияние технологических факторов на реологические свойства биополимерных композиций на основе полисахаридов// Технологии 21 века в легкой промышленности. 2011. №5. С.57-67.
157. Быркина Т.С. Разработка технологии получения лечебной гидрогелевой композиции на основе альгината натрия с увеличенным сроком годности // дисс. канд. техн. наук. М.: 2018. 212 с.
158. Belov A. A., Korotaeva A. I., Raspopova E. A. Influence solutions of glycerol on the enzymatic activity of Proteolytic complex of Hepatopancreas crab stabilized polysaccharide compounds // Chemical Technology. 2015. pp. 74-86.
159. Патент РФ № 0002524582 Боровикова Л.Н., Писарев О.А., Ершов Д.Ю. Способ стабилизации наночастиц биогенных элементов ферментами. 20.01.2015
160. РЛС. Регистр лекарственных средств 2022.
161. Улахович Н.А., Медянцева Э.П., Бабкина С.С., Кутырева М.П. Учебное пособие для лекционного курса «Основы бионеорганической химии». Казань: 2012. 102 с.
162. Jayachandran Venkatesan, Sukumaran Anil, Se-Kwon Kim, and Min Suk Shim. Marine Fish Proteins and Peptides for Cosmeceuticals: A Review // Mar. Drugs 2017, 15(5), p.143
163. Быркина Т.С., Олтаржевская Н.Д. Колаева А.В. Способы стабилизации микробиологических и реологических показателей лечебных депо-материалов «Колегель». Иваново: Сборник ИВГПУ. 2016. Ч.2. 164с.
164. Hassan A. Abd El-Rehima, Naeem M. El-Sawya, Iman A. Faragb. Synergistic effect of combining ionizing radiation and oxidizing agents on controlling degradation of Na-alginate. Carbohydrate Polymers. 2011. № 86. P.1439 –1444
165. Verma, P.R., Lyer, S.S., Controlled transdermal delivery of propranolol using HPMC matrices: design and in-vitro and in-vivo evaluation. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2010. №52. p.151– 156.

166. Валуева, М. И. Технология получения текстильных и гидрогелевых депо-материалов с радиопротекторными свойствами. - дисс. канд. техн. наук. Иваново, 2014. 242с.
167. Сергеев Б.М., Кирюхин М.В., Бахов Ф.Н. и др. Фотохимический синтез наночастиц серебра в водных растворах поликарбоновых кислот//Вестник МГУ. Сер. 2. Химия. 2001. Т.42. № 5. С.308-314.
168. Ершов Б.Г. Наночастицы металлов в водных растворах: электронные, оптические и каталитические свойства. Рос. хим. ж. 2001.Т. 45.№ 3. С.20-30.
169. Bhagyaraj S., Krupa I. Alginate-Mediated Synthesis of Hetero-Shaped Silver Nanoparticles and Their Hydrogen Peroxide Sensing Ability. Molecules. 2020. № 25.P.435-444
170. Филатов В.Н., Рыльцев В.В., Толстых М.П., Иванян А.А. Новые биологически активные раневые покрытия с металлокомплексами для лечения гнойных ран. Современные раневые покрытия. 1996. Москва. с.96.
171. Андреев А.А., Глухов А.А., Остроушко А.П., Карапатьян А.Р., Чуян А.О. Влияние кислотности на динамику репаративных процессов в мягких тканях//Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2017. №1 С.64-71
172. Роговин З.А. Химия целлюлозы. М.: Химия. 1972. 520с.
173. Козлова О.В., Одинцова О.И., Гарасько Е.В. Использование гумминовых соединений при создании текстильных изделий медицинского назначения//Известия Высших учебных заведений. Серия: химия и химическая технология. 2013 Т.56.№4. С.89-93.
174. Дмитриева А.Д., Кузьменко В.А., Одинцова Л.С., Одинцова О.И. Синтез и использование наночастиц серебра для придания текстильным материалам бактерицидных свойств//Известия Высших учебных заведений. Серия: химия и химическая технология. 2015.Т.58. №8. С.67-70.
175. Жуковский В.А. Синтез, структура и свойства высокомолекулярных соединений. 2021. Спб.: Левша. 112с.



## Приложение А



ФЕДЕРАЛЬНОЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ АГЕНТСТВО  
 Федеральное государственное бюджетное учреждение  
 «Научно-клинический центр токсикологии  
 имени академика С.Н. Голикова  
 Федерального медико-биологического агентства»  
 (ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России)

Бехтерева ул., д. 1  
 г. Санкт-Петербург, 192019  
 Тел./факс: (812) 365-06-80  
 e-mail: [institute@toxicology.ru](mailto:institute@toxicology.ru)  
<http://www.toxicology.ru>



УТВЕРЖДАЮ

им. С.Н. Голикова

Врио директора  
 ФГБУ НКЦТ  
 ФМБА России

В.Л. Рейнюк  
 «31» августа 2021 г.

Экз. № 1

ОТЧЕТ  
 О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Токсикологические исследования гидрогелевого материала  
 на основе альгината натрия+папаин+ AgNO<sub>3</sub>  
 (материал ранозаживляющий)

Руководитель темы

 30.08.2021

Н.В. Лапина

Приложение Б



**УТВЕРЖДАЮ**

Генеральный директор

ООО «Колетекс»

Н.Д.Олтаржевская

«20» сентября 2021 г.

**ИНСТРУКЦИЯ  
ПО ПРИМЕНЕНИЮ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ  
«МАТЕРИАЛ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИЙ»**

ТУ 21.20.24-028-58223785-2021

ПРОЕКТ

Москва 2021

## Приложение В

Общество с ограниченной ответственностью ООО «Колетекс»

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Колетекс»

д.т.н., профессор

Олтаржевская Н.Д.

«06» августа 2021 г.



### Технологический регламент

получения материала ранозаживляющего

**ТР 26943035-01-2021**

Срок действия регламента до 30 апреля 2024 г.

Москва 2021

## Приложение Г

**Таблица стабильности физико-химических свойств медицинского изделия  
«Салфетка лечебная на основе альгината натрия с папаином и нитратом серебра» после длительного хранения**

**Изучаемое изделие: Салфетка гидрогелевая на основе альгината натрия с папаином и нитратом серебра»**

**Наименование производителя:** Общество с ограниченной ответственностью «КОЛТЕКС» (ООО «КОЛТЕКС»)

Таблица 1 -Состав гидрогелевой композиции при нанесении на ТМ по технологии печати

| Рецептура                        | Масса, г<br>100,0 |
|----------------------------------|-------------------|
| <i>Действующие вещества</i>      |                   |
| Экстракт латекса папайи (папаин) | 4,0               |
| Серебра нитрат                   | 0,05              |
| <i>Вспомогательные вещества</i>  |                   |
| Альгинат натрия                  | 2,0               |
| Гидроксипропилметилцеллюлоза     | 0,5               |
| Глицерин                         | 2,0               |
| Эуксил (феноксиэтанол)           | 0,5               |
| Натрия карбонат                  | 1,0               |
| Вода                             | до 100,0          |

**Партии:** 041219, 051219, 061219.

**НД:** Проект Технических условий.

**Тип партий:** лабораторные.

**Температура опыта:** (20±5) °С; 40 °С.

**Начало опыта:** 08.12.2019 г.

**Конец опыта:** 08.12.2021 г.

**Влажность, при которой проводилось изучение стабильности:** от 45 до 60 %

**Таблица 2 - Результаты контроля качества 3 партий опытных образцов салфеток  
перед закладкой на хранение**

| <b>№ партии</b> | <b>Описание<br/>Бежевый или<br/>светло-<br/>коричневый<br/>цвет, слабый<br/>запах морских<br/>водорослей</b> | <b>рН вводной вытяжки<br/>6,5-7,0</b> | <b>Подлинность по папаину</b> | <b>Протеолитическая<br/>активность, ПЕ/г,<br/>1,0-3,0</b> | <b>Стерильность –изделие должно<br/>быть стерильным</b> |
|-----------------|--|---------------------------------------|-------------------------------|---|---|
| <b>1</b>        | <b>2</b>   | <b>3</b>                              | <b>4</b>                      | <b>5</b>  |   |
| <b>041219</b>   | соответствует  | 6,80                                  | соответствует                 | соответствует   | стерильно   |
| <b>051219</b>   | соответствует  | 7,10                                  | соответствует                 | соответствует   | стерильно   |
| <b>061219</b>   | соответствует  | 7,00                                  | соответствует                 | соответствует   | стерильно   |

| <b>Таблица 3 - Результаты контроля качества 3-х партий опытных образцов салфеток через 3 месяца хранения при температуре (20±5)°C</b> |   |          |               |               |           |
|---|---|----------|---------------|---------------|-----------|
|   | <b>1</b>                                  | <b>2</b> | <b>3</b>      | <b>4</b>      | <b>5</b>  |
|   | <b>хранение при температуре (20±5) °C</b> |          |               |               |           |
| <b>041219</b>   | соответствует                             | 7,10     | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>051219</b>   | соответствует                             | 7,25     | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>061219</b>   | соответствует                             | 6,90     | соответствует | соответствует | стерильно |
|   | <b>хранение при температуре 40°C</b>      |          |               |               |           |
| <b>041219</b>   | Не соответствует                          | 7,10     | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>051219</b>   | Не соответствует                          | 6,55     | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>061219</b>   | Не соответствует                          | 7,20     | соответствует | соответствует | стерильно |

| <b>Таблица 4 - Результаты контроля качества 3 партий опытных образцов салфеток через 6 месяцев хранения при температуре (20±5)°С</b> |   |          |               |               |           |
|--|---|----------|---------------|---------------|-----------|
|  | <b>1</b>                                  | <b>2</b> | <b>3</b>      | <b>4</b>      | <b>5</b>  |
|  | <b>Хранение при температуре (20±5) °С</b> |          |               |               |           |
| <b>041219</b>  | Соответствует                             | 6,20     | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>051219</b>  | Соответствует                             | 6,10     | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>061219</b>  | Соответствует                             | 5,60     | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>Результаты контроля качества 3 партий опытных образцов салфеток через 9 месяцев хранения при температуре (20±5) °С</b>            |   |          |               |               |           |
| <b>041219</b>  | Соответствует                             | 7,10     | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>051219</b>  | Соответствует                             | 6,55     | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>061219</b>  | Соответствует                             | 7,00     | соответствует | соответствует | стерильно |



**Таблица 5- Результаты контроля качества 3 партий опытных образцов салфеток через 12 месяцев хранения при температуре (20±5) °С**

|               |               |      |               |               |           |
|---------------|---------------|------|---------------|---------------|-----------|
| <b>041219</b> | Соответствует | 7,20 | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>051219</b> | Соответствует | 6,50 | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>061219</b> | Соответствует | 7,00 | соответствует | соответствует | стерильно |

**Таблица 6- Результаты контроля качества 3 партий опытных образцов салфеток через 24 месяца хранения при температуре (20±5) °С**

|               |               |      |               |               |           |
|---------------|---------------|------|---------------|---------------|-----------|
| <b>041219</b> | Соответствует | 7,20 | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>051219</b> | Соответствует | 6,50 | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>061219</b> | Соответствует | 7,10 | соответствует | соответствует | стерильно |

## Пояснение к таблицам

1. Описание (внешний вид, цвет, запах): салфетка бежевого или светло-коричневого цвета со слабым запахом морских водорослей.
2. рН водной вытяжки: 6,8 -7,2
3. Подлинность по папаину – время створаживания молока – не более 50 сек.
4. Протеолитическая активность – 1-3 ПЕ/г.
5. Стерильность: изделие должно быть стерильным.

\*\*После исследования опытных образцов салфеток по установленным параметрам было отмечено отсутствие каких-либо изменений при хранении (20±5) °С. Однако при хранении при температуре 40 °С было отмечено изменение свойств изделия, в том числе бежевый (светло-коричневый) цвет изменился на неоднородно-коричневый, а также неприятный запах при взятии проб на анализ.

В связи с нецелесообразностью продолжения дальнейшего контроля опытных образцов при температуре 40 °С было решено оставить на хранение в режиме реального времени образцы при температуре (20±5) °С.

#### **Заключение**

В результате проведенных исследований стабильности физико-химических свойств опытных образцов в процессе долгосрочного хранения, т. е. в режиме реального времени, в течение 24 месяцев при комнатной температуре (20±5)°С было установлено:

- салфетка имеет светло-коричневый или бежевый цвет со слабым запахом морских водорослей;

- среднее значение рН после 24 месяцев хранения при температуре (20±5)°С составляло около 7,00, что соответствует заявляемым требованиям.

- подлинность по папаину – время створаживания молока составляло около 50 сек после 24 месяцев хранения в холодильнике;

- протеолитическая активность папаина после 24 месяцев хранения при температуре (20±5)°С находилась в пределах заявленных показателей;

- изучение стерильности показало, что в течение всего периода наблюдения опытные образцы оставались стерильными, рост микроорганизмов не наблюдался.

Таким образом, можно заключить, что опытные образцы лечебных салфеток партий 041219, 051219, 061219, изготовленные по лабораторному регламенту, в процессе хранения при заданных температурах по установленным параметрам, определенным в соответствии с методиками анализа контроля качества, соответствуют предъявляемым к ним требованиям в НД.

Результаты проведенного исследования стабильности лечебной салфетки свидетельствуют о том, что по основным важнейшим показателям оптимальным диапазоном температуры хранения является  $(20\pm 5)^{\circ}\text{C}$ .

Результаты исследования в долгосрочном режиме подтверждают правильность заявленного срока годности.

## Приложение Д

**Таблица стабильности физико-химических свойств медицинского  
изделия  
«Гель ранозаживляющий на основе альгината натрия с папаином и  
нитратом серебра» после длительного хранения**

**Изучаемое изделие: Гель ранозаживляющий на основе альгината натрия с папаином и нитратом серебра»**

**Наименование производителя:** Общество с ограниченной ответственностью «КОЛТЕКС» (ООО «КОЛТЕКС»)

**Таблица 7 – Состав геля ранозаживляющего**

| Рецептура                        | Масса, г<br>100,0 |
|----------------------------------|-------------------|
| <i>Действующие вещества</i>      |                   |
| Экстракт латекса папайи (папаин) | 4,0               |
| Серебра нитрат                   | 0,05              |
| <i>Вспомогательные вещества</i>  |                   |
| Альгинат натрия                  | 2,0               |
| Гидроксипропилметилцеллюлоза     | 2,0               |
| Глицерин                         | 2,0               |
| Эуксил (феноксизтанол)           | 0,5               |
| Натрия карбонат                  | 1,0               |
| Вода                             | до 100,0          |

**Партии:** 01219, 021219, 03120.

**НД:** Проект Технических условий.

**Тип партий:** лабораторные.

**Температура опыта:** (20±5) °С; (2 – 8) °С.

**Начало опыта:** 08.12.2019 г.

**Конец опыта:** 08.12.2020 г.

**Влажность, при которой проводилось изучение стабильности:** от 45 до 60 %

**Таблица 8 - Результаты контроля качества 3 партий опытных образцов геля  
перед закладкой на хранение**

| <b>№ партии</b> | <b>Описание<br/>Бежевый или<br/>светло-<br/>коричневый<br/>цвет, слабый<br/>запах морских<br/>водорослей</b> | <b>Извлекае<br/>мый<br/>объем,<br/>г<br/>отклонен<br/>ие 10%</b> | <b>рН вводной<br/>вытяжки<br/>6,5-7,0</b> | <b>Подлинность по<br/>папаину</b> | <b>Протеолитическая<br/>активность, ПЕ/г,<br/>1,0-3,0</b> | <b>Динамическая вязкость,<br/>Па*с<br/>1,0-1,5<br/>(после стерилизации)</b> | <b>Стерильность –<br/>гель должен быть<br/>стерильным</b> |
|-----------------|--|--|---|-----------------------------------|---|---|---|
|                 | <b>1</b>   | <b>2</b>   | <b>3</b>                                  | <b>4</b>                          | <b>5</b>  | <b>6</b>  | <b>7</b>  |
| <b>011219</b>   | соответствует  | 50,00  | 6,90                                      | соответствует                     | соответствует   | соответствует   | стерильно   |
| <b>021219</b>   | соответствует  | 49,75  | 7,20                                      | соответствует                     | соответствует   | соответствует   | стерильно   |
| <b>031219</b>   | соответствует  | 50,60  | 7,50                                      | соответствует                     | соответствует   | соответствует   | стерильно   |

| <b>Таблица 9 - Результаты контроля качества 3-х партий опытных образцов геля через 3 месяца хранения при температуре (20±5)°С и при температуре от 2 до 8°С</b> |   |          |          |               |               |               |           |
|---|---|----------|----------|---------------|---------------|---------------|-----------|
|   | <b>1</b>                                  | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b>      | <b>5</b>      | <b>6</b>      | <b>7</b>  |
|   | <b>хранение при температуре (20±5) °С</b> |          |          |               |               |               |           |
| <b>011219</b>   | соответствует                             | 49,80    | 7,00     | соответствует | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>021219</b>   | соответствует                             | 50,00    | 7,35     | соответствует | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>031219</b>   | соответствует                             | 50,50    | 6,85     | соответствует | соответствует | соответствует | стерильно |
|   | <b>хранение при температуре 2 - 8°С</b>   |          |          |               |               |               |           |
| <b>011219</b>   | соответствует                             | 50,20    | 7,20     | соответствует | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>021219</b>   | соответствует                             | 49,90    | 6,75     | соответствует | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>031219</b>   | соответствует                             | 50,00    | 7,50     | соответствует | соответствует | соответствует | стерильно |

| <b>Таблица 10 - Результаты контроля качества 3 партий опытных образцов геля через 6 месяцев хранения при температуре (20±5)°С и при температуре от 2 до 8°С</b> |   |          |          |               |               |               |           |
|---|---|----------|----------|---------------|---------------|---------------|-----------|
|   | <b>1</b>  | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b>      | <b>5</b>      | <b>6</b>      | <b>7</b>  |
|   | <b>хранение при температуре (20±5) °С</b>                 |          |          |               |               |               |           |
| <b>011219</b>   | **Изменение цвета, появление неприятного запаха и хлопьев | 49,75    | 6,30     | соответствует | соответствует | ≤ 0,1 Па*с    | стерильно |
| <b>021219</b>   | **Изменение цвета, появление неприятного запаха и хлопьев | 50,00    | 6,00     | соответствует | соответствует | ≤ 0,1 Па*с    | стерильно |
| <b>031219</b>   | **Изменение цвета, появление неприятного запаха и хлопьев | 50,10    | 5,75     | соответствует | соответствует | ≤ 0,1 Па*с    | стерильно |
|   | <b>хранение при температуре 2 - 8°С</b>                   |          |          |               |               |               |           |
| <b>011219</b>   | соответствует   | 50,00    | 7,50     | соответствует | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>021219</b>   | соответствует   | 49,75    | 7,00     | соответствует | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>031219</b>   | соответствует   | 49,50    | 6,50     | соответствует | соответствует | соответствует | стерильно |



| <b>Таблица 11 - Результаты контроля качества 3 партий опытных образцов геля через 9 месяцев хранения при температуре от 2 до 8°С</b>  |   |          |          |               |               |               |           |
|---|---|----------|----------|---------------|---------------|---------------|-----------|
|   | <b>1</b>                                | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b>      | <b>5</b>      | <b>6</b>      | <b>7</b>  |
|   | <b>хранение при температуре 2 - 8°С</b> |          |          |               |               |               |           |
| <b>011219</b>   | соответствует                           | 49,50    | 6,75     | соответствует | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>021219</b>   | соответствует                           | 50,00    | 7,0      | соответствует | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>031219</b>   | соответствует                           | 49,50    | 6,60     | соответствует | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>Таблица 12 - Результаты контроля качества 3 партий опытных образцов геля через 12 месяцев хранения при температуре от 2 до 8°С</b> |   |          |          |               |               |               |           |
|   | <b>1</b>                                | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b>      | <b>5</b>      | <b>6</b>      | <b>7</b>  |
| <b>011219</b>   | соответствует                           | 49,50    | 7,0      | соответствует | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>021219</b>   | соответствует                           | 50,00    | 6,60     | соответствует | соответствует | соответствует | стерильно |
| <b>031219</b>   | соответствует                           | 49,50    | 7,0      | соответствует | соответствует | соответствует | стерильно |

## Пояснение к таблицам

6. Описание (внешний вид, цвет, запах): гель бежевого или светло-коричневого цвета со слабым запахом морских водорослей.
7. Извлекаемый из тубы объем должен быть не менее 95,0% от указанного на упаковке.
8. рН водной вытяжки: 6,8 -7,2
9. Подлинность по папаину – время створаживания молока – не более 50 сек.
10. Протеолитическая активность – 1-3 ПЕ/г.
11. Динамическая вязкость: 1,0– 1,5 Па\*с (вязкость после стерилизации).
12. Стерильность: гель должен быть стерильным.

\*\*После исследования опытных образцов геля по установленным параметрам было отмечено отсутствие каких-либо изменений при хранении в холодильной камере при температуре 2 - 8°C. Однако при хранении при температуре (20±5) °С было отмечено изменение свойств геля, в том числе бежевый (светло-коричневый) цвет изменился на темно-коричневый, появились хлопья, а также неприятный запах при взятии проб на анализ. Кроме того, значение рН сдвинулось в кислую область, изменился такой важный показатель для геля, как динамическая вязкость – она уменьшилась.

В связи с нецелесообразностью продолжения дальнейшего контроля опытных образцов при температуре (20±5) °С было решено оставить на хранение в режиме реального времени образцы при температуре 2 - 8°C.

### Заключение

В результате проведенных исследований стабильности физико-химических свойств опытных образцов геля в процессе долгосрочного хранения, т.е. в режиме реального времени, в течение 12 месяцев при комнатной температуре (20±5)°С, при температуре (2 - 8)° С и при температуре 40<sup>0</sup>С было установлено:

- гидрогелевая композиция представляет собой гелеобразную массу светло-коричневого или бежевого цвета со слабым запахом морских водорослей, однако после шести месяцев хранения при температуре (20±5)°С было замечено изменение цвета, наблюдалось появление хлопьев и неприятного запаха;

- извлекаемый объем содержимого опытных образцов геля после 12 месяцев хранения находилась в пределах нормы;

- среднее значение рН после 12 месяцев хранения при температуре (2 - 8)° С составляло около 7,00, что соответствует заявляемым требованиям. Однако после 6 месяцев хранения при комнатной температуре также было отмечено отклонение рН в кислую сторону;

- подлинность геля по папаину – время створаживания молока составляло около 50 сек после 12 месяцев хранения в холодильнике;

- протеолитическая активность папаина после 12 месяцев хранения при температуре (2 - 8)° С находилась в пределах заявленных показателей;

- динамическая вязкость геля после стерилизации через 12 месяца хранения при температуре является 2 - 8°С составляла 1,0 до 1,5 па\*с, что соответствует нормативным требованиям. Однако после 6-х месяцев хранения при температуре (20±5)°С отмечалось уменьшение вязкости опытных образцов всех партий;

- изучение стерильности геля показало, что в течение всего периода наблюдения опытные образцы оставались стерильными, рост микроорганизмов не наблюдался.

Таким образом, можно заключить, что опытные образцы геля партий 011219, 021219, 031219, изготовленные по лабораторному регламенту, в процессе хранения при заданных температурах по установленным параметрам, определенным в соответствии с методиками анализа контроля качества, соответствуют предъявляемым к ним требованиям в НД. Исключение составляют такие важные показатели, как рН и динамическая вязкость.

Результаты проведенного исследования стабильности геля свидетельствуют о том, что по основным важнейшим показателям, таким как рН и динамическая вязкость, оптимальным диапазоном температуры хранения является 2 - 8°С, то есть хранение в холодильной камере.

Результаты исследования стабильности геля в долгосрочном режиме подтверждают правильность заявленного срока годности.