

УДК 66.022

DOI 10.47367/0021-3497_2021_5_137

**ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ
С ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИМ И АНТИМИКРОБНЫМ ДЕЙСТВИЕМ***

**FEATURES OF THE TECHNOLOGY FOR OBTAINING WOUND COVERINGS
WITH PROTEOLYTIC AND ANTIMICROBIAL ACTION**

*Ю.С. ФИДОРОВСКАЯ¹, Е.О. МЕДУШЕВА¹, М.А. КОРОВИНА¹,
Г.Е. КРИЧЕВСКИЙ¹, Н.Д. ОЛТАРЖЕВСКАЯ²*

*YU.S. FIDOROVSKAYA¹, E.O. MEDUSHEVA¹, M.A. KOROVINA¹,
G.E. KRICHEVSKY¹, N.D. OLTARZHEVSKAYA²*

**(ООО "НПО Текстильпрогресс"¹, Москва,
ООО "Колетекс"², Москва)**

**(LLC "SPO Textilprogress"¹, Moscow,
LLC "Coletex"², Moscow)**

E-mail: koletex@list.ru

Публикация посвящена разработке технологии получения раневых покрытий (гидрогель, текстильная салфетка) на биополимерной основе с включением компонентов различного биологического действия, предполагающей совмещение в одной гидрогелевой композиции растительного фермента папаина и соли серебра с сохранением специфической протеолитической и антимикробной активности указанных компонентов. Освещена проблема инактивации протеаз тяжелыми металлами и представлено технологическое решение по сохранению активности ферментов в композиции, используемой для получения лечебных покрытий.

* Работа проводится в рамках выполнения Договора № 596ГРНТИ/63447 с ФГБУ «Фонд содействия развития малых форм предприятий в научно-технической сфере» (Фонд содействия инновациям).

This publication focuses on developing technology for wound coverings (hydrogel, textile napkin) on a biopolymer base with the inclusion of various components of biological actions. It involves the combination in one hydrogel composition of the plant enzyme papain and silver salt while maintaining the specific proteolytic activity of the enzyme and the antimicrobial properties of silver salt. The problem of inactivation of proteases by heavy metals is described and a solution of activity preservation of enzymes in the composition is presented.

Ключевые слова: гидрогелевая композиция, полимеры, растительные ферменты, серебро, гидроксипропилметилцеллюлоза, лечебные материалы, альгинат натрия, антибактериальные свойства.

Keywords: hydrogel composition, polymers, plant enzymes, silver, hypromellose, healing materials, sodium alginate, antibacterial properties.

Особенность раневого процесса на начальных (I-II) стадиях заключается в том, что инфицированная рана содержит самые разнообразные микроорганизмы, для борьбы с которыми нужен высокоэффективный антимикробный препарат широкого спектра действия. Одновременно основной быстрого заживления раны является ее очищение от гнойно-некротических масс, для чего нужны протеолитические ферменты [1].

При выборе протеолитического компонента для разрабатываемой лечебной композиции остановились на ферментах растительного происхождения, а именно – ферментном комплексе из латекса папайи (папаине). Он сохраняет активность в широком температурном диапазоне, активен не только в кислых, но и в нейтральных и щелочных средах, что отвечает требованиям при разработке изделия для гнойных ран [2], [3].

При выборе антисептического агента предпочтение отдано соли серебра (AgNO_3), разрешенной для применения в медицине.

Однако совмещение протеолитического фермента и соли серебра в одной композиции осложнено возможным взаимодействием между ними, приводящим к дезактивации фермента [4], и требует разработки технологических приемов, предотвращающих потерю указанными компонентами активности, необходимой для эффективного действия создаваемых лечебных изделий.

Экспериментально установлено, что в водной среде при взаимодействии папаина и соли серебра происходит инактивация и снижение протеолитической активности (ПА) фермента. При добавлении водного раствора папаина с активностью 0,2 ПЕ/мг к раствору соли азотнокислого серебра с концентрацией 2 г/л происходит падение активности папаина на 40%, при увеличении концентрации серебра в два раза – на 75%. Следовательно, необходимо введение компонентов, которые защитили бы от снижения ПА папаин и позволили соли серебра проявить максимальную антибактериальную активность. Было принято решение остановить свой выбор на природных полимерах, иммобилизуя в них за счет физических сил фермент и антисептик. Известно, что иммобилизация лекарственных препаратов ферментов с помощью полимеров снижает потерю ими протеолитической активности. Для этого необходимо выбрать полимеры, которые, будучи инертными или, что предпочтительнее, являющиеся пролекарствами, могли бы быть "депо" для введенных лекарств и одновременно защитным коллоидом для снижения нежелательного взаимодействия папаина и соли серебра.

Создаваемая полимерная композиция должна осуществлять направленную доставку лекарственных веществ к поврежденной области, обеспечить их высвобождение в нужный момент и в оптимальном количестве, необходимым для лечения [5].

К полимеру (полимерам) предъявляются требования как со стороны области применения (хирургия), так и со стороны технологии получения готовых форм. И те, и другие требования необходимо учитывать, чтобы создать материал с комплексом заранее заданных по медицинским показаниям свойств. Для физической иммобилизации лекарств широко используются различные биополимеры, включая альгинаты – натриевые и кальциевые соли природного полисахарида, содержащегося в бурых водорослях холодных морей. С технологической точки зрения с учетом реологических свойств альгината натрия (АН) является прекрасной основой для создания многокомпонентных гидрогелевых композиций. Кроме того, АН за счет его кровоостанавливающих свойств и способности к регенерации тканей можно отнести к пролекарствам [6]. Именно поэтому нами было решено физически иммобилизовать протеолитический фермент в геле АН.

Материалы и методы

В работе использовали:

- альгинат натрия (АН) – природный полимер-полисахарид;
- папаин;
- гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ);
- серебро азотнокислое ГОСТ 1277-75 (изм. 1);
- трикотажное полотно полифункциональное ПФ-2; олно нетканое холстопршивное безниточное, особенностью которого является наличие трикотажного покрытия с одной стороны и ворсового застила с другой стороны; полотно нетканое из вискозного волокна, полученное гидроструйным способом крепления.

Влагоемкость полотен определялась по методике ГОСТ 3816-81 (ИСО 811 - 81).

Характеристики текстильных материалов представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1

Текстильный материал	Поверхностная плотность, г/м ²	Влагоемкость, %	рН водной вытяжки из полотна	рН водной вытяжки текст. изделия с композицией
1.Трикотажное полотно полифункциональное ПФ-2 (полиэфирная нить 35%, хлопковискозная пряжа 65%)	200	411	7,5	7,8
2.Полотно нетканое холстопршивное безниточное (вискозное волокно 100%)	150	1510	7,1	7,5
3.Полотно нетканое (вискозное волокно 100%)	90	1248	7,0	7,3

Ферментативную активность определяли, используя в качестве субстрата казеин по Гаммерстену в 1/15М фосфатном буфере рН 8,0 (метод Кунитца), а также методом Ансона, используя в качестве субстрата гемоглобин бычьей крови [2]. Отметим, что определение ПА фермента в присутствии металлов классическим методом с использованием в качестве субстрата казеина по Гаммерстену вызвало затруднения в связи с тем, что, по всей видимости, нитрат серебра вступал в реакцию с казеинатом натрия, что сопровождалось образованием

казеината серебра и выпадением его в осадок. Было решено использовать другую методику определения ПА, а именно метод Ансона, в котором в качестве субстрата используют гемоглобин. Применение данной методики позволило получить корректные результаты и определить ПА иммобилизованного папаина в присутствии серебра (около 4,0 ПЕ/г).

Эффективную вязкость геля определяли до и после стерилизации с использованием ротационного вискозиметра "Brookfield RVDV-II+Pro".

Изучение антимикробной активности проводилось на референтных штаммах *St. aureus* и *E. Coli* с применением стандартной методики подсчета КОЕ. Для культивирования *St. aureus* и *E. coli* использовали 5%-ный кровяной колумбийский агар, контролем служила исходная тест-культура. Так же использовалась тест-система Rida Count. Образцы гелей на тест-подложках помещали в портативный инкубатор Cultura при 35°C, инкубировали в течение 24 ч, затем фиксировали рост микроорганизмов или его отсутствие.

При изготовлении аппликации композиция наносилась на материал с одной стороны методом печати с определенным количеством проходов ракля через плоский шаблон с ячейкой 20 меш и последующей принудительной сушкой. Стерилизацию изделий проводили радиационным способом. Доза гамма-облучения для салфеток составляет 15 кГр, для гелей 6 кГр.

Результаты и обсуждение

Эксперимент по изучению в течение 7 дней падения ПА папаина, иммобилизованного в 7%-ном альгинатном геле, показал, что такой подход позволяет сократить падение активности фермента, которое в первый день составило 9% и 14% во второй день. В водной среде происходит падение в первый день – на 50%, во второй день на 70% от исходной ПА, достигая снижения на 88...90% в третий день. Использование АН в композиции имело еще одну цель, а именно перевод серебра в форме катиона в нано-форму, что происходит под действием этого полисахарида как восстановителя в щелочной среде. Присутствие наносеребра должно увеличить антисептические свойства композиции при меньшей концентрации $AgNO_3$ и соответственно меньшей токсичности [7], [8]. Однако опасность снижения ПА фермента в присутствии соли серебра (как и других металлов) требовала предусмотреть при построении технологического процесса защиту фермента.

После стерилизации ПА папаина, иммобилизованного в альгинатном геле, падает на 80%. Помимо того, что облучение инактивирует фермент, отмечается также его негативное влияние на структуру АН,

то есть резкое падение вязкости композиции. Учитывая это, было принято решение об использовании в разрабатываемой композиции второго полимера. Для иммобилизации фермента использовалась гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ), широко применяемая в медицине. Предположительно, являясь интактным полимером, ГПМЦ способствует уменьшению подвижности фермента, находящегося в низковязком геле в постоянном хаотичном движении. Экспериментально доказано, что добавление ГПМЦ в композицию повышает ПА папаина до стерилизации в 1,6 раз при его 1%-ном добавлении к альгинату и в 1,9 раз – при 2%-ном добавке, то есть ГПМЦ выполняет функцию стабилизатора ПА.

Другая причина использования ГПМЦ – необходимость поддержания нужных вязкостных свойств композиции. Исходя из того, что нежелательными последствиями гамма-стерилизации является инактивация фермента и резкое падение вязкости композиции за счет радиочувствительности полисахаридов по отношению к продуктам радиолитической воды, можно ожидать, что начальное повышение вязкости гидрогелей и снижение количества воды в системе будут способствовать повышению устойчивости фермента и композиции в целом. Экспериментально установлено, что введение ГПМЦ в альгинатный гель помогает стабилизировать реологические параметры. После гамма-стерилизации наблюдается увеличение вязкости в среднем в 20 раз. Однако при большом содержании ГПМЦ можно ожидать потери полезных свойств, обеспечиваемых АН, например, гемостатической активности изделий.

Для выбора оптимального соотношения полимеров был проведен анализ вязкости композиций до и после радиационной стерилизации и определение гемостатических свойств изделий. Готовили матричные растворы АН и ГПМЦ, которые в дальнейшем соединяли в единую композицию. Наилучшим признано соотношение АН 6% и ГПМЦ 2%, что обусловлено оптимальной вязкостью до стерилизации и ее меньшим падением после стерилизации. При этом ПА папаина в композиции, содержащей

АН, ГПМЦ и AgNO_3 в течение первых суток эксперимента снижается лишь на 7%. Гемостатические свойства (время остановки капиллярно-паренхиматозного кровотечения) сохраняются.

При разработке технологии получения гидрогеля было решено пойти по пути раздельного приготовления композиции из фермента и антимикробного препарата на первом этапе и иммобилизации их в структуре разных полимерных носителей с целью защиты от взаимодействия и сохранения их основных полезных свойств. Разделение протеолитического фермента и соли серебра, их "изоляция" друг от друга с помощью разных полимеров позволит обеспечить защиту фермента и сохранение его ПА, а также создаст условия для перехода серебра из формы катиона (диссоциация соли) в наноформу и усилит антимикробный эффект при меньшей концентрации и токсичности используемой соли.

Технологическая схема выглядит следующим образом: отдельно готовилась гидрогелевая композиция на основе полисахарида АН (6%), которая подвергалась набуханию и структурированию в течение 18 ч, а также 0,05%-ный раствор нитрата серебра в среде карбоната натрия, который добавляли в гидрогель; одновременно готовилась вторая композиция на основе ГПМЦ 2%, в которую после ее набухания и структурирования вводился папаин (4%), далее композиция перемешивалась, время экспозиции фермента в геле составляло не более 1 ч; затем обе композиции смешивали. Внешних признаков нежелательного взаимодействия (образования осадка, выделения газа) при совместном присутствии компонентов в геле обнаружено не было. Далее добавляли глицерин для придания гелю эластичности и атравматичности при использовании и консервант для обеспечения срока годности, после чего подвергали гамма-стерилизации в дозе 6 кГр.

Рассматривалась возможность получения двух лечебных форм: гидрогелевой композиции и салфетки с нанесенной композицией, апплицируемой на рану. Во втором случае нестерильная гидрогелевая композиция наносилась через сетчатый шаблон

на текстильный материал и после сушки подвергалась операции гамма-стерилизации.

Предварительно были проведены эксперименты по выбору текстильного материала, применяемого для салфеток. К текстильному материалу для применения в медицине в рассматриваемой форме, то есть в виде аппликации, предъявляется ряд требований, таких как гипоаллергенность, воздухопроницаемость, высокая атравматичность, устойчивость к стерилизации. Поскольку данное изделие должно обеспечивать длительное поступление биологически активных веществ из салфетки в рану, а гнойного отделяемого – из раны, одним из определяющих параметров полотна является внутренний объем и влагоемкость, а также показатель рН водной вытяжки полотна и наносимой композиции.

Вязкость композиции для печати обеспечивается АН, что позволяет не вводить второй полимер (ГПМЦ), однако необходимым условием является нанесение композиции непосредственно после ее изготовления, или не более чем через 1...1,5 ч, чтобы избежать снижения ПА фермента в водной среде за счет взаимодействия с серебром. Количество композиции и активных веществ зависит от числа проходов ракли.

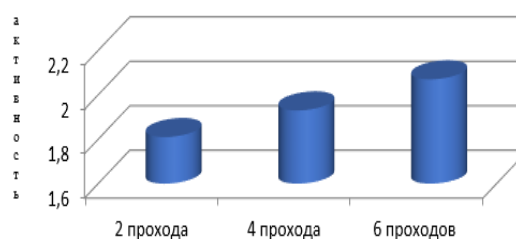


Рис. 1

На рис. 1 показана зависимость ПА иммобилизованного в альгинатном геле папаина от количества проходов ракли при печати салфетки, ПЕ/г.

Увеличение числа проходов ракли повышает концентрацию папаина и соответственно ПА салфетки. Однако при кратном увеличении числа проходов увеличение ПА папаина на см^2 поверхности становится незначительным, и поэтому было принято ре-

шение использовать четыре прохода ракли. Сушка материала после печати проводилась двумя способами: при комнатной температуре и при 70°C с обдувом горячим воздухом. Это сокращало время полного высыхания материала и способствовало снижению инактивации фермента (до 40%). Разработанная технологическая схема получения лечебных гидрогелей и салфеток представлена на рис. 2.

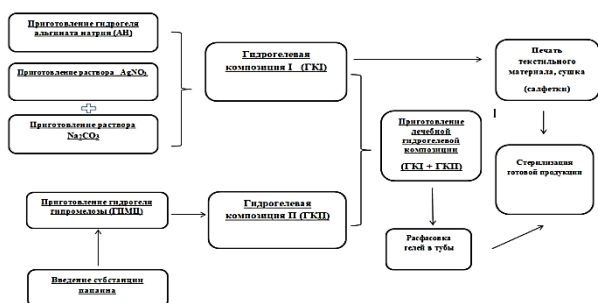


Рис. 2

Анализ антимикробных свойств разрабатываемых материалов подтвердил активность введенной соли $AgNO_3$ в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* и *E.Coli*.

Экспериментальные токсикологические исследования гидрогелевого материала на основе АН и ГПКМЦ и салфетки, содержащей гидрогелевый материал, предназначенных для лечения ран на I-II стадии раневого процесса, показали, что материалы по токсикологическим характеристикам относятся к IV классу малотоксичных химических веществ; их сенсибилизирующего, местно-раздражающего действия и цитотоксического действия не выявлено.

ВЫВОДЫ

Разработан технологический режим получения гидрогелевой композиции и текстильных салфеток на ее основе, обеспечивающий одновременно сохранение двух видов специфической активности действующих компонентов композиции, а именно протеолитической благодаря присутствию папаина и антимикробной ввиду присутствия соли серебра, что необходимо на начальных стадиях лечения ран в хирургии. Выбранные методы контроля позволили

подтвердить эффективность и безопасность действия материалов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ивануса С.Я., Зубарев П.Н., Рисман Б.В., Литвинов О.А. Современные принципы лечения гнойных ран. – 2017. С.235...236.
2. Белов А.А., Ванюшенкова А.А., Досадина Э.Э., Ханафина А.А. Новые текстильные перевязочные материалы на основе биodeградируемых полимеров, содержащих протеиназы, для лечения ран и ожогов // Раны и раневая инфекция. – 2018, №1. С.17.
3. Пенджиев А.М., Абдуллаев А. Фармакологические особенности сока дынного дерева // Научное обозрение. Медицинские науки. – 2017, № 1. С.36...56.
4. Игнатов И.И., Мосин О.В. Методы получения мелкодисперсных наночастиц коллоидного серебра // Интернет-журнал "Науковедение", вып. 3. – 2014. С. 16.
5. Хлыстова Т.С. Технология получения лечебных депо-материалов на текстильной и гидрогелевой основе с использованием печатных композиций из смеси биополимеров-полисахаридов: Дис.... канд. техн.наук. – М., 2015. С. 177...178.
6. Олтаржевская Н.Д., Кричевский Г.Е., Коровина М.А., Гусев И.В. Биополимеры в медицине. Лечебные депо-материалы на основе альгината натрия // Биофармацевтический журнал. – 2017. С.112.
7. Кричевский Г.Е. Зеленые и природоподобные технологии – основа устойчивого развития цивилизации. – М., 2020.
8. Darroudi M., Ahmad M.B., Zamiri R. et al. Time-dependent effect in green synthesis of silver nanoparticles // International Journal of Nanomedicine. – V. 6, 2011. P. 677...681.
9. 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.

REFERENCES

1. Ivanusa S.Ya., Zubarev P.N., Risman B.V., Litvinov O.A. Sovremennye printsiipy lecheniya gnoynukh ran. – 2017. S.235...236.
2. Belov A.A., Vanyushenkova A.A., Dosadina E.E., Khanafina A.A. Novye tekstil'nye perevyazochnye materialy na osnove biodegradiruemykh polimerov, soderzhashchikh proteinazy, dlya lecheniya ran i ozhogov // Rany i ranevaya infektsiya. – 2018, №1. S.17.
3. Pendzhiev A.M., Abdullaev A. Farmakologicheskie osobennosti soka dynnogo dereva // Nauchnoe obozrenie. Meditsinskie nauki. – 2017, № 1. S.36...56.

4. Ignatov I.I, Mosin O.V. Metody polucheniya melkodispersnykh nanochastits kolloidnogo serebra //Internet-zhurnal "Naukovedenie", vyp. 3. –2014. S.16.

5. Khlystova T.S. Tekhnologiya polucheniya lechebnykh depo-materialov na tekstil'noy i gidrogelevoy osnove s ispol'zovaniem pechatnykh kompozitsiy iz smesi biopolimerov-polisakharidov: Dis.... kand. tekhn.nauk. – M., 2015. S. 177...178.

6. Oltarzhevskaya N.D., Krichevskiy G.E., Korovina M.A., Gusev I.V. Biopolimery v meditsine. Lechebnye depomaterialy na osnove al'ginata natriya // Biofarmatsevticheskiy zhurnal. – 2017. S.112.

7. Krichevskiy G.E. Zelenye i prirodopodobnye tekhnologii – osnova ustoychivogo razvitiya tsivilizatsii. – M., 2020.

8. Darroudi M., Ahmad M.B., Zamiri R. et al. Time-dependent effect in green synthesis of silver nano-particles // International Journal of Nanomedicine. – V. 6, 2011. P. 677...681.

9. Andreev A.A., Glukhov A.A., Ostroushko A.P., Karapit'yan A.R., Chuyan A.O. Vliyanie kislotnosti na dinamiku reparativnykh protsessov v myagkikh tkanyakh // Vestnik eksperimental'noy i klinicheskoy khirurgii. – 2017, №1. S.64...71.

Рекомендована заседанием НТС ООО "НПО Текстильпрогресс". Поступила 27.09.21.
