## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

# МЕТОДИКА УСКОРЕННОГО ПРОГНОЗИРОВАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ ГИДРОГЕЛЕЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ

***Т.С. Быркина[1]*, К.П. Ловецкий[2], Н.Д. Олтаржевская[1]***

[1]ООО “Колетекс”, 115093, Москва, ул. Павловская 21, пом. 4-6; *эл. почта : koletex@list.ru
[2]Российский университет дружбы народов, 115419 Москва, ул. Орджоникидзе 3

Разработана ускоренная методика определения гарантийного срока годности биополимерных материалов медицинского назначения на гидрогелевой основе. Описаны технологические стадии производства гидрогелевых лечебных материалов на основе полисахарида альгината натрия марки “Колегель”, на которых возможно ухудшение свойств материала, приводящее к сокращению срока годности продукции (использование сырья природного происхождения, радиационная стерилизация), а также приведены способы уменьшения этого отрицательного влияния и увеличения впоследствии гарантийного срока медицинского изделия с помощью введения в его состав стабилизирующих добавок. Рассмотрен способ определения срока годности гидрогелевого материала из альгината натрия в зависимости от введения стабилизирующих добавок (сорбата калия и консерванта на основе 2-феноксиэтанола) в режиме “ускоренного старения”, основанный на математическом описании двух параллельных процессов, протекающих в гидрогелях, хранящихся при повышенной температуре, а именно: изменения микробной обсемененности гидрогелей до стадии финишной стерилизации (с помощью модели Бараньи-Робертса) и изменения динамической вязкости после заключительной радиационной стерилизации гидрогелей (с помощью модели на основе уравнения Аррениуса).

**Ключевые слова:** гидрогелевые материалы; медицинские изделия; альгинат натрия; ускоренное старение; срок годности

**DOI:** 10.18097/BMCRM00081

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в фармацевтической индустрии интенсивно используются биополимерные материалы. Основная доля биополимеров для создания этих материалов приходится на полисахариды, в том числе и наиболее применяемые из них – альгинаты, соли гиалуроновой кислоты, хитозана и др. [1]. Полисахариды в силу своего природного происхождения обладают уникальной биосовместимостью с организмом человека, что является одним из требований, предъявляемых к полимерам, использующимся в качестве сырья для создания материалов медицинского назначения. Немаловажно то, что они обладают и собственной биологической активностью [2].

В качестве примера данных материалов можно привести гемостатики на основе альгината натрия (SA) [3], часто применяемые в условиях “скорой помощи”, раневые покрытия на основе хитозана [4-6], материалы на основе гиалуроновой кислоты, предназначенные для введения в полости организма в урологии, гинекологии [7]. Все они относятся к медицинским изделиям (МИ) с классом потенциального риска 2а, 2б, то есть как контактирующие непосредственно с раневой поверхностью и слизистыми оболочками организма человека, а это означает, что данные материалы должны обязательно выпускаться стерильными (в соответствии с ГОСТ ISO 11137-1-2011).

Однако, несмотря на перечисленные преимущества полисахаридов, стоит отметить ряд проблем, возникающих при производстве материалов на их основе, связанных с исходной микробной обсемененностью этого природного сырья [8]. Используемые для производства полисахариды, как и любое сырье природного происхождения, сложно стандартизировать по показателю “Микробная обсеменённость”, и данный показатель может значительно различаться от партии к партии. Следует учитывать срок хранения сырья, время от закупки до момента использования. В некоторых случаях общая микробная обсеменённость (общее микробное число – ОМЧ) полупродукта, то есть бионагрузка МИ до финишной стерилизации, может влиять на достижение необходимого уровня стерильности ($10^{-6}$) выпускаемых МИ после их финишной стерилизации и, как следствие этого, на гарантируемый срок годности [9].

Одним из основных способов, используемых для финишной стерилизации МИ, является радиационная стерилизация, осуществляемая на установках, в которых источником излучения служат либо радионуклиды $^{60}$Co (в соответствии с ГОСТ ISO 11137-2-2011), либо ускоренные электроны [10]. Данный вид стерилизации относительно дешёв и удобен, однако для материалов на основе полисахаридов такая технологическая стадия является критической, поскольку в процессе радиолиза, протекающего в течение стерилизации, разрушается структура полисахарида, и ухудшаются реологические характеристики изделия [11]. Особенно нужно отметить такой показатель качества гидрогелевых материалов как вязкость, от которого зависит эффективность МИ. Изменения данного параметра в течение срока хранения после МИ стерилизации нужно обязательно отслеживать.

Производителю МИ требуется строить технологический процесс с учётом вышеперечисленных особенностей, и ключевым моментом является контроль исходной микробной обсеменённости сырья и полупродукта, то есть МИ до финишной стерилизации, а также ингибирование различными способами развития микроорганизмов в полупродукте. В свою очередь при более низкой бионагрузке доза стерилизации МИ может быть пониженной (например, до 6 кГр), что позволит избежать падения вязкости полисахаридного гидрогеля и снижения эффективности его применения в целом. Учитывая данные параметры, производитель сможет гарантировать наибольший срок годности МИ (2-3 года), в течение которого сохраняется стерильность и вязкость материала.

Для определения гарантийного срока годности МИ исследования проводятся, как правило, в реальном времени, при этом образцы закладываются на хранение в тех условиях, которые предполагаются в дальнейшем для использования, и на протяжении всего этого периода контролируются показатели качества для данной продукции в соответствии с нормативными документами. Необходимо отметить, что такие долгосрочные исследования являются обязательным этапом при регистрации медицинского изделия или

© 2018 Коллектив авторов. Лицензиат ИБМХ, Москва. Статья открытого доступа, распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY-SA 4.0) (http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

лекарственного препарата. Существует также метод “ускоренного старения”, предполагающий хранение продукции при повышенной температуре по сравнению с реальными условиями, что позволяет значительно сократить время определения срока годности, но данный подход нельзя использовать для термолабильных материалов (биологически активные вещества, природные полимеры).

Сказанное выше привело нас к необходимости разработки методов прогнозирования и вычисления срока годности гидрогеля медицинского назначения на основе полисахаридов, в частности альгината натрия (SA).

Был разработан способ прогнозирования срока годности лечебного материала на основе SA, в основе которого лежит фармакопейная методика “ускоренного старения” (ОФС.1.1.0009.15 Сроки годности лекарственных средств). Преимуществом такого подхода являлось понижение температуры экспериментального хранения (до 25°C), что не вызывает деструкции альгинатного гидрогеля. Кроме того, при данной температуре в течение эксперимента можно достоверно определять микробиологические показатели качества (ОМЧ и стерильность). Такая методика позволяет сократить время оценки влияния различных компонентов гидрогеля (например, консервантов, лекарственных субстанций) на достижение его срока годности, а также оценить целесообразность изменений в технологии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись гидрогелевые композиции на основе SA с диоксидином и лидокаином “Колетекс-АДЛ”® с консервирующими добавками и без. В качестве консервантов использовали сорбат калия (PS) в концентрации 0.25% (массовая доля) и консервант на основе 2-феноксиэтанола Euxyl PE 9010 (PE) в концентрации 0,10%. Предварительное рассчитанное в соответствии со временем эксперимента количество стерильных и нестерильных образцов гидрогелей закладывали на хранение в климатическую камеру СМ-30/100-80ВХ.

Для исследуемых гидрогелей температура хранения ($t_{st}$) в соответствии с технической документацией должна быть не выше (4±1)°C. Температура проведения эксперимента ($t_{exp}$) в рамках методики ускоренного старения составила (25±1)°C, следовательно, время эксперимента, высчитываемое в соответствии с таблицей 1 (ОФС.1.1.0009.15) [12], составило 116 суток, что соответствует разнице между температурой хранения в экспериментальных условиях и в реальных условиях, а именно 20°C (срок экспериментального хранения $T_{exp}$ рассчитывали исходя из реального срока хранения $T$ и коэффициента соответствия $K=A(t_{exp}-t_{st})/10$, где A – температурный коэффициент, равный 2.5, по формуле: $T = T_{exp}\cdot K$ [12]).

**Таблица 1.** Сроки экспериментального хранения в зависимости от температуры

| Shelf life | ($t_{exp}$– $t_{st}$), °C | Time of experimental storage, days |
|---|---|---|
| 2 years | 10 | 292 |
| | 15 | 182 |
| | 20 | 116 |
| | 25 | 74 |
| | 30 | 47 |
| | 35 | 30 |

В течение этого срока, что в реальном времени соответствует 2 годам, нами проверялась стерильность гидрогелей, прошедших финишную стерилизацию, а также их вязкость. В образцах же нестерильных гидрогелей на начальном этапе для определения эффективности действия консервантов определялось ОМЧ (по кривым роста микроорганизмов).

По мере поступления экспериментальных данных фиксировался момент изменения нормируемых показателей (ОМЧ до стерилизации и вязкость после стерилизации) для каждого гидрогеля, чтобы с помощью математической модели экстраполировать время изменения характеристик гидрогелей на срок хранения в реальных условиях.

Математическое моделирование процесса роста жизнеспособных микроорганизмов в рассматриваемых нестерильных гидрогелях приведено в Дополнительных материалах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Обработав экспериментальные данные с помощью скорректированной модели Бараньи-Робертса (см. Дополнительные материалы) в программе ShelfLife, для нестерильных образцов гидрогелевых композиций на основе SA (7.00%), на основе SA (7.00%) и PE (1.00%), на основе SA (7.00%) и PS (0.25%) получили кривые роста микроорганизмов, на которых стационарный участок максимально приближен к экспериментальным данным (рис. 1 a,b).

По итогам сравнения кривых роста микроорганизмов (рис. 2) можно отметить, что в приведенных нестерильных образцах гидрогелей в течение двух недель хранения при температуре 25°C темп роста микроорганизмов не переходит из индукционной фазы в экспоненциальную. Этот процесс медленнее всего происходит в гидрогеле с добавлением 1.00% PE. Это подтверждается также скоростью роста микроорганизмов в анализируемых

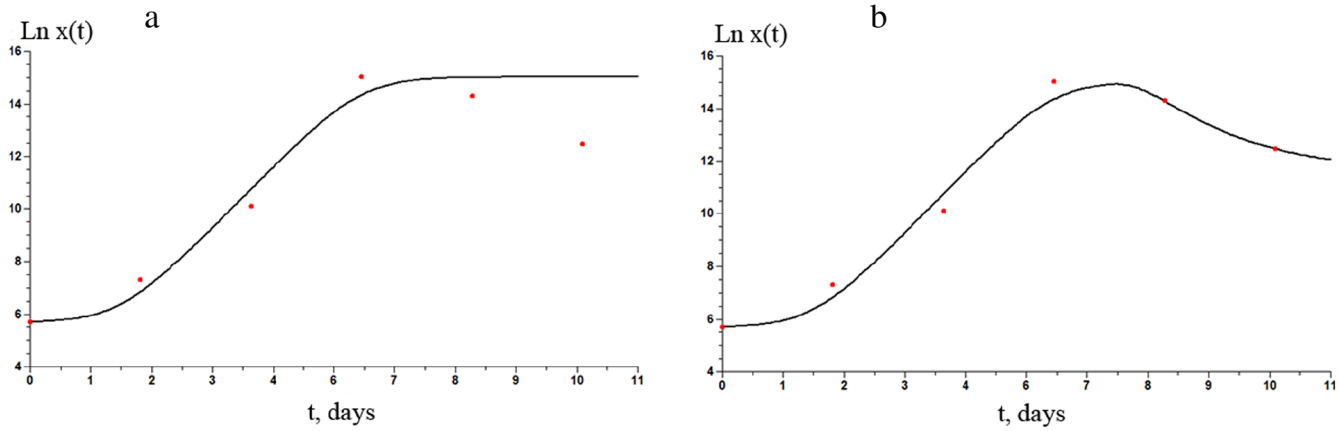


**Рисунок 1.** Кривые роста микроорганизмов в образце гидрогеля на основе SA 7.00%, полученные по традиционной модели Бараньи-Робертса (а) и по скорректированной модели Бараньи-Робертса (б).

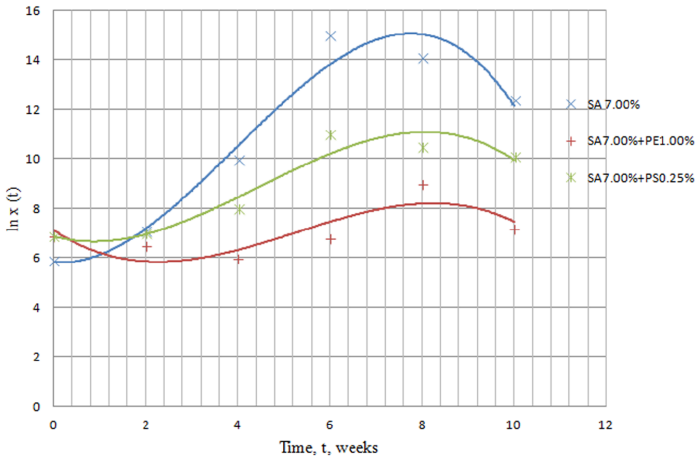


**Рисунок 2.** Кривые роста микроорганизмов в гидрогелях в процессе их хранения при 25°C

образцах, которая характеризуется тангенсом угла наклона касательных к кривым роста. Для кривой роста микроорганизмов в образце с PE тангенс угла наклона касательной равен 0.49 – самое низкое значение, для кривой роста микроорганизмов в образце с PS он равен 0.91 – среднее значение, а для кривой роста микроорганизмов в контрольном образце гидрогелевой композиции на основе SA без добавления стабилизаторов тангенс угла наклона касательной – 1.83, то есть самое высокое значение.

Также нами были построены зависимости изменения вязкости стерильных гидрогелей с добавлением 0.25% PS и 1.00% PE от экспериментального времени хранения. С помощью моделирования в программе ShelfLife спрогнозировали вязкость композиции во время хранения в течение 174 суток (рис. 3, 4), что составляет 3 года хранения в реальном времени (в соответствии со способом расчёта, приведенным в ОФС.1.1.0009.15). Вязкость гидрогеля с добавлением PS после стерилизации не опускается ниже 1.5 Па·с в течение 174 суток (рис. 3), а вязкость гидрогеля с добавлением PE после стерилизации также не опускается ниже 15 Па·с (рис. 4) в течение 174 суток, что соответствует 3 годам хранения в реальном времени. Это позволило нам предположить, что для низковязких (1.5-3.0 Па·с) лечебных гидрогелей целесообразней использовать в качестве стабилизирующей добавки PS в концентрации 0.25%, а для высоковязких (6.0-15.0 Па·с) – PE в концентрации 1.00%, что позволит обеспечить срок годности таких гидрогелей 3 года.

Параллельно с мониторингом вязкости гидрогелевых композиций с PS и PE, а также контрольного образца гидрогелевой композиции без добавок в процессе ускоренного старения проводился мониторинг их стерильности, поскольку наряду с вязкостью именно этим показателем лимитируется срок годности получаемой продукции.

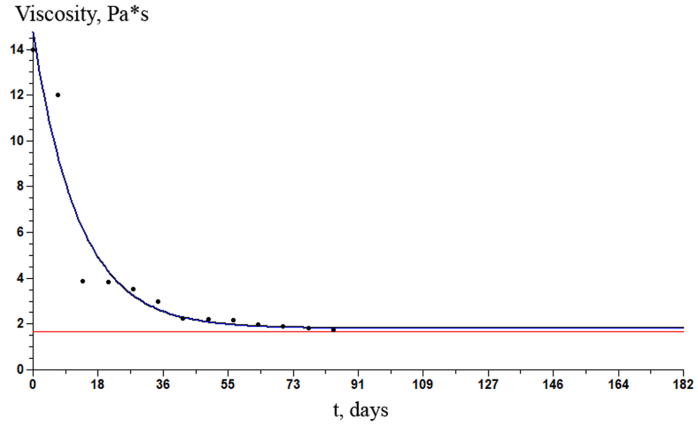


**Рисунок 3.** Изменение вязкости во времени стерильного гидрогеля с PS.

## ОБСУЖДЕНИЕ

По итогам проверки стерильности образцов гидрогелей с PE и PS, а также контрольного образца (гидрогель без добавок) установлено, что на 116 сутки хранения гидрогелей с дополнительными добавками при 25°C они выдерживают требования по данному показателю. При пересчёте на срок хранения в реальном времени (табл. 1) (то есть при (4±1)°C) это составляет 2 года, в то время как композиция на основе SA отвечала требованию стерильности только в течение 98 суток наблюдения.

Несмотря на то, что с помощью стабилизаторов PE и PS подтверждена возможность сохранения вязкости альгинатной гидрогелевой композиции в течение 3 лет, срок её годности может быть продлён до 2 лет, поскольку стерильность гидрогелей стабилизируется данными консервантами только в течение этого периода.

Разработанная модель ускоренного старения, прогнозирующая поведение МИ на основе гидрогелей полисахаридов, подтвердила целесообразность введения консервантов (PE, PS), эффективно подавляющих рост микроорганизмов до момента радиационной стерилизации, и позволила на основании результатов проверки стерильности и вязкости гидрогелей в течение экспериментального хранения определить срок годности гидрогелей, содержащих биополимер SA, в 2 года.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

К данной статье приложены дополнительные материалы, свободно доступные в электронной версии (http://dx.doi.org/10.18097/BMCRM00081) на сайте журнала.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Vroman, I., & Tighzert, L. (2009) Biodegradable polymers. Materials, 2, 307-344. DOI: 10.3390/ma2020307.

2. Boiko, A.V., Korytova, L.I., & Oltarzhevskaya, N.D. (2013) The directed delivery of medicines at treatment of oncological patients. M.: MK.

3. Kildeeva, N.R., Vikhoreva, G.A., Galbraykh, L.S., Mironov, A.V., Bonartseva, G.A., Perminov, P.A., & Romashova, A.N. (2006) Receiving the biodegraded porous films for use as wound coverings. Applied Biochemistry and Microbiology, 42(6), 716-720. DOI: 10.1134/S0003683806060160

4. Kildeeva, N.R., Babak, V.G., Vikhoreva, G.A., Ageev, E.P., Golub, M.A., Galbraykh, L.S., & Merkovich, E.A. (2000) New approach to creation of materials with controlled release of medicinal substance. Bulletin of the Moscow University, 41(6), 423-425.

5. Novikova, S.P., Bokeria, L.A., Bokeria, O.L., Salokhedinova, R.R., Nikolashina, L.N., Towns, A.Yu.... & Sivtsev, V.S. (2015) The polymeric biodegraded film compositions and products on their basis

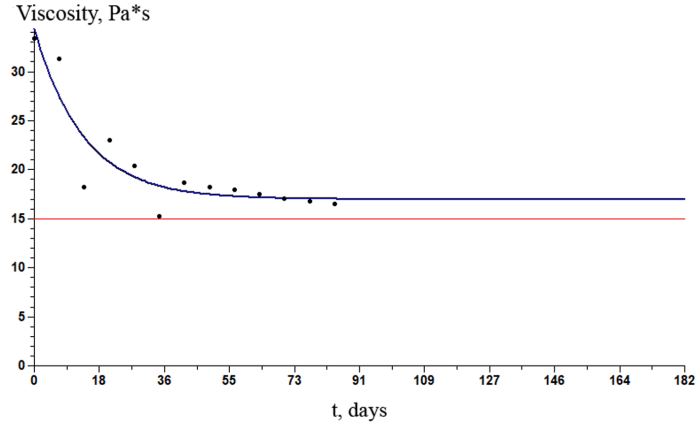


**Рисунок 4.** Изменение вязкости во времени стерильного гидрогеля с PE.

for cardiovascular surgery. The bulletin NTsSSH of Bakulev's AN of the Russian Academy of Medical Science Cardiovascular Diseases, 16(S3), 182-182.

6. Sevostyanov, M.A., Nasakina, E.O., Baikin, A.S., Leonov, A.V., Sergienko, K.V., Kaplan, M.A.... & Kolmakov, A.G. (2016) Release kinetics in water solutions of an antibiotic of lincomycin from the biodegraded biopolymer membranes of medical application on the basis of chitosan of high density. Achievements of Modern Natural Sciences, (12-2), 286-291.

7. Shulanova, Zh.Zh. (2016) The prospects of applying hyaluronic acid biopolymer matrices in surgery. Medical Bulletin of Bashkortostan, 11(61), 135-138.

8. Byrkina, T.S., Oltarzhevskaya, N.D., & Kolayeva, A.V. (2016) Ways of stabilization of microbiological and rheological indicators of medical depots materials "Kolegel". Vestnik of St. Petersburg State University of Technology and Design. Series 1. Natural and Technical Science, (3), 44-49.

9. Kalashnikov, V.V., Naumova, L.A., Rabinkova, E.V., & Shishkova, O.V. (2012) Sterility of the products of medical appointment which underwent radiation in A.I. Burnazyan's FMBTs in 2007-2009. Medical Radiology and Radiation Safety, 57(5), 66-71.

10. Dai, Z., Ronholm, J., Tian, Y., Sethi, B., & Cao, X. (2016) Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. Journal of Tissue Engineering, 7, 2041731416648810. DOI: 10.1177/2041731416648810

11. Fedorova, A.V., Satalina, A.V., Fenin, A.A., Antropova, I.G., Oltarzhevskaya, N.D., Valuyeva, M.I., & Kolayeva, A.V. (2014) Destruction of medicinal substances at radiation sterilization. Butlerovsky Messages, 38(4), 134-139.

12. Sakayeva, I.V., Bunyatyan, N.D., Kovalyova, E.L., Sakanyan, E.I., Mitkina, L.I., Prokopov, I.A.... & Mitkina, Yu.V. (2013) Main approaches to studying of stability of medicines: domestic and international experience. Sheets of Scientific Center of Examination of Means of Medical Application, (3).

Поступила: 01. 10. 2018.
Принята к публикации: 30. 10. 2018.

## METHODS OF ACCELERATED PREDICTION OF THE SHELF LIFE OF MEDICAL POLYSACCHARIDE-BASED HYDROGELS

***T.S. Byrkina[1]*, K.P. Loveckij[2], N.D. Oltarzhevskaya[1]***

[1]LLC "Coletex", 4-6 non-residential premises, 21 Pavlovskaya str., Moscow, 115093 Russia; *e-mail: koletex@list.ru
[2]Peoples' Friendship University of Russia, 3 Ordzhonikidze str., Moscow, 115419 Russia

The paper describes an accelerated technique for determining the warranty period for the hydrogel-based polymer materials used for medical purposes. It deals with the technological production stages of hydrogel therapeutic materials "Kolegel" based on a polysaccharide of sodium alginate. On these stages deterioration of the material properties might lead to reduction of the shelf life of products (using natural raw materials, sterilization). The article introduces the ways to reduce this negative effect and subsequently increase the warranty period of the medical product by adding stabilizing additives into its composition. The method for determining the shelf life of sodium alginate hydrogel material depends on the added stabilizing additives (potassium sorbate and preservative based on 2-phenoxyethanol) in the "accelerated aging" mode; based on a mathematical description of two parallel processes occurring in hydrogels which are stored at elevated temperatures, namely: a change in the microbial contamination of hydrogels to the stage of final sterilization (using the Barany-Roberts model), a change in the dynamic viscosity after the conclusion of radiation sterilization of hydrogels (using a model based on the Arrhenius equation).

**Key words:** hydrogel materials; medical products; sodium alginate; accelerated aging; shelf life

**SUPPLEMENTARY**

Supplementary materials are available at http://dx.doi.org/10.18097/BMCRM00081.