

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра полимеров на базе ООО «АКРИПОЛ»

**Термочувствительные хитозансодержащие гидрогели: формирование,
свойства, биологическая активность**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 412 группы

направления

04.03.01 «Химия»

Института химии

Харламова Виталия Николаевича

Научный руководитель,
зав. кафедрой, д.х.н.,
профессор

А.Б. Шиповская

Саратов 2022

Введение

Актуальность работы. В настоящее время активно ведется поиск новых фармацевтических гидрогелевых форм для доставки лекарств в труднодоступные места. Решением этой проблемы могут служить “умные” полимерные гидрогели, претерпевающие фазовый переход жидкость—гидрогель в зависимости от температуры, pH или ионной силы среды [1].

Наиболее перспективными являются системы, которые находятся в состоянии золя при комнатной температуре и подвергаются гелеобразованию с образованием вязкоупругой композиции при температуре живого организма. Такие термочувствительные гидрогели относятся к классу стимулирующих чувствительных гидрогелей и обладают уникальными преимуществами, включая способность введения лекарственного средства в труднодоступное место локализации, местную доставку и снижение дозы вводимого лекарственного средства, а также высокую адгезию к слизистым поверхностям [2, 3].

Перспективными полимерами для получения таких гидрогелей рассматриваются природные полисахариды, в частности хитозан, ввиду своей хорошей биологической и фармакологической активности [4]. Поскольку данный полисахарид не проявляет гелеобразования без сшивающих агентов, в настоящей работе для получения термочувствительных хитозансодержащих гидрогелей использован синтетический триблок сополимер полиэтиленоксида и пропиленоксида Pluronic F-127 [5].

Цель данной работы - разработка термочувствительных гидрогелей на основе гидрохлорида хитозана и Pluronic F-127 и изучение их свойств.

Задачи:

1. Исследование реологических свойств и реокинетики гелеобразования системы хитозан + Pluronic F-127 методом ротационной вискозиметрии в широком диапазоне составов компонентов и температур.
2. Определение оптимальных составов гелеобразующей

композиции на основе хитозана и Pluronic F-127 для получения термочувствительных гидрогелей.

3. Изучение мукоадгезивных свойств наиболее оптимальных составов термочувствительной композиции;

4. Оценка цитотоксичности и антимикробного действия гидрогелей в эксперименте *in vitro* на клеточных культурах и микроорганизмах.

5. Исследование фармакотерапевтического действия гидрогелей в эксперименте *in vivo* на животных моделях.

Исходными **реагентами** служили порошкообразный промышленный образец гидрохлорида хитозана (ХТЗ·HCl) с молекулярной массой 70 кДа, степенью деацетилирования 88.5 мольн.% (ЗАО “Биопрогресс”, РФ); триблоксополимер полипропиленоксида и полиэтиленоксида Pluronic F-127 (Pl F-127) с молекулярной массой 12.6 кДа (Sigma-Aldrich, США) и дистиллированная вода. Для анализа мукоадгезии использовали 98% водный раствор муцина (фильтрат слизистого секрета улитки *HelixAspersaSnail* (Испания)).

Объектами исследования являлись смеси водных растворов гидрохлорида хитозана и Pluronic F-127, а также полученные на их основе термочувствительные гидрогели.

Гидрогели готовили смешением исходных водных растворов в объемном соотношении 10:90–50:50. Для выражения компонентного состава смесевой композиции использовали отношение концентраций ХТЗ·HCl к Pl F-127, выраженное как $C_{\text{ХТЗ} \cdot \text{HCl}} / C_{\text{Pl F-127}}$.

Структура и объем работы. Выпускная квалификационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка используемых источников, включающего 117 наименований. Работа изложена на 62 листах машинописного текста, содержит 25 рисунков, 5 таблиц.

Основное содержание работы

1 Разработка составов гелеобразующей композиции на основе хитозана и Pluronic F-127

Изучены вязкостные свойства гелеобразующей композиции. При 4°C для всех исследуемых систем кривые течения проявляют линейный характер, который характерен для ньютоновских жидкостей. Это свидетельствует о том, что при данной температуре все композиции находятся в жидком агрегатном состоянии. С повышением температуры до 25°C система 5% ХТЗ·НСl : 15% Pl F-127 до соотношения компонентов 40:60 описывается классическими для растворов полимеров зависимостями $\lg \eta = f(\lg \tau)$ с областями наибольшей ньютоновской и структурной вязкости, при соотношении 50:50 – система ведет себя как дилатантная жидкость, а вязкость понижается. Система 8% ХТЗ·НСl : 20% Pl F-127 при той же температуре до соотношения компонентов 50:50 ведет себя как ньютоновская жидкость, а при соотношении 50:50 зависимость $\lg \eta = f(\lg \tau)$ становится типичной для растворов полимеров. При 37°C композиция 5% ХТЗ·НСl : 15% Pl F-127 при всех объемных соотношениях описывается кривыми течения ньютоновской жидкости, при этом вязкость по сравнению с аналогичными зависимостями $\lg \eta = f(\lg \tau)$ при 25°C понижается. Для 8% ХТЗ·НСl : 20% Pl F-127 характер течения иной. Для всех соотношений реализуются кривые течения структурированных композиций с пределом текучести. Наибольшее значение вязкости наблюдается для соотношения 30:70 [6].

Таким образом, для дальнейших экспериментов была выбрана система с $C_{\text{ХТЗ}} = 8 \text{ мас.}\%$ и $C_{\text{Pl F-127}} = 20 \text{ мас.}\%$.

Для более детальной оценки изменения вязкости с повышением температуры и изменения компонентного состава были построены температурные зависимости наибольшей ньютоновской вязкости η_{\max} .

При $T = 4^\circ\text{C}$ для всех изученных композиций вязкость имеет близкие значения, при 25°C незначительно возрастает с увеличением $C_{\text{ХТЗ·НСl}}/C_{\text{Pl F-127}}$.

Наиболее отчетливо повышение η_{\max} наблюдается при $T = 37^\circ\text{C}$ для соотношения $C_{\text{ХТЗ}\cdot\text{HCl}}/C_{\text{Pl F-127}} = 0.17$, что соответствует объемному соотношению 30 : 70. На основании полученных результатов определено оптимальное соотношение компонентов $C_{\text{ХТЗ}\cdot\text{HCl}}/C_{\text{Pl F-127}} = 0.04 - 0.2$ ($\text{ХТЗ}\cdot\text{HCl} : \text{Pl F-127} = 10:90 - 30:70$ об.%), в котором реализуется наибольшее значение вязкости при $T = 37^\circ\text{C}$, т.е. при температуре живого организма. Выбраны наиболее оптимальные составы для получения термочувствительных гидрогелей [7].

2 Оценка реологических свойств гелеобразующей

Системы хитозан + PluronicF-127

Оценку вязкоупругих свойств гелеобразующей композиции проводили в осцилляционном режиме при $T = 4 - 40^\circ\text{C}$. Композиция $\text{ХТЗ}\cdot\text{HCl} : \text{Pl F-127}$ состава 10 : 90 до 25°C характеризуется близкими значениями G' , G'' и высокими, возрастающими с повышением T , значениями $\text{tg } \delta$, что типично для жидкоподобных полимерных систем. Дальнейшее увеличение температуры приводит к росту значений модулей G' и G'' , а начиная с 30°C – резкому понижению $\text{tg } \delta$, что свидетельствует о преобладании упругой составляющей. При 35°C система достигает точки гелеобразования и претерпевает фазовый переход жидкость – гидрогель, при этом $G' = G''$ ($\text{tg } \delta = 1$).

Для состава $\text{ХТЗ}\cdot\text{HCl} : \text{Pl F-127} = 30 : 70$ температурная зависимость модулей несколько отличается. До температуры 20°C композиция ведет себя как жидкость, однако G' много больше G'' ($\text{tg } \delta > 1$). В диапазоне $T = 20-35^\circ\text{C}$ значение модуля G'' практически не изменяется, а G' начинает возрастать. Достижение точки гелеобразования, как и для состава $\text{ХТЗ}\cdot\text{HCl} : \text{Pl F-127} = 10 : 90$, наблюдается при 35°C [8].

3 Изучение реокинетики гелеобразования

системы хитозан + PluronicF-127

Для оценки характера гелеобразования композиции в процессе достижения гель-точки изучена кинетика осцилляционных параметров

(модуль G' и G'') при температуре фазового перехода (рис. 18).

Для обоих соотношений ХТЗ·НСІ : РІ F-127 (10:90 и 30:70 об.%) наблюдается повышение G' и G'' в процессе гелеобразования и различный характер поведения системы до и после фазового перехода жидкость – гидрогель ($G' = G''$).

На участке до геля-точки (при $G' = G''$) кинетической зависимости $G = f(t)$ наблюдается резкое увеличение значений модулей G' и G'' (рис. 18). Изучена зависимость времени гелеобразования во всем исследуемом диапазоне соотношений ХТЗ·НСІ : РІF-127 при физиологической температуре. Для композиций при $C_{\text{ХТЗ}}/C_{\text{РІF-127}} < 0.12$ время гелеобразования составляет всего лишь 3 – 7 мин. Повышение соотношения $C_{\text{ХТЗ}}/C_{\text{РІF-127}}$ приводит к увеличению времени гелеобразования. Так, для систем при $C_{\text{ХТЗ}}/C_{\text{РІF-127}} = 0.17 - 0.35$ время гелеобразования увеличивается до 15 – 30 мин.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что варьируя составы хитозансодержащей термочувствительной композиции можно регулировать кинетику фазового перехода жидкость – гидрогель [9].

4 Оценка условий формирования гидрогелей

Для визуализации условий формирования гидрогелей каплю смесевой композиции, охлажденную до 4°C, наносили на нагретую до 37°C стеклянную подложку. Выбор такой температуры обусловлен тем, что средняя нормальная температура тела теплокровного животного (крупный рогатый скот, домашние животные) составляет 37°C и выше.

Наблюдения проводили до завершения процесса гелеобразования и фиксировали контактный угол

Для композиции ХТЗ·НСІ : РІ F-127 = 10 : 90 в начальный момент нанесения ($t = 0$ мин) гидрогеля угол контакта жидкой капли с подложкой составляет $\sim 90^\circ$. Через 3 мин капля переходит в гелеобразное состояние. Такое поведение указывает на сверхбыстрый фазовый переход жидкость-гидрогель. Повышение соотношения до 30:70 об.% приводит к тому, что в момент нанесения угол контакта снижается до 50° , а время гелеобразования

увеличивается до 15 мин. При соотношении 8% ХТЗ·НСІ : 20% РІ F-127 = 50 : 50) в момент нанесения капля растекается по поверхности подложки (угол контакта $\sim 30^\circ$), а фазовый переход наблюдается через 35 мин.

Проведенные исследования позволили выявить составы композиции для получения термочувствительных гидрогелей ХТЗ·НСІ : РІ F-127 с различным временем фазового перехода (3, 15 и 35 мин). Полученные результаты представляются важными, поскольку время термического перехода жидкость–гидрогель в значительной степени определяется областью введения и назначением термочувствительного гидрогелевого препарата.

5 Изучение антибактериальной активности

Проведенные эксперименты изучения антибактериального действия показали, что исследуемый термочувствительный гидрогель проявляет умеренную антибактериальную активность в отношении грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, причем наибольшее действие проявляется в отношении грамположительных штаммов *B. cereus* 8833 и *S. Aureus* 6538 [10].

6 Исследование мукоадгезии с биомиметической поверхностью на основе мембраны яичной скорлупы

Как видно из таблицы 3, образец 1 показал время мукоадгезии 8 мин. в ацетатном буфере и 6 мин. в фосфатном. В то время как образец 2 содержащий больше ХТЗ·НСІ в своем составе показал большее время мукоадгезии, 25 мин. в ацетатном буфере и 22 мин. в фосфатном.

Проведенные тесты показывают, что увеличение содержания ХТЗ·НСІ в гидрогелевой композиции повышает прочность адгезионной связи к поверхности муцина, что подтверждается значением времени адгезии для композиции, в которой содержание хитозана выше, оно больше в 3 раза, чем у композиции с наименьшим содержанием хитозана.

7 Изучение мукоадгезионной прочности

Проведенные механические тесты показывают, что увеличение содержания ХТЗ·НСI в гидрогелевой композиции повышает прочность адгезионной связи к поверхности муцина, что подтверждается большим значением работы адгезии (рис. 21, табл.4). При этом максимальная сила отрыва гидрогеля ХТЗ·НСI : PI F-127 в объемном соотношении 30 : 70 выше, чем у коммерчески доступного мукоадгезивного геля для лечения десен «МетрогилДента» [11].

8 Анализ оптимальных гидрогелей на цитотоксичность в эксперименте на клеточных культурах *in vitro*

Культивирование *in vitro* эпителиальных клеток (4T1) в присутствии термочувствительного хитозансодержащего гидрогеля не выявило его цитотоксичности.

9 Исследование фармакотерапевтического действия гидрогелей на моделях *in vivo*

Положительная динамика у животных, лечение которых проводили с использованием свечного суппозитория ХТЗ·НСI : PI F-127, отмечалась уже на первые сутки лечения и достигала 20%. На вторые сутки лечения количество выздоровевших животных составило 60%. Полное выздоровление (100% выздоровевших животных) наблюдалось на 3 сутки лечения, контрольной группы – на 5 сутки.

Таким образом, оценка фармакологической активности *in vivo* при лечении и профилактики серозно-катарального вагинита у коров выявила более высокий терапевтический эффект по сравнению со стандартным лечением. Учитывая фармакологическую активность хитозана, использование термочувствительного гидрогеля на его основе не накладывает ограничение на использование молока и мяса животных в пищевых целях, как во время, так и в первые несколько суток после лечения [12].

Заключение

В ходе работы проведены исследования реологических свойств смесей водных растворов ХТЗ·HCl и Pluronic F-127, построена обобщенная диаграмма вязкостных свойств системы в широком диапазоне составов и температур. Выявлены термочувствительные свойства исследуемой композиции.

Изучены вязкоупругие параметры гелеобразующей хитозансодержащей композиции в осцилляционном режиме. Показано, что для всех изученных смесевых композиций с повышением температуры наблюдается увеличение модуля упругости и потерь. Фазовый переход жидкость-гидрогель наблюдается в диапазоне температур 35 – 38°C.

Изучена кинетика гелеобразования, оценено влияние соотношения компонентов смесевой композиции на процесс формирования гидрогеля. Показано, что при соотношении гидрохлорида хитозана и Pluronic F-127 10 : 90 – 30 : 70 об.%, время гелеобразования составляет 3-15 мин, при соотношении 40 : 60 – 50 : 50 об.% – 20-35 минут.

В результате исследования мукоадгезивных свойств показано, что хитозансодержащий термочувствительный гидрогель обладает более высокими мукоадгезивными свойствами по сравнению с коммерческим мукоадгезивным гелевым препаратом.

Выявлено, что термочувствительные хитозансодержащие гидрогели проявляют умеренную антибактериальную активность, низкую цитотоксичность и высокий терапевтический эффект.

Список используемых источников

1. Mahinroosta M., Farsangi Z. J., Allahverdi A. & Shakoori, Z. Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications // Materials Today Chemistry. 2018. Vol. 8. P. 42-55.
2. Li Y., Yang H. Y., Lee D. S. Advances in biodegradable and injectable hydrogels for biomedical applications // Journal of Controlled Release. 2021. Vol. 330. P. 151-160.
3. Pagano C. et al. Development and characterization of mucoadhesive-thermoreponsive gels for the treatment of oral mucosa diseases // European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2020. Vol. 142. P. 105125.
4. Yang Y., Wang Sh., Wang Y., Wang X., Wang Q., Chen M. Advances in self-assembled chitosan nanomaterials for drug delivery // Biotechnology Advances. 2014. Vol. 32. P. 1301-1316.
5. Domínguez-Delgado C.L., Fuentes-Prado E., Escobar-Chávez J.J., Vidal-Romero G., Rodríguez-Crus I.M., Díaz-Torres R. Chitosan and Pluronic F-127: Pharmaceutical applications // Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials-Processing Methods and Applications. 2016. P. 1513-1535.
6. Гегель Н.О., Харламов В.Н., Шиповская А.Б. Реологические свойства смеси хитозана и Pluronic F-127 в процессе фазового перехода жидкость – гидрогель // Сб. тез. докл. XXX Симпозиума по реологии: Тверь. 2021. С. 58-59.
7. Харламов В.Н., Шиповская А.Б. Термочувствительные хитозансодержащие гидрогели для создания ветеринарных препаратов нового поколения // Сб. тез. XXXI Менделеевской шк.-конф. молодых уч. М.: Издательство «Перо». 2021. С. 9-13.
8. Харламов В.Н., Гегель Н.О., Шиповская А.Б. Вязкоупругие свойства хитозансодержащей термочувствительной композиции в процессе гелеобразования // Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии: Межвуз. сборник науч. трудов XIV Всероссийск.

конф. молодых ученых с международ. уч. Саратов: Изд-во «Саратовский источник». 2020. С. 140-142.

9. Харламов В.Н., Гегель Н.О., Шиповская А.Б. Особенности кинетики гелеобразования водных растворов гидрохлорида хитозана и Pluronic F-127 // «Достижения молодых ученых: химические науки»: сб. тез. докл. V Всероссийской (заочной) молодежной конференции. Уфа: РИЦ БашГУ. 2020. С. 346-348.

10. Gegel N. O., Shipovskaya A. B., Khaptsev Z. Y., Radionov R. V., Belyaeva A. A. & Kharlamov V. N. Thermosensitive Chitosan-Containing Hydrogels: Their Formation, Properties, Antibacterial Activity, and Veterinary Usage // Gels. 2022. Vol. 8. P. 93.

11. Харламов В.Н., Гегель Н.О., Голядкина А.А. Мукоадгезионные свойства термочувствительных хитозансодержащих гидрогелей // Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии: Межвузовский сборник научных трудов XV Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием. Саратов: Изд-во «Саратовский источник». 2021. С. 218-221.

12. Харламов В.Н., Гегель Н.О., Шиповская А.Б., Хапцев З.Ю., Родионов Р.В. Средство для профилактики и лечения вагинита у коров. Патент РФ №2751876. 17 с. // Б.И. 2021. №20.