

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

Кафедра полимеров на базе ООО «АКРИПОЛ»

**Получение и свойства термочувствительных гидрогелей
гидрохлорида хитозана**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 412 группы

направления
(специальности)

04.03.01 «Химия»

Института Химии

Беляевой Анастасии Александровны

Научный руководитель
зав. кафедрой полимеров
на базе ООО «АКРИПОЛ»,
д.х.н.

А. Б. Шиповская

Зав. кафедрой полимеров
на базе ООО «АКРИПОЛ»,
д.х.н.

А. Б. Шиповская

Саратов 2019

Актуальность работы. Последние исследования в области гидрогелей сфокусированы на получении «умных» материалов. Такие гидрогели способны изменять свои свойства под действием pH среды, температуры, света, электрического поля и т.д. В последние годы число публикаций о получении, исследовании и возможности применения термочувствительных гидрогелей на основе природных и синтетических полимеров неуклонно растет. Интерес к таким материалам вызван из-за их способности к спонтанному гелеобразованию при определенной температуре. Такое свойство гидрогелей делает их востребованными для клеточной биологии, регенеративной медицины и биомедицинских и ветеринарных применений. Кроме того, использование природных полимеров в их составе, в частности полисахаридов, повышает функциональность гидрогелевой системы. Материалы на основе природных полисахаридов биосовместимы, биоразлагаемы, являются матрицами для высвобождения лекарств в определенное время или в определенном месте организма.

Одними из перспективных полимеров для получения термочувствительных гидрогелей рассматриваются природный полисахарид хитозан и синтетический триблок сополимер полиэтиленоксида и пропиленоксида Pluronic F-127.

Цель данной работы - комплексное исследование свойств водных растворов смеси гидрохлорида хитозана и Pluronic F-127 для получения термочувствительного гидрогеля.

Научная новизна:

В работе впервые:

- изучены реологические свойства растворов смеси гидрохлорида хитозана и Pluronic F-127 без (с) добавлением борной кислоты;
- получены частотные зависимости динамического модуля упругости и потерь;

- определено оптимальное соотношение компонентов и температурный диапазон, при которых в системе реализуется фазовый переход жидкость – гидрогель;

- оценено влияние добавки борной кислоты на морфологию поверхности, антибактериальные и мукоадгезивные свойства разработанного термочувствительного гидрогеля;

Практическая значимость работы.

Полученные реологические характеристики представляют интерес для решения практических задач, в частности, при выборе оптимальных составов и условий формирования термочувствительного гидрогеля с быстрым переходом жидкость–гель в диапазоне физиологических температур

Разработанная термочувствительная композиция вследствие собственной антибактериальной активности может использоваться как самостоятельный препарат, так и в качестве биологически активной матрицы для доставки биологически активных веществ.

Полученные в работе результаты позволяют рассматривать полученный термочувствительный гидрогель в качестве перспективного мукоадгезивного и гемостатического средства для ветеринарии.

Объем и структура бакалаврской работы.

Работа состоит из введения, 3 глав (1 глава – обзор литературы по теме исследования, 2 глава – характеристика объектов и методов исследования, 3 глава – обсуждение полученных результатов), выводов и списка литературы из 108 наименований.

Работа изложена на 47 стр., включает 18 рисунков и 3 таблицы, список литературы из 108 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **введении** обоснована актуальность выбранной темы бакалаврской работы, сформулирована цель исследования.

В **первой главе** представлен обзор научных работ, посвящённых механизмам образования геля *in situ*, краткому обзору свойств Pluronic F-127, гидрохлорида хитозана. Также описана краткая характеристика мукоадгезии хитозана

Во **второй главе** представлена характеристика объектов и методов исследований. В качестве объектов исследования использовали водные растворы. Для получения водных растворов использовали:

- промышленный образец ХТЗ·HCl с молекулярной массой 38 кДа, степенью деацетилирования 79.8 мольн.% (ЗАО “Биопрогресс”, РФ);
- Pluronic F-127 (Pl F-127) с молекулярной массой 126 кДа (Sigma-Aldrich, США);
- борную кислоту (БК) (ООО «Тульская фармацевтическая фабрика»).
- дистиллированную воду.

Для приготовления водного раствора ХТЗ·HCl с концентрацией полимера ($C_{\text{ХТЗ·HCl}}$) 1-4 мас.% навеску полимера растворяли в дистиллированной воде при комнатной температуре и нормальном атмосферном давлении в течение 1 суток.

Для приготовления раствора ХТЗ·HCl ($C_{\text{ХТЗ}} = 3$ мас.%) с добавкой БК ($C_{\text{БК}} = 3$ мас.%) навеску полимера смешивали с навеской БК и растворяли в дистиллированной воде при комнатной температуре и нормальном атмосферном давлении в течение 1 суток.

Водные растворы Pl F-127 концентрации (C_{Pl}) 25мас.% готовили при $T = 4^{\circ}\text{C}$. Хранили в условиях холодильника при $T = 4^{\circ}\text{C}$.

Методы исследования: реология и осцилляционные характеристики (ротационный вискозиметр Rheotest RN-4.1), метод текстурного анализа (универсальной испытательной машины Instron 5965 (Англия)), сканирующая

электронная микроскопия (микроскоп MIRA\\LMU, напряжение 8 кV, проводящий ток 60 pA), оценка гемостатического действия гидрогеля исследовали *in vivo* на животной модели половозрелых беспородных крыс – самок.

В третьей главе приводятся и обсуждаются результаты, полученные при изучении свойств смесей водных растворов исходных полимеров.

На первом этапе исследованы вискозиметрические свойства. Кривые течения водных растворов исходного раствора ХТЗ·НСl и его смесей с Pl F-127 до 50 об.% при всех температурах описываются классическими для растворов полимеров зависимостями $\lg \eta = f(\lg \tau)$ с областями наибольшей ньютоновской и структурной вязкости. С увеличением содержания Pl F-127 до 70 об.% смесевая система ХТЗ·НСl : Pl F-127 при $T = 4^\circ\text{C}$, как и исходный раствор Pl F-127, ведет себя как дилатантная жидкость. С повышением температуры до 25 и 37°C и смесь ХТЗ·НСl : Pl F-127 = 30:70, и раствор плюроники характеризуются кривыми течения структурированных композиций с пределом текучести.

Зависимость ньютоновской вязкости η от содержания Pl F-127 в смесевой системе показывает, что с увеличением содержания Pl F-127 вязкость смесевых растворов повышается при всех температурах. Наиболее отчетливо эффект увеличения η наблюдается при $T = 25$ и 37°C.

На основании проведенных исследований для визуальной оценки фазового перехода раствор-гидрогель выбрана смесевая система ХТЗ·НСl : Pl F-127 в соотношении компонентов 30:70. Как и следовало ожидать, данная смесь при $T = 4^\circ\text{C}$ представляет собой жидкость, а при $T = 37^\circ\text{C}$ в течение 1-2 минут претерпевает переход в формоустойчивый гидрогель. При этом переход раствор-гидрогель является термически обратимым.

Добавка БК в систему изменила характер течения исходной системы. При 4°C система ХТЗ·НСl : Pl F-127 = 30:70 ведет себя как дилатантная жидкость. При остальных температурах обе системы характеризуются кривыми течения структурированных композиций с пределом текучести. По сравнению с

кривыми течения для системы $\text{ХТЗ} \cdot \text{HCl} : \text{Pl F-127} = 30:70$, реограммы вязкости системы с добавкой БК характеризуются более высокими значениями предела текучести.

Следующим этапом явилось оценка влияния содержания Pl F-127 в системе на ее осцилляционные характеристики. Зависимости модуля упругости (G') и потерь (G'') от содержания Pl F-127 в системе. При всех исследуемых температурах значения модулей G' и G'' возрастают с увеличением содержания Pl F-127 в системе. При этом при 4°C во всем диапазоне соотношений $\text{ХТЗ} \cdot \text{HCl} : \text{Pl F-127}$ оба модуля G' и G'' имеют близкие значения. Такое поведение характерно для систем, демонстрирующих характер вязкой жидкости. При 25 и 37°C и соотношении компонентов $\text{ХТЗ} \cdot \text{HCl} : \text{Pl F-127} \sim 30:70$, модуль G' становится больше G'' . Это свидетельствует об образовании геля, когда упругое деформирование доминирует над вязким течением полимерной системы. Обнаружено также существенное повышение значений G' и G'' с увеличением температуры. Наибольшее увеличение наблюдается для значений G' при $T = 37^\circ\text{C}$ и соотношении $\text{ХТЗ} \cdot \text{HCl} : \text{Pl F-127} > 80:20$.

Для определения оптимальной концентрации $\text{ХТЗ} \cdot \text{HCl}$ в смеси для формирования гидрогелей были получены зависимости G' и G'' от $C_{\text{ХТЗ} \cdot \text{HCl}}$ в исходном растворе. Установлено, что при 4°C значения модулей G' и G'' имеют близкие значения. При 25 и 37°C – показывают экстремальную зависимость $G = f(C_{\text{ХТЗ} \cdot \text{HCl}})$. При 25°C наибольшие значения модулей реализуются при $C_{\text{ХТЗ} \cdot \text{HCl}} = 2$ мас.%, при 37°C – в диапазоне $C_{\text{ХТЗ} \cdot \text{HCl}} = 2-3$ мас.%. При этом независимо от концентрации $\text{ХТЗ} \cdot \text{HCl}$ в исходном растворе значения G' и G'' увеличиваются с повышением температуры.

Методом СЭМ получены изображения внешней и внутренней поверхности гидрогелей. Все образцы имеют гладкий, ровный поверхностный рельеф без четких элементов морфоструктуры, что свидетельствует о хорошем взаимодействии и совместимости компонентов смеси между собой. Внутренняя структура твердой фазы гидрогеля изменяется с добавлением БК в систему. Так

исходный гидрогель характеризуются сложной неупорядоченной структурой, добавка БК способствует образованию плотно упакованной регулярно-направленной внутренней структуры.

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. Добавка борной кислоты существенно повышает антибактериальную активность в отношении грамотрицательных микроорганизмов.

Для оценки влияния биоадгезивных свойств гидрогеля к поверхности слизистой был проведен модельный эксперимент по динамическому измерению угла контакта гидрогеля к мушину. При нанесении гидрогелей на поверхность с мушином угол контакта $<90^\circ$ для всех систем при всех исследуемых температурах. Это свидетельствует о быстром распределении геля по модели слизистой поверхности в момент нанесения. Увеличение угла контакта при 37°C вызвано гелеобразованием. Дополнительно были проведены механические тесты по изучению мукоадгезии термочувствительных гелей к поверхности мушины при 37°C . Была определена максимальная сила отрыва от адгезивного субстрата ($F_{\max}$) и работа адгезии (W) для системы ХТЗ·HCl : Pl F-127 = 30:70 без и с добавкой БК. Для сравнения использовали коммерчески доступный мукоадгезивный гель для лечения десен «Метрогил Дента». Максимальная сила отрыва геля с БК сопоставима с коммерческим гелем. Введение БК в состав гидрогеля повышает прочность адгезионной связи, что подтверждается большим значением работы адгезии.

На заключительном этапе термочувствительный гидрогель испытывали в качестве кровоостанавливающего средства. Была проведена оценка его гемостатического действия. На поверхности раны происходит фазовый переход жидкость-гидрогель, с мгновенным гемостазом крови.

Выводы

1. Исследованы реологические свойства водных растворов гидрохлорида хитозана, Pluronic F-127, их смесей в объемном соотношении 10:90 – 90:10 при температуре 4-37°C без и с добавкой борной кислоты. Установлено, что в зависимости от температуры и соотношения компонентов реализуются кривые течения ньютоновских или дилатантных жидкостей, либо реограммы вязкости структурированных композиций с пределом текучести, свидетельствующих о гелеобразовании. Добавка борной кислоты не изменяет характер течения, но увеличивает значения предела текучести. Политермические наблюдения показали, что переход жидкость-гидрогель является термообратимым.

2. Проанализированы частотные зависимости динамического модуля упругости и потерь. Установлено, что переход из состояния вязкоупругой жидкости в вязкоупругое тело реализуется в диапазоне температур 25-37°C. На основании проведенных исследований выбрано оптимальное соотношение компонентов (30:70) для получения гидрогелей.

3. Проведена оценка морфологии поверхности гидрогелей. Установлено, что все образцы имеют гладкий поверхностный рельеф. Введение борной кислоты способствует формированию регулярно-направленной внутренней структуры.

4. Хитозансодержащий термочувствительный гидрогель обладает удовлетворительными мукоадгезивными свойствами по сравнению с коммерчески доступными гелевыми препаратами. Добавка борной кислоты повышает прочность адгезионной связи к модельному субстрату. Гидрогель проявляет умеренную антибактериальную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов и демонстрирует мгновенный гемостатический эффект.

Список публикаций по теме исследования

1. Беляева А.А., Гегель Н.О., Шиповская А.Б. Кривые течения растворов смесей хитозана с Pluronic F-127 // Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии: Межвуз. сб. науч. трудов XII Всерос. конф. молодых ученых с международ. уч. Саратов: изд-во «Саратовский источник». 2017. С. 124-126.

2. Беляева А.А., Гегель Н.О., Шиповская А.Б. Реологические свойства водных растворов гидрохлорида хитозана с добавкой Pluronic F-127 // Тез.докл. IV Всерос. молодежной конф. «Достижения молодых ученых: химические науки». Уфа: РИЦ БашГУ. 2018. С. 446-448.

3. Беляева А.А., Гегель Н.О., Шиповская А.Б. Оценка гелеобразования смесей гидрохлорида хитозана с Pluronic F-127 в водном растворе // Тез.докл. VI Всерос. молодежной конф. «Теоретические и экспериментальные исследования синтеза и переработки полимеров». Уфа: БашГУ. 2018. С. 64-66.

4. Беляева А.А., Гегель Н.О. Вязкостные свойства раствора смеси хитозана с Pluronic F-127 в диапазоне температур 4-37°C // Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии: Межвуз. сборник науч. трудов XIII Всерос. конф. молодых ученых с международ. участием. Саратов: Изд-во «Саратовский источник». 2018. С. 104-105.

5. Беляева А.А., Гегель Н.О., Шиповская А.Б. Термочувствительный гидрогель на основе гидрохлорида хитозана и Pluronic F-127 // Матер. международ. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых уч. «Ломоносов-2019», секция «Химия». Москва: Изд-во «Перо». 2019. С. 123.