

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

Кафедра полимеров на базе ООО «АКРИПОЛ»

Физико-химические свойства смесей хитозана и Pluronic F-127

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса магистратуры

направления

04.04.01 «Химия»

Института химии

Харламова Виталия Николаевича

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

А.Б. Шиповская

Саратов 2024

Введение

Гидрогели амфифильных сополимеров этиленоксида и пропиленоксида (плюроники), проявляющих самоорганизацию макроцепей с формированием надмолекулярных образований при изменении физических параметров системы, представляют большой интерес в области биомедицины и фармацевтики для стабилизации коллоидных суспензий и адресной доставки лекарств [1, 2], а также в качестве самовосстанавливающихся оптических материалов [3]. Баланс гидрофильно-гидрофобных свойств таких объектов определяется концентрацией сополимера и температурой.

Благодаря интересному фазовому поведению P1 F-127 его смеси с биологически активными полимерами, в частности хитозаном [4], могут стать весьма перспективными для получения термочувствительных полимерных гидрогелей с высокой фармакологической активностью.

Полученные знания о специфике взаимодействия этих двух полимеров позволят открыть перспективы создания на их основе «умных» материалов не только с улучшенными, но и новыми свойствами.

Цель работы - изучение физико-химических свойств смесей хитозана и Pluronic F-127, а также влияние добавок полисахарида на агрегированную мицеллярную фазу плюроника, образующуюся при термическом золь-гель переходе, в широком диапазоне соотношений компонентов бинарной смеси.

Задачи:

- 1) Построение фазовой диаграммы термочувствительной композиции ХТЗ·НСl : P1 F-127 методом поляризационной микроскопии;
- 2) Изучение вязкостных свойств разбавленных растворов Pluronic F-127 и его смесей с хитозаном с помощью метода капиллярной вискозиметрии;
- 3) Исследование оптических свойств разбавленных растворов P1 F-127 и ХТЗ·НСl, а также их смесей методом спектрополяриметрии;

4) Изучение дермо- и мукоадгезивных свойств термочувствительной композиции с различным соотношением компонентов в системе;

5) Исследование гелеобразования гидрогелей в модельной системе имитирующей полые трубчатые органы живого организма;

6) Изучение терапевтического эффекта исследуемых образцов гидрогелей при лечении открытых ран.

Исходными **реагентами** являлись порошкообразный промышленный образец гидрохлорида хитозана ($\text{ХТЗ} \cdot \text{HCl}$) 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 дермо- и 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.

Композиции $\text{ХТЗ} \cdot \text{HCl}$: Pl F-127 готовили смешением исходных водных растворов в объемном соотношении 10 : 90 – 60 : 40. Для представления компонентного состава смесевой композиции использовали отношение концентраций $\text{ХТЗ} \cdot \text{HCl}$ 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 126 наименований. Работа изложена на 76 листах машинописного текста, содержит 17 рисунков, 8 таблиц.

Основное содержание работы

1 Исследование агрегированной мицеллярной фазы Pluronic F-127 и системы ХТЗ·НСl + Pluronic F-127 методом поляризационной микроскопии

Методом поляризационной микроскопии были визуализированы особенности поляризационного свечения мицеллярных фаз P1 F-127 и его смесей с ХТЗ·НСl. Температура перехода из изотропного раствора в анизотропный гель для индивидуального P1 F-127 с CP1 F-127 = 5-10 мас.% составляет 40°C. В диапазоне CP1 F-127 > 12 мас.% до T=30°C система изотропна, с повышением температуры наблюдается оптическая анизотропия. Для бинарной смеси ХТЗ·НСl : P1 F-127 с увеличением добавки ХТЗ·НСl наблюдается увеличение температуры перехода из изотропного раствора в анизотропный гель.

Раствор индивидуального P1 F-127 концентрации 12 мас.% при T = 30°C в поляризованном свете прозрачный и оптически изотропный. При повышении температуры до 50°C образуются ярко выраженные радиальные сферолиты с «мальтийскими крестами», которые заполняют весь объем раствора. Данное явление говорит об образовании жидкокристаллической (ЖК) фазы и сложной упорядоченной структуры. Визуально раствор P1 F-127 представляет собой жидкость, через 2 мин раствор образует формоустойчивый гидрогель.

Бинарные смеси ХТЗ·НСl + P1 F-127 при 30°C жидкие и изотропные, а при повышении температуры вязкоупругие и с признаками двойного лучепреломления. Однако количество вводимой добавки существенно влияет как на время фазового перехода и формоустойчивость гель-фазы, так и на оптические характеристики образующихся текстур, яркость свечения которых уменьшается по мере изменения содержания P1 F-127 в системе.

2 Анализ вискозиметрических параметров растворов индивидуального P1 F-127 и смеси ХТЗ·НСl +Pluronic F-127

Проведена оценка молекулярных и мицеллярных свойств разбавленных

растворов Pluronic F-127 и его смесей с ХТЗ·НСI с помощью метода капиллярной вискозиметрии. Во всех случаях для раствора P1 F-127 зависимости изменения приведенной вязкости ($\eta_{пр}$) от концентрации полимера проявляют линейный характер, что является типичной особенностью поведения незаряженного полимера. Полученные результаты могут быть использованы для определения константы Хаггинса и предельного числа вязкости $[\eta]$, необходимого для расчета эффективного радиуса макромолекулярного клубка при бесконечном разбавлении R_{ef} .

С увеличением концентрации полимера вязкость раствора увеличивается, это вызвано агрегацией сополимера в мицеллы. Но с увеличением температуры значения $[\eta]$ и R_{ef} уменьшаются. Вероятнее всего это вызвано усилением мицеллярной гидратации, приводящей к демицеллизации и уменьшению размера мицелл.

При добавлении ХТЗ·НСI к раствору P1 F-127 зависимости $\eta_{пр} = f(C_{P1 F-127})$ проявляют нелинейный характер. Такое поведение обусловлено тем, что хитозан в водной среде проявляет свойства полиэлектролита. Полученные зависимости не линеаризуются в координатах Хаггинса. Поэтому для нахождения предельного числа вязкости был использован подход Иржака и Баранова.

Добавление ХТЗ·НСI к раствору Pluronic F-127 приводит к увеличению значения $[\eta]$ и R_{ef} , что может быть вызвано встраиванием макроцепей хитозана в структуру мицелл плюроника, но дальнейшее повышение температуры до 40°C приводит к незначительному снижению этих параметров. Вероятнее всего при добавлении ХТЗ·НСI гидратация мицелл затрудняется и демицеллизация не происходит.

На следующем этапе для оценки влияния содержания хитозана на вязкостные свойства системы ХТЗ·НСI + Pluronic F-127 была построена диаграмма предельное число вязкости/состав.

Выявлено, что измеренные значения $[\eta]$ лежат выше аддитивных, особенно в области, где доля Pluronic F-127 в смеси большая. Вероятнее

все это связано с увеличением размера смесового клубка системы ХТЗ·НСl + Pluronic F-127.

Предполагаемый механизм такого поведения – увеличение размеров индивидуальных компонентов. Возможно, это реализуется из-за повышения качества Н₂О как растворителя ХТЗ·НСl и Pluronic F-127 при совместном присутствии и соответственно улучшению сольватации макромолекулярных клубков.

Таким образом, полученные данные дают возможность ориентироваться при выборе состава для дальнейших испытаний.

3 Спектрополяриметрия

Было проведено исследование оптических свойств индивидуальных растворов полимеров и их смесей методом спектрополяриметрии. В качестве образца сравнения использовали также целлобиозу, являющуюся прототипом макромолекулярного звена хитозана.

Растворы целлобиозы и хитозана проявляют оптическую активность благодаря наличию в составе молекул хиральных центров. Раствор целлобиозы показывает положительные значения $[\alpha]$ (+, правовращающий), раствор хитозана – отрицательные (-, левовращающий). Все кривые плавные и относятся к нормальному типу, что свидетельствует об отсутствии оптических электронных переходов в данной области длин волн.

Модуль ДОВ низкомолекулярного углевода практически в 2 раза превышает модуль заряженного полимера, что обусловлено протяженностью макромолекулярной цепи и возможностью принятия клубкообразной конформации, экранирующей возможность проявления хиральными центрами оптической активности.

Повышение температуры не изменяет значения удельного оптического вращения раствора целлобиозы, но понижает значения $[\alpha]$ раствора хитозана, что подтверждает факт о том, что в оптическую активность вносят вклад не только хиральные центры, но и конформация цепи. Раствор Pluronic F-127 не

проявляет оптической активности, так как в составе его молекулы нет хиральных центров.

Все исследуемые смеси проявляют оптическую активность, значения дисперсии оптического вращения отрицательные. Кривые ДОВ также плавные и относятся к нормальному типу. Добавка синтетического полимера приводит к понижению модуля значений удельного оптического вращения раствора хитозана. Чем больше содержание синтетического полимера, тем значения ДОВ ближе к нулю.

4 Изучение дермоадгезивной прочности

Проведено исследование дермоадгезионных свойств гидрогелей методом отрыва в условиях преодоления сил адгезии гидрогелевого материала от дермальной поверхности кожи курицы (*ex vivo*). Предварительно исследуемая поверхность была высушена, затем при проведении испытаний смочена раствором муцина и закреплена на пуансоне. Размеры исследуемой поверхности составляли $= 762 \text{ мм}^2$.

Проведенные механические тесты показывают, что увеличение содержания ХТЗ·НСI в гидрогелевой композиции повышает прочность адгезионной связи к дермальной поверхности, что подтверждается большим значением работы адгезии и данный параметр выше, чем у коммерчески доступного гидрогелевого препарата «Метрогил Дента».

На следующем этапе была проведена оценка дермоадгезивных свойств хитозансодержащих гидрогелей в зависимости от времени контакта с модельной дермальной поверхностью – фильтровальной бумагой с нанесенным слоем муцина. Определяющим параметром была выбрана F_{max} необходимая для отделения пластинки с гидрогелем.

Полученные результаты показывают, что содержание ХТЗ·НСI и P1 F-127 в гидрогеле влияет на его дермоадгезивные свойства. Для обеих систем наблюдается возрастание силы, необходимой для отрыва от дермальной поверхности, с увеличением времени контакта t_k . Максимальное значение

наблюдается при $t_k = 7$ мин.

5 Изучение мукоадгезивной прочности

На следующем этапе было проведено исследование мукоадгезивной прочности гидрогелей и сравнение результатов мукоадгезии исследуемых образцов с полученными значениями дермоадгезии для понимания эффективности их применения. Образцы всех составов проявляют высокие мукоадгезивные свойства. Чем выше содержание хитозана в исследуемом гидрогеле, тем выше адгезионная способность к поверхности муцина. Полученные результаты позволяют говорить об их эффективности в лечении поражения мягких тканей, как животных, так и человека [5]. Кинетические испытания также подтверждают, что чем выше содержание полисахарида в системе, тем выше адгезия к модельной слизистой поверхности. Увеличение времени контакта, как и в случае дермоадгезии, повышает адгезионные характеристики гидрогелевого материала.

6 Исследование гелеобразования гидрогелей в модельной системе, имитирующей полые трубчатые органы живого организма

Было проведено исследование эффективности применения гидрогелей в медицине на модельной системе – «модель вены, артерии, сосуда» – для возможности оценки их использования при проведении операций на данных объектах. Диаметр трубки составлял 5 мм, что соответствует диаметру средних вен и артерий.

Полученные результаты показывают, что термочувствительные гидрогели могут применяться в сложных операциях на полых трубчатых органах живого организма, таких как вена или артерия для остановки кровотечения. Характерной особенностью таких гидрогелей является то, что при охлаждении образцов они переходят в состояние золя и легко могут быть удалены из места локализации, где они были применены.

7 Исследование фармакотерапевтического действия гидрогелей на моделях *in vivo*

Термочувствительный хитозансодержащий гидрогель показывает высокий терапевтический эффект. Уже после однократного применения наблюдается эффект заживания раны, что выше по сравнению с традиционными методами лечения.

Заключение

В ходе работы визуализированы особенности поляризационного свечения мицеллярных фаз Pl F-127 и его смесей с ХТЗ·НСI. Индивидуальный раствор Pl F-127 показывает наиболее интенсивное двулучепреломление в диапазоне температур. Добавка ХТЗ·НСI, в зависимости от ее содержания в бинарной смеси ХТЗ·НСI : Pl F-127, может как разрушать, так и стабилизировать организованную структуру плуроника.

Проведена оценка молекулярных и мицеллярных свойств разбавленных растворов Pluronic F-127 и его смесей с ХТЗ·НСI методом капиллярной вискозиметрии, на основе которых построен фрагмент диаграммы состав–свойство смеси. Во всех случаях значения предельного числа вязкости смесей Pl F-127 : ХТЗ·НСI больше аддитивных, что свидетельствует о разбухании смеси в сравнении с синтетическим полимером. Размер смеси увеличивается с повышением концентрации ХТЗ·НСI, что подтверждается рассчитанным значением эффективного радиуса макромолекулярного клубка в индивидуальном состоянии.

Исследована оптическая активность водных растворов Pl F-127, ХТЗ·НСI и их смесей. Испытания показывают, что раствор плуроника не проявляет оптической активности, в то время как раствор хитозана и его смеси с плуроником характеризуются отрицательными значениями удельного оптического вращения, модуль которых возрастает с повышением температуры. Однако добавка синтетического полимера понижает модуль оптического вращения смеси. Кривые дисперсии оптического

вращения растворов хитозана и его смесей с плуроником плавные и относятся к нормальному типу.

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

Оценена возможность гелеобразования оптимальных образцов гидрогелей в модельной системе, имитирующей полые трубчатые органы живого организма (вены, артерии, сосуды). Определено предельное давление воды, выдерживаемое гидрогелем в «стесненных» условиях до начала его разрушения. И результаты показывают перспективы применения исследуемых гидрогелей для временной остановки потока крови в хирургической практике.

Исследовано фармакотерапевтическое действие *in vivo* гидрогелей при лечении рваных ран поверхностных тканей лошади серой масти орловской породы. Оценка фармакологической активности *in vivo* выявила высокий терапевтический эффект.

Список используемых источников

1. Kelly A. Pluronic F127 thermosensitive injectable smart hydrogels for controlled drug delivery system development / Isreb M., Babenko M., Mahmoudi N., Rogers S., Shebanova O., Snow T., Gough T.J. // Journal of colloid and interface science. – 2020. – Т. 565. – С. 119-130.
2. Bodratti A.M. Formulation of poloxamers for drug delivery / Alexandridis P. // Journal of functional biomaterials. – 2018. – Т. 9, №. 1. – С. 11.
3. Nikolaeva A.L. Optical limiting in Pluronic F-127 hydrogel with nanocarbon inclusions / Povarov S.A., Vocharov V.N. // Optics and Spectroscopy. – 2017. – Т. 122. – С. 243-249.
4. Shipovskaya A.B. Structure and properties of chitosan salt complexes with ascorbic acid diastereomers / Malinkina O.N., Gegel N.O., Zudina I.V., Lugovitskaya T.N. // Russian Chemical Bulletin. – 2021. – Т. 70. – С. 1765-1774.
5. Харламов В.Н. Термочувствительные хитозансодержащие гидрогели: формирование, свойства, биологическая активность: автореф. бак. раб. / Харламов В.Н. – Саратов, 2022. – 11 с.