

МИНОБРНАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
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 И БИОЛОГИЧЕСКАЯ  
АКТИВНОСТЬ ГЛИЦЕРОГИДРОГЕЛЕЙ СМЕСЕЙ ГЛЮКОМАННАНА  
И ХИТОЗАНА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 412 группы

направления 04.03.01 – Химия

Института химии

Приданкиной Дарьи Владимировны

Научный руководитель

старший преподаватель

кафедры

\_\_\_\_\_

О.Н. Малинкина

подпись

Саратов 2024

**Введение** в научно-исследовательскую работу: гидрогели являются перспективными системами для косметологии и биомедицины благодаря способности удерживать, доставлять и контролируемо высвобождать биологически активные вещества, лекарственные препараты и стимуляторы клеточного роста [1–2]. Среди многообразия гидрогелей – «мягких» покровных материалов особое внимание заслуживают гидрогели на основе биосовместимых полимеров, в частности полисахаридов, а также их смесей [3, 4]. Использование полисахаридов разной природы – катионогенного аминополисахарида хитозана (ХТЗ) и нейтрального глюкоманнана (ГМ) позволяет сочетать преимущества в одном материале [5–11]. Способность ионногенных полимеров в растворах к конформационным изменениям в ответ на рН, ионную силу позволяет проектировать «умные» материалы, например, для доставки активных фармацевтических ингредиентов [12, 13].

**Целью работы** является исследование гидродинамических свойств смесевых систем хитозан–глюкоманнан, изучение реокинетики процесса гелеобразования Si-глюкоманнан-хитозансодержащих гидрогелей при 37°C, оценка антибактериальной активности *in vitro*, ранозаживляющего действия *in vivo* и дермоадгезионных свойств *ex vivo*.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследование гидродинамических свойств смесевых систем хитозан–глюкоманнан в широком диапазоне соотношений компонентов методом капиллярной вискозиметрии.

2. Изучение реокинетики процесса гелеобразования многокомпонентной полисахаридсодержащей смеси на основе низко- и высокомолекулярного ХТЗ (ГХ·ХТЗ-38 и ГХ·ХТЗ-200).

3. Исследование *in situ* кинетики формирования гидрогелевого покрытия на дермальной и модельной раневой поверхностях (~37°C).

4. Оценка муко- и дермоадгезионных свойств гидрогелевых покрытий *in vitro* и *ex vivo*.

5. Сравнение антибактериальной активности *in vitro* гидрогелевых покрытий на модели грамположительных и грамотрицательных условно-патогенных бактерий.

6. Оценка гемостатической и ранозаживляющей активности *in vivo* гидрогелевых покрытий на животной биологической модели.

**Структура и объем работы.** Работа изложена на 45 листах, содержит 21 рисунок, 5 таблиц, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка используемых источников, включающего 47 наименований.

**В литературном обзоре** осуществлен поиск литературных данных о способах получения и свойствах гидрогелевых материалов на основе полисахаридов, о влиянии на физико-химические свойства различных диапазонов составов смесевых систем и о влиянии модифицирующих добавок на биологические свойства.

**В экспериментальной части** получены индивидуальные водные растворы ГМ ( $C_{ГМ} = 0.0375$  г/дл, а так же 0.2 и 0.5 мас.%) и ГХ·ХТЗ ( $C_{ГХ·ХТЗ} = 0.5$  г/дл) смешением навески с растворителем и последующим нагревом СВЧ-излучением при мощности 800 Вт в течение 30–45 с до  $80 \pm 5^\circ\text{C}$ . Для получения Na-ацетатных буферных растворов полисахаридов навеску полимера заливали расчетным количеством буфера (0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ,  $\text{pH}=4.4$ ) и перемешивали на магнитной мешалке.

Систему на основе 4 мас.% гидрохлорида ХТЗ-38 и 4% АмК получили следующим образом: к навеске 4 г гидрохлорида ХТЗ-38 добавляли 92 мл дистиллированной воды (растворитель) при перемешивании, после чего полученный раствор выдерживали при  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 1 сут. К полученному раствору добавляли навеску 4 г АмК и перемешивали.

Систему на основе 4 мас.% гидрохлорида ХТЗ-200 и 4% АмК приготавливали следующим образом: навеску 4 г ХТЗ-200 диспергировали в 76.8 мл дистиллированной воды (нерастворитель) и добавляли при перемешивании 15.2 мл 0.1 N HCl (эквимольное соотношение к аминогруппам

ХТЗ-200), после чего полученный раствор выдерживали при  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 1 сут. К полученному раствору добавляли навеску 4 г АмК и перемешивали на магнитной мешалке до получения гомогенного раствора.

С помощью различных методов определены: физико-химические свойства (методы капиллярной и ротационной вискозиметрии, метод отрыва на приборе Tinius Olsen H1KS), антибактериальная активность *in vitro* (методом диффузии в агар в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов), гемостатическое и ранозаживляющее действия *in vivo* (на животной модели половозрелых беспородных лабораторных крыс-самок весом  $350 \pm 50$  г в стандартных условиях вивария СГМУ по времени остановки кровотечения и средней линейной скорости заживления раневой поверхности).

**Обсуждение результатов** работы содержит результаты и выводы по проделанной работе. Потенциометрически было определено, что минимальное содержание HCl, необходимое для растворения ХТЗ-200, составило 0.75 от количества аминогрупп полимера при  $\text{pH}=3.5$ . Установлено оптимальное соотношение ГХ·ХТЗ и модифицирующей добавки АмК в исходном растворе. Введение порошка АмК в водный раствор ГХ·ХТЗ способствует повышению pH, однако при  $C_{\text{АмК}} > C_{\text{ХТЗ}}$  в растворах со временем происходит высаживание полимера в виде мелкодисперсного осадка, поэтому содержание АмК определяли  $C_{\text{ХТЗ}}$ .

Методом капиллярной вискозиметрии проведено исследование гидродинамических свойств разбавленных растворов полисахаридов в индивидуальном состоянии. Для нейтрального ГМ как в водном, так и в кислотно-солевом растворах концентрационные зависимости числа вязкости в координатах Хаггинса имеют классический вид для незаряженных полимеров. Для водного раствора ГХ·ХТЗ наблюдается полиэлектролитный эффект за счет электростатического отталкивания сегментов в макро клубках поликатиона. В таком случае нахождение предельного числа вязкости проводили в координатах Фуосса. В кислотно-солевом растворе вследствие экранирования зарядов внешними электролитами клубки поджимаются более чем в 10 раз.

При использовании воды в качестве общего растворителя предельное число вязкости для смесевых систем определяли из уравнения Фуосса вследствие проявления ПЭ. В случае кислотно-солевого растворителя концентрационные зависимости числа вязкости имели линейный характер во всем диапазоне соотношений исходных растворов полисахаридов, поэтому наравне с предельным числом вязкости определен и параметр вязкостного взаимодействия. Построение зависимости предельного числа вязкости от массовой доли ХТЗ для смесевых систем не совпадает с аддитивными значениями. Так для водных смесевых систем обнаружено отрицательное отклонение от аддитивности, а кислотно-солевых – преимущественно положительные. Согласно критериям смешиваемости Гарсия и Кригбаума–Уолла система ГМ-ХТЗ т/д устойчива при использовании воды в качестве общего растворителя во всем диапазоне составов и не устойчива в кислотно-солевом растворителе, за исключением высококонцентрированной области по ХТЗ. Оценка смешиваемости по параметру вязкостного взаимодействия приводит к таким же выводам. Т.о., в общем хорошем растворителе, которым является вода, реализуются сильные межмолекулярные взаимодействия, а в условиях подавления полиэлектролитного эффекта предпочтительны однородные контакты полимер–полимер и полимер–растворитель по сравнению с разнородными взаимодействиями, приводящие к кинетической нестабильности смесевой системы.

Методом ротационной вискозиметрии показано, что переход в нетекучее состояние смесевой композиции сопровождается ростом коэффициента вязкости и появлением характерной структурной ветви на реограммах вязкости с последующим упрочнением структуры. Сравнение структурированных систем показывает формирование более прочных сеток гидрогелей на основе высокомолекулярного ХТЗ.

Полученные значения силы муко- ( $W_m$ , кПа) и дермоадгезионного соединения ( $W_d$ , кПа) сравнивали с таковыми для фармацевтического гидрогелевого препарата «Метрогил Дента». Выявлено, что сила дермоадгезии гидрогелевого материала на основе ГХ·ХТЗ-38•и ГХ·ХТЗ-200 равна  $11.7 \pm 0.6$  и  $16.2 \pm 0.8$  кПа, соответственно, в то время как для контрольного препарата она

составила  $13.2 \pm 0.7$  кПа. Сила мукоадгезии тех же составов составила  $25.0 \pm 1.5$  и  $12.4 \pm 0.7$  кПа, соответственно, а для контрольного препарата при тех же условиях  $21.9 \pm 1.3$  кПа.

Сравнивали антибактериальную активность разработанных композиций и хлоргексидина в отношении грамположительных *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (В-8172) и палочковидных грамотрицательных *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923 (В-6643). Зоны задержки роста бактерий измеряли через 18 ч культивирования. Исходя из полученных результатов можно сделать вывод, что в отношении грамположительных микроорганизмов наибольшей антимикробной активностью обладает гидрогель на основе низкомолекулярного ХТЗ, а также смесь глицериновых растворов гелеобразователя и ТБН. В отношении грамотрицательных микроорганизмов установлена умеренная активность гидрогелей и их компонентов.

Показано, что разовая обработка резанной раны (наложение на дно раны гидрогелевой композиции на основе ГХ·ХТЗ-38•и ГХ·ХТЗ-200) снижает сроки заживления по сравнению с контролем (ежедневная обработка препаратом «Левомеколь»). Установлено, что среднее время остановки кровотечения при закрытии резанной раны гидрогелевым материалом на основе ГХ·ХТЗ-38•и ГХ·ХТЗ-200, составляет  $8.0 \pm 0.5$  и  $6.0 \pm 0.4$  мин, соответственно. При использовании коммерческого препарата «Левомеколь» среднее время остановки кровотечения в аналогичных условиях составляет  $20.0 \pm 1.2$  мин. Средняя линейная скорость ранозаживления при наложении на дно раны гидрогелевой композиции на основе ГХ·ХТЗ-38 и ГХ·ХТЗ-200, составляет  $7.6 \pm 0.4$  и  $9.9 \pm 0.5$  мм/сут, соответственно. Средняя линейная скорость ранозаживления антибактериального комбинированного коммерческого препарата «Левомеколь» в аналогичных условиях проведения эксперимента составляет  $2.4 \pm 0.1$  мм/сут.

Выводы работы можно представить следующим образом:

Определен оптимальный состав исходного раствора хитозана для формирования гомогенной гелеобразующей смеси: 4 мас.% ГХ·ХТЗ в 4% АмК с рН=5.6.

Исследованы гидродинамические свойства исходных растворов ГХ·ХТЗ и ГМ в воде и Na-ацетатном буфере, а также их смесей широком диапазоне составов. Установлено, что в водных растворах гидрохлорида хитозана проявляется полиэлектролитный эффект, подавление которого наблюдается при использовании Na-ацетатного буфера в качестве растворителя. В водных и Na-ацетатно буферных растворах ГМ полиэлектролитного эффекта не выявлено.

Определенные значения предельного числа вязкости для водных смесевых растворов полисахаридов имеют отрицательное отклонение от аддитивности, что позволяет предположить сильные межмолекулярные взаимодействия в результирующих макро клубках. В Na-ацетатно буферных растворах наблюдаются преимущественно положительные отклонения предельного числа вязкости, что свидетельствует о предпочтительном взаимодействии полимер–растворитель и однородных контактах полимер–полимер по сравнению с разнородными взаимодействиями ГХ·ХТЗ–ГМ, что позволяет предположить кинетическую нестабильность смесевой системы.

Изучена реокинетика гелеобразования многокомпонентной полисахаридсодержащей смеси методом динамической реологии. Показано изменение характера течения в процессе гелеобразования многокомпонентной полисахарид-содержащей смеси и формирование структурированных систем с более прочными сетками для образцов гидрогелей на основе ГХ·ХТЗ-200, чем на основе ГХ·ХТЗ-38.

Определены наилучшие составы смесевой композиции на основе ГХ·ХТЗ-200 с высокой скоростью гелирования при температуре живого организма 0.9–1.8 мин, на дермальной поверхности 2.5–3.0 мин, на модельной раневой поверхности 3.5–4.0 мин.

Исследование биологических свойств показало, что образующиеся биосовместимые монокристаллические покрытия с высокой дермо- и мукоадгезией обладают бактериостатическим, гемостатическим и ранозаживляющим действиями.



### Список используемых источников

1. Yang J., Wang S. Polysaccharide-based multifunctional hydrogel bioadhesives for wound healing: A review //Gels. – 2023. – Т. 9, №. 2. – С. 138.
2. Cai J. et al. Application of polymer hydrogels in the prevention of postoperative adhesion: A review //Gels. – 2023. – Т. 9, №. 2. – С. 98.
3. Zhou N. et al. Konjac glucomannan: A review of structure, physicochemical properties, and wound dressing applications //J. Appl. Polym. Sci. – 2022. – Т. 139, №. 11. – С. 51780.
4. Thirupathi K. et al. Update on chitosan-based hydrogels: preparation, characterization, and its antimicrobial and antibiofilm applications //Gels. – 2022. – Т. 9, №. 1. – С. 35.
5. Jiang Y. et al. Controlled release of silver ions from AgNPs using a hydrogel based on konjac glucomannan and chitosan for infected wounds //Int. J. Biol. Macromol. – 2020. – Т. 149. – С. 148–157.
6. Yuan Y. et al. Nano-silver functionalized polysaccharides as a platform for wound dressings: A review // Int. J. Biol. Macromol. – 2022. – Т. 194. – С. 644–653.
7. Devaraj R.D. et al. Health-promoting effects of konjac glucomannan and its practical applications: A critical review //Int. J. Biol. Macromol. – 2019. – Т. 126. – С. 273–281.
8. Yuan Z. et al. A cellulose/konjac glucomannan-based macroporous antibacterial wound dressing with synergistic and complementary effects for accelerated wound healing // Cellulose. – 2021. – Т. 28. – С. 5591–5609.
9. Gao S., Guo J., Nishinari K. Thermoreversible konjac glucomannan gel crosslinked by borax // Carbohydr. Polym. – 2008. – Т. 72, №2. – С. 315–325

10. Guo L. et al. Chitosan hydrogel, as a biological macromolecule-based drug delivery system for exosomes and microvesicles in regenerative medicine: A mini review //Cellulose. – 2022. – Т. 29, №. 3. – С. 1315–1330.
11. Gegel N.O. et al. Influence of chitosan ascorbate chirality on the gelation kinetics and properties of silicon-chitosan-containing glycerohydrogels //Polymers. – 2018. – Т. 10, №. 3. – С. 259.
12. Kulicke W.M., Clasen C. Viscosimetry of polymers and polyelectrolytes. – Berlin : Springer, 2004. – С. 139.
13. Сулейменов И.Э. и др. Обобщенная форма соотношения Фуосса для вязкости полиэлектролитов в солевых растворах сложного состава //Высокомолекулярные соединения.. – 2005. – Т. 47, №. 10. – С. 1841-1853.