

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ КОМПОЗИЦИИ ХИТОЗАН/β-ГЛИЦЕРОФОСФАТ

В.С. Пыжов, Е.О. Бахрушина

ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России

Поступила в редакцию 27.12.2024 г.

Аннотация. *In situ* системы направленной доставки лекарственных средств с полимерами природного происхождения, выступающими в качестве стимулочувствительной матрицы, являются активно развивающимися в наше время направлением биофармацевтической разработки. Одним из наиболее активно исследуемых полимеров в контексте *in situ* систем является деацетилированное производное хитина – хитозан (Хт), который зарекомендовал себя как высокоэффективный при низких концентрациях гелеобразователь. Однако, для создания стимулочувствительных систем на основе хитозана необходима либо модификация молекулы полимера, либо введение в гидрогель на его основе сшивающих агентов. Целью настоящего исследования стали разработка и исследование *in situ* системы Хт/β-глицерофосфат (β-ГФ) со способностью к термочувствительному переходу при физиологической температуре (37–38 °С), а также исследование зависимости скорости гелеобразования полученного раствора от процентного соотношения Хт:β-ГФ в композиции. В ходе экспериментальной работы были разработаны образцы термочувствительной композиции на основе хитозана путем добавления к водному раствору ацетатной соли исследуемого биополимера биосовместимого сшивающего агента – β-глицерофосфата, который стабилизирует гидрогель хитозана при нейтральном pH и придает композиции термочувствительные свойства в физиологическом диапазоне температур. Были получены и исследованы реологическими методами *in situ* системы Хт/β-ГФ с концентрациями хитозана 2% и сшивающего агента – от 3% до 5%. По результатам предварительного скрининга было установлено, что при значениях pH ниже 7,0 система Хт/β-ГФ не демонстрирует термочувствительного перехода, а при повышении температуры происходит осаждение хитозана из раствора. Испытуемые образцы со значениями pH выше 7 демонстрировали термочувствительный переход в диапазоне температур от 37 °С. Данная композиция была исследована на ротационном вискозиметре Lamy Rheology RM200 с коаксиальными цилиндрами.

Ключевые слова: хитозан, термочувствительные полимеры, *in situ* системы, бета-глицерофосфат, вискозиметрия, ротационный вискозиметр

Согласно современным тенденциям в области биофармацевтической разработки всё более актуальным становится создание стимулочувствительных систем на основе природных полимеров. Одним из представителей подобных биополимеров является хитозан - деацетилированное производное хитина, являющееся вторым по распространенности природным полимером после целлюлозы. Его преимуществами для разработки лекарственных систем направленной доставки являются биосовместимость, биоразлагаемость, высокая мукоадгезивность, собственная антимикробная активность и др [1–3].

Структура элементарных звеньев хитозана (Хт) – поли [β-(1→4)-2-амино-2-дезоксид-глюкана], включающая аминогруппы и гидроксигруппы, определяет возможность создания на его основе стимулочувствительных гидрогелей, в частности pH- и термочувствительных, биосовместимых с тканями живого организма. Хитозан, являясь аминополисахаридом с большим количеством свободных аминогрупп, относится к катионным гелеобразователям и растворяется в воде только в присутствии кислот. Как показывает одно из наших исследований, хитозан способен сохранять стабильный гидрогель вблизи значений pH 6,2–6,3, однако при превышении данных значений он выпадает в виде гидратированного гелеобразного осадка. То же самое происходит,

если хитозановые гидрогели нагревать до физиологической температуры тела человека при заданных значениях pH. Данные характеристики хитозановых гидрогелей подразумевают, что гидрогелевые композиции на основе хитозановых солей с органическими/минеральными кислотами не способны к стимулочувствительному переходу. Следовательно, для создания термочувствительной *in situ* системы на основе хитозана необходимы либо химическая дериватизация молекулы биополимера, либо введение в его раствор сшивающих агентов [4].

Одним из наиболее исследованных и перспективных сшивающих агентов для получения термочувствительных хитозановых композиций, способных совершать фазовый раствор-гель переход при повышении температуры окружающей среды, выступает β -глицерофосфат (β -ГФ). β -ГФ, или глицерол-2-фосфат - это сопряженное основание фосфорного эфира глицерина, вещество, одобренное Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) для лечения дисбаланса фосфатного обмена у пациентов. Впервые данный сшивающий агент в сочетании с хитозаном был применен в 2000 году группой исследователей во главе с Chenite A [5].

β -ГФ в композиции с хитозаном выполняет несколько основополагающих функций:

1. Стабилизация хитозанового гидрогеля в диапазоне pH от 6,2 до 7,5;
2. Улучшение межцепочечного взаимодействия между молекулами хитозана за счет снижения электростатического отталкивания между ионизированными аминогруппами биополимера;
3. Сшивающее действие за счет электростатического притяжения между фосфатными группами β -ГФ и заряженными аминогруппами хитозана. [6–10]

В совокупности за счет вышеперечисленных факторов введение β -ГФ в раствор хитозана ведет к образованию стабильной системы, способной к термочувствительному переходу, так как при повышении температуры до физиологической человека в композиции Хт/ β -ГФ происходит образование стабильной гелевой сети [11–15]. Характер взаимодействия хитозана с бета-глицерофосфатом продемонстрирован на Рисунке 1.

Целью настоящего исследования стало изучение *in situ* системы Хт/ β -ГФ со способностью к термочувствительному переходу при физиологической температуре (37–38 °C), а также исследование реологических свойств полученной композиции.

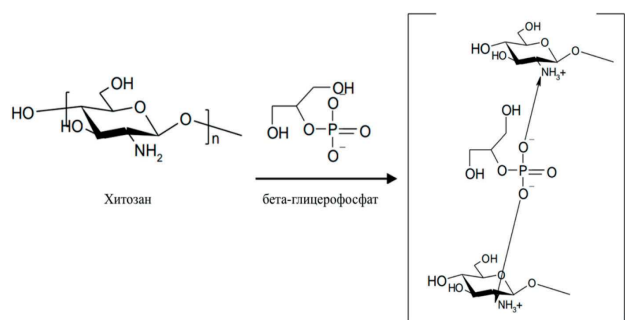


Рис. 1. Взаимодействие хитозана с β -глицерофосфатом.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для проведения исследования по разработке термочувствительной композиции в качестве исходных материалов были взяты: хитозан (в форме ацетатной соли) с молекулярной массой 70–80 кДа и степенью деацетилирования 90% (ООО «Биопрогресс», Россия), натрия бета-глицерофосфат пентагидрат (ООО ТД «ХИММЕД»).

Для исследования была получена серия водных гидрогелей состава хитозан– β -глицерофосфат со значениями pH от 7,1 до 7,3. Значения pH полученных растворов устанавливались потенциометрически с помощью pH-метра OHAUS starter 2100 pH bench. Концентрация хитозана во всех образцах была равна 2% (400 мг хитозана в 20 мл конечного раствора), что соответствует концентрации активных (деацетилированных) аминогрупп равной 0,110 М. Натрия бета-глицерофосфат пентагидрат растворялся в воде очищенной в количестве соответствующем 50%-й концентрации бета-глицерофосфата в водном растворе.

Для получения испытуемых растворов к водному раствору хитозана при температуре 4 °C, при постоянном перемешивании и при потенциометрическом контроле pH по каплям добавлялся 50%-й раствор β -ГФ до достижения значений pH 6,8; 6,9; 7,0; 7,1; 7,2; 7,3. Объем получаемых растворов доводили водой очищенной таким образом, чтобы конечная концентрация хитозана в композиции соответствовала 2%. Полученные образцы далее выдерживались в течение суток в холодильной камере при температуре 2–8 °C.

Далее проводилась скрининговая оценка свойств полученных гидрогелей по показателям стабильности гидрогелей (оценка синерезиса), способности к термочувствительному переходу, времени и температуры термочувствительного перехода.

Образцы, удовлетворяющие поставленной цели исследования далее изучались с помощью метода ротационной вискозиметрии с помощью ротацион-

ного вискозиметра Lamy Rheology RM200 (Lamy, France) для точной оценки температуры и времени термочувствительного перехода, а также исследования характеристик вязкости и упругости полученных гидрогелей в зависимости от температуры и степени их деформации.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе оценки свойств полученных испытуемых образцов водных растворов Хт/β-ГФ по результатам предварительного скрининга было установлено, что при значениях рН выше 6,5 и ниже 7,0 исследуемая система не является термочувствительной, и при повышении температуры происходит осаждение хитозана из раствора. Данное явление может объясняться дефицитом бета-глицерофосфата в композиции, вследствие чего при повышении температуры раствора молекулы хитозана в растворе не способны образовать стабильную сетку геля при самоагрегации.

Испытуемые образцы со значениями рН выше 7 демонстрировали термочувствительный переход в диапазоне температур от 37 °С до 42 °С.

Температура и время раствор-гель перехода для каждого из испытуемых образцов измерялись не менее 3 раз. В Таблице 1 отражены результаты скрининговых исследований для композиций с рН 7,1–7,3.

По результатам первичного скрининга наиболее удовлетворяющей целям исследования является композиция Хт/β-ГФ с рН 7,3, которая продемонстрировала быстрый термочувствительный переход при температуре 37–38 °С. Далее эта композиция исследовалась на ротационном вискозиметре с коаксиальными цилиндрами. На Рисунке 2 представлен термочувствительный переход гидрогелевой композиции Хт/β-ГФ с рН 7,3.

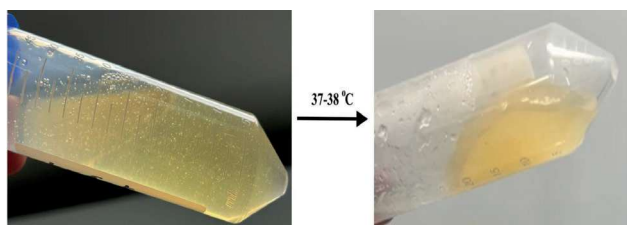


Рис. 2. Термочувствительный переход в композиции Хт/β-ГФ.

Результаты анализа композиции Хт/β-ГФ с рН 7,3 на ротационном вискозиметре с коаксиальными цилиндрами представлены на рисунках 3 и 4.

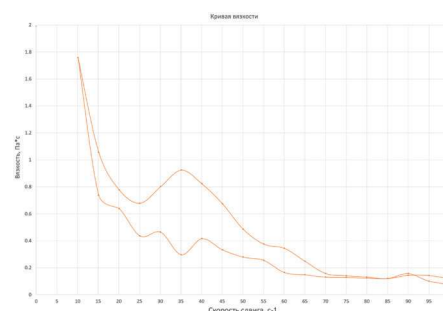


Рис. 3. Кривая вязкости гидрогеля с рН 7,3 при температуре 25,6 °С.



Рис. 4. Зависимость вязкости гидрогеля с рН 7,3 от температуры.

Приведенные графики демонстрируют реологические свойства испытуемого образца с рН 7,3. В температурном диапазоне до 35 °С водный раствор Хт/β-ГФ показывает характерное для гидрогелей поведение при воздействии на них упругой деформации, что подтверждается наличием на рисунке 3 петли гистерезиса, свойственной для вязкоупругих тел [16, 17].

График на рисунке 4 показывает, что при повышении температуры до 37–38 °С гидрогель Хт/β-ГФ претерпевает термочувствительный переход раствор-гель с резким повышением вязкости системы. При этом с дальнейшим повышением температуры вязкость системы значительно снижается, что может быть объяснено температурно-индуцированным синерезисом гидрогеля вследствие усиления гидрофобного взаимодействия между молекулами хитозана и активного удаления воды из его гелевой сети [18–20].

Таблица 1

Скрининговые исследования экспериментальных композиций Хт/β-ГФ

рН	Температура раствор-гель перехода (°С)	Время раствор-гель перехода (мин)
7,1 (N=3)	40–41	± 20
7,2 (N=3)	39–40	± 13
7,3 (N=3)	37–38	± 5–7

ВЫВОДЫ

По результатам выполненной работы была получена стабильная гидрогелевая композиция на основе хитозана и бета-глицерофосфата со значением pH, соответствующим физиологическому, способная к термочувствительному переходу при температуре тела человека (37–38 °C). В ходе работы была выявлена и исследована зависимость термочувствительности систем ХТ/β-ГФ от pH и температуры, посредством анализа на ротационном вискозиметре с коаксиальными цилиндрами были установлены реологические свойства испытуемого образца с pH 7,3, а также выявлен наиболее подходящий для дальнейшей разработки состав композиции ХТ/β-ГФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Bakhrushina E.O. *In situ* Intranasal Delivery Systems: Application Prospects and Main Pharmaceutical Aspects of Development (Review)/ E. O. Bakhrushina, N. B. Demina, M. M. Shumkova, P. S. Rodyuk, D. S. Shulikina, I. I. Krasnyuk // *Drug development & registration*. – 2021. – Vol. 10. – № 4. – P. 54-63.
2. Abourehab M.A.S. Recent Advances of Chitosan Formulations in Biomedical Applications/ M. A. S. Abourehab, S. Pramanik, M. A. Abdelgawad, B. M. Abualsoud, A. Kadi, M. J. Ansari, A. Deepak // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 18. – P. 10975.
3. Bhattarai N., Gunn J., Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2010. – Vol. 62. – № 1. – P. 83–99.
4. Pyzhov V.S., Vlasova D.M., Bakhrushina E.O. Results of research of thermosensitive properties of compositions based on chitosan lactate // *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. – 2024. – P. 3-10.
5. Chenite A. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ / A. Chenite, C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M. D. Buschmann, C. D. Hoemann, J. C. Leroux, B. L. Atkinson, F. Binette, A. Selmani // *Biomaterials*. – 2000. – Vol. 21. – № 21. – P. 2155-2161.
6. Ruel-Gariépy E. A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel / E. Ruel-Gariépy, M. Shive, A. Bichara, M. Berrada, D. Le Garrec, A. Chenite, J.-C. Leroux // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2004. – Vol. 57. – № 1. – P. 53-63.
7. Crompton K.E. Morphology and gelation of thermosensitive chitosan hydrogels / K. E. Crompton, R. J. Prankerd, D. M. Paganin, T. F. Scott, M. K. Horne, D. I. Finkelstein, K. A. Gross, J. S. Forsythe // *Biophysical Chemistry*. – 2005. – Vol. 117. – № 1. – P. 47-53.
8. Ruel-Gariépy E. Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs / E. Ruel-Gariépy, A. Chenite, C. Chaput, S. Guirguis, J.-C. Leroux // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2000. – Vol. 203. – № 1–2. P. 89–98.
9. Kim S. A chitosan/β-glycerophosphate thermosensitive gel for the delivery of ellagic acid for the treatment of brain cancer / S. Kim, S. K. Nishimoto, J.D. Bumgardner, W. O. Haggard, M. W. Waleed, Y. Yang // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31. – № 14. – P. 4157-4166.
10. Liu X. A novel thermo-sensitive hydrogel based on thiolated chitosan/hydroxyapatite/beta-glycerophosphate / X. Liu, Y. Chen, Q. Huang, W. He, Q. Feng, B. Yu // *Carbohydrate Polymers*. – 2014. – Vol. 110. – P. 62-69.
11. Cho J. Chitosan and glycerophosphate concentration dependence of solution behaviour and gel point using small amplitude oscillatory rheometry / J. Cho, M.-C. Heuzey, A. Bégin, P. J. Carreau // *Food Hydrocolloids*. – 2006. – Vol. 20. – № 6. – P. 936-945.
12. Bhuiyan M. H., Clarkson A. N., Ali M. A. Optimization of thermoresponsive chitosan/β-glycerophosphate hydrogels for injectable neural tissue engineering application // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2023. – Vol. 224. – P. 113193.
13. Asfour M. H. Chitosan/β-glycerophosphate in situ forming thermo-sensitive hydrogel for improved ocular delivery of moxifloxacin hydrochloride / M. H. Asfour, S. H. Abd El-Alim, G. E. A. Awad, A. A. Kassem // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021. – Vol. 167. – P. 106041.
14. Wang L., Stegmann J. P. Thermogelling chitosan and collagen composite hydrogels initiated with β-glycerophosphate for bone tissue engineering // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31. – № 14. – P. 3976-3985.
15. Song K. Characterization of human adipose tissue-derived stem cells in vitro culture and in vivo differentiation in a temperature-sensitive chitosan/β-glycerophosphate/collagen hybrid hydrogel / K. Song, L. Li, X. Yan, W. Zhang, Y. Zhang, Y. Wang, T. Liu // *Materials Science and Engineering: C*. – 2017. – Vol. 70. – P. 231-240.
16. Renaud M., Belgacem M.N., Rinaudo M. Rheological behaviour of polysaccharide aqueous solutions // *Polymer*. – 2005. – Vol. 46. – № 26. – P. 12348-12358.

17. Lamberti G. Injectable Chitosan/B-Glycerophosphate System for Sustained Release: Gelation Study, Structural Investigation, and Erosion Tests / G. Lamberti, D. Larobina, A. Dalmoso, M. Abrami, B. Galzerano, S. Boichichio, A. Barba, M. Grassi // *Current Drug Delivery*. – 2016. – Vol. 13. – № 999. – P. 216–223.

18. Aliaghaei M. Investigation of gelation mechanism of an injectable hydrogel based on chitosan by rheological measurements for a drug delivery application / M. Aliaghaie, H. Mirzadeh, E. Dashtimoghadam, S. Taranejoo // *Soft Matter*. – 2012. – Vol. 8. – № 27. – P. 7128–7137.

19. Lavertu M., Filion D., Buschmann M. D. Heat-Induced Transfer of Protons from Chitosan to Glycerol Phosphate Produces Chitosan Precipitation and Gelation // *Biomacromolecules*. – 2008. – Vol. 9. – № 2. – P. 640–650.

20. Niranjana R. A novel injectable temperature-sensitive zinc doped chitosan/ β -glycerophosphate hydrogel for bone tissue engineering / R. Niranjana, C. Koushik, S. Saravanan, A. Moorthi, M. Vairamani, N. Selvamurugan // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2013. – Vol. 54. – № 1. – P. 24–29.

Институт фармации им. А.П. Нелюбина,
ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова

*Пыжов Виктор Сергеевич, аспирант кафедр
фармацевтической технологии

E-mail: pyzhov_v_s@student.sechenov.ru

A.P. Nelyubin Institute of Pharmacy, I.M.
Sechenov First Moscow State Medical University

*Pyzhov Victor S., postgraduate student,
Department of Pharmaceutical Technology

E-mail: pyzhov_v_s@student.sechenov.ru

Бахрушина Елена Олеговна, доцент кафедры
фармацевтической технологии

E-mail: bakhrushina_e_o@staff.sechenov.ru

Bakhrushina Elena O., PhD., Associate Professor,
Department of Pharmaceutical Technology

E-mail: bakhrushina_e_o@staff.sechenov.ru

DEVELOPMENT AND RESEARCH OF A THERMO-SENSITIVE SYSTEM FOR DRUG DELIVERY ON THE BASIS OF CHITOSAN/B-GLYCEROPHOSPHATE COMPOSITE

V.S. Pyzhov, E.O. Bakhrushina

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

Abstract. In situ systems of targeted drug delivery with naturally occurring polymers acting as stimulus-sensitive matrix are an actively developing trend in biopharmaceutical development. One of the most actively investigated polymers in the context of in situ systems is a deacetylated chitin derivative, chitosan (Cht), which has proven to be a highly effective gelator at low concentrations. However, the creation of chitosan-based stimuli-sensitive systems requires either modification of the polymer molecule or the introduction of cross-linking agents into the chitosan-based hydrogel. The aim of the present study was the development and analysis of an in situ system of Cht/ β -glycerophosphate (β -GP) with the capability of thermosensitive transition at physiological temperature (37–38 °C), as well as the study of the dependence of the gelation rate of the obtained solution on the percentage ratio of Cht: β -GP in the composition. In the course of experimental work, samples of thermosensitive composition based on chitosan were developed by adding to an aqueous solution of acetate salt of the biopolymer under study a biocompatible crosslinking agent - β -glycerophosphate, which stabilises chitosan hydrogel at neutral pH and gives the composition thermosensitive properties in the physiological temperature range. Xt/ β -GP systems with chitosan concentrations of 2% and crosslinking agent concentrations of 3% to 5% were prepared and investigated by rheological methods. Preliminary screening results showed that at pH values below 7.0, the Cht/ β -GP system did not demonstrate a temperature-sensitive transition, and as the temperature increased, chitosan precipitated out of solution. The tested samples with pH values above 7 showed a thermosensitive transition in the temperature range from 37 °C to 42 °C. The Xt/ β -GP composition with a pH of 7.3, which demonstrated the fastest thermosensitive transition at 37–38 °C, best met the objectives of the study. This composition was investigated on a Lamy Rheology RM200 rotational viscometer with coaxial cylinders.

Keywords: chitosan, thermosensitive polymers, *in situ* systems, beta-glycerophosphate, viscosimetry, rotational viscometer