

Самченко Ю. М., Долинський Г. А., Пасмурцева Н. О.,
Полторацька Т. П., Ульберг З. Р., Гамалія М. Ф.

ГІДРОГЕЛЕВІ НАНОКОМПОЗИТИ ДЛЯ ТЕРМОІНІЦІЙОВАНОГО ВИВІЛЬНЕННЯ ФОТОСЕНСИБІЛІЗАТОРІВ

Методами абсорбційної спектроскопії і спектрофлуориметрії вивчено гідрогелеві нанокompозити на основі N-ізопропілакриламиду, що були насичені розчинами фотосенсибілізаторів фотосенсу або метиленового синього. При нагріванні від 20 до 37 °C і до 60 °C спостерігалася десорбція фотосенсибілізаторів із гідрогелю в розчин Хенкса, опромінення якого червоним світлом у діапазоні «вікна прозорості» біологічних тканин супроводжувалося дозозалежною продукцією синглетного кисню. Зроблено висновок про перспективність застосування запропонованої гідрогелевої композиції як терموкерованої платформи для доставки фотосенсибілізаторів при проведенні фотодинамічної терапії.

Ключові слова: гідрогелевий нанокompозит, N-ізопропілакриламід, лапоніт, термоініційована дифузія, фотосенсибілізатори.

Вступ

Розробка систем доставки лікарських засобів із контрольованими параметрами – один з важливих напрямів сучасної фармакології, що дає змогу значно підвищити ефективність уже відомих фармакопрепаратів за рахунок селективності дії і заданої швидкості надходження ліків у тканини й органи [1]. Особливий інтерес становлять системи керованого транспорту хіміопрепаратів для онкології, оскільки вважається, що вони можуть істотно понизити токсичність і забезпечити таргетність протипухлинної терапії [2]. Контрольована фармакокінетика матиме безперечні переваги, насамперед, для такого новітнього методу лікування, як фотодинамічна терапія, коли потрібне оптимальне співвідношення вмісту в тканині фотосенсибілізатора і дози світлового випромінювання, що зумовлює цитотоксичність унаслідок утворення активних форм кисню [3].

Перспективним убачається створення так званих «розумних» гідрогелів, які здатні різко й прогнозованим чином змінювати свої фізико-хімічні параметри (ступінь набухання, пористість, дифузійну проникність тощо) під впливом незначних змін у навколишньому середовищі [4]. Найширше досліджено термочутливі гідрогелі на основі N-ізопропілакриламиду (НІПАА), які за кімнатної температури перебувають у розгорненій гідратованій конфігурації із сорбованими за рахунок водневих зв'язків значними кількостями води, а при нагріванні

переходять у компактний дегідратований стан [5]. Фазовий перехід між набряклим і сколапсованим станом при підвищенні температури зумовлений посиленням гідрофобних взаємодій між ізопропіловими групами і руйнуванням водневих зв'язків [6]. Зона фазового переходу зазначених гідрогелів (32 °C) близька до температури людського тіла і може зсуватися до вищих або нижчих температур шляхом співполімеризації з гідрофільними або гідрофобними мономерами відповідно [7], що дає змогу використовувати їх для створення терморегульованої системи доставки лікарських препаратів, зокрема фотосенсибілізаторів.

Переважаючі гідрогелі на основі НІПАА отримують шляхом хімічного зшивання з використанням органічного зшивачого агента (наприклад, N,N-метиленбісакриламиду) [8]. Таким гідрогелям притаманні чіткий фазовий перехід і проста синтезу, але й деякі істотні недоліки, що обмежують їх застосування, наприклад, втрата прозорості при зміні частоти зшивання чи температури [9]. Крім того, хімічно зшитим гідрогелям на основі НІПАА бракує механічної міцності [10], у них відносно низька величина рівноважного ступеня набухання у воді і низька швидкість відгуку на зміни в навколишньому середовищі, насамперед швидкість переходу в сколапсований стан [11; 12]. Зазначених недоліків можна уникнути за допомогою методу синтезу, запропонованого нещодавно Харагучи [13]: цей метод полягає у фізичному зшиванні НІПАА з використанням наночасток лапоніту (гекториту). Отриманий

гідрогель характеризується такими властивостями, як оптична прозорість (гомогенність), механічна міцність та еластичність, а також високий ступінь набухання і підвищена швидкість переходу в сколапсований стан [14].

З огляду на викладене, метою цієї роботи було вивчення можливості використання отриманих методами хімічного і фізичного зшивання гідрогелевих нанокompatитів як платформи терморегульованої доставки фотосенсибілізаторів для фотодинамічної терапії.

Матеріали і методи

Для синтезу гідрогелевих нанокompatитів використовували N-ізопропілакриламід (97 %, Sigma-Aldrich, USA), який перекристалізували з гексану і сушили під вакуумом. Синтез гідрогелів на основі НІПАА здійснювали шляхом радикальної полімеризації у водному розчині, за температури близько 0 °С (охолодження на льодяній бані), в атмосфері азоту. Концентрацію мономера в композиції змінювали в діапазоні від 8 до 20 мас. %. У випадку ковалентно зшитих гідрогелів концентрацію зшиваючого агента – N,N-метиленбісакриламиду (МБА, 98 %, Merck, Germany) варіювали в діапазоні від 0,1 до 0,2 мас. %. При отриманні фізично зшитих гідрогелів як наповнювач використовували лапоніт RD (Conservation Resources International LLC, UK), вміст якого варіювали від 0,678 до 6,78 мас. %. Наважку лапоніту диспергували у водному розчині НІПАА та компонентів ініціюючої суміші (N,N,N'-тетраметилетилендіамін піросульфат натрію, 99 %, Merck, USA; амоній персульфат, 98 %, Sigma-Aldrich, USA) шляхом витримання на ультразвуковій бані протягом 5 хв, після чого композицію продували азотом за температури близько 0 °С і поміщали для проведення полімеризації між двома скляними скельцями, розділеними спейсерами заданої товщини. Через одну добу скельця рознімали й утворений нанокompatит відмивали від непрореагованих залишків шляхом екстракції у воді протягом трьох діб.

Зразки гелю у вигляді дисків масою $1,5 \pm 0,2$ мг витримували протягом однієї доби за температури 5 °С у водних розчинах фотосенсибілізаторів: фотосенс 0,2 % (НІОПК, Росія), метиленовий синій 0,025 % і 0,05 % (Новохім, Україна). Для оцінки сорбційної здатності гідрогелю використовували 1,5 мМ розчини обох фотосенсибілізаторів і реєстрували зміну їхньої концентрації в процесі насичення. Дифузію фотосенсибілізаторів спостерігали, приміщуючи насичені зразки

після промивання 1,2 % NaCl в розчин Хенкса за температури 20 °С, 37 °С і 60 °С. Отримані впродовж 1 год при 37 °С проби опромінювали червоним світлом некогерентного джерела LC-122M (LumaCare, USA), $\lambda_{ex} = 660 \pm 10$ нм, попередньо додаючи до них специфічний флуоресцентний індикатор синглетного кисню Singlet Oxygen Sensor Green (Molecular Probes, USA) до кінцевої концентрації 1 мкМ, і проводили вимірювання інтенсивності флуоресценції за допомогою спектрофлуориметра ND-3200 (NanoDrop, USA) після досягнення експозиційної дози 1 Дж/см², 2 Дж/см², 5 Дж/см² і 10 Дж/см².

Концентрацію фотосенсибілізаторів визначали за допомогою спектрофотометра ND-1000 (NanoDrop, USA) відповідно до значень екстинкції калібрувальних кривих, отриманих серійними розведеннями їхніх вихідних розчинів.

Статистичну обробку даних проводили засобами Пакету аналізу Microsoft® Office Excell 2013.

Результати та їх обговорення

Синтезовані нами гідрогелеві нанокompatити (як хімічно, так і фізично зшиті) відрізнялися чітким фазовим переходом між набухлим і сколапсованим станом за температури близько 32 °С, що притаманно гідрогелям на основі НІПАА (рис. 1).

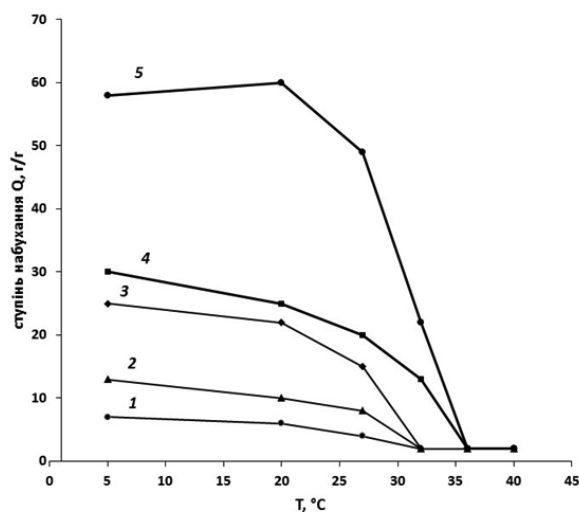


Рис. 1. Температурна залежність рівноважного ступеня набухання гідрогелів на основі НІПАА ($C_{\text{НІПАА}} = 16\%$) з різним вмістом МБА ($C_{\text{МБА}}$) і лапоніту ($C_{\text{лап}}$):
 1 – $C_{\text{МБА}} = 0,94\%$, $C_{\text{лап}} = 0\%$;
 2 – $C_{\text{МБА}} = 0,24\%$, $C_{\text{лап}} = 0\%$;
 3 – $C_{\text{МБА}} = 0\%$, $C_{\text{лап}} = 5,42\%$;
 4 – $C_{\text{МБА}} = 0\%$, $C_{\text{лап}} = 2,02\%$;
 5 – $C_{\text{МБА}} = 0\%$, $C_{\text{лап}} = 0,678\%$

Відзначимо, що фізично зшиті гідрогелі (криві 3–5) у набухлому стані мали значно більший

(у 5–10 разів) рівноважний ступінь набухання, ніж ковалентно зшиті (криві 1 та 2), і, відповідно, вищі інтенсивності фазового переходу. Зі збільшенням концентрації МБА та лапоніту рівноважний ступінь набухання прогнозованим чином зменшувався.

Придатність гідрогелів для термоініційованого вивільнення сорбованих лікарських засобів визначається швидкістю їх переходу з набряклого в сколапсований стан при нагріванні в якомога вужчому (і разом з тим фізіологічно прийнятному) температурному діапазоні. Між гідрогелями, отриманими шляхом хімічного і фізичного зшивання, спостерігалася істотна відмінність кінетики колапсу при нагріванні в інтервалі температури фазового переходу (рис. 2).

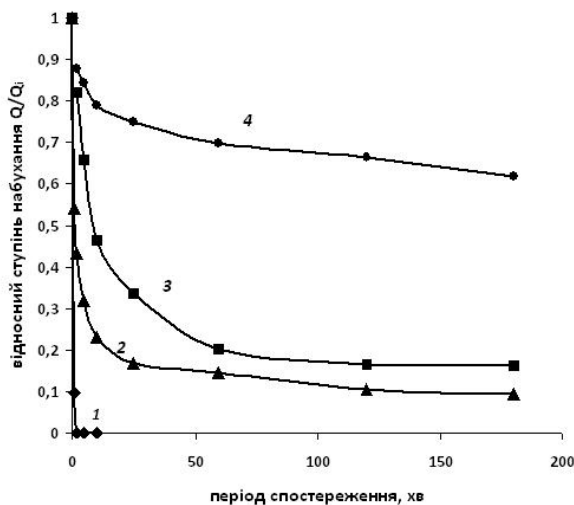


Рис. 2. Кінетика колапсу при нагріванні в температурному діапазоні від 29 до 40 °С гідрогелів на основі НІПАА ($C_{\text{НІПАА}} = 10\%$) з різним вмістом МБА ($C_{\text{МБА}}$) і лапоніту ($C_{\text{лап}}$):

- 1 – $C_{\text{МБА}} = 0\%$, $C_{\text{лап}} = 0,678\%$;
- 2 – $C_{\text{МБА}} = 0\%$, $C_{\text{лап}} = 3,97\%$;
- 3 – $C_{\text{МБА}} = 0\%$, $C_{\text{лап}} = 6,39\%$;
- 4 – $C_{\text{МБА}} = 0,125\%$, $C_{\text{лап}} = 0\%$

Гідрогелеві нанокompозити з лапонітом колапсували значно швидше. Так, після нагрівання від 29 до 35 °С втрата маси за 25 хв у випадку ковалентно зшитого НІПАА становила лише 22 %, тоді як у випадку нанокompозитів із вмістом лапоніту 3,97 % – вже 39 %, а при вмісті лапоніту 2,02 % – взагалі 91 %. При нагріванні від 29 до 40 °С втрата маси за 5 хв у випадку ковалентно зшитого НІПАА становила лише 15 %, тоді як у випадку нанокompозитів із вмістом лапоніту 3,97 % – вже 68 %, а рідкозшитий нанокompозит узагалі переходив у практично повністю дегідратований стан. Зазначені властивості термочутливих нанокompозитів відкривають перспективи

їх практичного застосування для керованого вивільнення сорбованих лікарських засобів шляхом безконтактного нагрівання до температури, вищої за точку фазового переходу. Наприклад, при додатковому інкорпоруванні магнетиту утворені ферогелеві системи можна розігрівати за допомогою змінного магнітного поля [15], а в разі інкорпорування плазмонно-резонансних наночастинок – шляхом інфрачервоного опромінення [16]. При такому безконтактному нагріванні забезпечуватиметься різкий колапс гелів і, як наслідок, інтенсивне вивільнення сорбованого в їхньому поровому просторі фармакопрепарату.

Нанокompозит на основі НІПАА з використанням лапоніту демонстрував значний концентруючий ефект щодо метиленового синього (рис. 3).

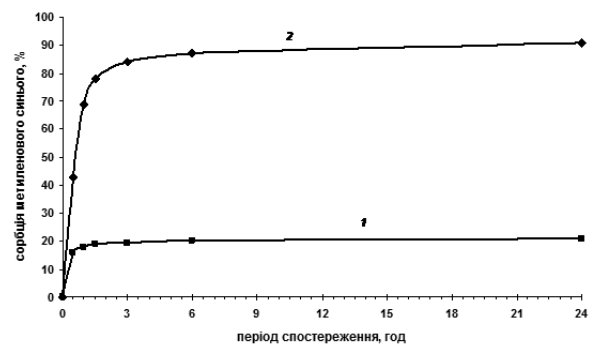


Рис. 3. Кінетика сорбції метиленового синього із 0,05 % водного розчину гідрогелями на основі НІПАА: 1 – ковалентно зшитим (НІПАА – 9,0 мас. %, МБА – 0,24 мас. %); 2 – фізично зшитим (НІПАА – 9,0 мас. %, лапоніт – 6,0 мас. %)

Протягом перших 30 хв сорбована ним кількість фотосенсибілізатора була приблизно в 3 рази більшою в порівнянні з ковалентно зшитим гідрогелем (43 % і 16 % відповідно), а протягом доби досягалася практично повна сорбція фізично зшитим нанокompозитом (91 % у порівнянні з 21 % у разі ковалентно зшитого гідрогелю). Очевидно, ця відмінність зумовлюється, насамперед, структурою наноповерхні (лапоніту), а саме сконцентрованими на його поверхні негативними зарядами [17] і їх взаємодією з N^+ фенотіазинового барвника.

З огляду на це, слід очікувати нелінійну залежність між концентраціями насичуючого розчину метиленового синього і вмістом його в середовищі після термоініційованої десорбції. Справді, насичені при вихідних концентраціях метиленового синього 0,025 % і 0,05 % зразки гідрогелю, які помістили в розчин Хенкса, продемонстрували суперпропорційний характер дифузії в температурному діапазоні від 20 до 37 °С (рис. 4).

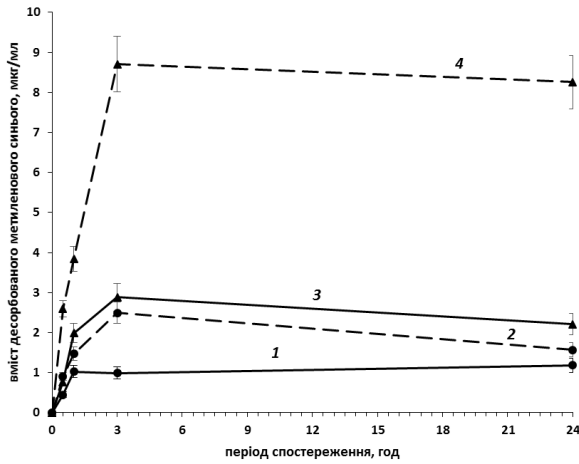


Рис. 4. Добова динаміка вмісту метиленового синього в розчині Хенкса після термоініційованої десорбції з гідрогелю, насиченого при різних концентраціях барвника:
 1 – 0,025 %, T = 20 °C; 2 – 0,025 %, T = 37 °C;
 3 – 0,05 %, T = 20 °C; 4 – 0,05 %, T = 37 °C

Здатність гідрогелевої композиції з лапонітом сорбувати метиленовий синій виявилася в 6 разів вищою ($P < 0,001$), ніж для фотосенсибілізатора фотосенсу, який не містить заряджених азотистих груп (рис. 5).

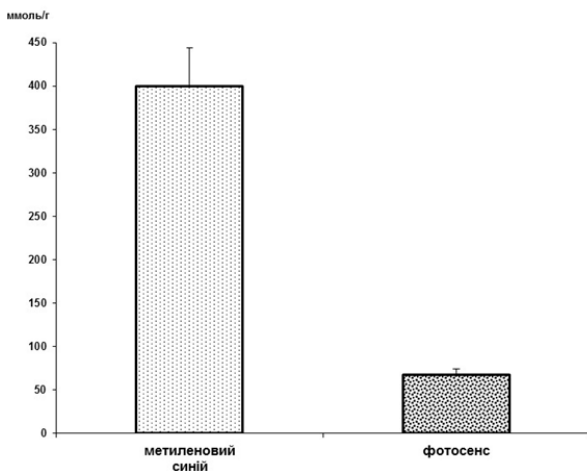
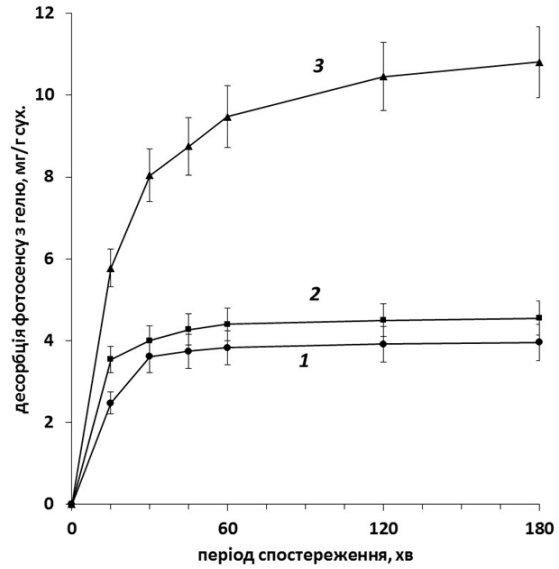
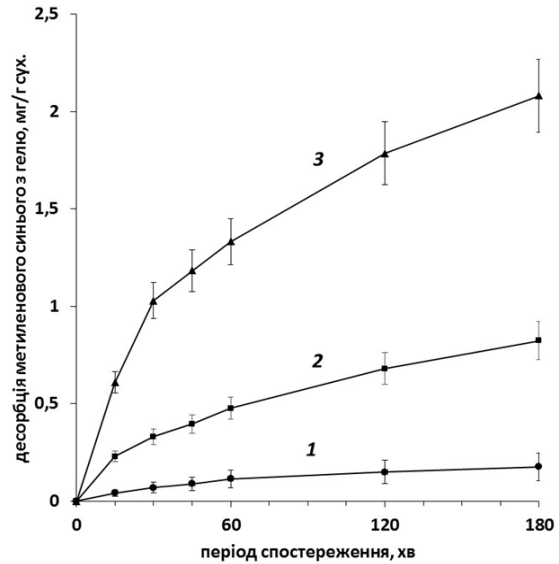


Рис. 5. Сорбція фізично зшитим гідрогелем (НПАА – 9,0 мас. %, лапоніт – 6,0 мас. %) метиленового синього та фотосенсу з їх 1,5 мМ водних розчинів

За умов більшої концентрації фотосенсу при насиченні гідрогелю його вивільнення після нагрівання також перевищувало відповідний рівень для метиленового синього, хоча відносний приріст дифузії був суттєво меншим, особливо в діапазоні температур 20–37 °C (рис. 6). Виділення фотосенсу здійснювалося значно швидше, ніж метиленового синього: рівень 50 % від кінцевої концентрації в розчині Хенкса досягався, відповідно, за 15 хв (рис. 6, а) і 45 хв (рис. 6, б). Отже, розроблюючи нанокомпозитний комплекс для



а



б

Рис. 6. Десорбція з фізично зшитого гідрогелю (НПАА – 9,0 мас. %, лапоніт – 6,0 мас. %) фотосенсу (а) та метиленового синього (б) за різних температур:
 1 – T = 20 °C; 2 – T = 37 °C; 3 – T = 60 °C

доставки лікарських засобів на основі фізично зшитого НПАА, обов'язково враховувати характер взаємодії сорбату з наповнювачем гідрогелевої композиції. На цьому підґрунті виникають додаткові можливості налаштування системи керованої фармакокінетики діючої речовини.

Оскільки первинним елементарним актом фотодинамічного ефекту є утворення синглетного кисню, ми провели тестування його продукції під впливом опромінення червоним світлом у пробах, отриманих після 1 год інкубації насичених фотосенсибілізаторами зразків у розчині Хенкса

при 37 °С, моделюючи таким чином умови застосування нанокompозитного носія в організмі (рис. 7).

для застосування під час проведення фотодинамічної терапії.

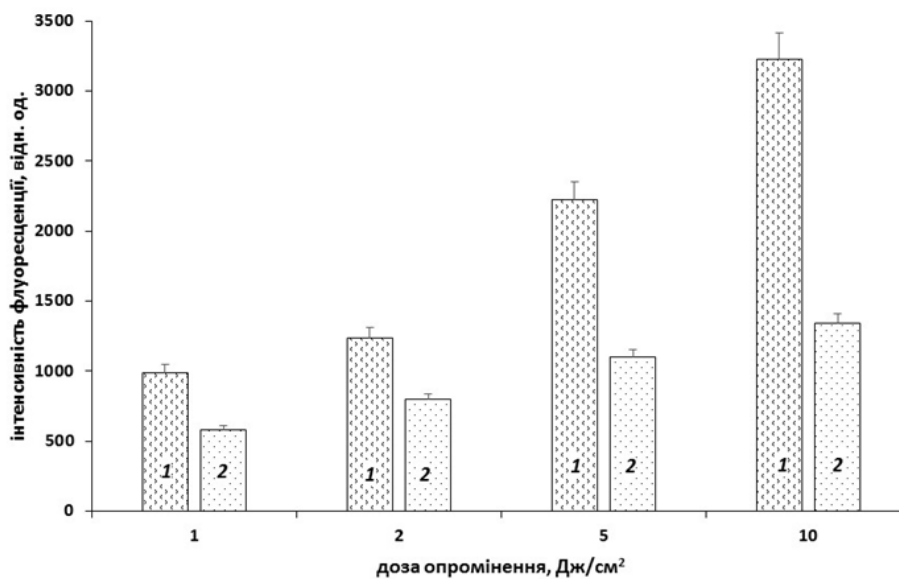


Рис. 7. Флуоресценція індикатора синглетного кисню після опромінення червоним світлом $\lambda_{\text{ex}} = 660 \pm 10$ нм проб, відібраних через 1 год десорбції фотосенсибілізаторів з гідрогелевого носія в розчин Хенкса при 37 °С: 1 – фотосенсу; 2 – метиленового синього

Вивільнення обох фотосенсибілізаторів з гідрогелю впродовж 1 год за температури тіла в розчин, близький за складом до інтерстиціальної рідини організму, було достатнім для забезпечення дозозалежної генерації синглетного кисню при опроміненні червоним світлом у діапазоні «вікна прозорості» біологічних тканин [18], що характеризує запропоновану термочутливу систему керованого транспорту лікарських засобів як перспективну

Висновки

Синтезована нами гідрогелева композиція НШАА з лапонітом, зважаючи на високу сорбційну ємність і термочутливу десорбцію, а також можливість варіювання параметрів її кінетики за рахунок афінності щодо діючої речовини, є перспективною платформою для дистантно регульованої доставки фотосенсибілізаторів під час фотодинамічної терапії.

Список літератури

1. Drug delivery systems: An updated review / G. Tiwari, R. Tiwari, B. Sriwastawa [et al.] // *Int. J. Pharm. Investig.* – 2012. – Vol. 2, № 1. – P. 2–11.
2. Prabhu R. H. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights / R. H. Prabhu, V. B. Patravale, M. D. Joshi // *Int. J. Nanomed.* – 2015. – Vol. 10. – P. 1001–1018.
3. Bugaj A. M. Targeted photodynamic therapy – a promising strategy of tumor treatment / A. M. Bugaj // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2011. – Vol. 10. – P. 1097–1109.
4. Samchenko Yu. Multipurpose smart hydrogel systems / Yu. Samchenko, Z. Ulberg, O. Korotych // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2011. – Vol. 168. – P. 247–262.
5. Shah N. Formulation and development of hydrogel for polyacrylamide-co-acrylic acid / N. Shah, K. R. Pate // *JPSBR.* – 2014. – Vol. 4, № 1. – P. 114–120.
6. Plate N. A. Lower critical solution temperature in aqueous solutions of N-alkyl-substituted polyacrylamides / N. A. Plate, T. L. Lebedeva, L. I. Valuev // *Polymer J.* – 1999. – Vol. 31. – P. 21–27.
7. Innovative antioxidant thermo-responsive hydrogels by radical grafting of catechin on inulin chain / U. G. Spizzirri, I. Altamari, F. Puoci [et al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2011. – Vol. 84. – P. 517–523.
8. Modeling of acrylamide/N,N'-methylenebisacrylamide solution co-polymerization / S. Lazzari, D. Pfister, V. Diederich [et al.] // *Ind. Eng. Chem. Res.* – 2014. – Vol. 53. – P. 9035–9048.
9. Franklin J. Additive-induced enhancement of optical clarity of polyacrylamide hydrogel / J. Franklin, Z. Y. Wang // *Chin. J. Polymer Sci.* – 2003. – Vol. 21, № 5. – P. 533–539.
10. Double Hydrogen-bonding pH-sensitive hydrogels retaining high-strengths over a wide pH range / H. Gao, N. Wang, X. Hu [et al.] // *Macromol. Rapid Commun.* – 2013. – Vol. 34. – P. 63–68.
11. Mandala B. Synthesis of interpenetrating network hydrogel from poly(acrylic acid-co-hydroxyethyl methacrylate) and sodium alginate: Modeling and kinetics study for removal of synthetic dyes from water / B. Mandala, S. K. Ray // *Carbohydr. Polym.* – 2013. – Vol. 98. – P. 257–269.
12. Samanta H. S. Synthesis, characterization, swelling and drug release behavior of semi-interpenetrating network hydrogels of sodium alginate and polyacrylamide / H. S. Samanta, S. K. Ray // *Carbohydr. Polym.* – 2014. – Vol. 99. – P. 666–678.

13. Haraguchi K. Effects of clay content on the properties of nanocomposite hydrogels composed of poly(N-isopropylacrylamide) and clay / K. Haraguchi, T. Takehisa, S. Fan // *Macromolecules*. – 2002. – Vol. 35. – P. 10162–10171.
14. Oxygen-controlled phase segregation in poly(N-isopropylacrylamide)/laponite nanocomposite hydrogels // H. Mauroy, Z. Rozynek, T.S. Plivelic [et al.] // *Langmuir*. – 2013. – Vol. 29. – P. 371–379.
15. Kumar C. S. S. R. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery / C. S. S. R. Kumar, F. Mohammad // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2011. – Vol. 63, № 9. – P. 789–808.
16. Multiple release kinetics of targeted drug from gold nanorod embedded polyelectrolyte conjugates induced by near-infrared laser irradiation / T.-R. Kuo, V. A. Hovhannisyanyan, Y.-C. Chao [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. – Vol. 132. – P. 14163–14171.
17. Poly(acrylamide/laponite) nanocomposite hydrogels: swelling and cationic dye adsorption properties / P. Li, Siddaramaiah, N. H. Kim [et al.] // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2009. – Vol. 111. – P. 1786–1798.
18. Influence of oxygen saturation on the optical scattering properties of human red blood cells in the spectral range 250 to 2000 nm / M. Friebe, J. Helfmann, U. Netz, M. Meinke // *J. Biomed. Optics*. – 2009. – Vol. 14, № 3. – P. 034001-1–034001-6.

Yu. Samchenko, G. Dolynskiy, N. Pasmurtseva, T. Poltoratska, Z. Ulberg, N. Gamaleia

HYDROGEL NANOCOMPOSITES FOR THERMOINITIATED RELEASE OF PHOTOSENSITIZERS

N-isopropylacrylamide based hydrogel nanocomposites loaded with photosensitizers photosens or methylene blue were studied by means of the absorption spectroscopy and spectrofluorimetry. Photosensitizers desorption out of the gel into Hank's Balanced Salt Solution during the heating was observed within the temperature ranges of 20 °C, 37 °C and 60 °C. Those samples irradiation with red light of the 'transparency window' band for biological tissues was followed by the dose-dependent singlet oxygen production. The availability of the proposed hydrogel composite exploiting as the temperature-controlled vehicle for the photosensitizers in photodynamic therapy was concluded.

Keywords: hydrogel nanocomposite, N-isopropylacrylamide, laponite, thermoinitiated diffusion, photosensitizers.

Матеріал надійшов 08.04.2015