

УДК 544.77

КОРОТИЧ О.І.¹, САМЧЕНКО Ю.М.¹, ПОЛТОРАЦЬКА Т.П.¹,
ЖОЛОБАК Н.М.², УЛЬБЕРГ З.Р.¹

КОМПЛЕКСНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ МАГНІТОЧУТЛИВИХ МІКРОГЕЛІВ З ІНКОРПОРОВАНИМ МАГНЕТИТОМ

Останнім часом в центрі уваги багатьох дослідників перебувають ферогелі – нанокомпозити на основі термочутливих гідрогелів з інкорпорованими магнітними частинками, які можуть бути використані для гіпертермії ракових пухлин та цільової доставки і контрольованого вивільнення лікарських препаратів. У даній роботі проведено дослідження рівноважного ступеня набухання гідрогеля як однієї з ключових характеристик, що безпосередньо впливає на швидкість сорбції води, проникність для лікарських препаратів, механічну міцність гелю та його біологічну сумісність, а також взаємозв'язок цього показника з іншими фізико-хімічними та біологічними параметрами. Встановлені оптимальні умови синтезу нанокомпозитів на основі термочутливих гідрогелів і показана можливість їх використання у медицині.

Ключові слова: рівноважний ступінь набухання гідрогелів, синтез нанокомпозитів

В последнее время в центре внимания многих исследователей находятся ферогели - нанокомпозиты на основе термочувствительных гидрогелей с инкорпорированными магнитными частицами, которые могут быть использованы для гипертермии раковых опухолей и целевой доставки и контролируемого высвобождения лекарственных препаратов. В данной работе проведено исследование равновесного степени набухания гидрогеля как одной из ключевых характеристик, которая непосредственно влияет на скорость сорбции воды, проницаемость для лекарственных препаратов, механическую прочность геля и его биологическую совместимость, а также взаимосвязь этого показателя с другими физико-химическими и биологическими параметрами. Установлены оптимальные условия синтеза нанокомпозитов на основе термочувствительных гидрогелей и показана возможность их использования в медицине.

Ключевые слова: равновесная степень набухания гидрогелей, синтез нанокомпозитов

Lately, ferrogels – nanocomposites based on thermosensitive hydrogels with incorporated magnetic particles that can be used for hyperthermia of cancer and development of targeted drug delivery systems, are in the limelight of many researchers. In this paper, the equilibrium swelling degree, as one of the key characteristics of hydrogels, which directly affects the rate of water sorption, permeability for drugs, mechanical strength of gels and its biological compatibility, has been investigated in conjunction with other physical, chemical and biological parameters. Optimal conditions of nanocomposites synthesis based on thermosensitive hydrogels were found and the possibility of their use in medicine was demonstrated.

Key words: equilibrium swelling degree of hydrogels, nanocomposites synthesis

Полімерні гідрогелі – це тривимірні високомолекулярні сітки, які складаються із зшитих співполімерних ланцюгів і води. Гідрогелі знаходять широке застосування в різних сферах. Найбільш успішно вони використовуються в медицині [1,2] завдяки їхній біосумісності (через високий водовміст), а також можливості введення до їх складу широкого спектру лікарських препаратів.

Останнім часом все більше уваги приділяється розробці нанокомпозитів на основі полімерних гідрогелів, які мають унікальні властивості завдяки поєднанню властивостей як полімерної матриці (високий вміст води, біосумісність, еластичність, здатність до іммобілізації різноманітних лікарських препаратів та до функціоналізації, хімічна і механічна стабільність, низька вартість), так і властивостей нанорозмірного наповнювача (велике відношення питомої поверхні до об'єму, міцність, твердість, висока хімічна реакційна здатність, магнітні, електричні та оптичні властивості). У свою чергу використання так званих «розумних» гідрогелів (що реагують прогнозованим чином на незначні зміни в середовищі, що їх оточує) дозволить створити нанокомпозити, чутливі до багатьох зовнішніх факторів. Так гідрогелі на основі N-ізопропілакриламід (НІПАА) є термочутливими і характеризуються наявністю нижньої критичної температури розчинення (НКТР), при якій відбувається фазовий перехід в системі [3] з набухлого стану (при температурах нижчих за НКТР) у сколапсований (при температурах вищих за НКТР), і навпаки. Співполімеризація НІПАА з гідрофільними або гідрофобними мономерами дозволяє відповідно збільшити або зменшити температуру фазового переходу [4,5], яка для гомополімерної матриці складає близько 32-34 °С.

Останнім часом багато уваги привертають до себе нанокомпозити на основі гідрогелів з інкорпорованими магнітними частками, які називаються ферогелями або магнітними гідрогелями. У якості наповнювача полімерних матриць використовують такі феромагнетики, як Fe, Ni, Fe₃O₄, γ-Fe₂O₃ тощо. Завдяки магнітному наповнювачу гідрогелеві нанокомпозити стають магнітно-чутливими, що дозволяє їх адресно локалізувати в безпосередній близькості до органу-мішені за допомогою постійного магнітного поля. У перемінному магнітному полі відбувається розігрівання ферогелів, яке пов'язане з перетворенням частинками енергії магнітного поля у теплову енергію, яка у випадку термочутливих систем призводить до колапсу матриці і, як результат, – до вивільнення інкорпорованих лікарських препаратів. Тому перспективним напрямком використання термочутливих ферогелів є розробка на їх основі систем для лікування раку [6,7,8], які дозволять одночасно поєднати гіпертермію та хіміотерапію. Ефективність гіпертермії, в свою чергу, пов'язана з тим, що у ракових пухлинах в порівнянні з нормальними тканинами кров'яна і нервова система розвинена набагато гірше. Тому ракові клітини більш вразливі до підвищених температур (43-45 °С) у порівнянні з нормальними клітинами і не здатні ефективно відводити тепло, внаслідок чого гинуть. На фоні зменшення життєздатності ракових клітин при гіпертермії збільшується також їхня чутливість до хіміотерапії і радіації [9], що зумовлює перспективність використання ферогелів для вирішення вказаних проблем.

До основних властивостей, які зумовлюють можливість використання гідрогелів та нанокомпозитів на їх основі для поставлених завдань, належить їх рівноважний ступінь та кінетика набухання, можливість спрямованого впливу на їхню проникність стосовно інкорпорованих хіміотерапевтичних засобів (наприклад, цитостатиків), біосумісність і біодеструкція, а також розмір частинок ферогелю, оскільки вони будуть доставлятися до органу-мішені по кров'яному руслі. Серед перерахованих вище властивостей рівноважний ступінь набухання є найбільш важливим, оскільки він безпосередньо впливає на швидкість сорбції води, проникність для лікарських препаратів та механічну міцність гелю. Крім того, ступінь набухання також суттєво впливає на біологічну сумісність гелю. У даній роботі ступінь набухання гідрогелів був досліджений у взаємозв'язку з іншими фізико-хімічними та біологічними параметрами, які безпосередньо впливають на властивості полімерних систем, а також їх використання для розробки систем гіпертермії раку та для цільової доставки і вивільнення лікарських препаратів.

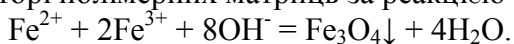
Експериментальна частина

Матеріали. N-ізопропілакриламід, НПАА (Sigma-Aldrich, 97 %), перекристалізували із гексану і сушили під вакуумом; акриламід, АА (Merck, ≥ 99.9 %), N,N'-метиленбісакриламід, МБА (Merck, 98 %), амоній персульфат, ПСА (Sigma, ≥ 98 %), N,N,N'-тетраметилетилендіамін, ТМЕД (Merck, ≥ 99 %), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Бром), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Реактив, ≥ 98 %), NaOH використовували без попереднього очищення.

Синтез гідрогелів та мікрогелів. (Спів)полімерні гідрогелі та мікрогелі на основі НПАА і АА були синтезовані методом радикальної полімеризації. Просторове зшивання співполімерних ланцюгів здійснювали біфункціональним мономером МБА. Ініціювання полімеризації проводили окисно-відновною системою, яка складалася з ПСА та ТМЕДу. Детально процес синтезу (спів)полімерних систем описано у роботі [10].

Склад (спів)полімерних гідрогелів та мікрогелів визначався складом реакційної суміші і був наступним: масова частка мономерів складала 20 % (співвідношення між мономерами змінювали у всьому діапазоні концентрацій), МБА – 0.20 і 0.04 %, концентрація еквімолярної ініціюючої суміші становила 0.04 моль/л для гідрогелів і 0.05 моль/л для мікрогелів.

Синтез ферогелів. Ферогелі були отримані під час синтезу магнетиту у поровому просторі полімерних матриць за реакцією осадження:



Синтез проходив у дві стадії. На першій стадії гідрогелеві матриці насичували (протягом 24 год) водним розчином солей двох- і трьохвалентного Феруму при 10 °С, при цьому співвідношення між Fe^{2+} та Fe^{3+} складало 1:2. Для запобігання гідролізу катіонів розчини готували на основі 0.1Н H_2SO_4 [11], а набухання проводили при пониженій температурі. На другій стадії гідро- та мікрогелі відділяли від розчину катіонів феруму та обробляли 10 % розчином NaOH при перемішуванні протягом 200 та 20 хв відповідно. Після закінчення синтезу високодисперсні ферогелі відфільтровували від вакуумом. Отримані магнітні гідро- та мікрогелі промивали дистильованою водою до нейтральних значень рН та висушували до постійної маси при 25 °С.

Набухання. Рівноважний ступінь набухання гідрогелів вивчали ваговим методом у воді та водних (0.1 Н H_2SO_4) розчинах катіонів феруму ($\text{Fe}^{2+}/2\text{Fe}^{3+}$). Для цього ксерогелі заливали надлишком дисперсійного середовища і ставили в термостат «ТС-1/80 СПН» при заданій температурі. Під час вимірювання рівноважного ступеня набухання через 24 год зразки діставали, фільтрувальним папером видаляли надлишок рідини з поверхні (мікро- та ферогелі фільтрували на скляному фільтрі під вакуумом) та зважували з точністю до четвертого знака після коми на вагах «Axis».

Розрахунок рівноважного ступеня набухання Q (г/г) гідрогелів проводили за формулою:

$$Q = \frac{m - m_0}{m_0},$$

де m_0 – маса ксерогелю, г; m – маса зразку, що набухнув до рівноважного стану, г.

ІЧ-спектроскопія. ІЧ-спектри зразків були отримані на приладі «Spectrum BX FT-IR» виробництва фірми Perkin Elmer в діапазоні 650-4000 cm^{-1} методом порушеного повного внутрішнього відбиття.

Оптична мікроскопія. Оптичні фотографії були зроблені на мікроскопі «Biolar A». Оптичний вихід мікроскопа був з'єднаний з цифровою камерою і персональним комп'ютером. При термостатуванні краплину водної дисперсії мікрогелю або ферогелю на покривному скельці поміщали на мідну пластину з отвором. До мідної пластинки була припаяна трубка, через яку пропускали потік води із термостата: Тип 100/45 (Mechanik Pruefgeraete Medingen, Германія). Температуру контролювали термopарою К-типу із цифровим термометром «Centre-309» (JDC Electronic SA, Швейцарія).

Рентгеноструктурний аналіз. Рентгенограми ферогелів були отримані на «Stoe Transmission Diffractometer System Stadi P» і згладжені з використанням FFT фільтра з частотою зрізу 3.00168.

Електронна мікроскопія. Електронні мікрофотографії ферогелів (злам гелів робили в рідкому азоті) були отримані на сканувальному електронному мікроскопі «JSM 6700F». Зразки кріпили на електропровідний скоч і покривали шаром платини (близько 20 нм). Вимірювання проводили в режимі вторинних відбитих електронів.

Магнітні дослідження. Вимірювання намагніченості співполімерних ферогелів проводили на автоматизованому комплексі «PPMS-9» при 27 °С.

Цитотоксичність. Цитотоксичність співполімерних термочутливих гідрогелів і ферогелів вивчали на клітинній лінії ПТП (перещеплювані тестикули поросят), отриманих з колекції Інституту ветеринарної медицини УААН. Більш детально методика визначення описана в статті [10].

Статистична обробка. Статистичну обробку результатів вимірювань проводили з використанням *t*-критерію для довірчої області (*P*) 0.95, кількість паралельних вимірювань становила 3-10.

Систематичну похибку визначення рівноважного ступеня набухання ΔQ_c розраховували за формулою:

$$\Delta Q_c = \left(\frac{1}{m_0} + \frac{m}{m_0^2} \right) \Delta m = \frac{m_0 + m}{m_0^2} \Delta m,$$

де $\Delta m = 0.0001$.

Для розрахунку випадкової похибки ΔQ_e використовували наступну формулу:

$$\Delta Q_e = \pm t \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Q_i - \bar{Q})^2}{n(n-1)}}.$$

Кінцевий результат вимірювання рівноважного ступеня набухання був наступний:

$$\bar{Q} \pm [\Delta Q_c + \Delta Q_e]$$

де \bar{Q} – середнє арифметичне значення рівноважного ступеня набухання.

Результати та обговорення.

(Спів)полімерні гідрогелеві системи та нанокомпозити на основі НПАА та АА були отримані у вигляді пластин (далі гідрогелі) і високодисперсних гелів (мікрогелів). Фазові переходи в полімерних матрицях з різним вмістом НПАА досліджували ваговим методом з температурної залежності рівноважного ступеня набухання (рис.1). Як видно з рис.1, співполімеризація НПАА з гідрофільним акриламідом призводить до збільшення температури фазового переходу, а також до зміни характеру залежності. Так НКТР гомополімерної матриці на основі НПАА складає близько 34 °С, але по мірі заміщення НПАА ланками АА НКТР співполімерних гідрогелів збільшується і становить відповідно 37 °С (2.5 % АА), 42 °С (5 % АА) та 47 °С (10 % АА). Крім того, при збільшенні вмісту АА спостерігається перехід від різкого фазового переходу (при високих концентраціях НПАА) до плавного (при концентраціях НПАА 80-25 %) з подальшою втратою полімерною матрицею термочутливих властивостей при концентраціях НПАА менше 25 %.

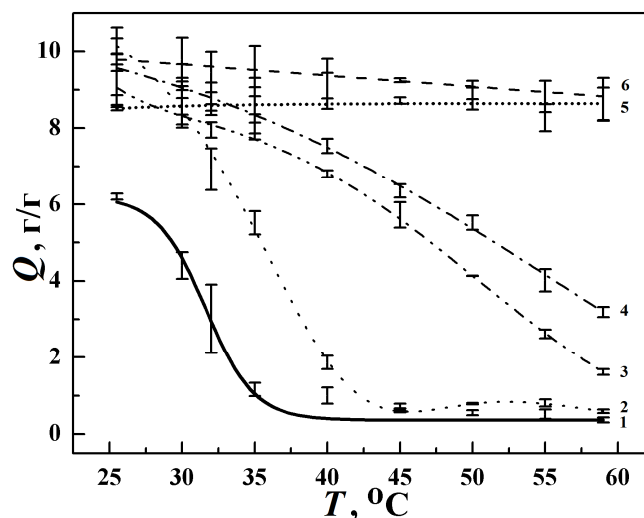


Рис.1. Температурна залежність рівноважного ступеня набухання у дистильованій воді співполімерних гідрогелів на основі НІПАА і АА: 100 % НІПАА (1); 95 % НІПАА (2); 80 % НІПАА (3); 75 % НІПАА (4); 25 % НІПАА (5); 0 % НІПАА (6). Вміст МБА 0.2 %.

З отриманої залежності видно, що співполімерна матриця, із 95 % вмістом НІПАА, НКТР якої складає близько 42 °С, найкраще підходить для розробки систем магнітної гіпертермії ракових пухлин та для цільової доставки і контрольованого вивільнення лікарських препаратів. Тому даній системі буде приділена основна увага при дослідженні фізико-хімічних параметрів гідрогелів.

Гомополімерні матриці на основі НІПАА та АА, а також їх співполімер із масовою часткою НІПАА 95 % (рис.2) були досліджені методом ІЧ-спектроскопії.

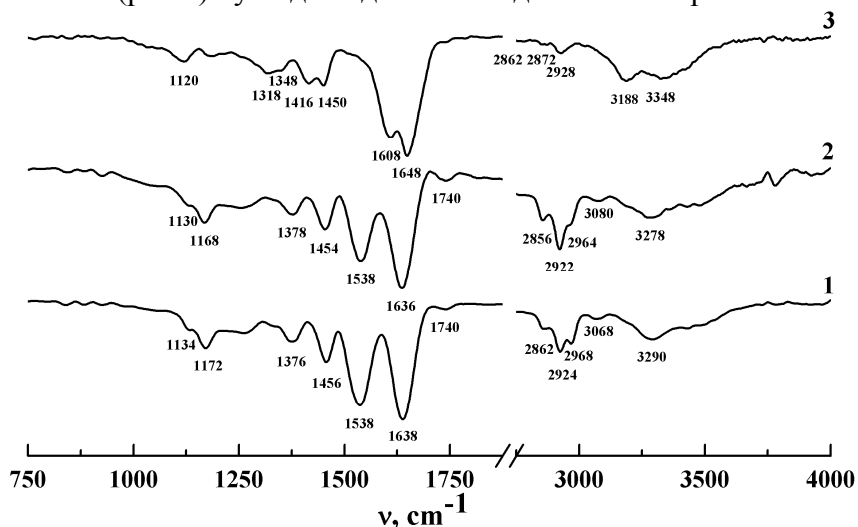


Рис.2. ІЧ-спектри співполімерних матриць на основі НІПАА і АА: 1 – 100 % НІПАА; 2 – 95 % НІПАА; 3 – 0 % НІПАА.

Як видно із спектра, смуги, які пов'язані з характеристичними частотами С-Н (метильної, метиленової і метинової групи), знаходяться в трьох областях: 3000-2800, 1400-1300 і близько 700 cm^{-1} . Поглинання в області 3000-2800 cm^{-1} обумовлене валентними коливаннями С-Н і проявляється у вигляді складної смуги. Оскільки матриці із вмістом 100 % (95 %) НІПАА містять ізопропільний фрагмент, то відповідно в їх спектрах, на відміну від гомополіакриламідної матриці, піки при 2968 cm^{-1} (2964 cm^{-1}) і 2862 cm^{-1} (2856 cm^{-1}) належать коливанням метильної групи (антисиметричні і симетричні відповідно). Піки, які відносяться до валентних коливань метиленової групи, проявляються при 2926 і 2853 cm^{-1} (антисиметричні і симетричні). Так для поліакриламідного гелю спостерігаються

як антисиметричні (2928 см^{-1}), так і симетричні (2862 см^{-1}) коливання С-Н метиленової групи. У матрицях на основі НПАА симетричні поглинання метиленової групи перекриваються смугами поглинання метильної групи, тоді як антисиметричні коливання спостерігаються при 2924 і 2922 см^{-1} , відповідно для гомо- і співполімерної матриці на основі НПАА. С-Н метиленової групи має відносно слабку смугу поглинання близько 2890 см^{-1} і перекривається більш інтенсивними смугами поглинання метильної і метиленової груп. Тому дана смуга проявляється лише в ІЧ-спектрі гомополіакриламідної матриці при 2872 см^{-1} .

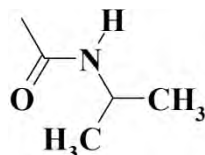
Поглинання в області $1400\text{-}1300\text{ см}^{-1}$ і близько 700 см^{-1} обумовлені деформаційними коливаннями С-Н зв'язків. Для матриць із вмістом 100 і 95% НПАА смуга поглинання при 1456 і 1454 см^{-1} відповідає антисиметричному деформаційному коливанню метильних груп, смуга поглинання при 1376 і 1378 см^{-1} – симетричному коливанню.

Для метиленових груп характерні 4 типи деформаційних коливань: ножичні, віяльні, крутильні і маятникові. Смуги, які відповідають ножичним коливанням метиленових груп, накладаються на смуги поглинання, які відповідають антисиметричним деформаційним коливанням метильної групи. Саме тому вони не проявляються у спектрах матриць на основі НПАА. Для матриць на основі АА дана смуга поглинання знаходиться при 1450 см^{-1} . Маятникові коливання метиленових груп знаходиться в області $790\text{-}720\text{ см}^{-1}$. Їх зміщення в низькочастотну область говорить про наявність поліметиленових ланцюгів. Смуги, які відповідають двом іншим типам коливань метиленових груп, малоінтенсивні і недостатньо характеристичні.

Смуги поглинання, які відповідають коливанню скелета, малоінтенсивні, і проявляються у двох областях: $1100\text{-}700\text{ см}^{-1}$ (валентні коливання) і нижче 500 см^{-1} (деформаційні).

Наявність ізопропільної групи підтверджується присутністю смуг поглинання при 1172 (1168) і 1134 см^{-1} (1130 см^{-1}) для матриць з вмістом НПАА 100% (95%).

Для первинних амінів характерна наявність двох смуг вільної аміногрупи біля 3500 і 3400 см^{-1} . Зсув даних смуг для АА матриці в низькочастотну область (3348 і 3188 см^{-1}) свідчить про їх асоціацію. Аналогічно для асоційованих вторинних амінів (матриці на основі НПАА) характерна наявність двох смуг: одна із яких знаходиться при 3068 см^{-1} (100% НПАА) і 3080 см^{-1} (95% НПАА), а інша – при 3290 см^{-1} і 3278 см^{-1} , відповідно і є характерною для *транс*-ізомерів [12]:



В області поглинання карбонільної групи амідів мають дві смуги поглинання: «Амід І» і «Амід ІІ». Перша з них обумовлена складним коливанням, у якому, крім карбонільної групи, беруть участь зв'язок С-Н і кути С-С-О і С-Н-С. Так для матриць із 100 та 95% вмістом НПАА дана смуга поглинання знаходиться при 1638 і 1636 см^{-1} відповідно. Для полімерної матриці на основі АА смуга Амід І проявляється при 1648 см^{-1} . Друга амідна смуга проявляється в первинних і вторинних амідах і пов'язана з деформаційними коливаннями N-H. Для первинних амідів (гомополімерна матриця на основі АА) вона знаходиться в області 1608 см^{-1} , для вторинних ця смуга проявляється при нижчих частотах – 1538 см^{-1} .

Всі інші смуги поглинання в області $1600\text{-}700\text{ см}^{-1}$ належать валентним коливанням С-Н зв'язку і деформаційним коливанням N-H.

На рис.3 наведено оптичні фотографії мікрогелю, які показують залежність розміру частинок співполімерної матриці із 95% вмістом НПАА від температури. Так при підвищенні температури з $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ об'єм частинок зменшується приблизно в 7 раз, що може бути використане для вивільнення інкорпорованих ліків з співполімерного гідрогелю.

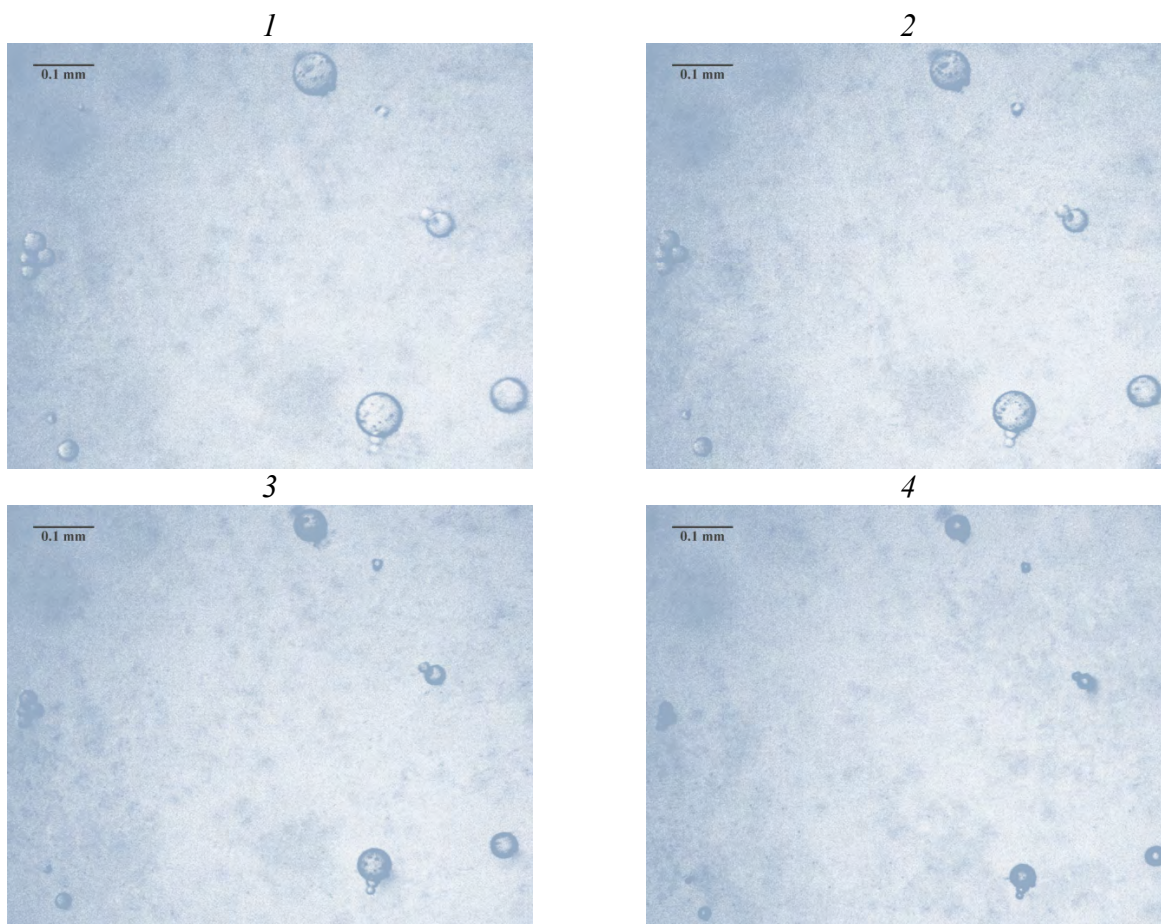


Рис.3. Оптичні мікрофотографії співполімерного гідрогелю на основі НПАА (95 %) і АА (5 %) при різних температурах: 20 °С (1), 30°С (2), 40 °С (3), 50 °С (4). Вміст МБА 0.2 %.

Для визначення полідисперсності отриманих систем у високодисперсному стані був досліджений розподіл частинок за розмірами співполімерного мікрогелю із 95 % вмістом НПАА (рис.4). Даний розподіл описується логнормальною залежністю з модою 35.9 мкм і середнім значенням 63.6 мкм, при цьому мінімальний і максимальний розмір частинок складає 9 і 291 мкм відповідно.

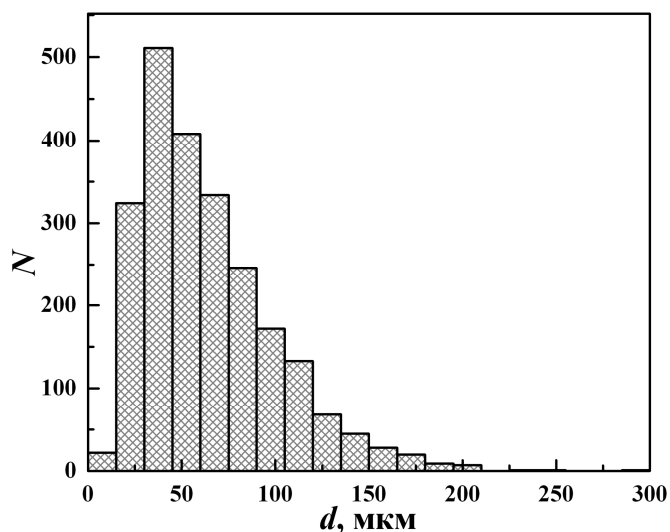


Рис.4. Розподіл за розмірами частинок співполімерного мікрогелю на основі НПАА (95 %) і АА (5 %) при 20 °С. Вміст МБА 0.2 %.

Тепер перейдемо до отримання ферогелів в процесі синтезу магнетиту в поровому просторі зшитих (спів)полімерних матриць, що містять мономерні ланки НПАА та АА у різних співвідношеннях.

Кількість інкорпорованого магнетиту визначає магніточутливість ферогелів, тому дослідження процесу набухання гідрогелів різного хімічного складу в залежності від концентрації розчинів катіонів феруму дозволило оптимізувати процес синтезу магнітних частинок у полімерних наноректорах. Було встановлено (рис.5), що рівноважний ступінь набухання гомополімерного гідрогелю на основі АА збільшується при збільшенні концентрації катіонів феруму з подальшим незначним зниженням при концентраціях, вищих за 6.00 %. Тоді як гомополімерний гідрогель на основі НПАА переходить в сколапсований стан при масовій концентрації катіонів феруму 2.15 %. Для співполімерного гідрогелю (95 % НПАА) критична концентрація, при якій відбувається фазовий перехід, збільшується і складає 4.50 %. У свою чергу рівноважний ступінь набухання співполімерної матриці із 75 % вмістом НПАА майже не змінюється при концентраціях катіонів феруму до 6.00 %, після чого спостерігається різке зниження ступеня набухання.

Такі закономірності можна пояснити наступним чином: гідратація гідрофобного фрагмента НПАА (ізопропільної групи) визначає фізичні властивості системи та відповідає за перебування гідрогелю у набухлomu стані. Присутність солей в свою чергу руйнує водневі зв'язки та змінює взаємодію між полімером і розчинником, що сприяє процесу дегідратації ізопропільного фрагмента і переходу гідрогелю в сколапсований стан. При заміщенні гідрофобних ланок НПАА гідрофільними ланками АА критична концентрація катіонів феруму збільшується, оскільки гідрофобні фрагменти співполімерного ланцюга стають розділені ланками акриламідy, які перешкоджають їх агрегації.

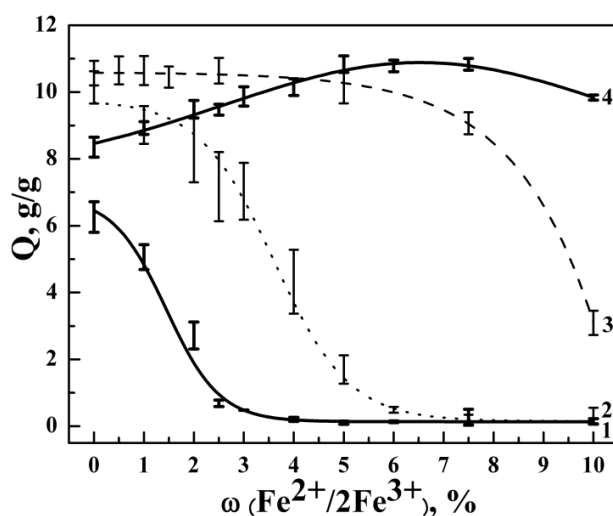


Рис.5. Рівноважний ступінь набухання співполімерних гідрогелів на основі НПАА та АА у дистильованій воді і водних розчинах $Fe^{2+}/2Fe^{3+}$ (25 °C): 100 % НПАА (1), 95 % НПАА (2), 75 % НПАА (3), 0 % НПАА (4);

Як було показано раніше, набухання співполімерної матриці з 95 % вмістом НПАА збільшується (в 1.5 рази) при зниженні температури (з 25 до 5 °C), причому значення критичної концентрації розчину катіонів феруму, при якій відбувається колапс матриці, збільшується (із 4.5 % до 10 % відповідно). При цьому різниця в ступенях набухання гідрогелю у розчинах катіонів феруму на основі води та 0.1 Н H_2SO_4 не є суттєвою. Додатково було показано (методом ІЧ-спектроскопії та визначення ступеня набухання), що матриці, оброблені 0.1 Н розчином H_2SO_4 протягом 24 год та 10 % розчином $NaOH$ близько 3 год, не гідролізують. Таким чином, оптимальними умовами проведення першої

стадії синтезу магнетиту є набухання полімерної матриці в розчинах катіонів феруму на основі 0.1 Н H₂SO₄ при низьких температурах (близько 5 °С). Саме за таких умов досягається зниження ступеня гідролізу та збільшується кількість сорбованого розчину і відповідно кількість інкорпорованого до складу матриці магнетиту.

Оскільки на основі розроблених ферогелів передбачається створення не тільки систем для магнітної гіпертермії, але і систем для цільової доставки та керованого вивільнення лікарських препаратів, отриманим ферогелям повинен бути притаманний комплекс властивостей, які іноді суперечать одна одній і вимагають оптимізації складу ферогелів. З одного боку, магнітокерованість та здатність нагріватися у зовнішньому перемінному магнітному полі визначається високим вмістом магнітного наповнювача. У той же час суттєву роль відіграє полімерна складова розроблених магнітних нанокомпозитів, оскільки саме вона відповідає за фазовий перехід між набухлим та сколапсованим станом під впливом зміни температури та за можливість іммобілізації широкого спектра лікарських препаратів. Залежність рівноважного ступеня набухання від температури для мікрогелю і високодисперсних ферогелів, отриманих у розчинах із різною концентрацією Fe²⁺/2Fe³⁺ (на основі 0.1 Н H₂SO₄), зображено на рис.6. З аналізу отриманих кривих можна зробити висновок, що синтезовані гідрогелеві нанокомпозити з інкорпорованим магнетитом зберігають термочутливі властивості, хоча їх рівноважний водовміст та інтенсивність фазового переходу дещо поступаються ненаповненій полімерній матриці. Це пояснюється тим, що при збільшенні вмісту магнетиту в полімерній матриці, з одного боку, зменшується вільний простір, який може займати вода, а з іншого, – наночастинки магнетиту стерично перешкоджають колапсу матриці та дифузії води. Також варто відмітити, що ступінь набухання гідрогелів та ферогелів, а також характер залежності є практично однаковими як для систем у звичайному стані, так і для високодисперсних систем.

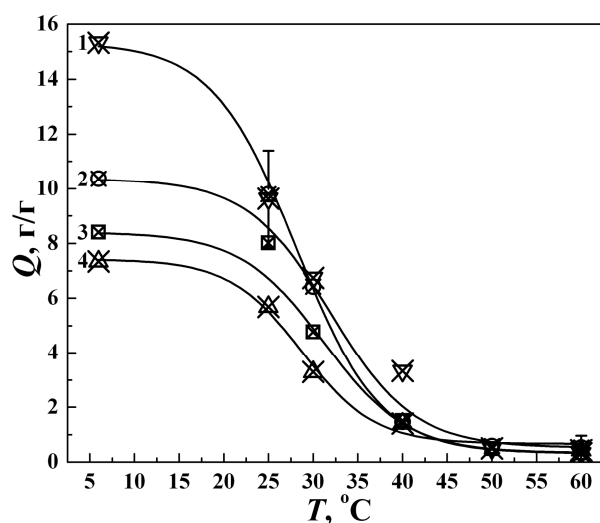


Рис.6. Температурна залежність рівноважного ступеня набухання у дистильованій воді нанокомпозитних співполімерних мікрогелів та високодисперсних ферогелів на основі НПАА (95 %) і АА (5 %), отриманих при різних концентраціях 0.1 Н H₂SO₄ розчинів Fe²⁺/2Fe³⁺: 0 % Fe²⁺/2Fe³⁺ (1); 0.5 % Fe²⁺/2Fe³⁺ (2); 0.1 % Fe²⁺/2Fe³⁺ (3); 2.5 % Fe²⁺/2Fe³⁺ (4). Вміст МБА 0.2 %.

Для підтвердження утворення магнетиту в процесі синтезу був проведений фазовий аналіз ферогелів методом рентгенівської дифракції (рис.7). Рентгенограми магнетиту (Fe₃O₄) та магеміту (γ-Fe₂O₃) схожі, але вони можуть бути ідентифіковані шляхом порівняння відносних інтенсивностей піків. Таким чином, визначення структури магнітного наповнювача всередині ферогелів було проведено шляхом співставлення з базою даних ASTM Index Cards 5-ти рефлексів та відносної інтенсивності піків з

індексами Міллера (220), (311), (400), (511) і (440), які відповідають міжплощинним відстаням 0.2966 (28%), 0.2530 (100%), 0.2096 (20%), 0.1712 (25%) та 0.1614 нм (34%) [13]. Аналіз даних дифракційних ліній підтверджує утворення кристалічної фази магнетиту Fe_3O_4 та відсутність інших фаз [14].

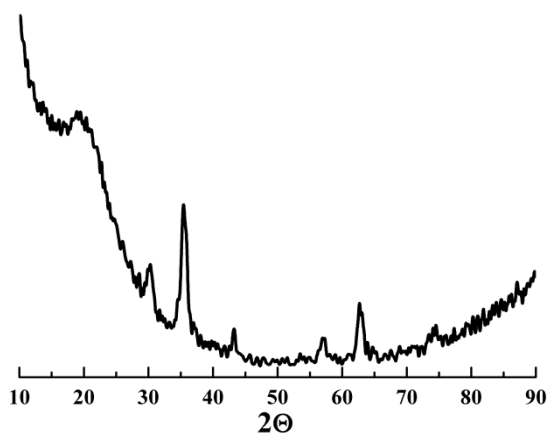


Рис. 7. Рентгенограма співполімерного ферогелю на основі НПАА (95 %) і АА (5 %). Вміст МБА 0.04 %.

Як видно з електронних мікрофотографій, частинки магнетиту, синтезовані в поровому просторі полімерних матриць при концентрації катіонів феруму 1.0 %, є нанорозмірними і практично монодисперсними з середнім розміром близько 20 нм (рис.8.1). Аналогічні мікрофотографії були також отримані для ферогелів, синтезованих у розчинах з концентраціями катіонів феруму 2.5, 5 і 7.5 %, але з дещо більшим середнім розміром частинок (близько 30 нм).

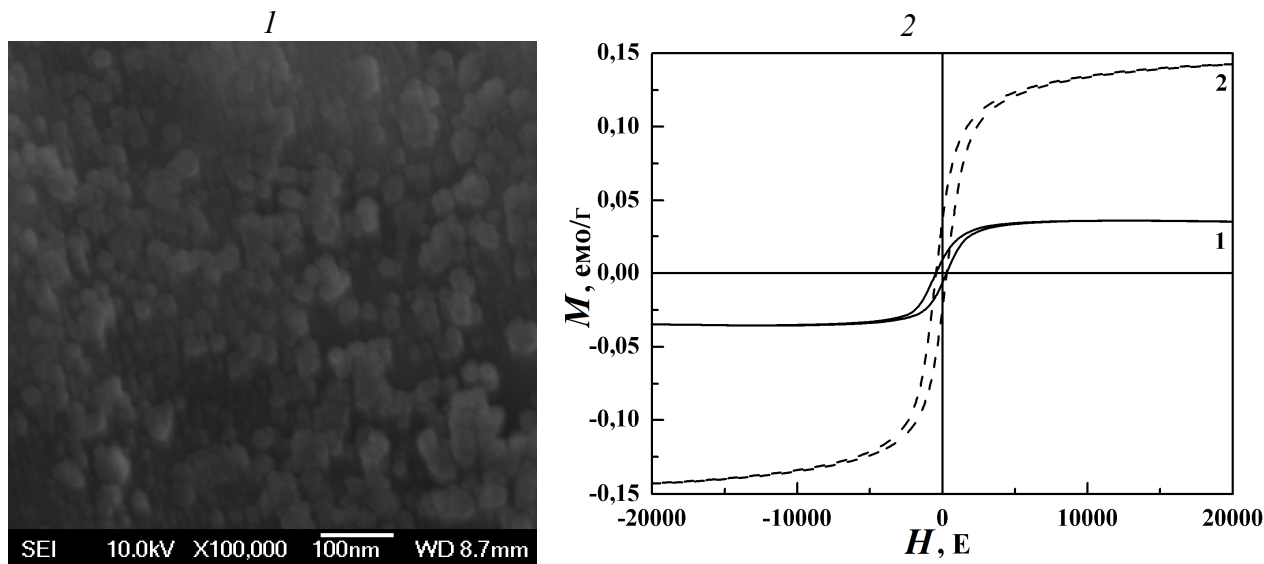


Рис. 8. Електронна мікрофотографія (СЕМ) (1) та магнітні петлі гістерезису (2) співполімерних ферогелів на основі НПАА (95 %) та АА (5 %), отриманих при різних концентраціях водних розчинів $\text{Fe}^{2+}/2\text{Fe}^{3+}$:

1 – 1.0 % $\text{Fe}^{2+}/2\text{Fe}^{3+}$;
2 – 0.5 % $\text{Fe}^{2+}/2\text{Fe}^{3+}$ (1), 2.5 % $\text{Fe}^{2+}/2\text{Fe}^{3+}$ (2).

На рис.8.2 наведено криві намагнічення співполімерних ферогелів, синтезованих у розчинах катіонів феруму з різною концентрацією (0.5 % і 2.5 % $\text{Fe}^{2+}/2\text{Fe}^{3+}$). Так наявність петлі гістерезису свідчить про те, що розмір синтезованих в поровому просторі частинок

магнетиту становить більше 10 нм, тобто магнітні частинки є багатодоменими, що підтверджується також даними СЕМ. Для отриманих ферогелів характерні низькі значення залишкової намагніченості, близько 0.01 (крива 1) і 0.04 емо/г (крива 2). Про магнітом'якість отриманих ферогелів свідчить невелике значення коерцитивної сили, яке складає близько 400 Е. Крім того, концентрація інкорпорованого магнетиту збільшується із збільшенням концентрації розчинів катіонів феруму (намагніченість насичення 0.03 (крива 1) та 0.14 емо/г (крива 2) при 1 та 2.5 % катіонів феруму відповідно).

Для співполімерних ферогелів із 95 % вмістом НІПАА були проведені біологічні дослідження, і було показано, що магнітні гідрогелі з вмістом магнетиту до 10 % не є токсичними для клітин ПТП (рис.9). Більше того, при контакті вихідної матриці із клітинами виявлено, що їх активність має тенденцію до збільшення у порівнянні із активністю контрольних інтактних клітин. Тому отриманий результат дозволяє розглядати ферогелі на основі співполімерних гідрогелів, які містять 95 % НІПАА та 5 % АА, придатними для створення систем гіпертермії ракових клітин, цільової доставки та контрольованого вивільнення лікарських препаратів, а також об'єктів для вирощування клітин.

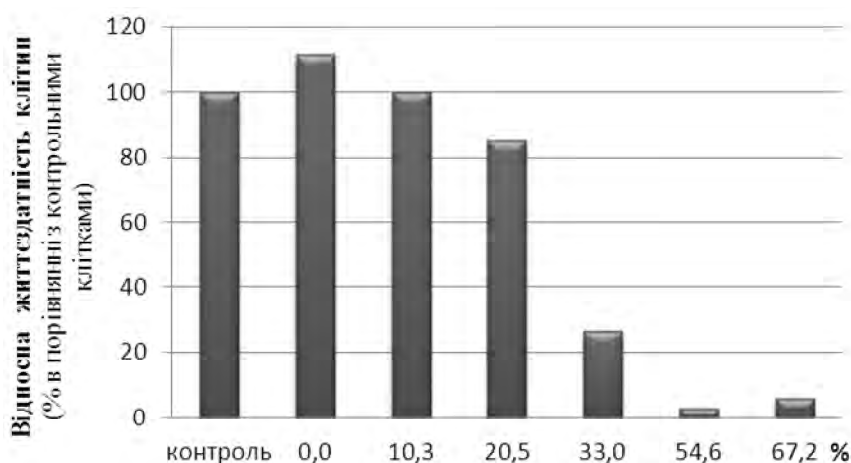


Рис.9. Цитотоксичність співполімерних ферогелів на основі НІПАА (95 %) та АА (5 %) для клітин ПТП. Вміст МБА 0.2 %.

Висновки

Було встановлено, що найкращими властивостями для створення магнітних нанокомпозитів володіє термочутлива співполімерна матриця, яка містить 95 % НІПАА та 5 % АА, і має температуру фазового переходу близько 42 °С. Дослідження ІЧ-спектрів показало наявність внутрішньомолекулярних водневих зв'язків між функціональними групами полімерних ланцюгів, про що свідчить зсув валентних коливань амідної групи в низькочастотну область. Крім того, було встановлено, що ізопропілакриламідна група у складі співполімерних матриць перебуває в *транс*-конфігурації.

Подальше дослідження фазових переходів у розчинах катіонів феруму дозволило встановити оптимальні умови синтезу магнетиту в поровому просторі співполімерної матриці. Було показано, що насичення матриці катіонами феруму краще проводити при температурах близько 5 °С в розчинах на основі 0.1 Н Н₂SO₄. За таких умов не лише зменшується ступінь гідролізу катіонів феруму, а також збільшується критична концентрація розчину, при якій відбувається колапс матриці, та кількість сорбованого розчину і відповідно кількість інкорпорованого до складу матриці магнетиту. Більше того, за таких умов синтезу не відбувається гідроліз співполімерної матриці.

Утворення магнетиту та відсутність інших фаз були підтверджені даними рентгеноструктурного аналізу. Згідно даних електронної мікроскопії, синтезований

магнетит є нанорозмірним з розміром частинок близько 20-30 нм. Наявність мангіточутливості синтезованих ферогелів підтверджують наведені петлі гістерезису. Співполімерні ферогелі, які містять 95 % НІПАА та 5 % АА, з вмістом магнетиту до 10 % не є токсичними для клітин ПТП.

Таким чином, вказаний метод синтезу та властивості термочутливих ферогелів є надзвичайно перспективними для отримання систем нового покоління для магнітної гіпертермії ракових клітин та цільової доставки і контрольованого вивільнення лікарських засобів.

ЛІТЕРАТУРА

1. **Peppas N.A., Hilt J.Z., Khademhosseini A., Langer R.** Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology // *Advanced Materials*.- 2006.- V 18.- N 11.- P. 1345-1360.
2. **Slaughter B.V., Khurshid S.S., Fisher O.Z., Khademhosseini A., Peppas N.A.** Hydrogels in regenerative medicine // *Advanced Materials*.- 2009.- V 21.- N 32-33.- P. 3307-3329.
3. **Plate N.A., Lebedeva T.L., Valuev L.I.** Lower critical solution temperature of N-alkyl-substituted polyacrylamides // *Polym. J.* - 1999.-V 31, P. 21.
4. **Badiger M.V., Lele A.K., Bhalerao V.S. et al.** Molecular tailoring of thermo-reversible copolymergels: some new mechanistic insights // *J. Chem. Phys.*-1998.- V 109.- P. 1175.
5. **Самченко Ю.М., Коновалова В.В., Коротич Е.И. и др.** Термочувствительные сополимерные гидрогели с регулируемой температурой фазового перехода // *Доповіді НАН України*, 2011.- № 8.- С. 123.
6. **La0 L.L., Ramanujan R.V.** Magnetic and hydrogel composite materials for hyperthermia applications // *J. Mater. Sci: Mater. Med.*-2004.-V. 15.- P. 1061.
7. **Babincova M., Leszczynska D., Sourivong P.** Superparamagnetic gel as a novel material for electromagnetically induced hyperthermia // *J. Magn. Magn. Mater.*-2001.- V 225 . - P. 109.
8. **Babincova M., Leszczynska D., Sourivong P.** Superparamagnetic gel as a novel material for electromagnetically induced hyperthermia // *J. Magn. Magn. Mater.*-2001.- V 225 . - P. 109.
9. **Shinkai M.** Functional magnetic particles for medical application // *J. Biosci. Bioeng.*- 2002.- V94.- N 6 .- P. 606.
10. **Korotych O., Samchenko Yu., Boldeskul I., et al.** N-Isopropylacrylamide-based fine-dispersed thermosensitive ferrogels obtained via *in-situ* technique // *Materials Science and Engineering C*.- 2013.- V 33.- N 2.- P. 892-900.
11. **Третьяков Ю.Д. и др.** Неорганическая химия. Химия элементов: Учебник для вузов. М.: Химия.- 2001.-С. 403-404.
12. **Эллиот А.** Инфракрасные спектры и структура полимеров // Из-во «Мир», М.: 1972 .- С. 116.
13. Powder Diffraction File. International centre for diffraction data. Swartmore, Pennsylvania, USA, 1977.
14. **Sözeri H., Alveroglu E., Kurtan U., et al.** Synthesis, electrical and magnetic characterization of polyacrylamide hydrogels including NiFe₂O₄ nanoparticles // *J. Supercond. Nov. Magn.*- 2012, (DOI: 10.1007/s10948-012-1714-y).

¹Інститут біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України, м. Київ.

²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, м. Київ.

Надійшло до редакції 09.12.2012 р.