

Дослідження наносистеми розгалужений полімер/нанозолото в області конформаційного переходу полімерної матриці

В.А. Чумаченко, Ю.І. Гарагуц, Н.В. Куцевол, Н.П. Мельник, О.М. Надтока

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, хімічний факультет
60, вул. Володимирська, Київ, 01033, Україна, kutsevol@ukr.net

*Полі-N-ізопропілакриламід (ПНІПАА) – біосумісний термочутливий полімер, перспективний для використання в нанобіотехнологіях, оскільки цей полімер має температуру фазового переходу (НКТР) в області фізіологічних температур. НКТР можна спрямовано регулювати зміною гідрофільно-гідрофобного балансу ПНІПАА-вмісної макромолекули або зміною її структури. Введення наночастинок золота в ПНІПАА полімер-наносистемі – один із сучасних підходів для створення препаратів нового покоління для фотодинамічної та фототермічної протипухлинної терапії. Наночастинки золота синтезовано *in situ* в полімерній матриці розгалуженого зіркоподібного термочутливого кополімеру з декстрановим ядром і прищепленими полі-N-ізопропілакриламідними ланцюгами (Д-ПНІПАА). Методом трансмісійної електронної мікроскопії показано, що наночастинки золота мають сферичну форму і розмір 5–10 нм. Методом динамічного розсіювання світла досліджено наносистему Д-ПНІПАА/Au в області конформаційного переходу полімерної матриці. Встановлено, що наносистема Д-ПНІПАА/Au містить вільні наночастинки золота та агрегати макромолекул полімерів з інкорпорованими наночастинками золота. Розмір наночастинок золота не змінюється в дослідженій області температур.*

Ключові слова: розгалужений кополімер, полі-N-ізопропілакриламід, НКТР, конформаційний перехід, наночастинки золота.

Вступ.

Термочутливі кополімери на основі полі(N-ізопропілакриламід) з конформаційним переходом в області фізіологічних температур – перспективні матеріали біомедичного призначення [1–3]. За кімнатної температури такі кополімери гідрофільні, а при нагріванні вище нижньої критичної температури розшарування (НКТР) відбувається конформаційний перехід, макромолекули стають частково гідрофобними і легше проникають крізь клітинні мембрани/тканини. Зміну гідрофільно-гідрофобного балансу залежно від температури можна використовувати для інкапсуляції гідрофільних біологічноактивних речовин за нормальних умов, подальшого введення гібридного нанокompозиту в організм і поступового вивільнення їх у фізіологічному середовищі.

Для лінійного полі-N-ізопропілакриламід (ПНІПАА) характерний конформаційний перехід за $T = 32\text{ }^{\circ}\text{C}$ [4]. Нами було синтезовано ряд розгалужених зіркоподібних кополімерів з декстрановим ядром різної молекулярної маси та з різною кількістю прищеплених ПНІПАА ланцюгів (Д-ПНІПАА), для яких температура переходу змістилася до $33,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ [5].

Створення металовмісних наносистем на основі термочутливих розгалужених кополімерів відкриває перспективу контрольованої цільової доставки і пролонгації дії лікарських засобів [6]. Нами було отримано золі золота, синтезовані у водних розчинах розгалужених зіркоподібних кополімерів з декстрановим ядром різної молекулярної маси та з різною кількістю прищеплених Д-ПНІПАА. Золото у нанорозмірному вигляді обрано завдяки унікальній властивості підвищувати терапевтичний ефект препаратів для фотодинамічної терапії [7, 8]. При цьому дуже важливими є розмірні характеристики наночастинок золота, а також агрегативна стійкість отриманих систем [9].

Метою роботи було дослідити поведінку наносистеми Д-ПНІПАА/Au в області конформаційного переходу полімерної матриці.

Експериментальна частина.

Синтез наносистеми Д-ПНІПАА/Au. Для синтезу наносистеми Д-ПНІПАА/Au використовували водні розчини отриманих нами [5] прищеплених кополімерів з декстрановим ядром ($M_w = 70000$) та з 15 прищепленими ланцюгами полі-N-ізопропілакрил-

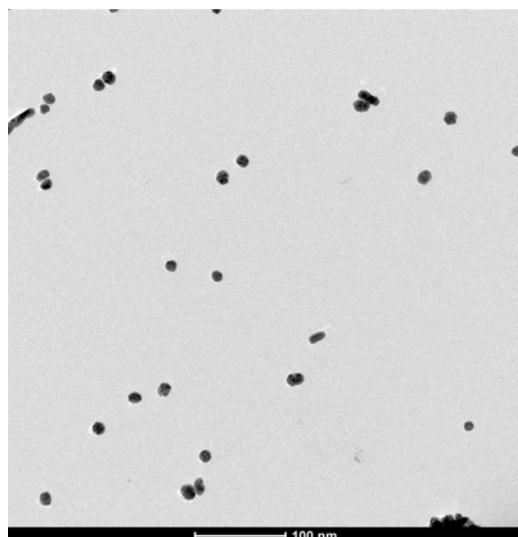


Рис. 1. Мікрофотографія наночастинок золота, синтезованих у розгалуженій полімерній матриці Д70-ПНІПАМ15

аміду (Д70-ПНІПАА15).

Вибір саме цього кополімеру базувався на результатах наших досліджень [5], оскільки саме кополімер Д70-ПНІПАА15 здатний до істотних змін гідродинамічного діаметра макромолекулярних клубків при конформаційному переході в області НКТР.

Наночастинки золота (AuНЧ) синтезували *in situ* хімічним відновленням тетрахлораурату (III) водню (Sigma Aldrich, США) в розчині Д70-ПНІПАА15. При цьому полімер відігравав роль матриці, здатної впливати на процес нуклеації, контролювати ріст і стабілізувати наночастинок. До 0,5 мл водного розчину полімеру ($C = 1 \cdot 10^{-3}$ г/см³) додавали 0,012 мл 0,1 М водного розчину тетрахлораурату (III) водню і перемішували протягом 20 хв. Потім додавали 0,047 мл 0,1 М водного розчину боргідриду натрію (Sigma Aldrich, США). Реакційну суміш перемішували ще протягом 30 хв. Процес відновлення проводили за температури 5 °С. Формування наночастинок Au реєстрували візуально – золь золота набував рубіново-червоного кольору.

Трансмісійна електронна мікроскопія (ТЕМ).

Для оцінки розмірів і форми отриманих наночастинок золота використовували метод трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ, JEOL (Japan) Jem-1000CXII). Зразки для ТЕМ досліджень готували розпиленням розведеного золю Au на мідну сітку за $T = 25$ °С. Мікрофотографії (рис. 1) підтверджують утворення наночастинок золота сферичної форми розміром 5–10 нм.

Динамічне розсіювання світла (DLS) застосовували для дослідження наносистем Д70-ПНІПАА15/Au в області конформаційного переходу полімерної матриці. Використовували Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., UK), на якому встановлено 4 мВ He-Ne лазер з довжиною хвилі 632,8 нм, а розсіяне світло детектується під кутом 173° (зворотне розсіювання).

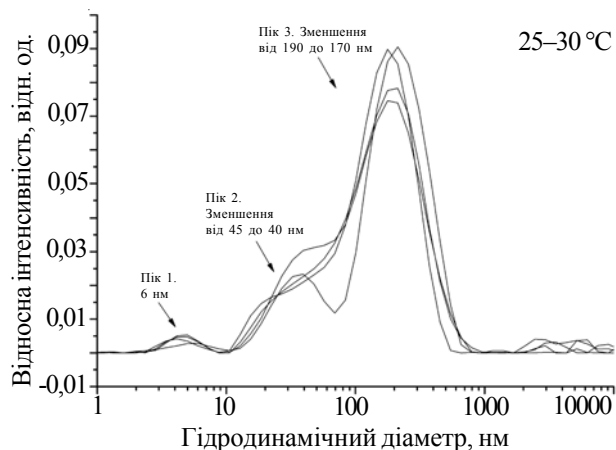


Рис. 2. Розподіли за розмірами в наносистемах Д70-ПНІПАА15/Au при нагріванні від 25 до 30 °С

Методом DLS отримані кореляційні криві для наносистем у температурному інтервалі 25–36 °С із кроком нагрівання 0,1 °С. Розподіл за гідродинамічними діаметрами розсіюючих об'єктів у наносистемі отримано за тією ж методикою, що і для наносистеми Д70-ПНІПАА15/Ag [5]. Було проаналізовано такі температурні інтервали: 25–30; 30–33; 33–34; 34,0–34,5 та 34,5–36,0 °С. Зразок термостатували за кожної температури протягом 5 хв.

Розподіл за розмірами для наносистеми Д70-ПНІПАА15/Au у температурному інтервалі 25–30 °С, тобто до суттєвого колапсу ланцюгів Д70-ПНІПАА15 [5], наведено на рис. 2. У цьому температурному інтервалі, як і надалі, спостерігали криві розподілу з трьома максимумами. Перший максимум відповідає дифузії безпосередньо наночастинок золота – Нанооб'єкт I-Au (Пік 1), які мають розмір 5–9 нм. Другий максимум (Пік 2) ми віднесли до окремих макромолекул Д70-ПНІПАА15 з інкорпорованими всередині наночастинок золота, які надалі позначено як Нанооб'єкти II-Au (45 нм за $T = 25$ °С). Третій максимум (Пік 3) відповідає

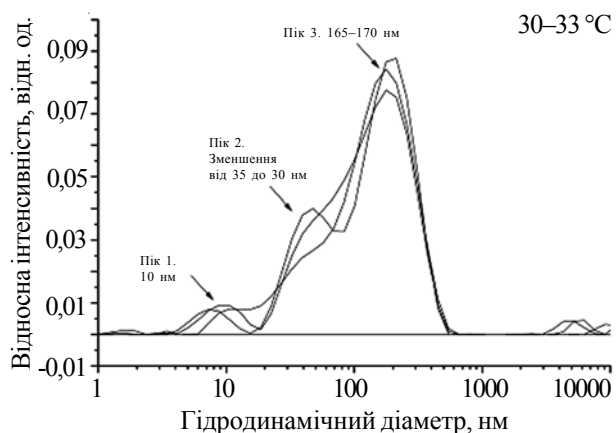


Рис. 3. Розподіли за розмірами в наносистемах Д70-ПНІПАА15/Au при нагріванні від 30 до 33 °С

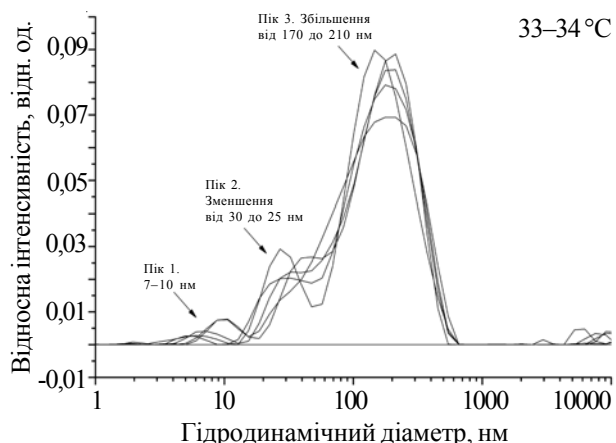


Рис. 4. Розподіли за розмірами в наносистемі Д70-ПНІПАА15/Аu при нагріванні від 33 до 34 °С

агрегатам, що складаються з Нанооб'єктів II-Аu (Нанооб'єкти III-Аu) і суттєво більші, ніж відповідні Нанооб'єкти III-Аg у зв'язку з більшим ступенем агрегації (200 та 100 нм відповідно). Додамо також, що в системі за температур, близьких до НКТР, також наявні агрегати Нанооб'єктів II-Аu, що містять у своєму об'ємі лише незначну кількість наночастинок золота (Нанооб'єкти IV-Аu аналогічні Нанооб'єктам IV-Аg, з тією різницею, що золотомісні Нанооб'єкти могли бути детектовані на розподілах за діаметрами у відповідному інтервалі температур). У температурному інтервалі 25–30 °С спостерігали зменшення розмірів Нанооб'єктів II (від 45 до 40 нм) і Нанооб'єктів III (від 190 до 170 нм), що свідчить про поступове стискання макромолекул Д70-ПНІПАА15 у складі Нанооб'єктів II та III, тобто про початок конформаційного переходу в полімерній матриці.

Ця тенденція зберігається і в температурному інтервалі 30–33 °С (рис. 3). Нанооб'єкти II зменшуються від 40 до 35 нм, а Нанооб'єкти III – зберігають свій розмір.

У температурному інтервалі 33–34 °С (рис. 4) спостерігали зменшення розміру Нанооб'єктів II до 25 нм. Водночас, зростають Нанооб'єкти III і з'являється плече на Піку 3, яке може відповідати початку утворення агрегатів макромолекул Д70-ПНІПАА15 у складі Нанооб'єктів II поблизу НКТР (формування Нанооб'єктів IV), що супроводжувалося зменшенням інтенсивності Піка 2.

При подальшому нагріванні в інтервалі температур 34,0–34,5 °С положення Піка 1 зберігається (рис. 5). Має місце досить різке зменшення діаметра Нанооб'єктів III від 210 до 170 нм, а плече на Піку 3, яке відповідає Нанооб'єктам IV, поступово зміщується в бік більших розмірів (від 55 до 85 нм) і зникає. Цей процес супроводжується подальшим зниженням інтенсивності Піків 1 і 2. Це пояснюється збільшенням інтенсивності розсіювання всіх агрегатів щодо індивідуальних частинок і макромолекул (причина – зростання кількості великих Нанооб'єктів).

При подальшому нагріванні в інтервалі температур

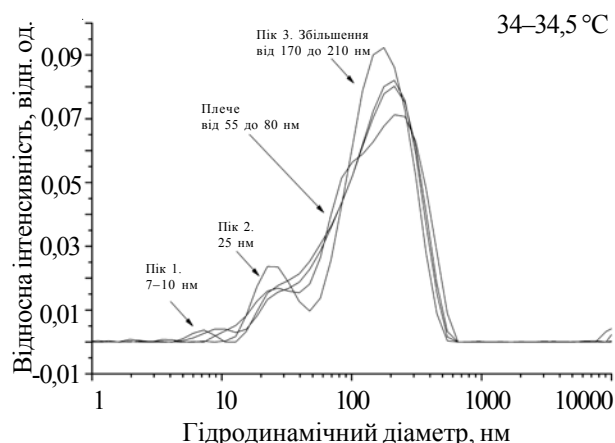


Рис. 5. Розподіли за розмірами наносистем Д70-ПНІПАА15/Аu при нагріванні від 34,0 до 34,5 °С

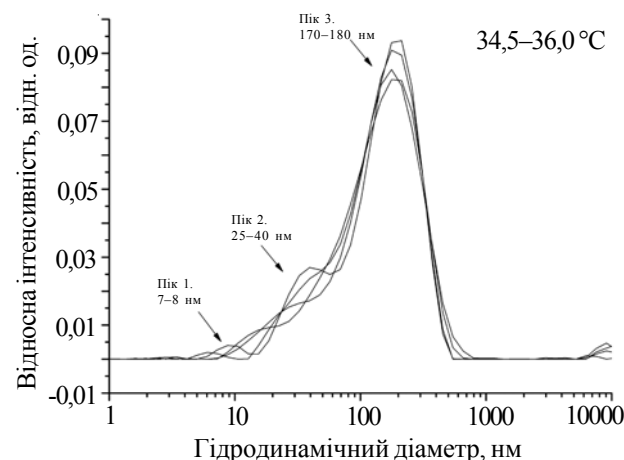


Рис. 6. Розподіли за розмірами наносистем Д70-ПНІПАА15/Аu при нагріванні від 34,5 до 36,0 °С

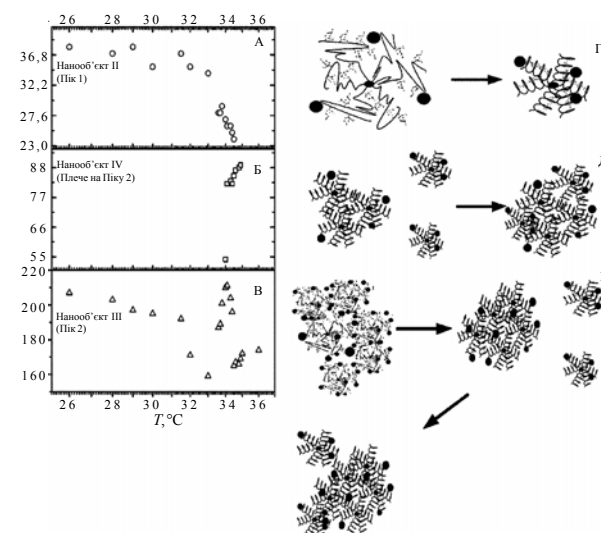


Рис. 7. Залежності положення максимуму Піків 2, 3 (А, В) і плеча на Піку 3 (В) на кривих розподілу за розмірами різних компонентів наносистеми та схеми відповідних процесів при підвищенні температури (Г, Д, Е)

34,5–36,0 °C (рис. 6), положення Піків 1 і 2 на кривих розподілу за гідродинамічними діаметрами істотно не змінюється.

На рис. 7 наведено залежності положення максимуму піків на кривих розподілу за розмірами різних компонентів наносистеми та схеми відповідних процесів при підвищенні температури. Нанооб'єкти I практично не змінювали розмір, тому на рис. 7 не наведена зміна їх розмірів у дослідженій температурній області. Крива A демонструє поступове зменшення гідродинамічного діаметра Нанооб'єктів II в наносистемі Д70-ПНІПАА15/Au. Вид цієї кривої а також значення гідродинамічних діаметрів близькі до таких для розчину вільного полімеру [5] з тією різницею, що НКТР для наносистеми Д70-ПНІПАА15/Au становила не 33,8 °C, як для індивідуального Д70-ПНІПАА15, а 34,3 °C.

Крива B на рис. 7 описує зміну положення плеча на Піку 3, що відповідає Нанооб'єктам IV. Крива охоплює лише інтервал температур, в якому можна було явно виділити плече на цьому піку. Різку зміну гідродинамічного діаметра Нанооб'єктів IV спостерігали за

$T = 34,3$ °C, що відповідає НКТР.

Найскладнішу форму має крива, яка відповідає зміні гідродинамічного діаметра Нанооб'єктів III зі зростанням температури (рис. 7, крива B). Спочатку спостерігали досить плавне зменшення розміру агрегатів до 160 нм за температури 33 °C, що відповідає поступовому колапсу ланцюгів ПНІПАА в складі агрегатів. Надалі розмір агрегатів збільшується до 210 нм за $T = 34,1$ °C. Подальше спадання кривої пояснюється підвищенням внеску розсіювання Нанооб'єктами IV, які розсіюють інтенсивніше за Нанооб'єкти III. Це призводить до зміщення Піка 3 у бік менших розмірів.

Висновки.

Показано, що в наносистемі Д70-ПНІПАА15/Au в області конформаційного переходу полімерної матриці розмір наночастинок золота не змінюється, що важливо для медико-біологічного застосування цих систем. Виявлено, що у наносистемі Д70-ПНІПАА15/Au в області НКТР полімеру відбуваються складні процеси, що полягають у зміні розміру агрегатів у результаті колапсу ланцюгів ПНІПАА.

Література

1. Ward Mark A. and Georgiou Theoni K. Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications. *Polymers*, 2011, 3: 1215-1242. doi:10.3390/polym3031215.
2. Reyes-Ortega F. pH-responsive polymers: properties, synthesis and applications. In book: *Smart Polymers and their Applications*. December 2014: 45-92. doi: 10.1533/9780857097026.1.45.
3. Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Dave A.M., Kumbhar S.G., Rudzinski W.E. Stimulus-responsive "smart" hydrogels as novel drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm*, 2002, 28: 957–974. <https://doi.org/10.1081/DDC-120006428>
4. Lima Luiz H., Morales Yael, Cabral Thiago. Poly-N-isopropylacrylamide (PNIPAM): a reversible bioadhesive for sclerotomy closure. *Int. J. Retina Vitreous*, 2016, 2 (23).
5. Chumachenko V., Kutsevol N., Harahuts Yu., Rawiso M., Marinin A., Bulavin L. Star-like dextran-graft-pnipam copolymers. Effect of internal molecular structure on the phase transition. *J. of Molecular Liquids*, 2017, 235: 77-82. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.02.098>
6. De Jong W.H., Borm P.J. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Inter. J. of Nanomedicine*, 2008, 3(2): 133-149. <https://doi.org/10.2147/IJN.S596>
7. Chunlei Zhang, Chao Li, Yanlei Liu, Jingpu Zhang, Chenchen Bao, Shujing Liang, Qing Wang, Yao Yang, Hualin Fu, Kan Wang, Daxiang Cui. Gold nanoclusters-based nanoprobe for simultaneous fluorescence imaging and targeted photodynamic therapy with superior penetration and retention behavior in tumors. *Adv. Funct. Mater.*, 2015, 25: 1314–1325. doi:10.1002/adfm.201403095.
8. Telegeev G., Kutsevol N., Chumachenko V., Naumenko A., Telegeeva P., Filipchenko S., and Harahuts Yu. Dextran-Polyacrylamide as Matrices for Creation of Anticancer Nanocomposite. *Inter. J. of Polymer Science*, 2017, 9 pages. Article ID 4929857, <https://doi.org/10.1155/2017/4929857>.
9. Pan Y., Neuss S., Leifert A., Fischler M., Wen F., Simon U., Schmid G., Brandau W. and Jahnen-Dechent W. Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small*, 2007, 3: 1941–1949. doi:10.1002/smll.200700378.

Надійшла до редакції 26 грудня 2017 р.

Исследование наносистемы разветвленный полимер / нанозолото в области конформационного перехода полимерной матрицы

В.А. Чумаченко, Ю.И. Гарагуц, Н.В. Куцевол, Н.П. Мельник, О.Н. Надтока

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, химический факультет
60, ул. Владимирская, Киев, 01033, Украина, kutsevol@ukr.net

Поли-N-изопропилакриламид (ПНИПАА) – биосовместимый термочувствительный полимер, который является перспективным для использования в нанобиотехнологии, так как имеет температуру фазового перехода (НКТР) в области физиологических температур. НКТР можно направлено регулировать изменением гидрофильно-гидрофобного баланса ПНИПАА-содержащей макромолекулы или изменением ее структуры. Введение наночастиц золота в ПНИПАА полимер-наноноситель – один из современных подходов для создания препаратов нового поколения для фотодинамической и фототермической противоопухолевой терапии. Наночастицы золота были синтезированы in situ в полимерной матрице разветвленного звездообразного термочувствительного сополимера с декстрановым ядром и привитыми поли-N-изопропилакриламидными цепями (Д-ПНИПАА). Методом трансмиссионной электронной микроскопии было показано, что наночастицы золота имели сферическую форму и размер 5–10 нм. Методом динамического рассеяния света исследовано наносистему Д-ПНИПАА/Au в области конформационного перехода полимерной матрицы. Установлено, что наносистема Д-ПНИПАА/Au содержит свободные наночастицы металлов и агрегаты макромолекул полимеров с инкорпорированными наночастицами золота. Размер наночастиц золота не изменяется в исследованной области температур.

Ключевые слова: разветвленный сополимер, поли-N-изопропилакриламид, НКТР, конформационный переход, наночастицы золота.

The investigation of nanosystems branched polymer/nanogold in the region of conformational transition of a polymer matrix

V.A. Chumachenko, Yu.I. Harahuts, N.V. Kutsevol, N.P. Melnyk, O.M. Nadтока

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Department of Chemistry
60, Volodymyrska str., Kyiv, 01033, Ukraine, kutsevol@ukr.net

Poly-N-isopropylacrylamide (PNIPAA) is a biocompatible thermosensitive polymer that is promising for using in nanobiotechnologies since this polymer has a phase transition temperature (LCST) in the physiological temperature range. LCST can be regulated by changing the hydrophilic-hydrophobic balance of the PNIPAA-containing macromolecule or by changing its structure. The incorporation of gold nanoparticles into PNIPAA polymer-nanocarrier is one of the modern approaches for the creation of new generation of drugs for photodynamic and photothermal antitumor therapy. The gold nanoparticles were synthesized in situ into polymeric matrix of branched star-shaped thermosensitive copolymer with dextran core and grafted poly-N-isopropylacrylamide chains (D-PNIPAA). Transmission electron microscopy has shown that gold nanoparticles had a spherical shape and a size of 5-10 nm. Dynamic light scattering was used for study D-PNIPAA/Au nanosystem in the region of the conformational transition of a polymer matrix. It was established that nanosystem D-PNIPAA/Au contained free nanoparticles of metals, as well as aggregates of polymer macromolecules with incorporated Au nanoparticles. The size of gold nanoparticles did not change in the studied temperature region.

Key words: branched polymer, Poly-N-isopropylacrylamide, LCST, conformational transition, Au nanoparticles.