

Дослідження наносистеми термочутливий розгалужений полімер/нанозолото/Хлорин еб у буферному розчині Хенкса

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

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, хімічний факультет
60, вул. Володимирська, Київ, 01033, Україна, garaguts.yulia.fox@gmail.com

Проведено порівняльні дослідження поведінки розчинів розгалуженого зіркоподібного кополімеру декстран-полі-N-ізопропілакриламід, наночастинок золота в цій полімерній матриці та наносистеми полімер/нанозолото/Хлорин еб у воді та у буферному розчині Хенкса, який використовують для випробовувань на культурах клітин, у діапазоні фізіологічних температур. Показано, що у сольовому розчині Хенкса не відбувається значних змін параметрів нанокмполімерів порівняно з водними розчинами. Встановлено, що в дослідженому діапазоні температур розмір наночастинок золота не змінюється. Методом динамічного світлорозсіювання виявлено, що за наявності фотосенсибілізатора відбувається незначний процес агрегації у системі. Це підтверджує факт взаємодії Хлорину еб з полімером-наночастиною, що узгоджується з результатами УФ-видимої спектроскопії. Показано, що фотодинамічна активність наносистеми полімер/нанозолото/Хлорин еб in vitro практично не відрізняється від ефективності вільного Хлорину еб за тієї ж концентрації.

Ключові слова: термочутливий кополімер, декстран-полі-N-ізопропілакриламід, наночастинок золота, Хлорин еб, фотодинамічна терапія.

Вступ.

Одним із найбільш перспективних методів лікування раку вважається терапія з використанням лазера, оскільки лазерне випромінювання можна дозувати, змінювати його параметри, воно не спричиняє болювих ефектів та не викликає алергії. Метод фотодинамічної терапії (ФДТ) базується на поєднанні лазера та фотосенсибілізатора (ФС) для лікування ряду онкологічних захворювань. Ефективне застосування ФДТ зумовлене селективним накопиченням ФС у необхідному місці (наприклад пухлині) та можливістю локалізовано його опромінювати, відповідно практично відсутніми побічними ефектами та малою травматичністю в цілому. Відомо, що ФС не токсичні без світлової експозиції, тому, навіть частково накопичуючись у нормальних тканинах завдяки можливості опромінювання у потрібній ділянці, не спричиняють токсичного ефекту [1]. Проте, і у ФДТ є один серйозний недолік – світлове випромінювання, на відміну від рентгенівського, не здатне проникати глибоко в тканини, що значно обмежує можливість застосування методу. Один із способів покращення світлочутливості ФС пов'язаний з можливістю плазмонного підсилення фотофізичних процесів, які забезпечують ФДТ, а саме поглинання світла барвником-фотосенсибілізатором. При цьому існують дві можливості підвищення ефективності ФДТ – це використання як матриць-наночастинок полімерних макромолекул і наночастинок золота.

Відомо, що полімери покращують доставку ліків у специфічні клітини та тканини. Вже на стадії попередніх досліджень вченим університету вдалося продемонструвати високу ефективність розгалужених біосумісних полімерів декстран-поліакриламід як векторів-наночастинок у медикаментозній терапії та основи для приготування наносистем, які містять одночасно металеві наночастинок і ФС хлорин еб. Було успішно продемонстровано, що зв'язування з розгалуженими полімерами зменшує агрегацію ФС, а розгалужена полімерна матриця дає змогу синтезувати стабільну в часі наносистему, яка містить і наночастинок золота. Вибір на користь використання саме нанорозмірного (колоїдного) золота зумовлений тим, що останнє практично нетоксичне та має спорідненість з біологічними факторами, які забезпечують ріст судин. На першій стадії пухлина збільшується, поглинаючи поживні речовини з тканин, які її оточують. Після того, як її розмір досягне 1,5–2,0 мм, спрацьовує механізм судиноутворення. Здатність наночастинок золота проникати крізь ендотелій пухлинних судин забезпечує вищу селективність накопичення протиракових засобів у пухлині. Явище локалізованого поверхневого плазмонного резонансу в наночастинках золота приводить до появи інтенсивної плазмонної смуги у спектрі поглинання, що дає можливість використовувати наночастинок золота у плазмонній фототермічній терапії, при якій опромінювання

наночастинок на довжині хвилі поглинання плазмонів спричиняє сильне локальне нагрівання, яке руйнує навколишні зляксісні клітини і тканини. Крім цього, полімерна матриця перешкоджає процесу агрегації ФС. Усі ці фактори сприяють глибшому проникненню ФС у клітини пухлини при використанні методу ФДТ.

Наночастинок золота виявляють особливі фізичні, хімічні та фармакологічні властивості, які й визначають їх застосування як носіїв специфічних молекул, компонентів біосенсорів і каталізаторів [2, 3]. Наноматеріали на основі золота підвищують терапевтичний ефект цих препаратів для ФДТ терапії [4]. При цьому дуже важливими є розмірні характеристики наночастинок золота, а також агрегативна стійкість отриманих систем [5]. Саме з цією метою використовуються полімерні матриці, оскільки саме макромолекули полімерів впливають на процеси утворення частинок металів, контролюючи їх розмір і форму, створюючи захисні екрани навколо наночастинок за рахунок специфічних взаємодій з їхньою поверхнею і агрегація наносистеми не відбувається [6, 7]. Як полімерні матриці можна використовувати біосумісні високомолекулярні речовини контрольованої молекулярної архітектури, що дає змогу передбачати їхню поведінку. В нашій роботі [8] було показано високу ефективність нанокмполімеру для ФДТ, який містив наночастинок золота (AuNPs), ФС хлорин е6 (Ce6), інкорпоровані в аніонну зіркоподібну матрицю декстран-поліакриламід-(ко)-поліакрилової кислоти. Нами було синтезовано та досліджено зіркоподібні розгалужені термочутливі кополімери декстран-полі-N-ізопропілакриламід (Д-ПНІПАА), які мають фазовий перехід у діапазоні фізіологічних температур. Показано можливість зміщення температури конформаційного переходу, регулюючи відстань між прищепленими ланцюгами у зіркоподібній макромолекулі Д-ПНІПАА на 3–4 °С у порівнянні з лінійним ПНІПАА, для якого НКТР (нижня критична температура розшарування) дорівнює 32 °С. Було синтезовано наночастинок золота (AuNPs) у полімерних матрицях Д-ПНІПАА [9, 10]. Показано існування аномального гістерезису для наносистеми Д-ПНІПАА/AuNPs при її нагріванні та охолодженні [11].

Оптичні властивості наночастинок благородних металів характеризуються наявністю в області видимого світла яскраво вираженої резонансної смуги, так званої смуги поверхневого плазмонного резонансу (ППР). Її виникнення пов'язане з утворенням поверхневих плазмонів – колективних коливань електронів провідності металу поблизу межі розділу метал–діелектрик [12]. Відомо [13], що на положення смуги ППР істотно впливають характеристики індивідуальних частинок, зокрема радіус наносфери і діелектричні властивості навколишнього середовища.

Було продемонстровано перспективу використання Д-ПНІПАА як наноносія протипухлинного

препарату доксорубіцину [14], який вивільняється з нанокмполімеру при зміні гідрофільно-гідрофобного балансу макромолекули в області НКТР. Наступним завданням було синтезувати та дослідити наносистеми в полімерній матриці Д-ПНІПАА та протестувати їхню ефективність для фотодинамічної терапії.

Відомо, що агрегаційні процеси в наносистемі можуть призводити до втрати її біологічної ефективності, оскільки розмір наночастинок металів визначає їхню біологічну активність. Агрегація ж полімерних макромолекул може призвести до критичного збільшення розміру нанокмполімеру, що також нівелює його активність. Показано [15,16], що введення додаткового компонента в полімерний наноносій може призводити до зміни гідрофільно-гідрофобного балансу макромолекули і до значного агрегаційного процесу з утворенням великих полімерних агрегатів, які нагадують “листя папороті”. Зміна температури і природа розчинника також можуть впливати на стан наносистеми.

Метою цієї роботи було дослідити поведінку наносистеми полімер/AuNPs/Ce6, розчину індивідуального полімеру Д-ПНІПАА в діапазоні фізіологічних температур у воді та у буферному розчині Хенкса, який використовують для випробовувань на культурах клітин, а також протестувати їхню фотодинамічну активність.

Експериментальна частина.

Синтез наносистеми Д-ПНІПАА/AuNPs. Синтез термочутливих кополімерів декстран-полі-N-ізопропілакриламід і синтез наночастинок золота в полімерних матрицях на їх основі детально описано в [9, 10].

Молекулярні характеристики кополімеру з декстрановим ядром ($M_w=70000$) і 15-тьма полі-N-ізопропілакриламідними прищепленнями наведені в таблиці. Отримані в цій полімерній матриці наночастинок золота розміром 5–10 нм мають сферичну форму.

Синтез наносистеми Д-ПНІПАА/AuNPs/Хлорин е6. До 1 мл системи Д-ПНІПАА/AuNPs додавали 0,5 мл розчину Хлорину е6 ($C = 154 \cdot 10^{-6}$ г/см³) та 8,5 мл буферного розчину Хенкса. Реакційну суміш інтенсивно перемішували.

Буферний розчин Хенкса був одержаний з Sigma-Aldrich (USA), фотосенсибілізатор Хлорин е6 (Ce6) був одержаний з Santa Cruz Biotechnology (USA).

Динамічне світлорозсіювання (DLS) вивчали на приладі Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., UK), на якому встановлено 4-мВ He-Ne лазер з довжиною

Таблиця 1. Молекулярні характеристики кополімеру Д-ПНІПАА

| Зразок | $M_w, 10^{-6}$ | $M_n, 10^{-6}$ | M_w/M_n | $n, \%$ |
|----------|----------------|----------------|-----------|---------|
| Д-ПНІПАА | 1,03 | 0,674 | 1,52 | 6,8 |

M_w – середньовагова молекулярна маса, визначена методом світлорозсіювання; M_n – середньочислова молекулярна маса; M_w/M_n – ступінь полідисперсності; n – вміст декстранової компоненти.



Рис. 1. УФ-спектри водного розчину розгалуженого кополімеру Д-ПНІПАА за температури 25–40–25 °С

хвилі 632,8 нм, а розсіяне світло детектується під кутом 173° (зворотне розсіювання).

Динамічне світлорозсіювання – найбільш універсальний і корисний набір методів для вимірювання *in situ* розмірів, розподілу розмірів і форми наночастинок [17]. Цей метод застосовували для вивчення зміни розмірів індивідуального Д-ПНІПАА, золю золота, синтезованого *in situ* в полімерній матриці, а також складного нанокompозиту з додаванням фотосенсибілізатора Себ за температури 25 і 37 °С.

УФ-видима спектроскопія. УФ-спектри поглинання золів золота були отримані за допомогою Varian Cary 50 scan УФ-спектрофотометра (Пало-Альто, Каліфорнія, США) в діапазоні 200–800 нм при нагріванні від 25 до 40 °С і подальшому охолодженні до температури 25 °С з кроком 1 °С і термостатуванням 2 хв за кожної температури.

Експерименти зі злякисними клітинами *in vitro*. Клітини лінії МТ-4 (Т-клітинний лейкоз людини) були отримані з банку клітинних культур Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Е. Кавецького НАН України. Клітини підтримували в середовищі RPMI-1640, яке містить 10 % фетальної бичачої сироватки за температури 37 °С в інкубаторі з 95 %-вою вологістю і 5 %-вим вмістом CO₂ в повітрі. Для фотодинамічної обробки готували суспензії клітин, які перебувають у логарифмічній фазі росту (0,5 Å~106/мл), в збалансованому сольовому розчині Хенкса. Через 1,5 год. інкубації клітин за температури 37 °С з хлорином еб чи з його нанокompозитом проби двічі промивали 10-тикратним об'ємом розчину Хенкса і піддавали впливу червоного лазера випромінювання (довжина хвилі 658 нм, питома потужність 1,1 мВт/см², доза 1 Дж/см²). Після опромінення клітини переносили в середовище для культивування та інкубували за T=37 °С протягом 18 год. для завершення фотодинамічної

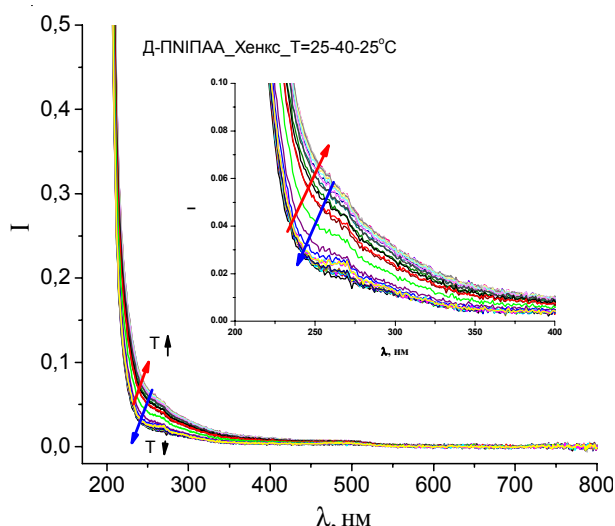


Рис. 2. УФ-спектри розгалуженого кополімеру Д-ПНІПАА у розчині Хенкса за температури 25–40–25 °С

індукованого процесу апоптозу. Потім визначали життєздатність клітин за допомогою тесту на виключення барвника трипанового синього.

На рис. 1 і 2 показано УФ-спектри розчинів розгалуженого кополімеру Д-ПНІПАА у воді та в розчині Хенкса відповідно. Показано, що при нагріванні інтенсивність полоси абсорбції за 250–275 нм, яка характеризує абсорбцію карбонільної [18] С=О-групи зростає, а при охолодженні знову знижується. Спостерігається невеликий гістерезис процесу, що може бути результатом великої швидкості процесу нагрівання–охолодження. Оскільки концентрація карбоксильних груп у зразку залишається без змін, а змінюється лише температура, то зміни інтенсивності полоси абсорбції, яка відповідає карбонільним групам, можуть бути пов'язані з конформаційними змінами полімерного

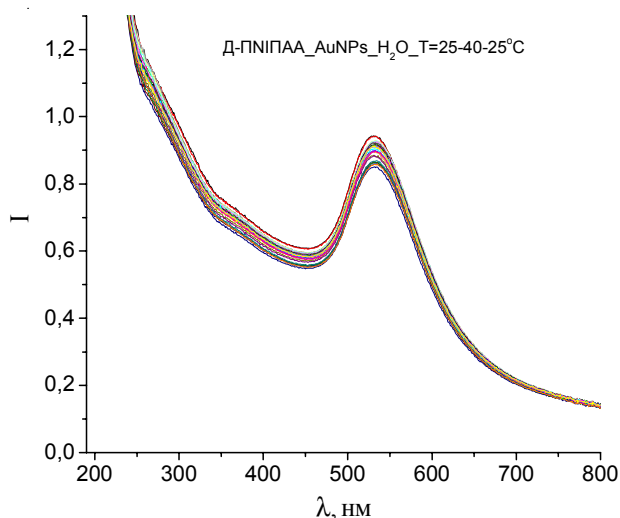


Рис. 3. УФ-спектри водних розчинів золів Au, синтезованих *in situ* в розгалуженому кополімері Д-ПНІПАА за температури 25–40–25 °С

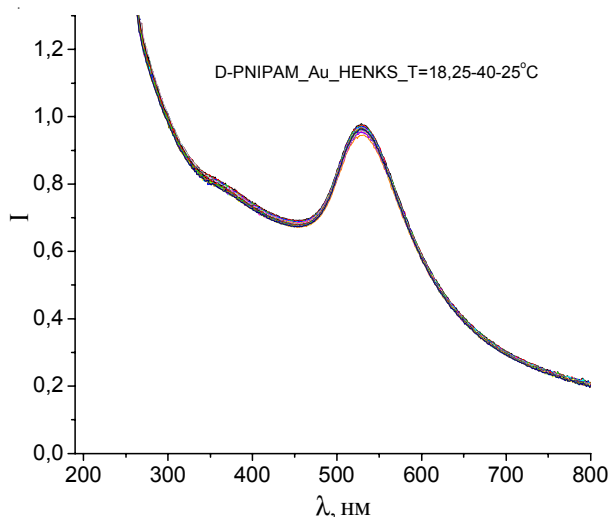


Рис. 4. УФ-спектри золів Au, синтезованих *in situ* в розгалуженому кополімері Д-ПНІПАА у розчині Хенкса за температури 25–40–25 °C

ланцюга в області НКТР.

Зміна інтенсивності абсорбції в області 250–275 нм і характер зміни при нагріванні–охолодженні спостерігається для кополімеру Д-ПНІПАА як у воді, так і у розчині Хенкса. Проте в розчині Хенкса ці зміни менш виражені

На рис. 3 та 4 подано УФ-спектри золів Au, синтезованих *in situ* у кополімері Д-ПНІПАА, у воді та у розчині Хенкса. В обох системах спостерігається пік ППР наночастинок Au за 530 нм, який не зміщується при нагріванні. Проте спостерігається незначна зміна інтенсивності полоси ППР, що також може бути викликано конформаційними змінами макромолекули в області НКТР. У розчині Хенкса зміна інтенсивності ППР при нагріванні–охолодженні набагато менша, ніж у водно-розчині.

На рис. 5 показано УФ-спектри гібридних наносистем полімер/AuNPs/Себ. Відомо, що спектр поглинання Себ має дві характеристичні смуги: в області 470–670 нм (перший електронний перехід), в області 350–440 нм (другий електронний перехід) – так звана смуга Сорє [19] (рис. 6).

Як видно, для наносистеми полімер/AuNPs/Себ (рис. 7) у спектрі абсорбції проявляються дві компоненти: фотосенсибілізатор (смуга Сорє в області 400 нм та одна з Q-смуг 671 нм) і наночастинок золота (530 нм). Як зазначалось вище, полімерна матриця не поглинає у даному діапазоні довжин хвиль.

Зі спектра видно, що внески в поглинання компонентів потрійної системи не адитивні, що особливо проявляється в області поглинання наночастинок. Також спостерігається ускладнення контуру смуги ППР за наявності фотосенсибілізатора. Можна зробити висновок про спектральні прояви взаємодії фотосенсибілізатора Себ з наночастинками золота.

При нагріванні наносистеми положення піків не

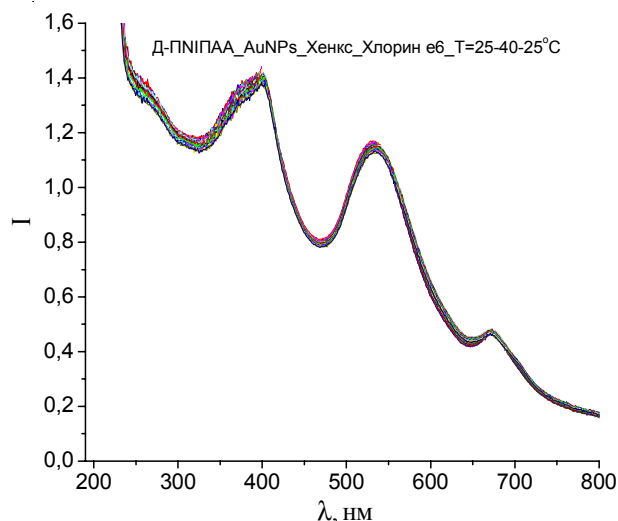


Рис. 5. УФ-спектри розчинів золів Au, синтезованих *in situ* в розгалуженому кополімері Д-ПНІПАА в розчині Хенкса з додаванням фотосенсибілізатора Себ за температури 25–40–25 °C

змінюється. Інтенсивність піка плазмонного резонансу AuNPs при нагріванні та подальшому охолодженні знижується, що, можливо, пояснюється утворенням деякої кількості осаду після вимірювань. Це свідчить про те, що після нагрівання систему не можна повторно використовувати, бо відбуваються незворотні зміни.

У нашій роботі [10] методом динамічного світлорозсіювання було проаналізовано розчин Д-ПНІПАА та наносистему Д-ПНІПАА/AuNPs у воді. Показано, що в наносистемі Д-ПНІПАА/AuNPs реєструються вільні наночастинок золота розміром 10 нм, макромолекули Д-ПНІПАА з інкорпорованими наночастинками золота розміром 40 нм, а також незначна частина агрегатів макромолекул з інкорпорованими наночастинками золота.

Розмірні характеристики індивідуального

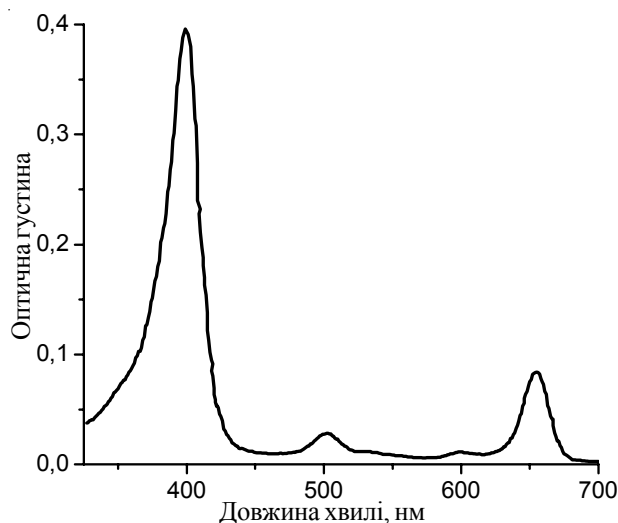


Рис. 6. Спектр абсорбції Хлорину еб за температури 25 °C

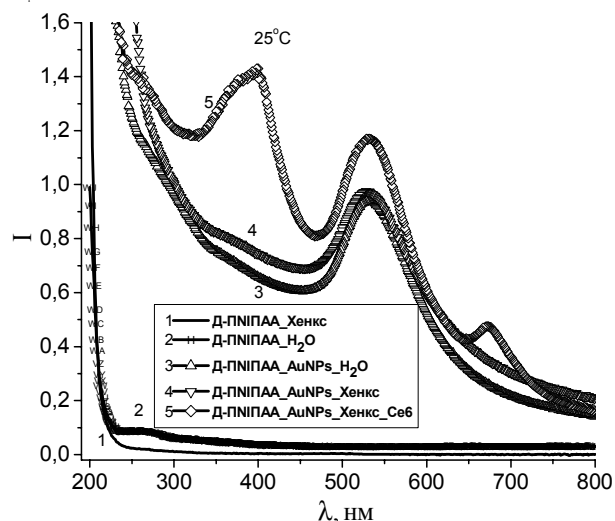


Рис. 7. УФ-спектри розчинів індивідуального полімеру та золів Au, синтезованих *in situ* в кополімері Д-ПНІПАА у воді та розчині Хенкса, а також складного нанокмозиту полімер/AuNPs/Ce6 за температури 25 °С

Д-ПНІПАА, наносистем Д-ПНІПАА/AuNPs і Д-ПНІПАА/AuNPs/Ce6 у сольовому розчині Хенкса подано на рис. 8.

Як видно, у розчині Хенкса розмір наночастинок золота у золі золота становить 10 нм і практично не змінюється для наносистеми полімер/AuNPs/Ce6.

За $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ спостерігається незначне зменшення розміру індивідуальних макромолекул Д-ПНІПАА до 30–35 нм, а також реєструється незначна кількість агрегатів макромолекул або поява невеликих піків в області 110–130 нм, що також може свідчити про відхилення форми розсіюючого макромолекулярного клубка від сферичної форми. Для системи полімер/AuNPs реєструється збільшення розмірів макромолекулярного клубка до 110 нм, що свідчить про утворення агрегатів, які містять декілька макромолекул, які більш компактні у порівнянні з індивідуальними макромолекулами. Для наносистеми полімер/AuNPs/Ce6 розмір наночастинок золота не змінюється, проте відбуваються кардинальні зміни в структурі агрегатів, і, як наслідок, спостерігається бімодальний розподіл інтенсивності піка, який характеризує агрегати.

Результати аналізу даних динамічного розсіювання світла досліджуваних систем у розчині Хенкса за $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ подано на рис. 9.

При підвищенні температури до 37 °С реєструється зменшення розмірів агрегатів макромолекул до 80 нм, що є результатом часткового колапсу макромолекул полімеру в області конформаційного переходу. Для золу золота, синтезованого в полімерній матриці Д-ПНІПАА, розмір наночастинок золота не змінюється, розмір наночастинок, які складаються з макромолекул полімеру з інкорпорованими AuNPs, також

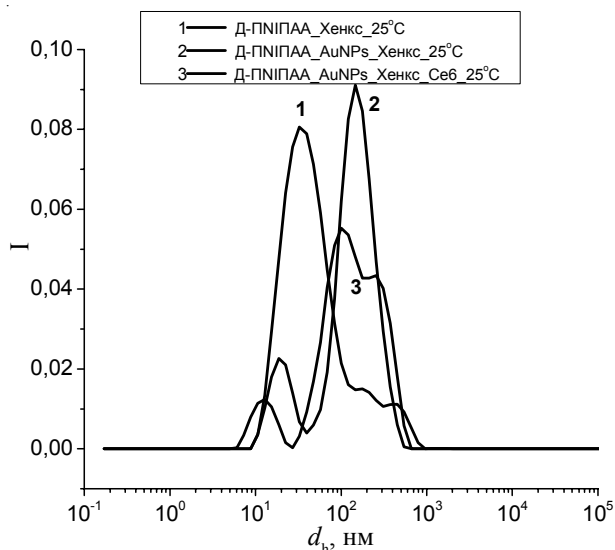


Рис. 8. Розподіли за гідродинамічними діаметрами розчинів індивідуального Д-ПНІПАА, золу золота, синтезованого *in situ* в полімерній матриці, а також нанокмозиту полімер/AuNPs/Ce6 за температури 25 °С у розчині Хенкса

зменшується у порівнянні з розміром цих наночастинок за $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Інтенсивність розсіювання зменшується, що свідчить про компактнізацію цих наночастинок після НКТР.

Таким чином показано, що при формуванні потрійних наносистем Д-ПНІПАА/AuNPs/Ce6, за $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ наночастинок золота не змінюють свого розміру, хлорин еб інкорпорується в наносистему. Доведено, що у сольовому розчині Хенкса не відбувається кардинальних змін в наносистемі, і вона залишається стабільною.

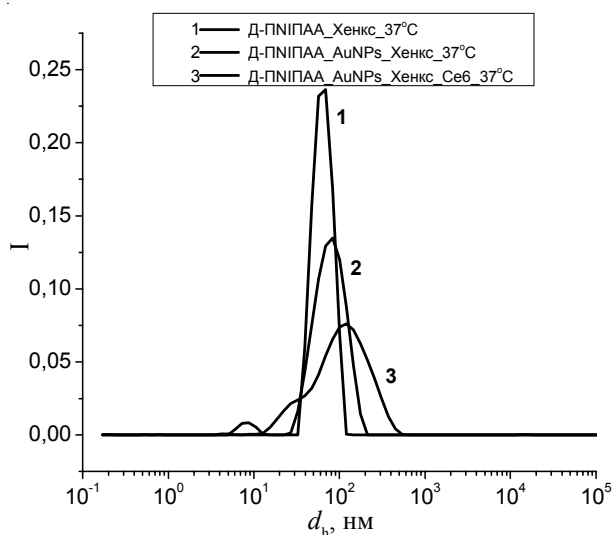


Рис. 9. Розподіли за гідродинамічними діаметрами розчинів індивідуального Д-ПНІПАА, золу золота, синтезованого *in situ* в полімерній матриці, а також нанокмозиту полімер/AuNPs/Ce6 за температури 37 °С

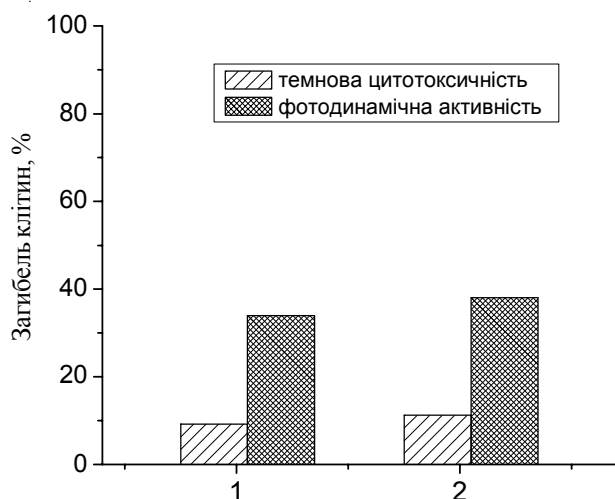


Рис. 10. Темнова цитотоксичність та фотодинамічна активність нанокompatитів ($c(\text{AuNPs})=1$ мкг/мл, $c(\text{Ce6})=0,1$ мкг/мл, опромінення 658 нм, 1 Дж/см², питома потужність 1,1 мВт/см²): 1 – Ce6; 2 – Д-ПНІПАА/AuNPs/Ce6

Виявлено, що у розчині Хенкса відбувається компактизація макромолекулярних клубків, що приводить до зменшення розмірів макромолекул-наночастин і агрегатів макромолекул, що може бути позитивним фактором для проникнення нанокompatиту через клітинну мембрану. Проте механізм взаємодії наносистеми з клітинами – це предмет окремого дослідження. За $T=37$ °C для всіх досліджених наносистем у буферному розчині Хенкса розмір наночастинок золота не змінюється, що важливо при медико-біологічному застосуванні цих систем для цільової доставки ліків, проте спостерігається компактизація агрегатів макромолекул, що може спричинити блокування фотосенсибілізатора.

Для перевірки цього припущення було проведено *in vitro* тестування фотодинамічної активності наносистеми Д-ПНІПАА/AuNPs/Ce6 на культурі малігнізованих лімфоцитів людини МТ-4. Було встановлено, що за відсутності опромінення червоним кольором нанокompatит не проявляє цитотоксичності. В той же час смертність лімфоцитів, попередньо інкубованих з нанокompatитом, після лазерного опромінення була лише на 4 % вища, ніж смертність клітин, інкубованих з вільним Хлорином е6 за тієї ж концентрації (рис. 10).

Література

1. Gao De, Rodney R., Hao Xu. Nanoparticles for Two-Photon PDT in Living Cells. *Nano Letters*, 2006, **6**, no. 11: 2383-2387. <https://doi.org/10.1021/nl0617179>
2. Rieznichenko L. Features of gold nanoparticles application for bio- and nanosensors. *Int J Biosen Bioelectron*, 2018, **4** (2): 39-40. <https://doi.org/10.15406/ijbsbe.2018.04.00095>
3. Elahi N, Kamali M, Baghersad MH. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*, 2018, July 1, **184**: 537-556. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.088>
4. Chunlei Zhang, Chao Li, Yanlei Liu, Jingpu Zhang, Chenchen Bao, Shujing Liang, Qing Wang, Yao Yang, Hualin Fu, Kan Wang, Daxiang Cui. Gold nanoclusters-

Отже, агрегаційні процеси, а також компактизація полімеру-наночастин після НКТР, які були зафіксовані в нанокompatиті полімер/AuNPs/Ce6 при підвищенні температури до 37 °C, призводять до блокування фотосенсибілізатора. Тому фотодинамічна активність нанокompatиту Д-ПНІПАА/AuNPs/Ce6 набагато нижча, ніж для нанокompatиту такого ж складу, але синтезованого в нетермочутливій полімерній матриці декстран-поліакриламід/ AuNPs/Ce6 [20] *in vitro*.

Висновки.

Доведено, що у сольовому розчині Хенкса не відбуваються кардинальні зміни в наносистемах Д-ПНІПАА/AuNPs і Д-ПНІПАА/AuNPs/Ce6 у порівнянні з тими ж системами у воді. У сольовому розчині Хенкса за $T=25$ °C відбувається лише незначне піджимання макромолекулярного клубка.

Виявлено, що за наявності фотосенсибілізатора відбувається незначний процес агрегації у системі, що є результатом зміни гідрофільно-гідрофобного балансу полімерної матриці. Це підтверджує факт взаємодії Ce6 з полімером-наночастин, що було також підтверджено методом УФ-спектроскопії.

За температури 37 °C для всіх досліджених наносистем у буферному розчині Хенкса розмір наночастинок золота не змінюється, що важливо при медико-біологічному застосуванні цих систем для цільової доставки ліків, проте спостерігається компактизація агрегатів макромолекул, що може викликати блокування фотосенсибілізатора.

In vitro тестування фотодинамічної активності наносистеми Д-ПНІПАА/AuNPs/Ce6 на культурі малігнізованих лімфоцитів людини МТ-4 показало, що смертність попередньо інкубованих з нанокompatитом лімфоцитів після лазерного опромінення була лише на 4 % вища, ніж смертність клітин, інкубованих з вільним Хлорином е6 за тієї ж концентрації. Таким чином агрегаційні процеси, а також компактизація полімеру-наночастин після НКТР, призводять до блокування фотосенсибілізатора.

Робота виконана за часткової фінансової підтримки МОН спільних українсько-білоруських науково-дослідних проектів «Дизайн і фізико-хімічні властивості нових багатокомпонентних наносистем для лікування та діагностики солідних пухлин» (2019–2020 рр.).

- based nanoprobe for simultaneous fluorescence imaging and targeted photodynamic therapy with superior penetration and retention behavior in tumors. Wileyonlinelibrary, 2015. <https://doi.org/10.1002/adfm.201403095>
5. Kangze Liu, Zhonglei He, Hugh J. Byrne, James F. Curtin and Furong Tian. Investigating the Role of Gold Nanoparticle Shape and Size in Their Toxicities to Fungi. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2018, **15**: 998. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050998>
 6. Ji Ho Youk, Mi-Kyoung Park, Jason Locklin, Rigoberto Advincula, Jinchuan Yang, and Jimmy Mays. Preparation of Aggregation Stable Gold Nanoparticles Using Star-Block Copolymers. *Langmuir*, 2002, **18** (7): 2455-2458. <https://doi.org/10.1021/la015730e>
 7. Muriel K. Corbierre, Neil S. Cameron, Mark Sutton, Simon G. J. Mochrie, Laurence B. Lurio, Adrian Ruhm, and R. Bruce Lennox. Polymer-Stabilized Gold Nanoparticles and Their Incorporation into Polymer Matrices. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123** (42): 10411-10412. <https://doi.org/10.1021/ja0166287>
 8. Shton I.A., Chumachenko VA, Shishko Ye.D., Kutsevol N.V., Arsentiev K.G., Gamaleya N.F. Synthesis and experimental testing of a new nanocomposite photosensitizer for photodynamic therapy. *Photobiology and experimental photomedicine (Ukr.)*, 2015, **1**, no. 2: 54-60.
 9. Chumachenko V., Kutsevol N., Harahuts Yu., Rawiso M., Marinin A., Bulavin L. Star-like dextran-graft-pnlpam copolymers. Effect of internal molecular structure on the phase transition. *Journal of Molecular Liquids*, 2017, **235**: 77-82. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.02.098>
 10. Chumachenko V.A., Harahuts Yu.I., Kutsevol N.V., Melnik N.P., Nadtocha O.M. The investigation of nanosystem of branched polymer/nanogold in the region of conformational transition of a polymer matrix. *Polym.J.(Ukr.)*, 2018, **40**, no. 1: 36-40.
 11. Yeshchenko O. A., Naumenko A. P., Kutsevol N. V., Maskova D. O., Harahuts Iu. I., Chumachenko V. A., Marinin A. I. Anomalous Inverse Hysteresis of Phase Transition in Thermosensitive Dextran-graft-PNIPAM Copolymer/Au Nanoparticles Hybrid Nanosystem. *J. Phys. Chem. C*, 2018, **122** (14): 8003-8010. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b01111>
 12. Shevtsova V.I., Hayduk P.I. The position of the band of surface plasmon resonance in colloidal solutions of silver and gold nanoparticles, *Vestnik BSU (Rus)*. Ser. 1, 2012, no. 2: 15-18.
 13. Mohammed Alsawafta, Mamoun Wahbeh, and Vo-Van Truong. Plasmonic Modes and Optical Properties of Gold and Silver Ellipsoidal Nanoparticles by the Discrete Dipole Approximation. *J. Nanomaterials*, 2012, **2012**, Article ID 457968, 10 pages. <https://doi.org/10.1155/2012/457968>
 14. Matvienko T., Sokolova V., Prylutska S., Harahuts Yu., Kutsevol N., Kostjukov V., Evstigneev M., Prylutsky Yu., Epple M., Ritter U. In vitro study of the anticancer activity of various Doxorubicin-containing dispersions. *Bioimpacts*, 2019, **9**, no. 1: 59-70. <https://doi.org/10.15171/bi.2019.07>
 15. Telegeev G., Kutsevol N., Chumachenko V., Naumenko A., Telegeeva P., Filipchenko S., and Harahuts Yu. Dextran-Polyacrylamide as Matrices for Creation of Anticancer Nanocomposite. *Int. J. Polym. Sci.*, 2017, Article ID 4929857. <https://doi.org/10.1155/2017/4929857>
 16. Kutsevol N., Naumenko A., Chumachenko V., Yeshchenko O., Harahuts Y., Pavlenko V. Aggregation processes in hybrid nanosystem polymer/nanosilver/cisplatin. *Ukr. J. Physics*, 2018, July 12, **63**, no. 6: 513-520. <https://doi.org/10.15407/ujpe63.6.513>
 17. Pecora R.. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *J. Nanoparticle Research*, 2000, **2**: 123-131. <https://doi.org/10.1023/A:1010067107182>
 18. Shanti R., Hadi A. N., Salim Y. S., Chee S. Y., Ramesh S. and Ramesh K. Degradation of ultra-high molecular weight poly(methyl methacrylate-co-butyl acrylate-co-acrylic acid) under ultra violet irradiation. *RSC Adv.*, 2017, **7**: 112-120. <https://doi.org/10.1039/C6RA25313J>
 19. Losytskyy M.Y., Kharchenko R.A., Harahuts Y.I., Shirinyan E.A., Malinovska Y.V., Kutsevol N.V., Yashchuk V.M. Different effect of polymer-incorporated nanoparticles of Au and Ag on hematoporphyrin interaction with graft polymers. *Funct. Mater.*, 2019, **26** (1): 107-113. <https://doi.org/10.15407/fm26.01.107>
 20. Chumachenko V. A., Shton I. O., Shishko E. D., Kutsevol N. V., Marinin A. I. and Gamaleia N. F. Branched Copolymers Dextran-Graft-Polyacrylamide as Nanocarriers for Delivery of Gold Nanoparticles and Photosensitizers to Tumor Cells. Chapter in the Book: *Nanophysics, Nanophotonics, Surface Studies, and Applications*, Vol. 183 of the series Springer Proceedings in Physics. Ed.: O. Fesenko, L. Yatsenko. 2016: 379-390. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30737-4_32

Надійшла до редакції 12 червня 2019 р.

Исследования наносистемы термочувствительный разветвленный полимер/ нанозолото/хлорин е6 в буферном растворе Хэнкса

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

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Химический факультет
60, ул. Владимирская, Киев, 01033, Украина

Проведены сравнительные исследования поведения растворов разветвленного звездообразного сополимера Декстран-поли-N-изопропилакриламид, наночастиц золота в этой полимерной матрице и наносистемы полимер/нанозолото/Хлорин е6 в воде и в буферном растворе Хэнкса, который используют для испытаний на культурах клеток, в области физиологических температур. Показано, что в солевом растворе Хэнкса не происходит значительных изменений параметров наноконструкций по сравнению с водными растворами. Установлено, что в исследованной области температур размер наночастиц золота не меняется. Методом динамического светорассеяния обнаружено, что в присутствии фотосенсибилизатора происходит незначительный процесс агрегации в системе. Это подтверждает факт взаимодействия Хлорина е6 с полимером-нанонесителем, что согласуется с результатами УФ-видимой спектроскопии. Показано, что фотодинамическая активность наносистемы полимер/нанозолото/Хлорин е6 in vitro практически не отличается от эффективности свободного Хлорина е6 в той же концентрации.

Ключевые слова: термочувствительный сополимер, Декстран-поли-N-изопропилакриламид, наночастицы золота, Хлорин е6, фотодинамическая терапия.

Studying the nanosystem thermosensitive branched polymer/nanogold/chlorine e6 in Hanks' balanced salt solution

Yu.I. Harahuts, N.V. Kutsevol, N.P. Melnik, O.M. Nadtoka, P.A. Virych

Taras Shevchenko Kyiv National University Department of Chemistry
60, Volodymyrska str., Kyiv, 010601, Ukraine, garaguts.yulia.fox@gmail.com

The comparative studies of the behavior of the branched star-like copolymer Dextran-poly-N-isopropylacrylamide, gold nanoparticles in the polymer matrix, and polymer/nanogold/Chlorine e6 nanosystem have been carried out in water and in the Hanks' balanced salt solution, used for testing on cell cultures, in the physiological temperature range. It has been shown that nanocomposite dimensional parameters do not undergo significant changes in Hank's balanced salt solution in comparison with aqueous solutions. The size of gold nanoparticles doesn't change in the temperature region studied. However, a slight aggregation process in nanosystem has been registered at the presence of photosensitizer. That was caused by the change in the hydrophilic-hydrophobic balance of the polymer matrix. It confirmed the interaction of Chlorine e6 with polymer-nanocarrier. This conclusion is in agreement with the results of UV-visible spectroscopy. The photodynamic activity of the polymer/nanogold/Chlorine e6 nanosystem has also been tested in vitro. The efficiency of the nanocomposite was not much different in comparison with the efficiency of free Chlorine e6 at the same concentration. Obviously, the aggregation processes and the compaction of the polymer-nanocarrier after LCST have resulted in blocking of the photosensitizer.

Key words: thermosensitive copolymer, Dextran-poly-N-isopropylacrylamide, gold nanoparticles, Chlorine e6, photodynamic therapy.