

ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭТИЛЕНИМИНА КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ

© 2020 г. А. В. Теньковцев*, М. П. Курлыкин, А. И. Амирова, А. С. Красова,
Т. Ю. Кирилэ, А. П. Филиппов

*Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук,
Большой пр. 31, Санкт-Петербург, 199004 Россия
e-mail: tenkovtsev@yandex.ru

Поступило в Редакцию 6 февраля 2020 г.

После доработки 6 февраля 2020 г.

Принято к печати 13 февраля 2020 г.

Ацилированием разветвленного полиэтиленimina изобутироилхлоридом с последующей обработкой 1,6-гексаметилендиизоцианатом получены термочувствительные наночастицы, коллоидные растворы которых обратимо теряют растворимость при температуре, близкой к физиологической. Исследовано влияние состава наночастиц на их гидродинамические параметры и температуры фазовых переходов в водных растворах.

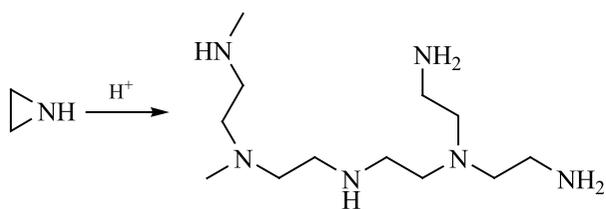
Ключевые слова: полиэтиленimin, термочувствительные полимеры, наночастицы

DOI: 10.31857/S0044460X20070185

В настоящее время гидрогели находят широкое применение в различных областях медицины и биотехнологии, в частности, при создании систем доставки лекарств, диагностике заболеваний, в тканевой инженерии, производстве мембран и т. д. [1–4]. Особый интерес в этих областях представляют термочувствительные гидрогели, способные к обратимому фазовому переходу вблизи физиологических температур [5]. При этом биосовместимость полимерной матрицы является необходимым условием для использования в биомедицинских приложениях. Одним из немногих полимеров, полностью удовлетворяющих всем вышеуказанным требованиям, является поли-2-изопропил-2-оксазолин, разрешенный к применению в качестве носителя лекарственных препаратов и способный в водном растворе претерпевать переход клубок-глобула, теряя при этом растворимость при температуре около 37°C. Сшитые полиоксазолины [6] также способны образовывать гели и в некоторых случаях демонстрируют термиче-

ски обратимое гелеобразование в узком диапазоне температур. Химически сшитые гидрогели необратимы, т. е. не переходят в раствор при изменении внешних условий, в то время как физические гели, формирующиеся вследствие образования сетки зацеплений макромолекул благодаря сольватобным или ионным взаимодействиям, обратимы и могут переходить в раствор при, например, повышении температуры [5]. В отличие от традиционных, термочувствительные гидрогели переходят в раствор не при повышении, а при понижении температуры ниже нижней критической температуры растворимости. До настоящего времени исследованы гели на основе ряда сшитых, нерастворимых в воде, полиоксазолинов [7–9]. Однако для решения ряда медицинских проблем, например, временного тромбоза кровеносных сосудов при хирургических вмешательствах, необходимы растворимые в воде, обратимые термочувствительные гидрогели, для получения которых, по мнению авторов, могут быть использованы наночастицы

Схема 1.



на основе разветвленных и частично сшитых термочувствительных *N*-изобутироилполиэтилениминов. В связи с этим, целью настоящей работы был синтез водорастворимого, частично-сшитого, разветвленного полиизобутирилоксазолина и оптимизация условий получения наночастиц на его основе.

Для исследований был использован образец разветвленного полиэтиленимина с $M_w = 25000$ и $M_n = 10000$ г/моль (Aldrich). При исследовании разветвленных полимеров важным вопросом является их степень ветвления. Для определения числа первичных, вторичных и третичных аминогрупп, присутствующих в исходном разветвленном полиэтиленимине, использовали метод Холикросса [10].

Разветвленный полиэтиленимин в промышленности получают полимеризацией этиленимина по схеме 1.

Очевидно, что при данном способе синтеза количество третичных и первичных атомов азота равно друг другу. С учетом этого, анализ спектральных данных показывает, что доля вторичных атомов азота составляет 0.590, в то время как доля первичных и третичных равна 0.215.

Разветвленный полиэтиленимин подвергли ацилированию хлорангидридом изомасляной кислоты в условиях акцепторно-каталитического процесса (схема 2). В качестве акцептора хлороводорода использовали триэтиламин. С целью определения условий, позволяющих получить полиизобутироилэтиленимин с определенной степенью замещения аминогрупп, реакцию проводили как с использованием различных методов амидирования, так и при различном соотношении реагентов.

Степень ацилирования полиэтиленимина определяли по данным спектроскопии ЯМР. Как следует из данных ЯМР, в спектре частично ацилированного изомасляной кислотой разветвленного полиэтиленимина замещение водорода аминогруппы на остаток изомасляной кислоты приводит к значительному сдвигу протонов метиленовых групп, соседствующих с аминогруппами, что позволяет количественно определить степень замещения.

Данные по влиянию метода ацилирования и соотношения реагентов на степень замещения ами-

Схема 2.

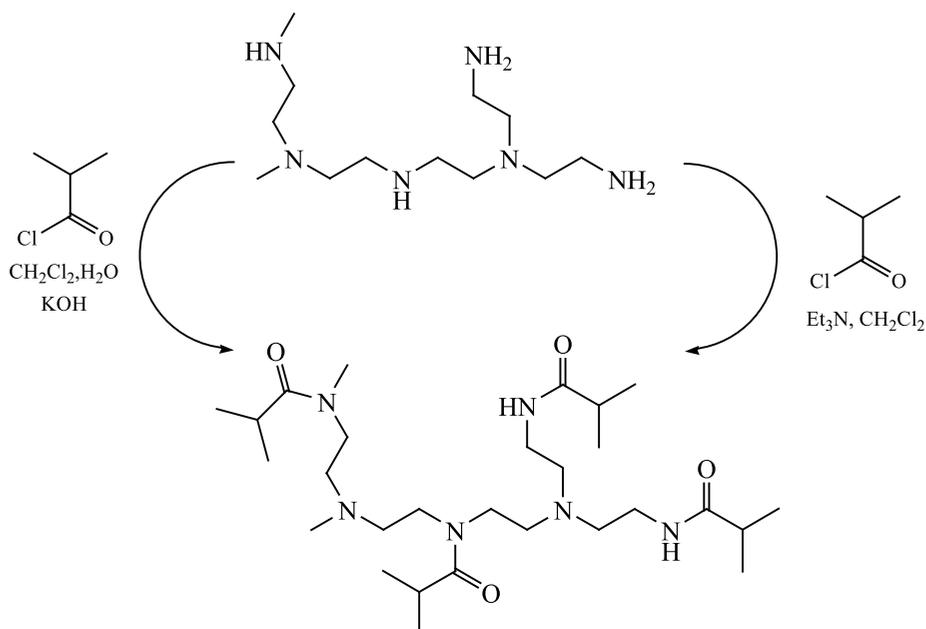


Таблица 1. Влияние метода ацилирования и соотношения реагентов на степень замещения аминогрупп

Метод синтеза	Мольное соотношение изобутироилхлорид–полиэтиленимин	Степень замещения аминогрупп, %
Акцепторно-каталитический	0.7	50
Акцепторно-каталитический	1.0	73
Межфазный	1.0	48
Акцепторно-каталитический	3.0	87

Таблица 2. Растворимость и молекулярная масса полученных образцов^a

Образец	Количество сшивателя, ^b мол%	$M_w \times 10^3$	Растворимость		
			H ₂ O	EtOH	CHCl ₃
1	18.5	28	+	+	+
2	21.7	28	+	+	+
3	26.8	27	±	+	+
4	29.9	31	–	–	+
5	35.0	–	–	–	–

^a M_w для исходного ацилированного полиэтиленимина составляет 28×10^3 .

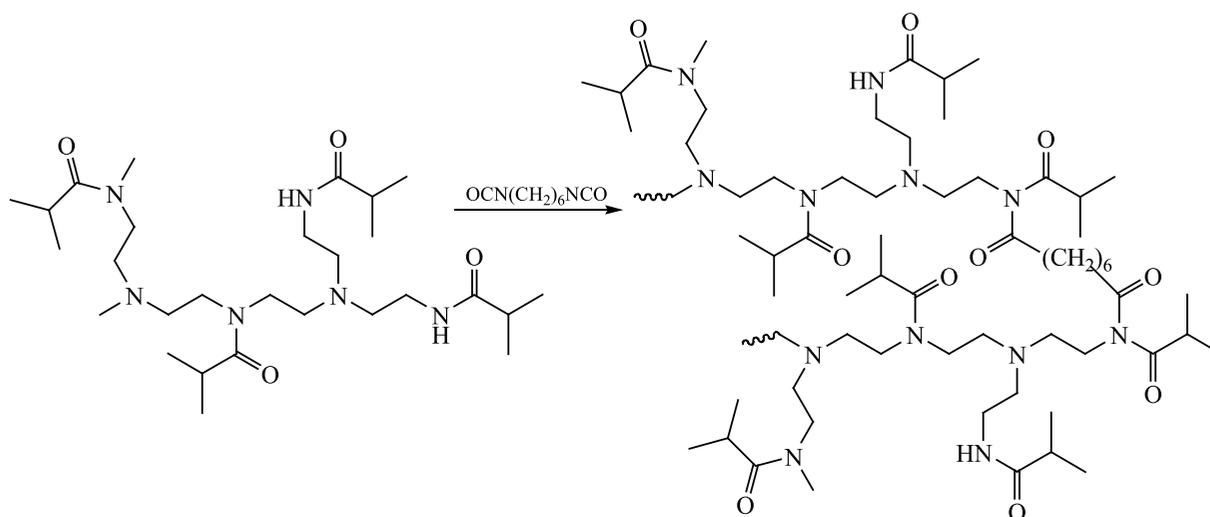
^b моль сшивателя/моль мономерного звена $\times 100\%$.

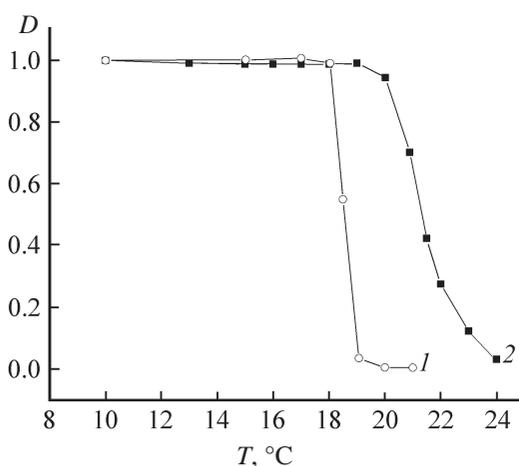
ногрупп приведены в табл. 1. Видно, что в случае использования реакции Шоттена–Баумана степень замещения аминогрупп значительно ниже, чем при использовании реакции Эйнхорна при одинаковом соотношении реагентов. Причиной этого является, вероятно, высокая склонность хлорангидридных групп к нуклеофильной атаке, которая нивелирует большую реакционную способность аминогрупп по сравнению с водой, что усиливается концентрационным эффектом.

С целью получения наночастиц и гидрогеля с достаточно высокой вязкостью, необходимой для временного тромбоза кровеносных сосудов, была

предпринята попытка частичной сшивки полимерного клубка по свободным аминогруппам. При этом критичным фактором являлось сохранение растворимости продукта в воде. Для синтеза частично сшитого полиизобутироилэтиленимина в качестве сшивателя был выбран 1,6-гексаметилендиизоцианат (схема 3).

Выбор данного сшивателя обусловлен тем, что, как известно [11], изоцианаты количественно реагируют как с первичными, так и со вторичными аминогруппами при комнатной температуре и относительно устойчивы к действию воды при комнатной или более низкой температуре. При

Схема 3.




Температурная зависимость оптической плотности растворов образцов 1 (1) и 4 (2).

этом следует учесть, что полное удаление воды из полиэтиленимина и продуктов его ацилирования достаточно проблематично. Реакцию проводили с добавлением определенного количества диизоцианата. Для дальнейших исследований было получено 4 образца растворимого, частично сшитого ацилированного полиэтиленимина, различающихся количеством добавленного сшивателя (табл. 2). Как видно из приведенных данных, несмотря на изменение физических свойств, в частности растворимости, увеличения молекулярной массы частиц с увеличением количества сшивателя не наблюдается. При этом с увеличением концентрации сшивателя резко снижается характеристическая вязкость растворов полимеров.

Существенное снижение значений характеристической вязкости растворимых образцов при постоянстве M_w свидетельствует о внутримолекулярном характере сшивки, приводящей к уплотнению макромолекул. Такое поведение можно объяснить тем, что на первой стадии взаимодействия полиэтиленимина с диизоцианатом преимущественно происходит реакция с аминогруппами, находящимися на поверхности клубка, и внутримолекулярная сшивка.

При дальнейшем увеличении количества сшивателя вследствие диффузии клубка в клубок начинается межмолекулярная сшивка, и полимер теряет растворимость (табл. 2). По данным динамического светорассеяния, гидродинамический радиус полученных наночастиц, сохраняющих

способность образовывать коллоидный раствор в воде, составил 3.6–4.8 нм.

На рисунке приведена зависимость оптической плотности 0.5%-ного раствора образцов 1 и 4 в зависимости от температуры. Как видно из рисунка, температура и интервал фазового перехода увеличивается при компактизации наночастицы. Такое поведение, вероятно, связано с уменьшением сольватной оболочки полимерного клубка, что, как известно, увеличивает температуру помутнения ацилированных полиэтилениминов [12].

В настоящее время проводятся исследования возможности использования полученных полимеров для временного тромбоза кровеносных сосудов, результаты которых будут опубликованы в специализированных изданиях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ^1H ЯМР получены на приборе Bruker AVANCE (400 МГц) для растворов в дейтерированном хлороформе. УФ спектры получены на спектрофотометре СФ-256 (ЛОМО ФОТОНИКА, Россия). Для диализа использовали диализные мешки CellaSep с MWCO 3000 D. Термочувствительность полимеров исследовали на приборе Specord UV-VIS. Определяли светопропускание в водных растворах ($c = 0.5\%$) в зависимости от температуры. Нагрев производили с постоянной скоростью 0.2 град/мин. Светорассеяние изучали на установке Photocor Complex (ООО «Фотокор», Россия), источником света служил He-Ne лазер с длиной волны $\lambda = 632.8$ нм. В качестве калибровочной жидкости использовали толуол ($R_V = 1.38 \times 10^{-5} \text{ см}^{-1}$). Корреляционную функцию интенсивности рассеянного света получали с использованием коррелятора Photocor-PC2 с числом каналов 288 и обрабатывали с помощью программного обеспечения DynaLS.

Характеристическую вязкость измеряли на вискозиметре Оствальда. Измерения проводили с использованием блока контроля температуры LOIP LT-100 (ООО ЛОИП, Россия). Время истечения растворителя составляло $t_0 = 48.5$ с. Значения характеристической вязкости были оценены методом Хаггинса.

Разветвленный полиэтиленимин, гексаметилендиизоцианат и изобутироилхлорид (Aldrich) использовали без дополнительной очистки.

Поли-*N*-изобутироилэтиленимин (мольное соотношение реагентов 1:1). К раствору 10 г полиэтиленимина и 25 мл триэтиламина в 100 мл хлористого метилена при охлаждении льдом и интенсивном перемешивании в течение 1 ч добавляли 17.5 г изобутироилхлорида. Смесь оставляли при комнатной температуре на 10 ч, затем растворитель удаляли в вакууме. Остаток диализовали относительно воды в течение 48 ч и подвергали лиофильной сушке.

Поли-*N*-изобутироилэтиленимин, частично сшитый 1,6-гексаметилендиизоцианатом (образец 3). К раствору 830 мг в 8 мл хлористого метилена добавляли 300 мг диизоцианата. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, после чего добавляли 0.5 мл диэтиламина. После удаления растворителя остаток диализовали относительно воды в течение 48 ч и подвергали лиофильной сушке.

Образцы 1, 2, 4 и 5 получали аналогично.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-73-20318).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ahn S., Kasi R.M., Kim S.-C., Sharma N., Zhou Y.* // *Soft Matter*. 2008. Vol. 4. N. 5 P. 1151. doi 10.1039/B714376A
2. *Singh N.K., Lee D.S.* // *J. Control. Rel.* 2014. Vol. 193. P. 214. doi 10.1016/j.jconrel.2014.04.056 0168-3659
3. *Gandhi A., Paul A., Sen S.O., Sen K.K.* // *Asian J. Pharm. Sci.* 2015. Vol. 10. N 2. P. 99. doi 10.1016/j.ajps.2014.08.010
4. *Jones C.D., Steed J.W.* // *Chem. Soc. Rev.* 2016. Vol. 45. P. 6546. doi 10.1039/C6CS00435K
5. *Yang Z., Ding J.* // *Macromol. Rapid Commun.* 2008. Vol. 29. N 9. P. 751. doi 10.1002/marc.200700872
6. *Chujo Y., Sada K., Kawasaki T., Saegusa T.* // *Pol. J.* 1992. Vol. 24. N 11. P. 1301. doi 10.1295/polymj.24.1301
7. *Chujo Y., Sada K., Matsumoto K., Saegusa T.* // *Macromolecules.* 1990. Vol. 23. N 4. P. 1234. doi 10.1021/ma00207a002
8. *Rueda J., Suica R., Komber H., Voit B.* // *Macromol. Chem. Phys.* 2003. Vol. 204. N 7. P. 954. doi 10.1002/macp.200390065
9. *Voorhaar L., Hoogenboom R.* // *Chem. Soc. Rev.* 2016. Vol. 45. N 14 P. 6546. doi 10.1039/c6cs00130k
10. *Holycross D.R., Chai M.* // *Macromolecules.* 2013. Vol. 46. N 17. P. 6891. doi 10.1021/ma4011796
11. *Kelly A.M., Wiesbrock F.* // *Macromol. Rapid Commun.* 2012. 33. N 19. P. 1632. doi 10.1002/marc.201200333
12. *Sideratou Z., Agathokleous M., Theodossiou T.A., Tsiourvas D.* // *Biomacromolecules.* 2018. Vol. 19. N 2. P. 315. doi 10.1021/biomac.7b01325

Thermosensitive Nanoparticles Based on Polyethylenimine as Promising Materials for Biomedical Applications

A. V. Tenkovtsev*, M. P. Kurlykin, A. I. Amirova, A. S. Krasova, T. Yu. Kirila, and A. P. Filippov

Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199004 Russia

*e-mail: tenkovtsev@yandex.ru

Received February 6, 2020; revised February 6, 2020; accepted February 13, 2020

Thermosensitive nanoparticles were synthesized by acylation of branched polyethylenimine with isobutyroyl chloride and cross-linking by 1,6-hexamethylenediisocyanate. It was found that colloidal aqueous solutions of these particles reversibly lose the solubility at temperatures close to physiological ones. The influence of nanoparticle composition on their hydrodynamic parameters as well as phase transition temperatures in aqueous solutions was studied.

Keywords: polyethylenimine, thermosensitive polymers, nanoparticles