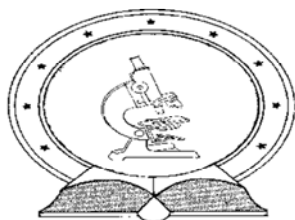


**DE TTK**



**1949**

**PAMAM DENDRIMEREK VIZES OLDATBELI  
VISELKEDÉSE ÉS KÖLCSÖNHATÁSA  
KISMOLEKULÁKKAL**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

**Kéri Mónika**

Témavezető: Bányai István, egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM  
Természettudományi Doktori Tanács  
Kémia Doktori Iskola  
Debrecen, 2015.



*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Kémia Doktori Iskola Makromolekuláris és felületi kémia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.*

*Debrecen, 2015. január 20.*

*a jelölt aláírása*

*Tanúsítom, hogy Kéri Mónika doktorjelölt 2008- 2012 között a fent megnevezett Doktori Iskola Makromolekuláris és felületi kémia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.*

*Debrecen, 2015. január 20.*

*a témavezető aláírása*



# PAMAM DENDRIMEREK VIZES OLDATBELI VISELKEDÉSE ÉS KÖLCSÖNHATÁSA KISMOLEKULÁKKAL

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a Kémia  
tudományágban

Írta: **Kéri Mónika**, okleveles környezetkutató, angol-magyar szakfordító

Készült a Debreceni Egyetem Kémiai Doktori Iskolája  
(Makromolekuláris és felületi kémia alprogramja) keretében

Témavezető: **Bányai István**, tanszékvezető egyetemi tanár

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Brücher Ernő, professzor emeritus (DE)

tagok: Dr. László Krisztina, egyetemi tanár (BME)  
Dr. Tóth Imre, egyetemi tanár (DE)

A doktori szigorlat időpontja: 2013. január 28.

Az értekezés bírálói:

Dr. ....  
Dr. ....  
Dr. ....

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. ....

tagok: Dr. ....  
Dr. ....  
Dr. ....  
Dr. ....

Az értekezés védésének időpontja: 2015. .... .



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, *Bányai István* egyetemi tanárnak, a Kolloid- és Környezetkémiai Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra a dolgozat elkészítését és mindvégig figyelemmel kísérte munkámat. Őszintén köszönöm neki a munkám során nyújtott sokrétű, önzetlen segítségét, türelmét és megértését. Hálás vagyok, hogy megismertette velem az NMR spektroszkópia világát, sokat tanultam tőle.

Köszönetemet szeretném kifejezni *Dr. Nagy Zoltánnak* a szakmai és emberi támogatásáért, a kísérletek kivitelezésében és az eredmények értelmezésében tett hozzájárulásáért, kiemelve a pH-potenciometriás méréseket. Köszönöm *Dr. Berka Mártának* az oktatásban való segítségét, és hogy bevezetett a kolloidkémia rejtelmeibe.

Hálás vagyok *Dr. Novák Leventének* a hasznos szakmai beszélgetésekért és a labormunkában nyújtott segítségért, valamint *Szatmári Mihálynak* az oktatásban való segítségéért. Köszönet a Kolloid- és Környezetkémiai Tanszék minden további tagjának, hogy baráti légkört biztosítottak a munkám során. Köszönöm *Kozmáné Ildikónak és Dóra Rékának*, a tanszék korábbi és jelenlegi adminisztrátorainak a hivatalos ügyekben nyújtott segítségüket.

Köszönet illeti *Xiangyang Shi professzort és kutatócsoportját* (Donghua University, Shanghai) a közös kutatásban való részvételükért, illetve az ott eltöltött idő alatt nyújtott vendégszeretetükért.

Köszönöm *Prof. Dr. Kövér Katalinnak* az STD NMR kísérletek során nyújtott segítségét.

Hálásan köszönöm családomnak és barátaimnak, kiemelve *férjemet és kisfiunk nagyszüleit*, hogy támogatásukkal segítették a munkámat, valamint *édesanyámat*, aki elindított ezen az úton.

A kutatásom a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt által nyújtott személyi támogatással valósult meg. A kutatás infrastruktúrája a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0043 számú ENVIKUT projekt által biztosított forrásból valósult meg. Mindkét projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg. A kínai kutatócsoporttal való együttműködést a TÉT\_12\_CN-1-2012-0032 számú kínai-magyar kétoldalú kutatói program támogatta.





# TARTALOMJEGYZÉK

<b>1</b>	<b>Bevezetés és célkitűzések .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Irodalmi előzmények .....</b>	<b>5</b>
2.1	PAMAM dendrimerek jellemzése .....	7
2.2	Ionok kölcsönhatása dendrimerrel .....	19
2.3	A PAMAM dendrimerek orvosi alkalmazása, gyógyszerhatóanyaggal való kölcsönhatásuk .....	22
2.4	Az arany nanorészecskék és a PAMAM dendrimerek közötti kölcsönhatás .....	25
<b>3</b>	<b>Kísérleti körülmények és vizsgálati módszerek .....</b>	<b>30</b>
3.1	A felhasznált vegyszerek .....	30
3.2	NMR mérések .....	30
3.2.1	Mintakészítés .....	30
3.2.2	NMR módszerek .....	32
3.3	pH-potenciometriás mérések .....	36
3.3.1	Mintakészítés .....	36
3.3.2	pH-mérés .....	37
3.3.3	pH-potenciometrikus titrálás .....	37
<b>4</b>	<b>Eredmények .....</b>	<b>38</b>
4.1	NH <sub>2</sub> -végcsoportú G5 PAMAM dendrimerek szerkezetének jellemzése, kölcsönhatása az oldószerrel és annak ionjaival .....	38
4.1.1	<sup>1</sup> H NMR spektrum azonosítása, szerkezet jellemzése .....	38
4.1.2	G5.NH <sub>2</sub> dendrimer kölcsönhatása vízmolekulákkal, dendrimer gél pórusainak jellemzése .....	42
4.1.3	G5.NH <sub>2</sub> dendrimer kölcsönhatása oxóniumionokkal .....	47
4.2	NH <sub>2</sub> -végcsoportú G5 PAMAM dendrimer ionokkal, kismolekulákkal való kölcsönhatásának vizsgálata .....	50
4.2.1	Foszfátionok beépülése a G5.NH <sub>2</sub> dendrimer molekulába .....	50
4.2.2	G5.NH <sub>2</sub> dendrimer ionpár képzése Au <sup>III</sup> -ionokkal .....	68
4.2.3	Különböző módon funkcionizált G5 PAMAM dendrimerek kölcsönhatása doxorubicinnal (DOX) .....	71

4.3	Arany nanorészecskék kölcsönhatása G5.NH <sub>2</sub> dendrimerrel .....	84
<b>5</b>	<b>Összefoglalás.....</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>Tudományos publikációk.....</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>Irodalmi hivatkozások.....</b>	<b>100</b>

## Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata

1D, 2D	Egy- és kétdimenziós
AFM	Atomerő mikroszkópia ( <i>Atomic Force Microscopy</i> )
COSY	Korrelációs spektroszkópia ( <i>Correlation Spectroscopy</i> )
DEN	Dendrimerek által kapszulázott, intradendrimér nanorészecske ( <i>Dendrimer Encapsulated Nanoparticle</i> )
DOSY	Diffúzió kontrollált spektroszkópia ( <i>Diffusion Ordered Spectroscopy</i> )
DOX	Doxorubicin
DSN	Dendrimerek által közrefogott és stabilizált, interdendrimér nanorészecske ( <i>Dendrimer Stabilized Nanoparticle</i> )
EPR	Elektron paramágneses rezonancia, ( <i>Electron Paramagnetic Resonance</i> )
G	Generáció
HAADF-STEM	Nagyszögű elektronszórás detektálására használt gyűrű alakú detektort tartalmazó pásztázó transzmissziós elektronmikroszkóp ( <i>High-Angle Annular Dark-Field Scanning Transmission Electron Microscope</i> )
HGD	Nagy generációs dendrimér ( <i>High Generation Dendrimer</i> )
HMBC	Különböző atomokon detektált többkötéses csatolás ( <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> )
HOESY	Heteronukleáris Overhauser-hatás spektroszkópia ( <i>Heteronuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i> )
HPLC	Nagy teljesítményű folyadék kromatográfia ( <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> )
HSQC	Különböző atomokon detektált egykötéses csatolás ( <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> )
LGD	Alacsony generációs dendrimér ( <i>Low Generation Dendrimer</i> )
MD	Molekuladinamikai
MGD	Közép generációs dendrimér ( <i>Medium Generation Dendrimer</i> )
NICISS	Neutral Impact Collision Ion Scattering Spectroscopy
NMR	Mágneses magrezonancia ( <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
NOESY	Nukleáris Overhauser-hatás spektroszkópia ( <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i> )
PAMAM	Poli(amido-amin)
PEG	Poli(etilén-glikol)
PFGSE	Pulzus gradiens spin echó ( <i>Pulsed Field Gradient Spin Echo</i> )
$R_g$	Girációs sugár
$R_h$	Hidrodinamikai sugár
SANS	Kisszögű neutronszerzés ( <i>Small Angle Neutron Scattering</i> )
SAXS	Kisszögű röntgenszerzés ( <i>Small Angle X-ray Scattering</i> )

STD	Telítés átvitel differencia ( <i>Saturation Transfer Difference</i> )
TEM	Transzmissziós Elektron Mikroszkópia
UV	Ultraibolya

# 1 BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A PAMAM, poli(amido-amin) dendrimerek szabályos, elágazó szerkezetű mesterséges molekulák, melyek etilén-diamin és akrilsav egységekből épülnek fel. Az 5. generációs PAMAM dendrimer (G5.NH<sub>2</sub>) már közel gömb alakú, és számos protonálható terminális primer és láncközi terciér aminos csoportot tartalmaz. Hidrofil karakterű, vizes oldatbeli szerkezetét többnyire neutron- és röntgenszórással valamint molekuladinamikai számításokkal vizsgálják, de ezek gyakran ellentmondanak egymásnak. Szintén a kutatások tárgyát képezi a dendrimerek méretének és belső szerkezetének pH-függő változása.

A dendrimerek széleskörű alkalmazhatóságát a funkciós csoportok mellett a molekula belsejében feltételezett üregek is növelik. Gyógyszermolekulák, katalizátorok, képalkotásban használatos ágensek köthetők kovalensen a végcsoportokra, vagy építhetők be a molekula belső, nanoméretű üregeibe. A PAMAM dendrimerek polielektrolit jellegük miatt töltéssel rendelkező részecskékkel elektrosztatikus kölcsönhatásba lépnek. Az ismert formulák azonban nehezen alkalmazhatók a töltött makromolekula viselkedésének leírására ellenionok jelenlétében.

A gyógyszerkutatások sok esetben irányulnak a rákellenes hatóanyagok G5 PAMAM dendrimerekkel való szállítására. Az említett előnyös tulajdonságok mellett a G5.NH<sub>2</sub> dendrimer mérete a hemoglobinnal közel azonos, és a terminális NH<sub>2</sub>-csoportok könnyen funkcionálizálhatóak, lehetővé téve a sejtekbe való bejutást.

Kismolekulák mellett nanorészecskék templátjaként is alkalmazzák a PAMAM dendrimereket. Az arany nanorészecskéket, melyek röntgen és CT (számítógépes tomográfia) képalkotó eljárásokban kontrasztanyagként, katalizátorként vagy akár génátviteli eljárásokban is alkalmazhatóak, a dendrimerek sztérikus módon vagy kapszulázással stabilizálni képesek. A stabilizálás módja többek között függ a dendrimer generációjától és a nanorészecske méretétől.

A doktori munkám során célul tűztük ki a G5.NH<sub>2</sub> dendrimer vizes oldatbeli viselkedésének jellemzését. Előzőleg azt tapasztaltuk, hogy a pH-nak jelentős hatása van a dendrimerek méretére és szerkezetére. Ezért

részletes többdimenziós, nagyfelbontású NMR és NMR relaxációs méréseket terveztünk, hogy megállapítsuk a G5.NH<sub>2</sub> dendrimer szerkezeti változásait pH-változás hatására.

Célunk volt, hogy a G5.NH<sub>2</sub> dendrimer belső szerkezetében feltételezett üregek létezését kísérleti úton igazoljuk, hiszen ezek meghatározóak lehetnek a dendrimereket jellemző templáthatást illetően. A növekvő víztartalmú dendrimergél pórusméretének meghatározására NMR krioporozimetriás és diffúziometriás méréseket terveztünk.

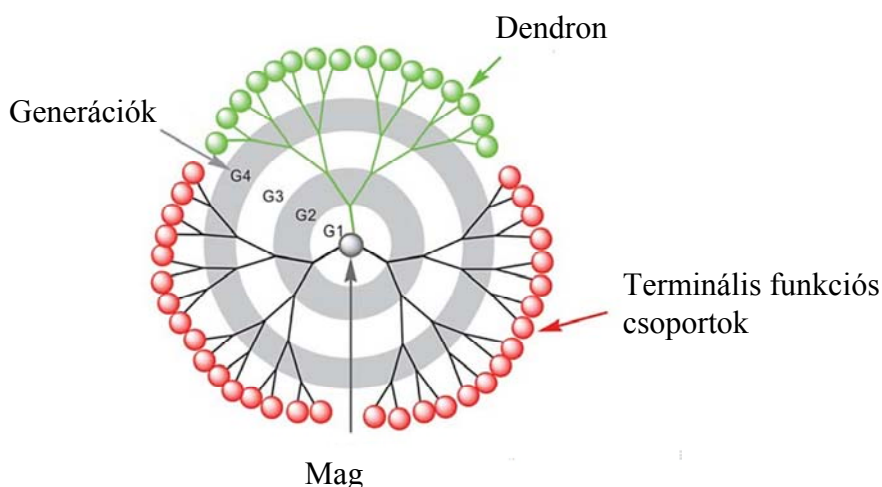
A dendrimerek alkalmazásának egyik kulcskérdése azok minősége. A PAMAM dendrimerek gyors analizisét méretkizárásos kromatográfiával foszfát pufferben végezték. Kölcsönhatást találtunk a foszfátionok és dendrimerek között és ennek természetét kívántuk vizsgálni multinukleáris, többdimenziós NMR spektroszkópiával és pH-potenciometriával. A foszfátionok a véráramban is jelen vannak, ezért ennek ismerete a gyógyászati alkalmazás szempontjából is igen fontos.

A doxorubicin (DOX) rákellenes hatóanyag bejuttatása az élő szervezetbe történhet különböző felületi csoportokkal módosított PAMAM dendrimerekkel. Az orvosi alkalmazás szempontjából is fontos a kölcsönhatás vizsgálata, így további céljaink között szerepelt acetyl, hidroxil, és karboxil végcsoportú G5 dendrimerek és DOX közötti kölcsönhatás jellemzése különböző NMR módszerekkel.

Számos irodalmi forrás leírja, hogy a dendrimerek arany nanorészecskéket stabilizálnak, azonban az 5. generációs PAMAM dendrimerek esetében nem egyértelmű a stabilizálás módja. Nagyfelbontású NMR-rel és diffúziometriával terveztük tisztázni a kölcsönhatás természetét és a stabilizálás jellegét. A dendrimerrel stabilizált arany nanorészecskék szintézise során fontos lépés a töltött dendrimer Au<sup>III</sup>-ionokkal való reakciója. A kölcsönhatás helyének és jellegének (komplex- vagy ionpár képződés) meghatározó szerepe lehet a nanorészecskék stabilizálási módjában és a hibrid részecske összetételében. Így a G5.NH<sub>2</sub> Au<sup>III</sup>-ionnal való kölcsönhatásának vizsgálatát is célul tűztük ki.

## 2 IRODALMI ELŐZMÉNYEK

A dendrimerek szabályos, faágszerűen elágazó térbeli szerkezettel rendelkező, rétegekből felépülő, mesterséges makromolekulák, jól reprodukálhatóan előállítható monodiszperz szerves nanorészecskék. A molekula központi magjához kapcsolódó monomer egységek generációkat építenek fel, a kapcsolódási pontokban pedig a szerkezet faágszerűen elágazik (1. ábra). A mag nélküli, faágszerűen elágazó molekularészek a dendronok. Az elágazási pontok és a terminális funkciós csoportok, valamint a molekula belsejében feltételezett „üreges” lehetővé teszik a dendrimerek széleskörű felhasználását a komplexkémiai, az orvosi kémiában és a katalitikus reakciókban. A dendrimerek szerepe a gyógyszerkutatóban jelentős, mert gyógyszer-molekulákkal kölcsönhatásba lépve, mint gyógyszer-szállító részecskék, szerepük lehet a rák kemoterápiás kezelésében. A hatóanyag-molekulái, a detektálást segítő egységek és a vektorok (célba juttató molekulák) kovalensen köthetők a végcsoportokra, vagy a feltételezett nanoméretű üregesbe nem kovalens kötéssel építhetők be. A dendrimerek mutatják az úgynevezett dendritikus katalízist, mely során a katalizátor és a szubsztrátum lokális koncentrációja a makromolekulában igen nagy, és a reakció a dendrimer molekula belsejében játszódik le.<sup>1-6</sup>



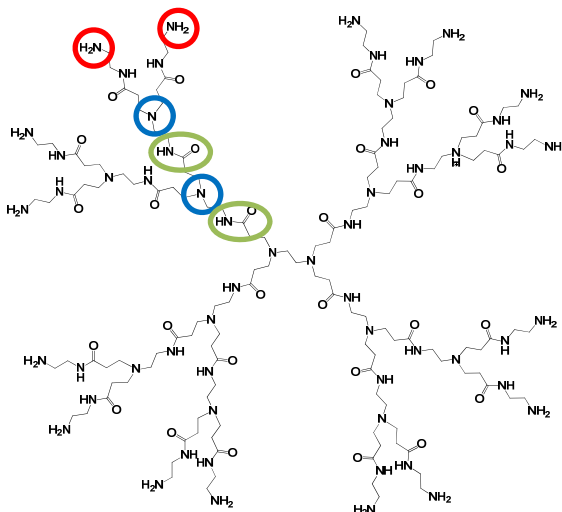
1. ábra: A dendrimer molekula idealizált, síkra levetített szerkezete.<sup>5</sup>

Elsőként 1978-ban Vögtle és munkatársai írtak olyan ismétlődő reakciólépésekről, melyek során jól meghatározható elágazó szerkezetű, ún. „kaskád molekulák” keletkeztek.<sup>7</sup> A '80-as évek elején Denkwalter és munkatársai polilizin dendrimerek szintézisét szabadalmaztatták.<sup>8-10</sup> Az első részletesebb jellemzés a Tomalia által elsőként előállított poli(amido-amin) dendrimerekről<sup>11</sup>, valamint a Newkome által közölt arborol dendrimerekről<sup>12</sup> jelent meg 1985-ben. Tomalia és munkatársai az általuk előállított makromolekulákat szerkezetük alapján „csillagszóró” (starburst) polimereknek (1. ábra) nevezték el, és ők használták először a dendrimer elnevezést (görög dendron=fa, meros=rész). Ezeknek, az általunk is alkalmazott, poli(amido-amin) (PAMAM) dendrimereknek (2. ábra) szimmetrikus szerkezetük van, benne nagyszámú elágazási ponttal és terminális funkciós csoporttal. A dendrimer előállítására divergens módszert használtak, vagyis egy központi iniciátor (etilén-diamin, illetve ammónia) magra építették rá az egymást követő rétegeket (generációkat). Hasonló módszerrel állított elő Mülhaupt<sup>13</sup> és de Brabander<sup>14</sup> poli(propilén-imin) (PPI) dendrimereket. A divergens módszer hátránya, hogy az egyes csoportok esetleges mellékreakciói hibás szerkezethez vezetnek, és az első rétegekben megjelenő hiba „öröklődik”, nem javítható. Frechet és Hawker<sup>15</sup> aromás poliéter bázisú dendrimereket már konvergens módszerrel szintetizáltak, vagyis a molekula szintézisét a külső csoportokkal kezdték, majd a mag felé haladva felépítették a dendronokat, amiket azután egy multifunkciós maghoz kapcsoltak. Emiatt a módszer kevesebb szerkezeti hibalehetőséget rejt magában, és a molekula tervezhetőségét is megkönnyítheti az, hogy a kívánt csoportok precízebben beépíthetők a molekulába. A dendrimerek fontos csoportját alkotják még a Moore által először szintetizált fenil-acetilén dendrimerek.<sup>16</sup> A dendrimerek felsorolt alaptípusai a legismertebbek és a leginkább kutatottak. Az 1990-es évek óta természetesen számtalan altípust és új típust szintetizáltak, a köztes és terminális csoportokat úgy alakítva, hogy az előállított makromolekulák minél szélesebb körben alkalmazhatók legyenek.<sup>6</sup>



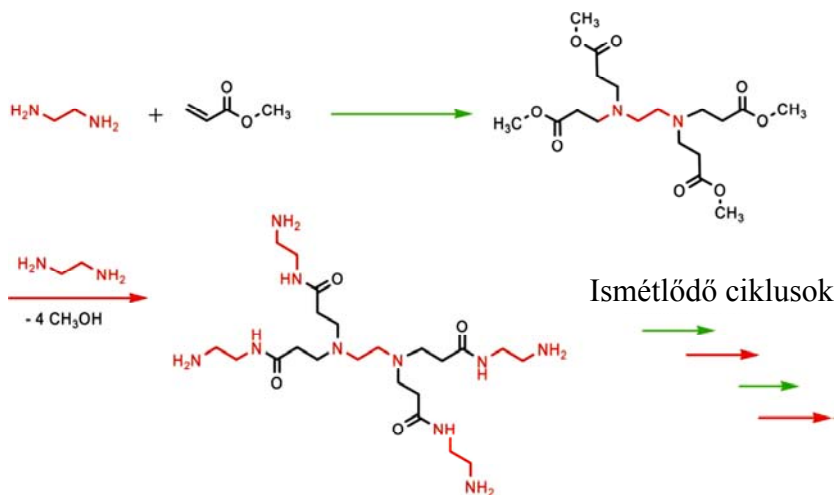
## 2.1 PAMAM dendrimerek jellemzése

A poli(amido-amin) (PAMAM) dendrimerek etilén-diamin és akrilsav egységekből előállított makromolekulák, amelyek az elágazási pontokban terciér N-eket, az ágakon peptidkötéseket és terminális (primer) aminocsoportokat tartalmaznak. (2. ábra) Az említett csoportok miatt jól szolvatálódnak vízben és poláris oldószerekben, hidrofíl karakterük miatt nagyon jól oldódnak. A funkciós csoportok biokompatibilisek. A molekula primer aminocsoportjai igen jól funkcionálizálhatók különböző felhasználásokhoz. Az orvosi alkalmazások szempontjából erre szükség is van, hiszen a primer aminocsoportok nagyobb koncentrációban káros mellékhatást válthatnak ki, vagy akár toxikusak is lehetnek. A primer és terciér aminocsoportok a pH csökkentésével protonálódnak, így egy dendrimer molekulának nagyszámú pozitív töltése is lehet (pl.: egy 5. generációs PAMAM dendrimernek 4-es pH-értéken mintegy 250 pozitív töltése van). A PAMAM dendrimerek széleskörű alkalmazhatóságát az ún. dendritikus sajátságoknak tulajdonítják: a kaszkádszerű szimmetrikus struktúra, a monodiszperzitás, a belső és külső funkciós csoportok reakciókészsége, a terminális csoportok nagy száma, a belső és külső funkciós csoportok nagy lokális koncentrációja, a soft-hard kolloid karakter és a szolvatált dendrimer molekula pszeudofázisként való viselkedése.<sup>17</sup>



2. ábra: 2. generációs (G2) PAMAM dendrimer felépítése és funkciós csoportjai: terciér aminocsoportok (kék), peptidkötések (zöld) és primer aminocsoportok (piros).

A PAMAM dendrimerek első sikeres, divergens szintézisét a 3. ábra mutatja. Etilén-diamin és ammónia iniciátor mag aminos funkció csoportjához Michael-addícióval metil-akrilátot kapcsoltak, a keletkező észtert etilén-diaminnal amidálták, így létrehozva a belső rétegeket, generációkat. Az amidálás előtti, észter „réteget” feles generációnak (0,5; 1,5; 2,5 stb.) nevezték el (3. ábra).<sup>11, 18</sup>

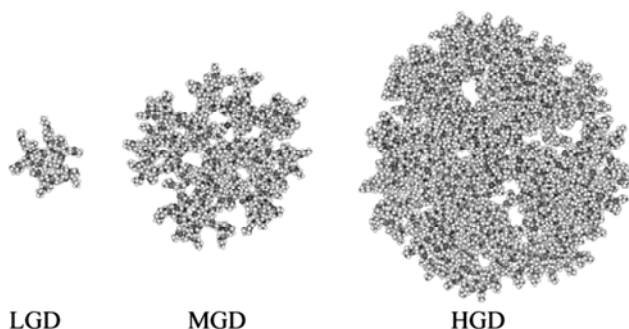


3. ábra: Etilén-diamin (EDA) magvú PAMAM dendrimer szintézise.<sup>11, 19</sup>

### ***PAMAM dendrimer molekulák alakja, struktúrája:***

A dendrimer molekulák alakját, méretét, oldatbeli viselkedését alapvetően meghatározza a dendrimer típusa, felépítése és generációja. Generációk szerint az angol nyelvű szakirodalom beszél „alacsony” generációs (LGD, Low Generation Dendrimer), „közép” generációs (MGD, Medium Generation Dendrimer) és „nagy” generációs dendrimerekről (HGD, High Generation Dendrimer) (4. ábra). PAMAM dendrimerek esetében a 3-6 generációkat az MGD-hez sorolják, de a funkcionizált változatoknál ettől esetenként eltérnek.<sup>17</sup> A kis molekulatömegű LGD dendrimerek esetében a molekula szerkezete teljesen átjárható, így a külső és belső funkció csoportok egyformán elérhetőek. Ezzel szemben a HGD dendrimerek gömb alakú, kevésbé átjárható, szimmetrikus szerkezetű nanorészecskék, melyek láncvégi csoportjai sokkal könnyebben elérhetőek, így az oldatukhoz adott reaktánsok elsőként a felületi csoportokkal reagálnak, majd a molekula

belsejébe diffundálva érhetik el a belső funkciós csoportokat. Az MGD dendrimerek mindkét csoport tulajdonságaival jellemezhetők, és egyes irodalmak a „soft” kolloidokhoz hasonló karakterűnek írják le őket.<sup>20 17</sup>

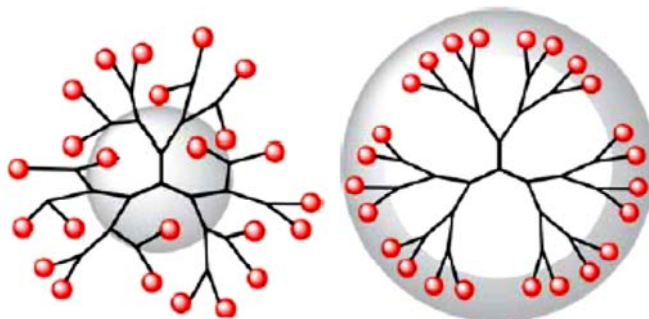


4. ábra: LGD (G2), MGD (G5) és HGD (G7) etilén-diamin-magvú, NH<sub>2</sub>-végcsoportú PAMAM dendrimerek térkitöltő molekula modellje.<sup>17</sup>

A dendrimer molekulák alakja 0-2-ik (G0-G2) generációnál még aszimmetrikusnak tekinthető, 3-4-ik (G3-G4) generációnál ellipszoid jellegű, míg az ötödik generációtól (G5) közel gömb alakú. Egy újabb generáció kb. 1 nm-rel növeli a molekula sugarát.<sup>21</sup> Az ötödik generációnál a közel gömb alakú molekulák jelentős részben átjárhatóak. E molekulákban a felületi csoportok már meghatározóak a dendrimer tulajdonságait illetően, de még elérhetők a belső funkciós csoportok is. Számítógépes molekulamodellizések is igazolják ezeket a sajátosságokat, de bizonyos generációkig az ágak még mozgékonyak, flexibilisek. A zezugos, üreges szerkezet a negyedik generációtól jellemző, míg a 6. generációtól jól definiálható belső struktúrát mutatnak a számítások.<sup>18</sup>

A PAMAM dendrimerek szerkezetét kísérleti úton elsősorban kisszögű röntgen- (SAXS) és neutronszórással (SANS) vizsgálták. Prosa és munkatársai kimutatták, hogy G7-G10 PAMAM dendrimereknél monodiszperz, gömb alakú részecskék feltételezhetők, egységes sűrűségű belső szegmensekkel.<sup>22</sup> PAMAM dendrimerek metanolos oldatában G3-G4-nél elágazó, csillagszerű szerkezet (soft sphere), míg a lényegesen nagyobb méretű G9-10-nél a merev falú (hard-sphere) szerkezet és a gömb alak jellemző SAXS mérések szerint. G4 és G8 között a szerkezet csillagszerű jellege fokozatosan „hard-sphere” szerkezetté alakul.<sup>23</sup>

A dendrimer molekulák méretét alapvetően befolyásolja a közeg. Jól szolváló oldószer esetén a molekula szerkezete tágabb, míg rosszul szolváló oldószerben a terminális csoportok visszahajlanak, így a molekula mérete kisebb.<sup>17</sup> Kísérleti úton bizonyították, hogy a 4. generáció felett már érvényesül ez a hatás.<sup>24</sup> A közeg ionerőssége is fontos tényező, hiszen modellszámítások igazolják, hogy nagy ionerősségű közegben a végcsoportok visszahajlanak a molekula belsejébe és ezáltal magban tömörödő (dense-core) szerkezet alakul ki. Kis ionerősségnél a molekula töltése kevésbé árnyékolt ellenionok által, így az elektrosztatikus taszítás miatt az ágak kiterjeszkednek, és a szerkezet a héjban tömörödő (dense-shell) modellel írható le (5. ábra).<sup>25</sup>



5. ábra: A magban tömörödő (dense-core) és a héjban tömörödő (dense-shell) modell.<sup>5</sup>

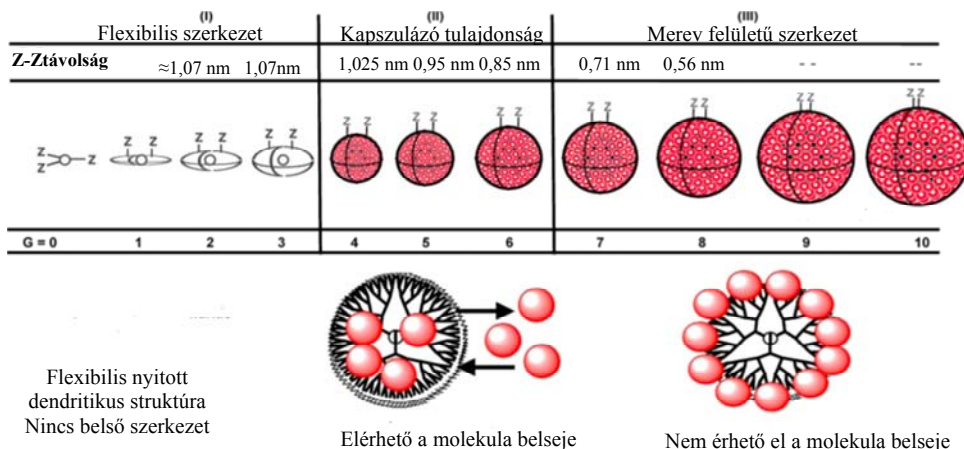
Meltzer és munkatársai a láncok dinamikáját  $^{13}\text{C}$  NMR relaxációs módszerrel tanulmányozták, és a molekula belsejében lassabb mozgást tapasztalva arra a következtetésre jutottak, hogy az ágak bizonyos mértékben visszahajlanak.<sup>26</sup> Karbamiddal funkcionizált és deuterált G4 poli(propilén-amin) dendrimer dimetil-acetamidos oldatának SANS vizsgálata során úgy találták, hogy a végcsoportok elhelyezkedése széles maximumot mutatott a sugárnak megfelelő távolságban, vagyis a terminális csoportok a dendrimer molekulában szétszórtnan helyezkednek el, többnyire visszahajlanak a molekula belsejébe, nem képeznek jól definiálható felületet. Ezek az eredmények alátámasztják a dendrimerek „dense-core” modelljét.<sup>27</sup> Maiti és munkatársai G3-11 dendrimerekre molekuladinamikai számításokat végezve arra a következtetésre jutottak, hogy még nagyobb generációknál is jelentős a dendronok visszahajlása és ezáltal a primer nitrogénatomok mennyisége a molekula belsejében. A molekula mérete és a generációk száma között a

következő összefüggés áll fenn:  $R_g \sim N^{1/3}$ .<sup>28</sup> A visszahajlást más molekula dinamikai szimuláció is igazolta.<sup>29</sup>

A szimulációs eredmények összességében azt mutatják, hogy a semleges dendrimerek felépítése „dense core” jellegű, vagyis a legnagyobb sűrűség a molekula magjában tapasztalható, mely annak köszönhető, hogy a dendrimer flexibilis szerkezete lehetővé teszi az ágak visszahajlását, így a terminális csoportok a molekula belsejében megközelítőleg egyenletesen oszlanak el. Ezt az is alátámasztja, hogy míg a molekulaméret ( $R$ , sugár) a generációval ( $N$ ) a  $R \sim N^{1/3}$  összefüggés alapján változik, addig a monomerek száma exponenciálisan nő a generációk számával, így a végcsoportok a kevés hely miatt visszahajlanak a molekula belsejébe, kihasználva a belső generációk kisebb helyigénye miatti szabad teret. A dendrimerek oldatbeli viselkedésének vizsgálatára végzett SANS kísérletek is alátámasztják az elméleti eredményeket.<sup>20</sup>

A dendrimer molekulák méretének felső határát az ún. limitáló generáció szabja meg. A dendrimerek szerkezete egy bizonyos generáció felett nem bővíthető tovább monomer egységekkel a terminális funkciós csoportok szterikus kölcsönhatása miatt, mely PAMAM dendrimereknél a 10. generáció felett jelenik meg.<sup>28</sup> Ennek a magyarázata, hogy a terminális csoportok helyigénye a dendrimer sugarának négyzetével arányos, míg a terminális csoportok száma exponenciálisan nő a dendrimer generációjával. Így minden újabb generációnál a végcsoportok több felületet igényelnek, emiatt a dendrimer külső héja zsúfoltabbá válik. Ha a visszahajló végcsoportokat is figyelembe vesszük, akkor is elér a dendrimer mérete egy limitáló generációt, amely feletti generációszámnál a terminális csoportok további létesítése szterikusan gátolt.

A PAMAM dendrimerek generációfüggő tulajdonságait foglalja össze a 6. ábra. Jól látható, hogy a közép generációtól gömb alakúnak tekinthetők a molekulák. A közép generációs PAMAM dendrimerek szerkezete átjárható, a molekula belső része elérhető lehet vendégmolekulák számára. A nagy generációjú dendrimer molekulák periférikus része egyre zsúfoltabb a generáció növekedésével, így a belső rész egyre nehezebben megközelíthető. Ezek a molekulák inkább „dense-shell” struktúrával jellemezhetők.



6. ábra: PAMAM dendrimerek tulajdonságai a generáció függvényében (Z=terminális funkciós csoportok, G=generációk száma).<sup>30</sup>

A dendrimerek méretmeghatározásának egyik módja lehet a molekula diffúziós együtthatójának mérése diffúzió kontrollált mágneses magrezonancia (DOSY NMR) alkalmazásával. A diffúziós együtthatóból az Stokes-Einstein-egyenlet (1) segítségével számítható a molekula hidrodinamikai sugara. Ennek szabatos definíciója: annak a merev falú gömbnek a sugara, amelynek diffúziós együtthatója megegyezik a vizsgált molekula diffúziós együtthatójával.

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (1)$$

ahol  $R_H$  a hidrodinamikai sugár,  $k_B$  a Boltzmann-állandó,  $T$  a hőmérséklet,  $\eta$  a közeg viszkozitása és  $D$  a diffúziós együttható.

Korábbi közleményünkben beszámoltunk a G5.NH<sub>2</sub> PAMAM dendrimerek diffúziós együtthatójának koncentráció-függéséről. A nulla koncentrációra extrapolált diffúziós együtthatóból számítva a hidratált dendrimer hidrodinamikai sugara 3,05 nm-nek adódott, míg a görbe meredeksége arra engedett következtetni, hogy az 5. generációs PAMAM dendrimerek hidrodinamikai szempontból merev falú gömbi kolloidként viselkednek.<sup>31</sup>

Van Dongen és munkatársai a kereskedelemben kapható PAMAM dendrimer vizes oldatának komponenseit izolálták, és a G5 PAMAM monomer (65%) mellett a G2-G4 PAMAM dendrimereket és oligomereket (G5 dimer, trimer, tetramer) találtak.<sup>32</sup> A G5 PAMAM hidrodinamikai sugara

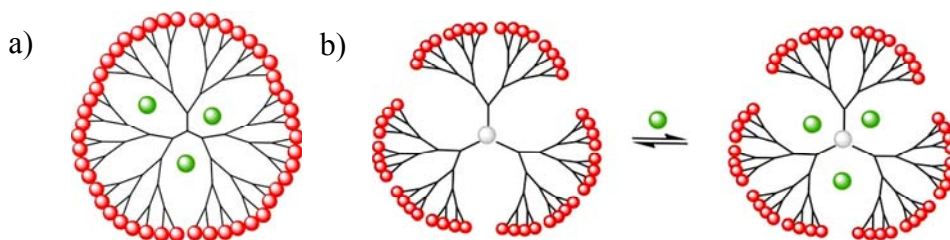
pH 7,4-en  $3,1 \pm 0,1$  nm-nek adódott, mely jó egyezést mutat az általunk meghatározott mérettel ( $3,05$  nm)<sup>31</sup>. Az izolált komponensek DOSY NMR mérései azt mutatták, hogy a hidrodinamikai sugár az egymást követő generációk, a G5 monomer és az oligomer jellegű anyag körülbelüli atomszámával  $R_H \sim N^{0,35}$  arányt mutat. Érdekes eredmény, hogy a szintézis során létrejött G5 PAMAM dendrimerek alkotta dimer, trimer és tetramer molekulák mérete a vártnál kisebbnek adódott (dimer:  $R_H=4,0$  nm, trimer:  $R_H=4,1$  nm, tetramer:  $R_H=4,6$  nm)<sup>32</sup>, amely a kapcsolódó molekulák átfedésének és a közös hidrátburoknak a következménye lehet.

### ***Üreges szerkezet és kismolekulák kapszulázása:***

A dendrimer molekulák dense-shell típusú modellje (5. ábra) alapján a dendrimer belső szerkezete üregesnek vélhető, vagyis a belső hidratált vázban a generációk növekedésével egyre sűrűsödő elágazó szerkezet eredményeképpen üreg jelenik meg.<sup>3</sup> Ez az üreg, mérettől és a dendrimer struktúrájától függően, akár egyfajta belső felületet is definiálhat. Az üregek méretét befolyásolja a molekula konformációs flexibilitása, amit a dendrimer felépítő egységek határoznak meg. Aromás csoportokból felépülő merev szerkezetű dendrimereknél például kísérleti úton is igazolható a dense-shell struktúra.<sup>33</sup> Bár a PAMAM dendrimereket felépítő etilén-diamin egységek igen flexibilisek, Tomalia és munkatársai az oldószer számára elérhető felület modellezésével úgy tapasztalták, hogy már a 6. generációs PAMAM dendrimer üregeinek belső felülete is nagyobb mint a külső felület.<sup>18</sup>

A dendrimer molekulák gömb alakjuk és üreges szerkezetük révén alkalmasak lehetnek vendég (guest) molekulák kapszulázására. Ennek egyik módja, hogy a végcsoportok térbeli kompressziója révén úgynevezett „dendrimer-dobozt” (dendrimer-box) hoznak létre, azáltal, hogy a dendrimer külsejét védőcsoportokkal látják el, amik megakadályozzák a bejuttatott vendég molekulák diffúzióját az oldatba (7. ábra). A dendrimer és az üregek struktúrája, valamint a vendégmolekula alakja határozza meg a kapszulázott molekulák számát. Meijer és munkatársai például poli(propilén-imin) dendrimerbe festékmolekulákat zártak ily módon.<sup>34</sup> A dendrimer molekulák felületi csoportjainak módosításával egyfajta szolubilizálás érhető el, a kapszulázott anyag (pl.: hidrofil festék) bevihető olyan közegbe (pl.: szerves oldószerbe), amelyben amúgy nem oldható. A dendrimer dobozba különböző

katalizátorok is beépíthetők. Crooks és munkatársai számos közleményben számolnak be dendrimerbe zárt fém (Pd, Au) nanorészecskékről.<sup>35-40</sup> Vendégmolekulák nem kovalens módon való kötése a dendrimer molekula belsejében egyensúlyi folyamat során is történhet. Ez esetben a vendég molekula diffúzió révén, a hidofil és hidrofób kölcsönhatások egyensúlya következtében kijuthat a tömbfázisba, illetve bejuthat a dendrimerbe. (7. ábra)



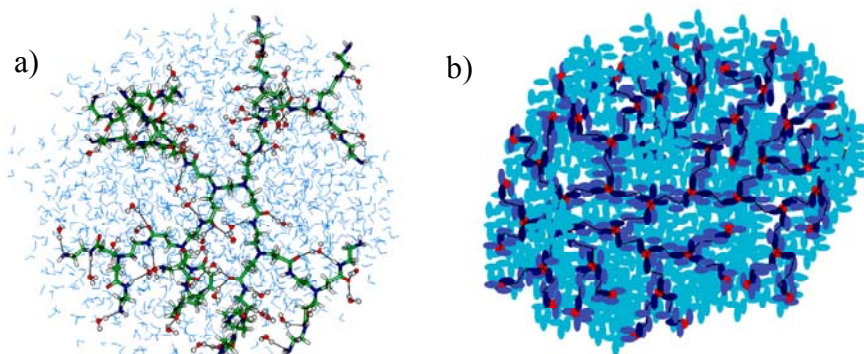
7. ábra: Kismolekulák kapszulázása a dendrimerben a „dendrimer doboz” effektus (a) és dinamikus egyensúlyi folyamat (b) révén.<sup>41</sup>

Egy más megközelítésből tekintve a dendrimerek belsejében megkötődő molekulákat, nem pórusok vagy üregek létezéséről beszélhetünk, hanem egy úgynevezett dendrimer-fázis kialakulásáról. Közép- és nagy generációjú dendrimerek oldatban eltérő polaritású pszeudo-fázist képeznek, amelyben az oldószer molekulái nagy számban maradnak vissza. Ezek a nanoméretű egységek nagyon erős elektrosztatikus kölcsönhatás, hidrogénkötés vagy hidrofób kölcsönhatások révén vendégmolekulákkal kerülhetnek kapcsolatba.<sup>19</sup> A PAMAM dendrimerek ionos karakterük révén ionokat (kationokat, fémionokat donor-akceptor kölcsönhatás révén, anionokat protonált állapotban) köthetnek meg és képezhetnek nanokompozitokat.<sup>42</sup> A terminális csoportokat módosítva apoláris illetve poláris karakterűktől függően, a dendrimer molekulák képesek kisebb molekulákat feloldani, szolubilizálni hidrofób kölcsönhatások révén. Ez igen fontos a dendrimerek gyógyszer szállításban való alkalmazásakor, hiszen ily módon a kis oldhatóságú rákellenes hatóanyagok (pl: doxorubicin) oldatba vihetővé válnak.<sup>17</sup>

A PAMAM dendrimerek belsejében található üregek méretének becslésére Li és munkatársai vizes oldatban vizsgálták a molekulába bejutó



víz-molekulák mennyiségét. Modellszámításokkal és SANS mérésekkel is igazolták, hogy a közepes generációjú (G4-6) PAMAM dendrimer molekulák belsejében jelentős mennyiségű víz található. A G5 PAMAM dendrimer esetében az egy dendrimer molekulában lévő vízmolekulák száma 556-nak adódott, a víz által elfoglalt üreg mérete pedig a számítás módjától függően 16-21 nm<sup>3</sup>.<sup>43</sup> Egy 2012-es közleményünkben mi is beszámoltunk olyan NMR diffúziómérésekből számolt eredményekről, amelyek szerint modelltől függően 3100-3700 vízmolekula mozog együtt egy 5. generációs PAMAM dendrimer molekulával. Ez a szám magában foglalja a dendrimer belsejében található vízmolekulákat és azokat is, amelyek a hidratációban vesznek részt. A vízmolekulák számából és a mért diffúziós együtthatóból számított dendrimer térfogat 110-130 nm<sup>3</sup> között alakul a modelltől és a módszertől függően.<sup>31</sup>

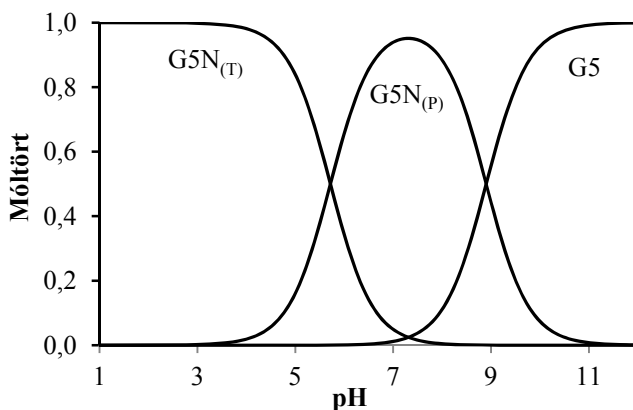


8. ábra: Vízmolekulákkal töltött PAMAM dendrimer szerkezete molekuladinamikai szimuláció<sup>44</sup> (a) és kísérleti eredmények<sup>31</sup> (b) alapján.

Látható tehát, hogy a feltételezett üregek méretének mérése illetve számítása jelentősen függ az alkalmazott módszertől és modelltől. Mindazonáltal bizonyos, hogy oldószer- vagy vendégmolekulák jelen vannak/lehetnek a dendrimer molekulák belsejében (8. ábra), a makromolekula és a kismolekula között pedig hidrofób vagy elektrosztatikus kölcsönhatás, esetleg hidrogénkötés alakul ki.<sup>19</sup>

### ***A pH hatása a PAMAM dendrimer molekulák méretére és konfigurációjára:***

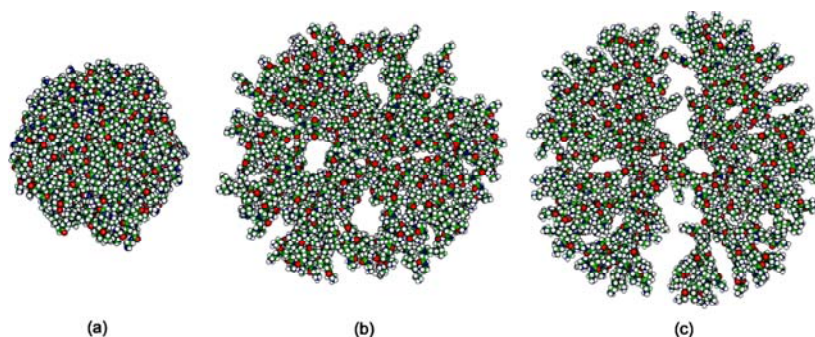
PAMAM dendrimereknél a külső primer nitrogének és a belső tercier nitrogének protonálódás során pozitív töltésre tesznek szert, így elektrosztatikusan vonzzák az anionokat, deprotonálódáskor pedig szabad elektrópárok keletkeznek, melyek bizonyos fémionok koordinációs kötésében kaphatnak szerepet. Az azonos töltések erőteljes taszítása következtében a pH-változáskor bekövetkező protonálódás-deprotonálódás jelentős szerkezeti változást, zsugorodást vagy az ágak kiterjedését idézi elő.<sup>17</sup> A protonálódás során elsőként a láncvégi primer aminocsoportok protonálódnak ( $pK \approx 9,0$ ), majd a pH-t csökkentve kezdenek protonálódni a tercier aminocsoportok ( $pK \approx 5,8$ ).<sup>45</sup> A dendrimerek különböző orvosi biológiai alkalmazása szempontjából (pl.: gyógyszer- és génátvitel) kiemelten fontos a pH-változás hatására bekövetkező méretnövekedés ismerete. A 9. ábra mutatja a két makroállandó felhasználásával számított eloszlást. A  $pK$  pH-potenciometriás meghatározása mellett a dendrimerek protonálódása NMR titrálással is nyomon követhető. A dendrimer  $^1H$  NMR spektrumain jól látható a primer majd a tercier nitrogének melletti  $CH_2$ -csoportok kémiai eltolódásának változása a nitrogének protonálódása során.<sup>46</sup>



9. ábra: G5.NH<sub>2</sub> dendrimer protonálódása. A G5N<sub>(P)</sub> a primer aminocsoportok, míg a G5N<sub>(T)</sub> a tercier aminocsoportok protonálódását jelzi.

Számos molekuladinamikai (MD) számítást, atomisztikus szimulációt végeztek a dendrimerek pH-függő szerkezeti változásainak a vizsgálatára.<sup>29,44, 47-49</sup> Lee és munkatársai szimulációval kimutatták, hogy pH

10 felett a PAMAM dendrimereket gömb alak, és lazán tömött szerkezet jellemzi minden generációnál, míg kisebb pH-n (<4) rendezett a szerkezet, és a generációk növelésével egyre nagyobb üreg található a molekulák belsejében (10. ábra). A bázikus és semleges szerkezet térfogatában az 5. generációtól tapasztalható ugrásszerű növekedés.<sup>44</sup>



10. ábra: G6 PAMAM dendrimer MD szimulációs konfigurációja (a)lúgos (minden aminocsoport deprotonált), (b)semleges (primer aminok protonáltak) és (c)savas közegben (minden aminocsoport protonált).<sup>44</sup>

Maiti és munkatársai<sup>47, 48</sup> szintén atomisztikus szimulációt alkalmaztak a G4-6 PAMAM dendrimer szerkezeti és konformációs pH-függő változásának vizsgálatára. Az 5. generációs dendrimernél azt tapasztalták, hogy oldószer (víz) hatására a dendrimer 33%-os duzzadást mutat, a pH csökkentésének hatására pedig 2,1 nm-ről 2,5 nm-re nő a mérete ( $R_g$ ). Ez utóbbi a protonált tercier és primer aminok közötti elektrosztatikus taszításnak köszönhető, mely hatására a dendrimer belső szerkezete elérhetővé válik az oldószer molekulák számára (lúgos közegben 3 vízmolekula/tercier nitrogén, savas közegben 6 vízmolekula/tercier nitrogén). Mind savas, semleges és lúgos kémhatásnál a külső terminális csoportok visszahajlását figyelték meg, (backfolding), még kis pH-n is a primer N-ek majdnem 40%-a a molekula belsejében helyezkedik el. Nagyobb generáció (G8) esetén is méretnövekedést tapasztaltak a pH-t 12-ről 3-ra csökkentve.<sup>49</sup>

Liu és munkatársai PAMAM G4.NH<sub>2</sub> dendrimer szerkezetének pH-függő konformációs változásait oldószer és ellenion jelenlétében vizsgálták molekuladinamikai számításokkal.<sup>50</sup> Ily módon sikerült reprodukálni korábbi SANS mérésből származó eredményeket<sup>51</sup>, melyek szerint a dendrimer girációs sugara  $R_g \approx 2,1-2,2$  nm között mutat kismértékű növekedést a pH csökkenésével. A csekély méretnövekedés ellenére jelentős konformációs

változást tapasztaltak: nagy pH-n a dendrimer magja körül nagy a sűrűség (~1 nm), vagyis a dense-core modell érvényesül, míg kis pH-n a dendrimer külső szférájában nagyobb a sűrűség (~1,8 nm), azaz a dense-shell modell jellemző, a dendrimer-víz-ellenion rendszerben kialakuló erős intramolekuláris hidrogénkötések miatt. A dendrimer pH-függő méretváltozását tehát a geometriai zsugorodás és a kifelé irányuló tömegátrendeződés együttesen határozza meg.<sup>50</sup> Újabb, szintén hidrogénkötéseket figyelembe vevő MD szimulációk is igen közeli eredményt adtak a SANS mérésekhez. A dendrimer atomjainak térbeli eloszlását vizsgálva arra az eredményre jutottak, hogy kis pH-n a molekula belseje átjárhatóbb a vízmolekulák számára a dendronok taszítás miatti eltávolodása következtében.<sup>52</sup>

Az említett kisszögű neutronszórási mérésekkel Chen és munkatársai a PAMAM dendrimerek pH-függő szerkezeti, konformációs tulajdonságainak kísérleti úton való vizsgálatát célozták. Azt tapasztalták, hogy G4 dendrimer esetén a lúgosról savasra váltztatva a közeg kémhatását, a molekula girációs sugara mintegy 4%-kal nő, miközben jelentős ellenion asszociáció ill. kondenzáció történik. Az ellenionok közti kölcsönhatás és a dendrimer molekulák protonálódása befolyásolja a dendrimer konformációját, amely feltehetően egy fokozatos belső átrendeződésen megy át az aminocsoportok protonálódása során.<sup>51</sup>

A PAMAM dendrimerek méretének pH-függő meghatározását célzó molekuladinamikai számítási eredmények és a kísérleti tapasztalatok különbözőségére van Dongen és munkatársai nemrég megjelent közleményükben kínálnak magyarázatot. A kereskedelmi forgalomban lévő G5 PAMAM dendrimerből izolált részecskék diffúziós együtthatóját DOSY NMR technikával vizsgálták, a pH változtatását a dendrimer különböző, deuterált (ftalát és foszfát) puffer oldatokban való feloldásával érték el. A G5 PAMAM monomer esetében nem tapasztaltak jelentős méretnövekedést a pH csökkenésével ( $R_H = 3,1$  nm 11-es pH-n,  $R_H = 3,2$  nm 3-as pH-n), míg a G5 dimerek esetében az  $R_H$  értéke 44%-os növekedést mutatott a protonálódás következtében. Ebből arra a következtetésre jutottak, hogy a dendrimer molekulák korábbiakban leírt pH-függő méretváltozását a kereskedelemben kapható G5 PAMAM dendrimer melletti dimer és oligomer molekulák hatása okozza. Az izolált G5 monomer mérete a pH-val igen kismértékű változást mutat, ahogy azt számos, tökéletes szerkezeten alapuló molekuladinamikai

számítás is előre jelezte.<sup>32</sup> Megállapításaik nem egyeznek az általunk tapasztaltakkal: pH 3-11 tartományban a G5 PAMAM dendrimer diffúziós együtthatója jelentős növekedést mutat (kb.  $6-7,5 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ), aminek oka szignifikáns méretcsökkenés is lehet. Mi a pH-t deuterált HCl és NaOH hozzáadásával változtattuk, pufferoldatokat nem használtunk.<sup>31</sup> Az állandó ionerősség és a méretszámításhoz szükséges pontos viszkozitás adatok hiánya miatt mi méretmeghatározásra nem vállalkoztunk, csak a diffúzió adatokat közöltük. Jelen munka során fényt derítettünk a G5 PAMAM dendrimer foszfát pufferben bekövetkező méret és szerkezeti változásaira, ami megkérdőjelezi van Dongen és munkatársai következtetéseinek helyességét.

## 2.2 Ionok kölcsönhatása dendrimerrel

A PAMAM dendrimerek pH-tól függően több száz pozitív töltésre is szert tehetnek. 5. generációs molekulák esetében savas közegben (pH = 3), ahol minden tercier (124 db) és primer (128 db) aminocsoport protonált, 256 pozitív töltés is kialakulhat, amennyiben tökéletesnek tekintjük a szintézist. A pH csökkenésével először a terminális aminocsoportok, majd a tercier nitrogének protonálódnak. A dendrimerek méretét és polielektrolit jellegét tekintve, oldatbeli szerkezetük vizsgálata során semmiképpen sem hanyagolható el a molekula ellenionokkal való kölcsönhatása, az elektromos kettősréteg megjelenése.

Polielektrolit molekulák és ellenionok között az ellentétes töltések miatt elektrosztatikus kölcsönhatás alakul ki. Az ellenionok eloszlását a hőmozgásból származó energia és az elektrosztatikus térből származó helyzeti energia viszonya határozza meg. A potenciál változását töltött felület környezetében a Poisson-Boltzmann-egyenlet (2) írja le.

$$\nabla^2 \psi = \frac{-1}{\varepsilon_0 \varepsilon_r} \sum_i n_i^0 z_i e \exp\left(\frac{-z_i e \psi}{kT}\right) \quad (2)$$

ahol  $\psi$  a potenciál,  $\nabla^2$  a Laplace operátor,  $\varepsilon_0$  a vákuumban mért dielektromos permittivitás,  $\varepsilon_r$  a relatív permittivitás,  $n_i^0$  i-edik ion koncentrációja a tömbfázisban,  $z_i$  i-edik ion töltése,  $e$  az elemi töltés,  $k$  a Boltzmann-állandó,  $T$  a hőmérséklet. Amennyiben a helyzeti energia kicsi a kinetikus energiához

képest, a Poisson-Boltzmann-egyenlet analitikus megoldása (a potenciál változása a távolsággal) a Debye-Hückel-féle közelítésre (3) vezet:

$$\psi = \text{const} \exp(-\kappa x) \quad (3)$$

ahol  $\kappa$  a Debye-Hückel paraméter,  $x$  a felülettől mért távolság. Merevfalú gömb alakú kolloidoknál kis felületi potenciál esetén az ellenioneloszlást az ezen az egyenleten alapuló kettősréteg modellek írják le különböző részletességgel (Helmholtz-, Gouy-Chapman-, Stern-modell).

A polielektrolit molekulák és ellenionok kölcsönhatásának leírására sok esetben alkalmas a Manning-féle elmélet.<sup>53</sup> E szerint az ellenionok a poliionos molekulákon kondenzálódnak addig, amíg a polielektrolit szomszédos monomerjei közti töltéssűrűség egy bizonyos érték alá csökken. A kondenzált ellenionok egyensúlyban vannak a polielektrolit molekulát körülvevő ionatmoszférával, mely a Debye-Hückel megközelítéssel írható le. Az ellenion kondenzáció akkor következik be, ha a polielektrolit töltéssűrűsége 1 vagy annál nagyobb, amit a Bjerrum-hossz (az a távolság egy adott közegben, amelynél két elemi töltés elektrosztatikus energiáját a hőmozgás kompenzálja) és a makromolekula töltéssel rendelkező monomertávolságának hányadosa ad meg (4). Ez alapján tehát polielektrolitok esetében többnyire a Coulomb-kölcsönhatás dominál, hiszen vizes közegben a Bjerrum-hossz értéke  $\sim 0,7$  nm, a monomertöltések távolsága pedig ennél kisebb.

$$\zeta = \frac{q^2}{\epsilon kTB} = \frac{l_B}{B} \quad (4)$$

ahol  $\zeta$  a poliion lineáris töltéssűrűsége,  $q$  a töltés,  $\epsilon$  relatív permittivitás,  $k$  a Boltzmann-állandó,  $T$  a hőmérséklet,  $B$  a polimer molekula szomszédos töltéseinek távolsága,  $l_B$  a Bjerrum-hossz.

PAMAM dendrimerek esetében kísérletileg és modellszámításokkal is bizonyítható az ellenionok kötődése a számos pozitív töltéssel rendelkező makromolekulához.<sup>54</sup> pH-potenciometriás titrálással kimutatták, hogy a karboxil végcsoportú dendrimerek effektív felületi töltéssűrűsége kisebb, mint a szerkezet alapján várt és a Poisson-Boltzmann-egyenletből számolt érték, amit az ellenion kondenzációnak tulajdonítottak.<sup>55</sup> Böhme és munkatársai G0-3 PAMAM dendrimer diffúziós és elektroforézises NMR vizsgálatával határozták meg az effektív töltést 3-as és 7,7-es pH-értéken, és azt tapasztalták, hogy a valós töltés a névleges töltés kb. 50-70 százaléka pH-tól és generációtól függően. Ugyanakkor a valós töltések száma nem változik

jelentősen a pH csökkentésével (pH=7,7 és 3 között). Nagyobb generációnál az effektív töltések aránya kisebb, amit azzal magyaráztak, hogy nagyobb generációnál nagyobb az ellenion kondenzáció.<sup>46</sup> Maiti és munkatársai 3-7 generációs PAMAM dendrimerek esetében azt tapasztalták, hogy a zéta potenciál csak lassú mértékben növekszik a generációk számával, és nagy generációnál telítést mutat.<sup>56</sup> Ez ellentétes a névleges felületi töltés exponenciális viselkedésével, amely a protonált terminális csoportok számából és a szimulált ellenion-eloszlásból lenne következtethető. Ezt is a dendrimeren kívül lévő ellenionokkal magyarázták. Semleges pH-n több generációnál szimulálták az ellenion- és monomersűrűséget, és azt találták, hogy az ellenionok jelenléte a molekula belsejében jelentős, kifelé haladva kisebb. Ezt az ágak visszahajlásával magyarázták, ami miatt a monomerek sűrűsége is nagyobb a molekula belsejében. Huang és munkatársai megállapították, hogy a dendrimerek ellenionokkal való kölcsönhatása a Manning-elmélettel sem írható le teljes mértékben.<sup>57</sup> Gurtonvenko eredményei szerint a Debye-Hückel megközelítés sem igazán alkalmazható a dendrimerek esetében, azok belső töltései és nagy atomsűrűsége miatt.<sup>58</sup>

Számos olyan közlemény jelent meg, mely szimulációkkal vizsgálja, hogy az elektrosztatikus kölcsönhatások hogyan befolyásolják a dendrimerek alakját és méretét. Maiti és Goddard úgy találták, hogy az ellenion kondenzáció növeli a dendrimer duzzadását<sup>48</sup>, a pH csökkentésével nagyobb duzzadás tapasztalható.<sup>59</sup> Blaak és munkatársai számítógépes szimulációt alkalmazva töltéssel rendelkező dendrimerek (pl.: PAMAM dendrimerek esetében a terciér és primer aminocsoportok) kölcsönhatását vizsgálták egy- és kétértékű ionokkal. Úgy találták, hogy a töltéssel rendelkező csoportok taszítása miatt tágul a szerkezet és ez lehetőséget ad az ellenionok diffúziójának a dendrimer belsejébe. Ezzel együtt az ellenionok leárnyékolják a töltéseket és ezáltal viszont csökken a szerkezet tágulása. Az egyértékű ellenionok jelentősen nem változtatják a dendrimer méretét és struktúráját. A kétértékű ellenionok ellenben csökkentik a dendrimer méretét, jobban árnyékolják a monomerek töltését, és kevesebb is szükséges a kétértékű ionokból a töltéskompensációhoz, így kisebb a sztérikus gátlás.<sup>60</sup> Ellenionok jelenlétében tehát a PAMAM dendrimerek töltéssel rendelkező csoportjainak taszítása miatt duzzad a szerkezet, az ellenionok kondenzációjuk során viszont leárnyékolják a töltéseket, így a szerkezet zsugorodását idézik elő.<sup>58</sup>

## **2.3 A PAMAM dendrimerek orvosi alkalmazása, gyógyszerhatóanyaggal való kölcsönhatásuk**

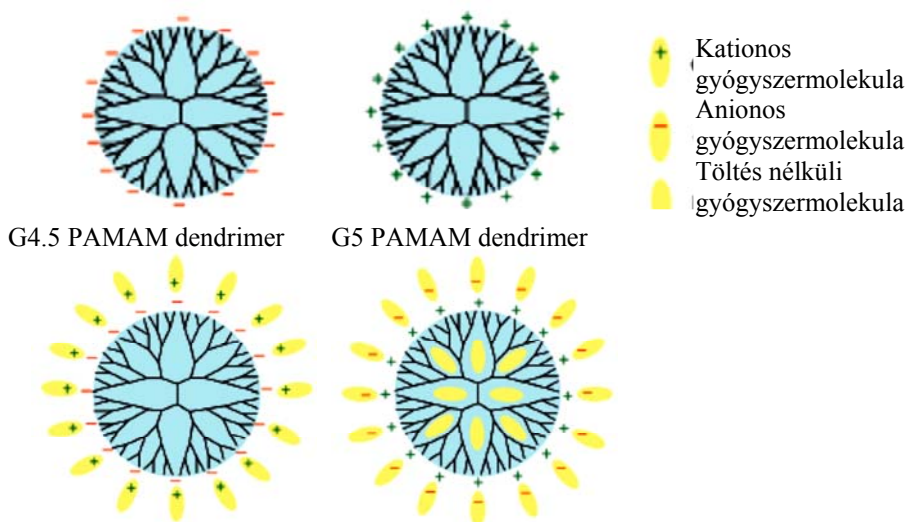
Évről évre egyre több tudományos közlemény jelenik meg a dendrimerek széleskörű orvosi biológiai alkalmazásáról. A molekulák mérete, különböző funkciós csoportjaik, vagyis az elágazási pontok és a terminális csoportok, valamint az üregesnek vélt térbeli szerkezet kifejezetten alkalmassá teszik a dendrimereket különböző hatóanyagok, gyógyszermolekulák, képzőanyagok használatos ágensek, stb. megkötésére, kapszulázására, szállítására.<sup>17</sup>

A dendrimerek gyógyszer szállításban való alkalmazhatóságának megítélésénél az egyik fontos tényező a molekula töltése, a terminális csoportok minősége. Túl sok pozitív felületi töltés esetén károsodik a sejthártya, így a terminális NH<sub>2</sub>-csoporttal rendelkező poli(amido-amin) (PAMAM) dendrimerek, melyek mint láthattuk pH-tól függően számos pozitív töltéssel rendelkeznek, oldják a sejthártyát, citolízist okoznak, ezért citotoxikusnak minősülnek.<sup>61</sup> A citotoxicitás mértéke a generációs számtól és a koncentrációtól is függ.<sup>62, 63</sup> Bár az 5. generációs PAMAM dendrimerek mérete közelíti a hemoglobin méretéhez, pozitív töltésük miatt a vörösvértestek sejthártyájában lévő fehérjékkel, lipidekkel kölcsönhatásba lépnek, így hemolitikus hatást váltanak ki.<sup>64</sup> A toxicitás lecsökkentésére megoldást ad a „felületi” NH<sub>2</sub>-csoportok semlegesítése PEGilálással<sup>65, 66</sup>, acetilézéssel<sup>67, 68</sup>, hidroxilálással<sup>69, 70</sup> vagy karboxilézéssel<sup>71, 72</sup>, mely eredményeként jelentősen javul a molekula biokompatibilitása. A felületmódosított dendrimerek így módon már alkalmasak különböző gyógyszermolekulák szállítására. A gyógyszer szállítás két alapvető módja a gyógyszer molekula kovalens megkötése a terminális csoportok által, illetve a korábban említett úgynevezett dendrimer fázisban történő fizikai kötést létrehozó kapszulázás.<sup>17</sup>

In vitro és in vivo kísérletek igazolják, hogy a különböző gyógyszerhatóanyagok dendrimer molekulákhoz kapcsolása jelentősen befolyásolja a gyógyszer molekula vízoldhatóságát és biológiai aktivitását, valamint a hatóanyag leadás sebességét.<sup>73, 74</sup> Mivel számos rákellenes gyógyszerhatóanyag igen rosszul oldódik vízben, így az apoláris gyógyszermolekulák kvázi „szolubilizálása” fontos előnye a dendrimer alapú gyógyszer szállításnak. Többek között vizsgálták a doxorubicin hatóanyag kapszulázását is liposzómákban, polimerekben, és a terápiás index javulását, a toxicitás csökkenését tapasztalták.<sup>75</sup>

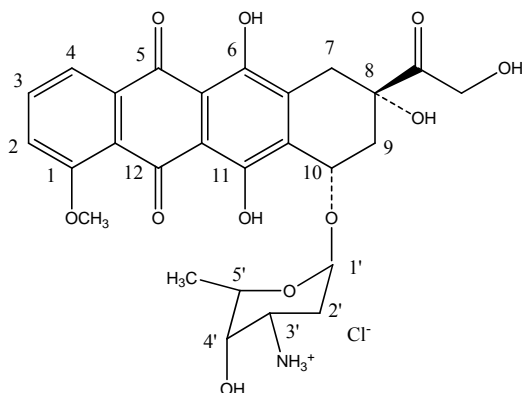


A dendrimerek és gyógyszermolekulák közötti kölcsönhatás vizsgálatára számos technika áll rendelkezésünkre. Az UV/látható spektroszkópia<sup>76</sup>, az elektron paramágneses rezonancia (EPR), a mágneses magrezonancia<sup>77</sup> és a folyadék kromatográfia (HPLC)<sup>78</sup> mind alkalmazható a PAMAM dendrimer alapú gyógyszer szállító rendszerek host-guest sajátosságainak és fizikai-kémiai paramétereinek jellemzésére. Az NMR módszerek közül az <sup>1</sup>H és a <sup>13</sup>C NMR titrálás, a kétdimenziós mag Overhauser hatás spektroszkópia (2D-NOESY) és a diffúziometria (DOSY), bizonyult hatékony módszernek a host-guest kölcsönhatások vizsgálatában.<sup>79-81</sup> Chandra és munkatársai többek között NMR spektroszkópiát alkalmaztak a funkcionizált poli(amido-amin) dendrimer és gyógyszermolekula komplexének jellemzésére, és hidrogénkötések kialakulásának lehetőségét vetették fel.<sup>82</sup> Cheng és munkatársai pozitív és negatív töltésű „felületmódosított” PAMAM dendrimerek, mint gazda (host) molekulák, és négyféle savas karakterű gyógyszerhatóanyag, mint vendégmolekula (guest), alkotta komplexek tulajdonságait vizsgálták NMR technikák alkalmazásával. Megállapították, hogy a kationos gyógyszermolekulák csak elektrosztatikusan kötődnek az anionos dendrimerek felületi csoportjaihoz, míg az anionos vendégmolekulák megoszlanak a kationos dendrimerek felületi és belső üreges régiója között (11. ábra).<sup>83</sup>



11. ábra: Negatív és pozitív felületi töltéssel rendelkező dendrimerek kölcsönhatása különböző gyógyszermolekulákkal.<sup>83</sup>

Az egyik igen széles körben kutatott és alkalmazott rákellenes gyógyszerhatóanyag a doxorubicin (12. ábra), mely erős antitumor aktivitása mellett súlyos mellékhatásokkal és dózis-limitált toxicitással is rendelkezik. Emiatt a doxorubicin alkalmazhatóságát tekintve igen fontos szerepet kapott a tumor-célzott gyógyszer szállító rendszerek kifejlesztése.



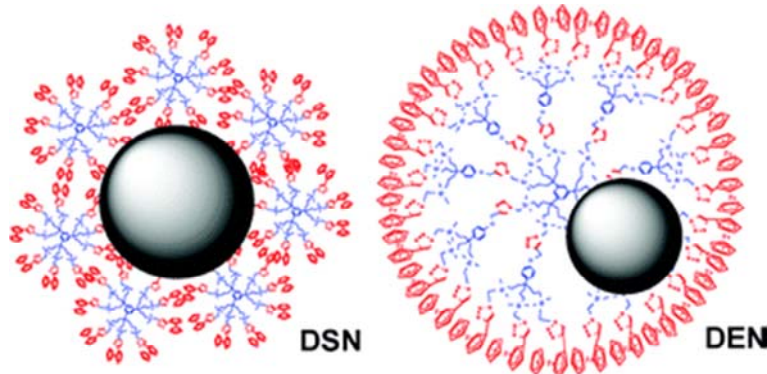
12. ábra: A doxorubicin-hidroklorid (DOX·HCl) szerkezeti képlete.

A doxorubicin „szolubilizálására” és szállítására többféle módszert is kifejlesztettek (pl.: hidrofób kölcsönhatások révén polimer micella belsejében<sup>84</sup>). Wang és munkatársai 5. generációs PAMAM dendrimert alkalmaztak a doxorubicin rákos sejtekhez való szállítására, oly módon, hogy a dendrimert fluoreszcens izotiocianáttal és folsavval funkcionálizálták kovalens módon, a molekula nyomon követése és célba jutása céljából, majd a még szabad primer aminok acetilezését követően doxorubicinnal reagáltatták. Kimutatták, hogy egy módosított dendrimer molekula egy doxorubicint képes kapszulázni, és a létrehozott komplex stabilis és vízoldható.<sup>85</sup> A doxorubicin <sup>1</sup>H NMR spektruma igen jellegzetes csúcsokat mutat az alifás és az aromás kémiai eltolódás tartományban egyaránt<sup>86</sup>, így az NMR spektroszkópia igen alkalmasnak tűnik a doxorubicindendrimer komplexek jellemzésére, a gyógyszermolekula és a makromolekula közti kölcsönhatás vizsgálatára.

## 2.4 Az arany nanorészecskék és a PAMAM dendrimerek közötti kölcsönhatás

Az arany nanorészecskéket az utóbbi időben igen széles körben kutatják és alkalmazzák számos előnyös tulajdonságuk miatt. Katalizátorként való alkalmazásuk mellett a rákgyógyításban, génátvitelben, valamint röntgen és CT (számítógépes tomográfia) képalkotó eljárásokban kontrasztanyagként való felhasználását is vizsgálják.<sup>87</sup> Az arany nanorészecskék biokompatibilisnek tűnnek, és viszonylag könnyen kapcsolhatók a felszínükhöz más molekulák (pl: bioszenzorok).<sup>88</sup> A PAMAM dendrimereket gyakorlatilag felfedezésük óta alkalmazzák szervesetlen nanorészecskék templátjaként.<sup>42</sup>

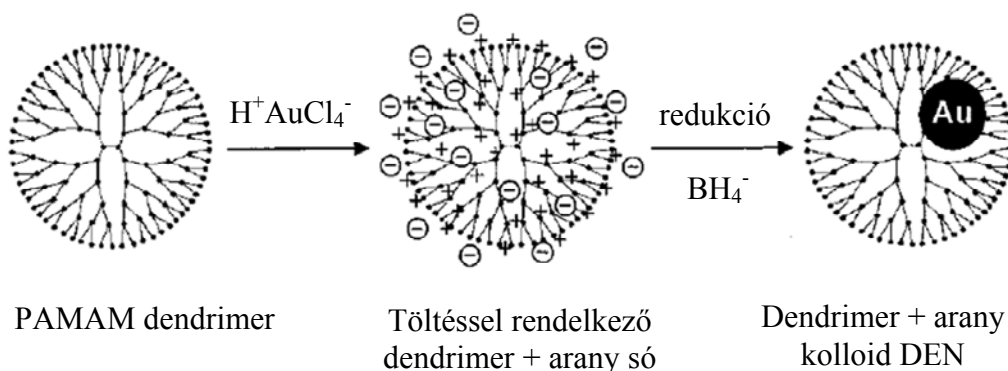
A dendrimerek által stabilizált nanorészecskéknek két formája ismert: 1. A dendrimer molekula által magába zárt (azaz intradendrimer) nanorészecskék (DENS, *Dendrimer Encapsulated Nanoparticles*); 2. A dendrimer molekulák által közrefogott és stabilizált (azaz interdendrimer) nanorészecskék (DSNs, *Dendrimer Stabilized Nanoparticles*) (13. ábra). Az intradendrimer nanorészecskék esetében a dendrimer molekulák üreges jellegű szerkezetük miatt képesek a nanorészecskéket magukba foglalni. Az interdendrimer nanorészecskék felületét pedig több dendrimer molekula stabilizálja.<sup>40</sup> (13. ábra) PAMAM dendrimerekkel stabilizált arany nanorészecskék esetében a dendrimer terminális primer aminocsoportjai számos target molekulával funkcionálizálhatók, növelve az alkalmazási lehetőségeket.<sup>89</sup>



13. ábra: Ferrocenyl dendrimerek által inter- (DSN) és intradendrimer (DEN) módon stabilizált palládium nanorészecskék.<sup>90</sup>

Az arany nanorészecske – PAMAM intradendrimer (DEN) komplex szintézise során az első lépésnek a fémionok és a dendrimer belsejében

található tercier aminok közti komplexképződést tételezik fel. Ezt követően redukálószerrel (általában  $\text{BH}_4^-$ ) állítják elő a semleges nanorészecskéket (14. ábra).<sup>40</sup> A szintézis során fontos az arany-dendrimer arány, a dendrimer koncentráció és a reakciósebesség megfelelő optimalizálása, hiszen ezek a tényezők befolyásolják a keletkező arany nanorészecskék számát és méretét. Nagy dendrimer koncentrációnál ( $\geq 2\%$ ) az arany só redukciója során csapadékképződés történhet, míg 0,12 (m/m)%-os koncentráció esetén egyforma méretű aranykolloidok képződnek.<sup>91</sup>



14. ábra: Intradendrimer arany nanorészecske szintézise.<sup>91</sup>

Azt, hogy a szintézis során DSN vagy DEN képződik-e, elsősorban a fémionok és a dendrimer végcsoportjainak aránya dönti el. Gröhn és munkatársai G2-G10 PAMAM\_ $\text{NH}_2$  jelenlétében állítottak elő aranykolloidot, és arra a következtetésre jutottak, hogy a dendrimer generációja is jelentősen befolyásolja a képződő nanostruktúra szerkezetét.<sup>91</sup> A G2-G4 dendrimerek kolloid stabilizátorként viselkednek, vagyis a képződő, viszonylag nagyméretű fém nanorészecskét több makromolekula sztérikusan stabilizálja. A G6-G10 dendrimerek már valódi nanotemplátnak tekinthetők, az arany nanorészecskék a különálló dendrimer molekulák belsejében képződnek. Egy makromolekulában egy fém részecske jön létre, melynek mérete az egy dendrimer molekulára jutó fémionok számával kontrollálható. G10 PAMAM dendrimereknél azt tapasztalták, hogy több fém kolloid is kialakul egy molekulán belül. A G5 PAMAM dendrimereket illetően nem tudtak állást foglalni. Gröhn megállapításait alátámasztja Hoffman és munkatársainak a közleménye<sup>92</sup>, melyben G4 és G8 PAMAM dendrimerek arannyal alkotott nanorészecskéit vizsgálják TEM, AFM és

NICISS módszerekkel. Megállapítják, hogy a kisebb generációjú (G4) dendrimer molekulák körbeveszik az arany nanorészecskéket, míg a nagyobb generációjú PAMAM (G8) intradendrimer nanorészecskét hoz létre.

Kim és munkatársai kvaterner trimetil-ammóniummal funkcionizált G4 és G6 PAMAM dendrimerekkel állítottak elő intradendrimer arany nanorészecskéket. A részben funkcionizált PAMAM.NH<sub>2</sub> dendrimer megnövekedett pozitív töltése megakadályozta a molekulák aggregációját, így a szintézis során kisméretű, 1-2 nm átmérőjű igen monodiszperz arany nanorészecskék keletkeztek a dendrimer molekulák belsejében. A nanorészecskék előállításakor az AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>/dendrimer arány 55-nek illetve 140-nek adódott, mindkét esetben a számolt méret és a transzmissziós elektronmikroszkóppal mért átmérő jó egyezést mutatott, a keletkezett arany nanorészecske sűrűségét azonosnak feltételezve az arany sűrűségével, valóban 55 ill. 140 aranyatom alkotja a DEN részecskét. Utóbbi esetében arra a következtetésre jutottak, hogy az aurationok kapszulázásában nem csak a tercier aminok vesznek részt (hiszen itt 62 tercier aminocsoportra 140 auration jut), hanem az elektrosztatikus kölcsönhatásoknak is fontos szerepe van.<sup>39</sup>

Az arany nanorészecskék vizsgálati módszerei közül a legelterjedtebb az UV/látható spektrofotometria. A fény fotonjainak hatására az arany szabad elektronjainak rezgése egy adott hullámhossznál rezonanciát hoz létre a plazmon rezonancia tartományban. A rezonancia maximum értéke az arany nanorészecskék méretétől és alakjától függ, így a módszer jól alkalmazható a részecskék jellemzése során.<sup>93</sup> A PAMAM dendrimer által kapszulázott gömb alakú arany nanorészecskék UV/látható spektrumán 510 nm hullámhossz körül jelentkezik a plazmon rezonancia sáv.<sup>69</sup> Shi és munkatársai azt tapasztalták, hogy az 5. generációjú, különböző terminális csoporttal rendelkező (-NH<sub>2</sub>, -Ac, -GlyOH) PAMAM dendrimerből és 51 aranyatomból álló nanorészecskéből képzett DEN részecske hasonló abszorpciós viselkedést mutat, mely hasonló méretre és méreteloszlásra enged következtetni. A részecskék UV/látható spektruma a pH-változás (5,3-8,5) hatására sem mutatott változást, így az előállított részecskéket igen stabilnak nyilvánították.

A fém nanorészecskék méretének, méreteloszlásának meghatározására széles körben alkalmazzák a transzmissziós elektronmikroszkópiát.<sup>69, 89, 94, 95</sup> A TEM felvételeken azonban csak a fém nanorészecskék láthatók, az őket stabilizáló dendrimer molekulák nem. Az intra- (DEN) vagy interdendrimer

(DSN) módon létrehozott dendrimer-arany nanotemplát méretének meghatározására megoldást jelenthet az NMR diffúziometria.<sup>38</sup> Ez esetben ugyanis a dendrimer molekula diffúziós együtthatóját határozzuk meg, melyből gömb alakú részecskék esetén az Stokes-Einstein egyenlet (1. egyenlet) alkalmazásával számítható a részecske hidrodinamikai sugara. Az arany nanorészecske – dendrimer nanokompozit ily módon meghatározott méretéből következtethetünk a nanorészecske stabilizálásának módjára is (DEN vagy DSN). Gomez és munkatársai hidroxil terminális csoportot tartalmazó G4 PAMAM dendrimerek által kapszulázott palládium nanorészecskék hidrodinamikai méretét PFGSE NMR diffúziómérésekkel meghatározva arra a következtetésre jutottak, hogy mivel a dendrimer mérete a Pd nanorészecskével való kölcsönhatás során nem változik, így biztosan kizárható annak a lehetősége, hogy több dendrimer stabilizál egy nanorészecskét.<sup>38</sup>

Az NMR az arany és a dendrimer molekula közötti kölcsönhatás jellegének és helyének felderítésében is segítségünkre lehet. Ez esetben fontos elkülöníteni az arany nanorészecske szintézisének két lépése során bekövetkező kölcsönhatást, vagyis (1) az Au<sup>III</sup>-ionok és a dendrimer molekula kapcsolatát, valamint (2) a redukció után a töltés nélküli Au-atomokból álló arany nanorészecske dendrimerrel alkotott nanostruktúra szerkezetét. A hidrogén-tetrakloro-aurátot hozzáadva a PAMAM dendrimer oldatához megfigyelték, hogy a dendrimer <sup>1</sup>H NMR spektruma megváltozik. Lee Hoffman PhD értekezésében számol be arról, hogy G4 PAMAM dendrimer oldatához Au<sup>III</sup>-ionokat adva (mintegy 100 ion/dendrimer molekula), a dendrimer <sup>1</sup>H NMR csúcsai nagyobb kémiai eltolódás felé tolódnak.<sup>96</sup> Értelmezése szerint a csúcsok kémiai eltolódás növekedésének különböző mértéke arra utal, hogy a dendrimer különböző funkciós csoportjai (tercier amin, szekunder amid és primer amin) különböző mértékben vesznek részt az Au<sup>III</sup>-ionok komplexálásában, hiszen az aranyion többlet miatt nem csak az elsődleges kötőhelyek telítődnek. Shi és munkatársai<sup>95</sup> 7 aranyionnal feltöltött G5.NH<sub>2</sub> PAMAM dendrimer <sup>1</sup>H NMR spektrumát vizsgálva úgy találták, hogy a terminális primer aminokhoz közeli protonok kémiai eltolódása változik meg jelentősen arra utalva, hogy a primer aminocsoportok erős kölcsönhatásba lépnek az Au<sup>III</sup>-ionokkal.

A G4-OH PAMAM dendrimerek esetében Gomez és munkatársai is hasonló eredményre jutottak.<sup>38</sup> A G4-OH(Pd<sub>55</sub>) és a G4-OH <sup>1</sup>H NMR

spektruma gyakorlatilag megegyezett, a G4-OH(Pd<sup>2+</sup>)<sub>55</sub> spektruma viszont jelentős eltérést mutatott. Ellenben rámutattak arra, hogy az <sup>1</sup>H NMR csúcsok intenzitása változik a fém nanorészecske hatására, mely a nanorészecske kapszulázásának következtében kialakuló gátolt helyi mozgásnak és a heterogenitásnak tulajdonítható. Azt is megfigyelték, hogy az intenzitáscsökkenés mértéke arányos a Pd nanorészecske méretével (az alkotó atomok számával).<sup>37</sup>

Láthatjuk tehát, hogy a dendrimerek fém nanorészecskékkel alkotott nanostruktúráját leíró irodalom igen széleskörű, de az arany nanorészecskék 5. generációs PAMAM dendrimerekkel való stabilizálásának módja az irodalom alapján nem egyértelmű. Szintén kérdéses, hogy a nanorészecskék képződését megelőzően milyen kölcsönhatás alakul ki az Au<sup>III</sup>-ionok és a makromolekulák között.

## **3 KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK**

### **3.1 A felhasznált vegyszerek**

A kísérletek során felhasznált ötödik generációs (G5) etilén-diamin magvú,  $\text{NH}_2$ -végcsoportú poli(amido-amin) (PAMAM) dendrimert (1205\_06-E5.0-LD) a Dendritech cégtől vásároltuk (Midland, MI, USA). A dendrimerek oldatát megtisztítottuk a benne lévő kisebb generációs maradékoktól. Metanolos oldatukat bepároltuk, vízben oldást követően fagyasztva szárítottuk és így tároltuk. Minőségüket NMR-rel ellenőriztük.

A felhasznált vegyszerek kereskedelmi forgalomban kaphatóak, analitikai tisztaságúak. Az NMR méréseknél oldószerként használt 99,96 %-os izotóptisztaságú  $\text{D}_2\text{O}$ -t, valamint a pH változtatásához használt DCl- és NaOD-oldatokat a Sigma Aldrichtől szereztük be. A foszfáttartalmú minták készítéséhez felhasznált  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -t a Merck, míg a  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -ot a Sigma Aldrich gyártotta.

A pH-potenciometriás titrálásokhoz a Sigma Aldrich által forgalmazott szilárd KOH-ot, a Scharlau cégtől beszerzett KCl-ot, a Mercktől vásárolt HCl-oldatot, pufferként pedig a Scharlau által forgalmazott KH-ftalát-oldatot használtuk.

Az arany(III)ionokkal és arany nanorészecskékkel végzett kísérletek során a  $\text{HAuCl}_4$ -oldatot a Reanal cég által forgalmazott  $\text{HAuCl}_4$  ampulla vízben való feloldásával készítettük. A redukcióhoz használt  $\text{NaBH}_4$  az Aldrichtől származott.

A doxorubicin-hidrokloridot ( $\text{DOX} \cdot \text{HCl}$ ) a Beijing Huafeng Pharmaceutical Co., Ltd. (Peking, Kína) gyártotta. A metanolt és a semlegesítéshez használt trietil-amint a Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd.-től (Kína) szereztük be.

### **3.2 NMR mérések**

#### **3.2.1 Mintakészítés**

Az NMR kísérletekhez a dendrimert 99,96 %-os izotóptisztaságú  $\text{D}_2\text{O}$ -ban oldottuk fel (általában 10 mg/ml koncentrációban), Az NMR titrálás során a pH állításához megfelelően hígított DCl- és NaOD-oldatokat használtunk.



Az NMR krioporozimetriás kísérletekhez 77,4 mg liofilizált G5 PAMAM dendrimert mértünk műanyag NMR csőbe, dry-box-ban, nitrogén atmoszféra alatt, melyhez 1000-4000 mol vizet adagoltunk dendrimer mólonként, 4 lépésben. Az egyes adagolási lépések között legalább 7 napot vártunk, mely elegendőnek bizonyult ahhoz, hogy a víz a gélbe diffundáljon, ezt követően végeztünk NMR kísérleteket.

A foszfátionok és G5 PAMAM dendrimer kölcsönhatásának vizsgálatához a dendrimer 10 mg/ml koncentrációjú oldatát  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  és  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  hozzáadásával készítettük ( $c_{\text{H}_3\text{PO}_4} = \sim 0,1 \text{ M}$ ). A  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  és  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  arányát az elérni kívánt pH-értéknek megfelelően változtattuk (pH = 2,2-12,4), valamint a pH-t azonos értéken tartva (pH=6,4) a teljes foszfátkoncentrációt változtattuk.

A  $\text{G5.NH}_2 \text{ Au}^{\text{III}}$ -ionokkal való kölcsönhatásának jellemzéséhez 12,2 mg dendrimert oldottunk fel 800  $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$ -ban, amihez 600  $\mu\text{l}$  10 mg/ml koncentrációjú  $\text{HAuCl}_4$ -oldatot adagoltunk 4 lépésben.

A doxorubicinnal (DOX) végzett kísérletekhez a shanghai Donghua Egyetemen a G5 PAMAM dendrimer terminális csoportját 3 féle módon funkcionizálták, acetamid-, hidroxil- és karboxilcsoporttal. A doxorubicinnal való kölcsönhatás lehetőségének vizsgálatához 10 mg G5.Ac dendrimert és 5 mg DOX-HCl-ot oldottunk fel 1 ml  $\text{D}_2\text{O}$ -ban. Az így kapott savas minta (pH  $\approx$  3) 500  $\mu\text{l}$ -ét 0,5  $\mu\text{l}$  trietil-aminnal (TEA) semlegesítettük.

Erélyesebb körülményeket alkalmazva, a különböző dendrimer-DOX komplexeket egy már korábban leírt módszer alapján<sup>97</sup> állítottuk elő: A dendrimerek 10 mg-ját vízben (1,5 ml) oldottuk fel, majd trietil-aminnal semlegesített doxorubicin-hidroklorid metanos oldatát (300  $\mu\text{l}$ ) adtuk a dendrimeroldatokhoz tízszeres mólnyi mennyiségben. Kevertetést követően (~12 óra) a dendrimer-DOX keveréket centrifugáltuk (7000 rpm, 10 perc), majd a felülúszóban maradt vízdoldható dendrimer-DOX komplexet liofilizáltuk. A szilárd mintákat az NMR méréshez  $\text{D}_2\text{O}$ -ban oldottuk.

A dendrimer templátú arany nanorészecskék szintézise szintén a shanghai Donghua Egyetemen történt az alábbi módon: A  $\text{G5.NH}_2$  dendrimer oldatához  $\text{AuCl}_4^-$  oldatot adtak különböző ( $\text{Au}^{\text{III}}$ -ion)/(dendrimer) molarányban (25,50,75,100/1) jegesvíz hőmérsékletén, majd az  $\text{Au}^{\text{III}}$ -ionokat nátrium-tetraborohidriddel redukálták. A reakcióelegyet hatszor 3 napig dializálták 4 l vízzel (Regenerált cellulóz dialízis membrán (molekula tömeg határ = 10000), Fisher), majd liofilizálták az arany-dendrimer nanorészecskéket.<sup>94</sup> A nanorészecskéket UV-látható spektroszkópiával és

transzmissziós elektronmikroszkóppal jellemezték.<sup>94</sup> A szilárd dendrimer-arany nanorészecskéket deutérium-oxidban (4-6 mg / 500 µl D<sub>2</sub>O) diszpergáltuk, majd 5-10 perc szonikálást követően 5 mm külső átmérőjű NMR csőbe mértük.

### **3.2.2 NMR módszerek**

A G5 PAMAM dendrimer kismolekulákkal való kölcsönhatásának vizsgálata során az <sup>1</sup>H és <sup>31</sup>P 1D spektrumokat, valamint a különböző 2D spektrumokat (COSY, NOESY, HMBC, DOSY) Bruker DRX 400 MHz-es NMR készülékkel vettük fel egy gradiens inverz szélessávú mérőfej alkalmazásával, a standard impulzusprogramok valamint TopSpin és XWIN-NMR programok segítségével. A dendrimer <sup>13</sup>C spektrumát Bruker AM 360 spektrométerrel vettük fel a direkt mérőfej előnyeit kihasználva. A méréseket többnyire 300 K hőmérsékleten végeztük. Ennek beállítását és stabilizálását, valamint a változó hőmérsékleteken végzett kísérleteknél a hőmérséklet szabályozását egy Eurotherm egység végezte. A hűtés egy Bruker BSCU 05 egység alkalmazásával, hideg levegő befújásával (<sup>31</sup>P jelszélesség valamint a dendrimer <sup>1</sup>H spektrumának hőmérséklet függése) vagy a krioporozimetriás kísérletek esetében alacsonyabb hőmérséklet eléréséhez folyékony nitrogén segítségével történt. A hőmérsékletet glikolra és metanolra kalibráltuk.<sup>98</sup> A mérések során mindig az aktuálisan meghatározott 90°-os impulzushosszt állítottuk be.

A spektrumokat MestRec és MestreNova 8.1© szoftverekkel értékeltük ki. Az NMR titrálásokat követően a kémiai eltolódások pH-függéséből a protonálódási állandó számítását és a szükséges illesztéseket a Scientist 3.0 programmal végeztük.

A használt NMR technikák:

**Kémiai eltolódás spektroszkópia:** <sup>1</sup>H és <sup>31</sup>P 1D spektrumokat vettünk különböző pH-n és foszfát-koncentrációnál. A dendrimer <sup>13</sup>C spektruma a proton jelek azonosítását segítette.

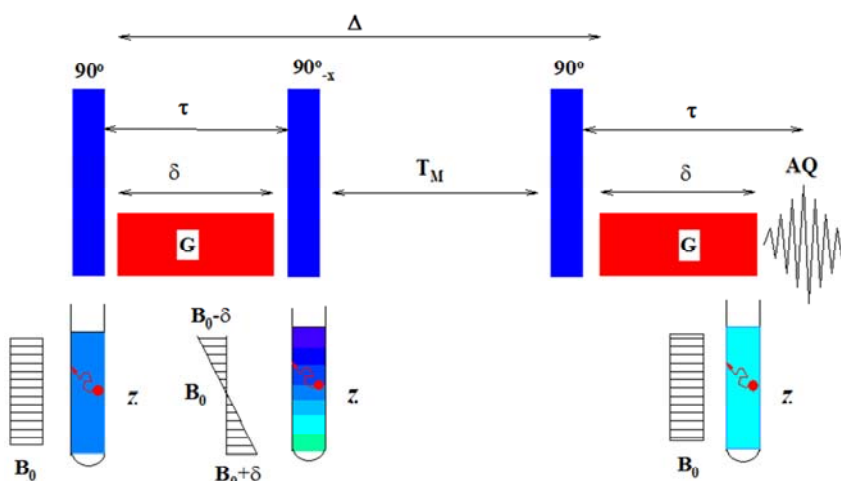
**COSY:** A skalárisan csatolt protonok közötti korrelációt mutatja. Többnyire a geminális (<sup>2</sup>J<sub>HH</sub>) és vicinális (<sup>3</sup>J<sub>HH</sub>) csatolások láthatók a spektrumon, de speciális körülmények mellett a <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> és <sup>5</sup>J<sub>HH</sub> is detektálható.<sup>99</sup>

**HSQC és HMBC:** Különböző, skalárisan csatolt magok közötti korrelációt mutatja. A kétdimenziós spektrum keresztcsúcsa az egyik dimenzióban a <sup>1</sup>H kémiai eltolódás a másik dimenzióban a protonhoz

kapcsolódó X mag ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) közötti korrelációt jelöli ki. A HSQC módszernél egykötéses korrelációt detektálunk, míg a HMBC-nél a  $^1J_{\text{CH}}$  korrelációk az impulzusszekvenciából adódóan nem láthatóak, csak a két és három kötéstávolságra lévő atomok közti koherencia jelenik meg.<sup>100</sup> A G5 PAMAM dendrimer NMR jellemzése során  $^{13}\text{C}$  és  $^{15}\text{N}$  proton korrelációs spektrumokat vettünk fel.

**NOESY:** Az egymáshoz térben közel lévő protonok között ad keresztcsúcsot a dipoláris csatolás eredményeképpen. Különböző keveredési idő alkalmazásával követhető a NOE felépülés és meghatározható annak sebessége, ami a magok közötti távolság függvénye.<sup>100</sup> A NOESY mérések során a keverési idő (mixing time) 150-200 ms volt, míg a NOE felépülés sebességét egy szélesebb, 50-200 ms-os keverési idő tartományban vizsgáltuk 0,26 foszfát/dendrimer aminocsoport arányánál.

**DOSY:** A DOSY az NMR aktív magot tartalmazó részecskék, molekulák Brown-mozgását (reverzibilis diffúzióját) méri. A módszer lényege, hogy úgynevezett stimulált spin-ekhót hozunk létre a 15. ábrán látható impulzus szekvenciával.



15. ábra: A stimulált spin-ekhó impulzus szekvencia.

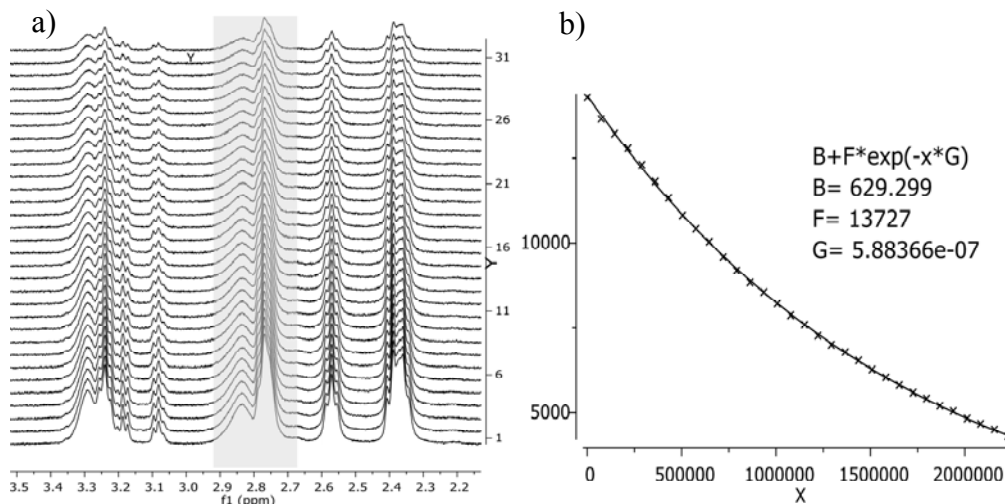
Az első  $90^\circ$ -os impulzus után alkalmazott gradiens egy fázisjelölést okoz az NMR cső  $z$ -tengelye mentén. A második  $90^\circ$ -fokos impulzus ezt  $z$ -tengely menti longitudinális információvá kódolja. A diffúzió idő alatt a bekövetkező longitudinális relaxációt gyorsítja a diffúzió, mert kicserélődést okoz, a  $z$ -irányú mágnesezettségek között. A következő  $90^\circ$ -os impulzus fáziskódolt

transzverzális mágnesezettséget hoz létre, amely fáziskódoltságát egy második gradiens impulzussal megszüntetjük, így detektálható jelet, spin-ekhót hozunk létre. A jel intenzitásváltozását a következő egyenlet írja le:<sup>101</sup>

$$I = I_0 / 2e^{-\left(\frac{2\tau}{T_2} + \frac{T_M}{T_1}\right)} e^{-\left(\gamma^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) DG^2\right)} \quad (5)$$

ahol  $D$  a mért diffúziós együttható,  $\delta$  a gradiens impulzus hossza,  $\gamma$  a giromágneses hányados,  $\Delta$  a diffúzió idő,  $G$  a gradiens nagysága,  $\tau$  időtartam, ami alatt transzverzális relaxáció zajlik,  $T_M$  időtartam, ami alatt longitudinális relaxáció is folyik.

A gradiens impulzus erősségét növeltük nullától 50 Gauss  $\text{cm}^{-1}$  ( $G$ ) értékig, egy kísérleten belül általában 32 lépésben. A mérést víz–nehévíz elegyre kalibráltuk, mert a  $G$  abszolút értéke nem ismert elég pontosan.<sup>102</sup> A kísérletek során az alábbi paramétereket állítottuk be: a diffúziós idő  $\Delta = 10$ -15 ms (víz esetében),  $\Delta = 40$ -70 ms (foszfátion, dendrimer, nanorészecske esetében), a gradiens impulzus hossza  $\delta = 4$  ms (víz esetén), 8 ms (dendrimer, nanorészecske esetén), 10 ms (foszfátionok esetén). A diffúziós együtthatót az (5) egyenlet alapján nemlineáris legkisebb négyzetek módszerével határoztuk meg. Egy tipikus DOSY mérés spektrumsorozata és a kijelölt csúcsok integrálváltozására illesztett exponenciális függvény a 16. ábrán látható. A diffúziós együttható ismeretében az Einstein-Stokes-egyenletet (1) alkalmazva számítható a részecske hidrodinamikai sugara.



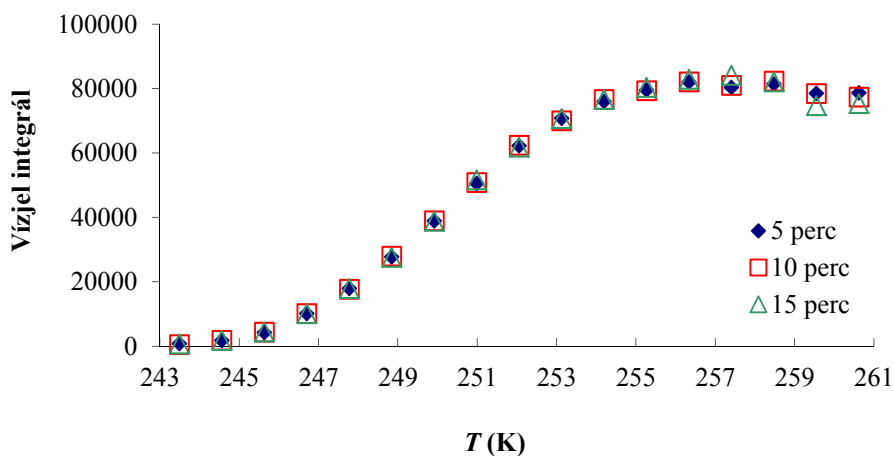
16. ábra: Egy tipikus DOSY kísérlet spektrumsorozata (a) és a kijelölt csúcsok integrálváltozására illesztett exponenciális függvény (b).

**NMR krioporozimetria:** Az NMR krioporozimetria a néhány nm-től kb 200 nm-ig terjedő pórusméret tartományban alkalmazható a pórusok méretének és alakjának meghatározására. A krioporozimetria alapja az a jelenség, hogy a pórusban lévő folyadék olvadás- és fagyáspontja kisebb a tömbfáziséhoz képest. Az olvadáspont-csökkenés mértéke fordítottan arányos a pórus méretével, vagyis minél kisebb a pórus, annál alacsonyabb a pórusba zárt folyadék olvadáspontja. Ezt az összefüggést a Gibbs-Thomson egyenlet módosított változata írja le:<sup>103</sup>

$$\Delta T_{m/f} = T_{m/f} - T_0 = -\frac{nK_c}{r} \quad (6)$$

ahol  $\Delta T_{m/f}$  az olvadás- és fagyáspontcsökkenés, mely a tömbfázis ( $T_0$ ) és a pórusba zárt folyadék ( $T_{m/f}$ ) fázisátmeneti hőmérsékletének különbségeként írható fel.  $K_c$  a krioporozimetriás konstans, mely a közegre jellemző,  $n$  geometriai tényező,  $r$  a pórus mérete. Az NMR krioporozimetriás mérés során az olvadt fázist detektáljuk folyékony fázisú NMR-rel különböző hőmérsékleten. Spin ekhó alkalmazásával érzük el, hogy egy vizes diszperzió  $^1\text{H}$  NMR spektrumában csak a folyadék állapotú víz csúcsát látjuk. A spin ekhó impulzus szekvenciában az első  $90^\circ$ -os gerjesztő RF impulzus után egy  $180^\circ$ -os RF impulzussal refókuszáljuk a koherenciát. A két impulzus közötti várakozási idő (az ún. ekhó idő), változtatásával küszöböljük ki a szilárd fázis jelét. A mérés során a hőmérsékletet csökkentve veszünk fel spektrumokat egymás után. A folyadék fázisú víz mennyiségének csökkenése miatt csökkenő jelintenzitást tapasztalunk. A kapott hőmérséklet – intenzitás görbe a fagyás- illetve, visszafelé változtatva a hőmérsékletet, az olvadásgörbét rajzolja ki.<sup>103</sup>

A dendrimer gél minta pórusméretének meghatározásához a Carr-Purcell-Meiboom-Gill spin ekhó szekvenciát alkalmaztuk. Az ekhó időt 0,5 ms-nak határoztuk meg. Tipikus kísérletben a mintát  $-40^\circ\text{C}$ -ra hűtöttük le, majd  $0,5^\circ\text{C}$ -onként  $5^\circ\text{C}$ -ig növeltük a hőmérsékletet egy program segítségével. Minden hőmérsékletváltozást követően 5 perc várakozási időt állítottunk be, amely elegendőnek bizonyult ahhoz, hogy a minta átvegye a hőmérsékletet (17. ábra). A kapott FID-ek transzformálását követően a vízjel integrálját ábrázoltuk a hőmérséklet függvényében. A pórusméret számításánál  $K_c=30$  nm K víz esetén, a geometriai faktor  $n=2$ , mivel a dendrimer gélben gömb alakú pórusokat feltételeztünk.



17. ábra: A vízjel integrálja dendrimergélben különböző várakozási időknél a hőmérséklet függvényében, 3000 víz/dendrimer mólarányánál.

**$T_1$  relaxáció:** A G5 PAMAM dendrimer protonjainak  $T_1$  relaxációs idejét inverzió-visszaépülés  $T_1$  módszerrel határoztuk meg. A  $180^\circ$ -os impulzust követő  $90^\circ$ -os impulzus előtti várakozási idő értékét 0,005-3 s között változtattuk. Szelektív gerjesztést is alkalmaztunk néhány esetben

### 3.3 pH-potenciometriás mérések

#### 3.3.1 Mintakészítés

A pH-potenciometriás meghatározások során a mintákat  $\sim 0,2$  M, pontosan ismert koncentrációjú KOH mérőoldattal titráltuk. A mérőoldat elkészítése során szilárd KOH pasztillákat oldottunk vízben argon alatt, hogy karbonátmentes oldatot kapjunk. A titrált mintákban az állandó  $0,2$  M ionerősséget  $1,00$  mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú KCl-oldat hozzáadásával értük el. A minták savas kémhatását  $\sim 0,2$  M ismert koncentrációjú HCl-oldat hozzáadásával állítottuk be. A dendrimer tartalmú mintákhoz  $40$  mg dendrimerből készítettünk törzsoldatot. A titrált minták összterfoga minden esetben  $4$  ml volt. Az oldatok elkészítéséhez háromszor ioncserélt MilliQ vizet használtunk.

### 3.3.2 pH-mérés

A vizes közegbeli pufferre kalibrált pH-mérő (Metrohm 827 pH lab) által kijelzett értékek a D<sub>2</sub>O-oldatokban pD értékeknek felelnek meg. A pD értékeket pH-skálára az alábbi, irodalomból vett módszer segítségével számítottuk át:<sup>104</sup>

$$\text{pH} = \text{pD} + 0,415 \quad (7)$$

### 3.3.3 pH-potenciometrikus titrálás

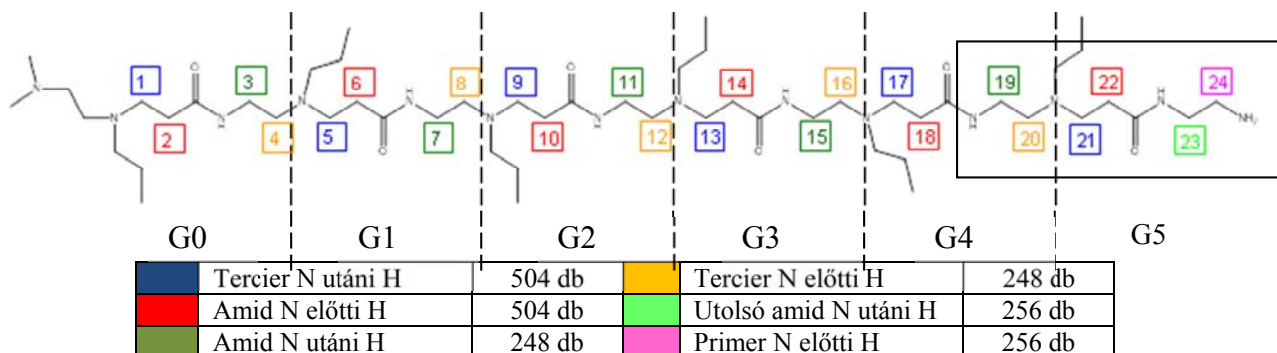
A minták titrálása 0,2 M KOH-oldattal ( $c = 0,1919 \text{ M}$ ) 25°C-on, Ar atmoszférában, Metrohm 6.0234.100 kombinált üvegelektóddal és Metrohm 736 GP Titrino titrálókészülékkel történt. A foszforsavas és az G5.NH<sub>2</sub> dendrimeres minta titrálását követően növekvő foszfát-koncentrációnál (3mM - 18 mM) határoztuk meg a protonálódási állandókat. A titrálási adatokat Hyperquad 2008 programmal értékeltük ki. A stabilitási állandók és a képződő részecske összetételének ismeretében a koncentráció-eloszlási görbéket a MEDUSA programmal szerkesztettük meg.

## 4 EREDMÉNYEK

### 4.1 NH<sub>2</sub>-végcsoportú G5 PAMAM dendrimerek szerkezetének jellemzése, kölcsönhatása az oldószerrel és annak ionjaival

#### 4.1.1 <sup>1</sup>H NMR spektrum azonosítása, szerkezet jellemzése

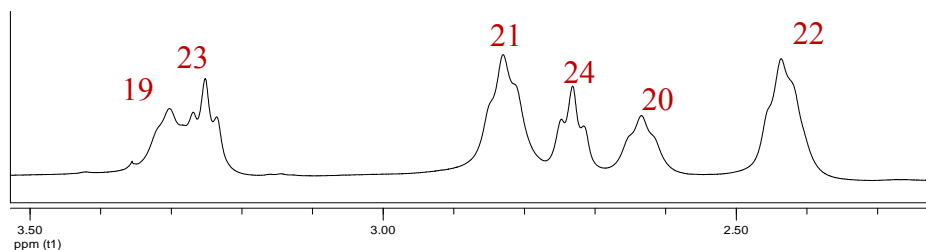
A G5.NH<sub>2</sub> dendrimer különböző kémiai környezetben lévő protonjainak <sup>1</sup>H NMR spektrumon való azonosításához a 18. ábrán látható jelölést alkalmaztuk. A dendrimer egy dendronjának CH<sub>2</sub>-csoportjait, az elágazásokat nem figyelembe véve, 1-24 számozással jelöltük. A CH<sub>2</sub>-csoportokat kémiai környezetüket tekintve 6 kategóriába sorolhatjuk az ábrán különböző színnel jelölve: tercier nitrogén előtti és utáni, amid nitrogén előtti és utáni, valamint az utolsó amid nitrogén utáni és a primer nitrogén előtti csoportok. A csoportok jelölését és a protonok számát a 18. ábra táblázata tartalmazza. A továbbiakban a dendrimer protonjainak azonosítására a külső hat CH<sub>2</sub>-csoport számozását használjuk. Így a 19-es típusú CH<sub>2</sub>-csoport jelöli az összes amid nitrogén utáni protont (3, 7, 11, 15, 19), a 20-as típusú proton jelenti a tercier N előtti protonokat (4, 8, 12, 16, 20), a 21-es típus a tercier nitrogének utáni CH<sub>2</sub>-csoportoknak (1, 5, 9, 13, 17, 21) felel meg, míg a 22-es az amid nitrogén előtti protonoknak (2, 6, 10, 14, 18, 22). A láncvégi, primer nitrogén előtti 23-as és 24-es típusú CH<sub>2</sub>-csoportok a dendrimer belsejében nem ismétlődnek.



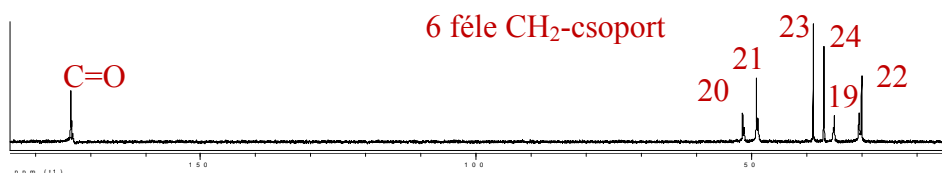
18. ábra: A G5.NH<sub>2</sub> dendrimer egy dendronja, és a CH<sub>2</sub>-csoportok jelölése és a protonok száma.



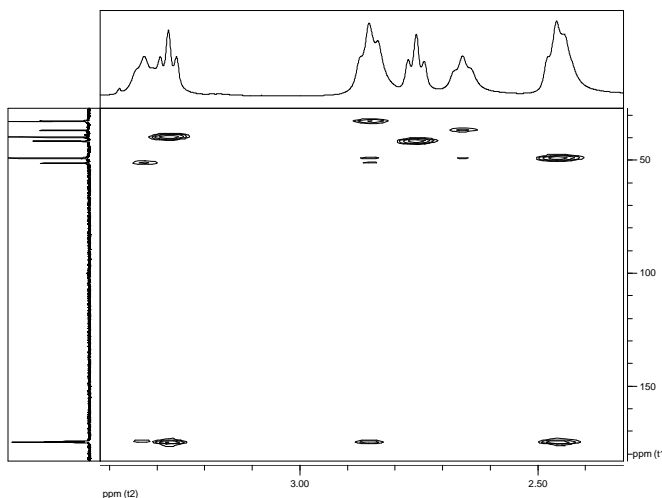
A vizes ( $D_2O$ ) közegben feloldott  $G5.NH_2$  ( $pH=10,48$ )  $^1H$  NMR spektrumán (19. ábra) a vártnak megfelelően 6 jelcsoportot látunk, melyek a dendrimerben előforduló 6 féle kémiai környezetben lévő protonoktól származnak.



19. ábra:  $G5.NH_2$   $^1H$  NMR spektruma  
(10 mg/ml  $G5.NH_2$ ,  $D_2O$ ,  $pH = 10,48$ ,  $T = 298$  K).



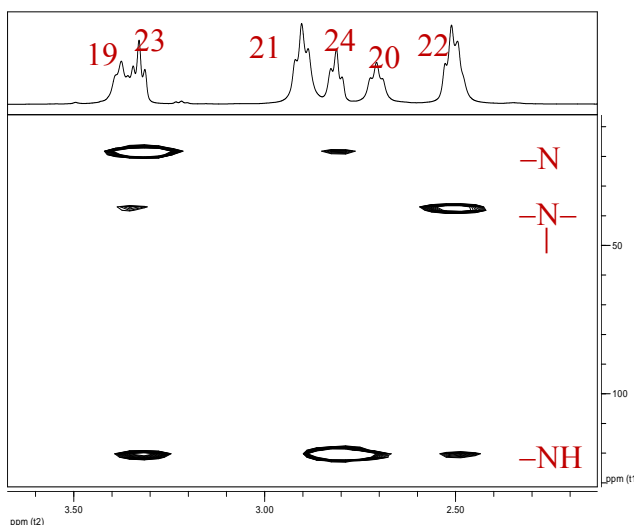
20. ábra:  $G5.NH_2$   $^{13}C$  (inverse gated decoupling) NMR spektruma  
(10 mg/ml  $G5.NH_2$ ,  $D_2O$ ,  $pH = 10,48$ ,  $T = 298$  K).



21. ábra:  $G5.NH_2$  HMBC NMR spektruma  
(10 mg/ml  $G5.NH_2$ ,  $D_2O$ ,  $pH = 10,48$ ,  $T = 298$  K).

A jelcsoportok azonosítása  $^{13}\text{C}$  és HMBC NMR spektrumok (20. ábra és 21. ábra) alapján történt, mely utóbbi az egymástól 2 vagy több kémiai kötéssel elválasztott H- és C-atomok közti korrelációt jelöli. Segítségünkre volt a molekula COSY spektruma is (23. ábra), mely a skalárisan csatolt protonok (19-20, 21-22 és 23-24-es) között mutat korrelációt.

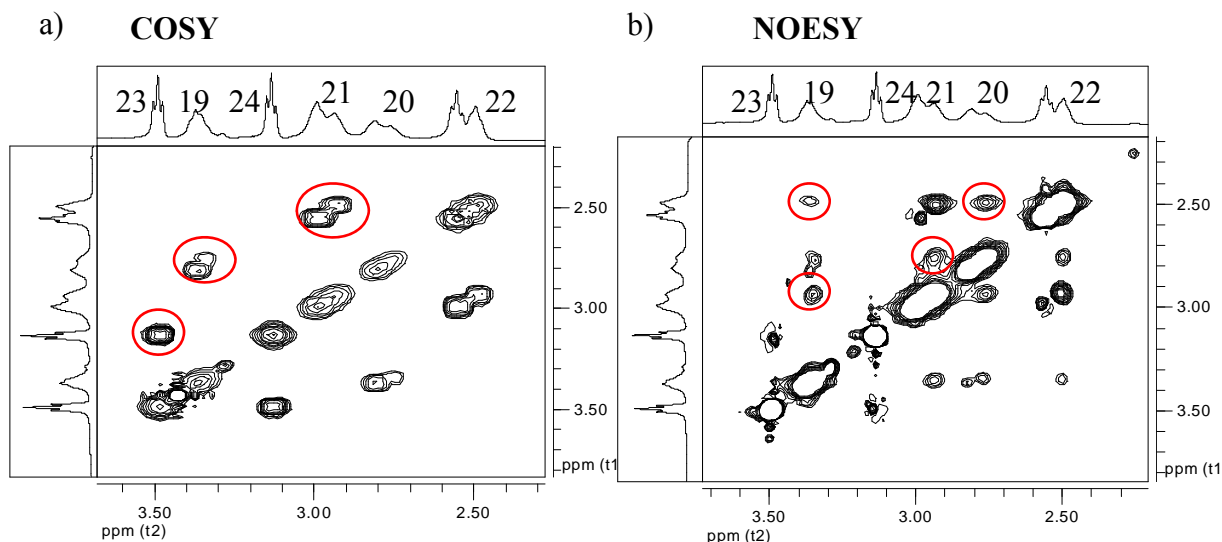
A jelazonosítás megerősítéseként  $^{15}\text{N}$  HMBC spektrumot (22. ábra) is készítettünk a G5.NH<sub>2</sub> 10,48-as pH-értékű töményebb oldatáról, mely a molekulában előforduló három féle típusú nitrogén és a nitrogénatomoktól több kötés távolságra elhelyezkedő protonok közötti korrelációt adja meg. Az alkalmazott 60 ms-os felépülési idő a N-től 3 kötés távolságra elhelyezkedő protonokkal való korrelációnak kedvez, így ezek a keresztcsúcsok nagyobb intenzitásúak (pl.: NH<sub>2</sub>- primer nitrogén és 23-as CH<sub>2</sub>-csoport, -NH- amid nitrogén és 24-es CH<sub>2</sub>-csoport). A nitrogének azonosításához hisztamin-dihidroklorid  $^{15}\text{N}$  HMBC spektrumát vettük fel, mely segített az NH- és NH<sub>2</sub>- típusú nitrogének kémiai eltolódásának meghatározásában.<sup>105</sup>



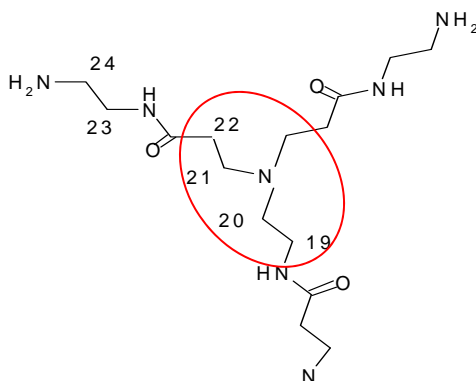
22. ábra: A G5.NH<sub>2</sub> dendrimer  $^{15}\text{N}$  HMBC spektruma (40 mg/ml G5.NH<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O, pH = 10,4,  $T = 298\text{ K}$ , késleltetési idő 60ms).

A térbeli szerkezetet NOESY 2D NMR spektrum (23. ábra/b) segítségével határoztuk meg. A NOESY spektrumon megjelenő dipoláris csatolást jelző keresztcsúcsok a térben egymáshoz közel lévő protonokat jelölik ki. Ez esetben a COSY keresztcsúcsokhoz (23. ábra/a) képest további keresztcsúcsok (piros karikával jelölve) a térben egymáshoz közel lévő 19-

21, 19-22, 20-21 és 20-22-es (vagyis a tercier N-ek körüli) protonok között jeleznek dipoláris csatolást, vagyis térbeli közelséget (24. ábra). Ennek alapján megállapítottuk, hogy a dendrimer belső szerkezetét vizes közegben saját pH-n az  $\text{NH}_2$ -végcsoport jelentősen nem befolyásolja.



23. ábra: G5.NH<sub>2</sub> COSY (a) és NOESY (b) NMR spektruma (10 mg/ml G5.NH<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O, pH=6,41,  $T = 298$  K, NOE keveredési idő 150 ms).

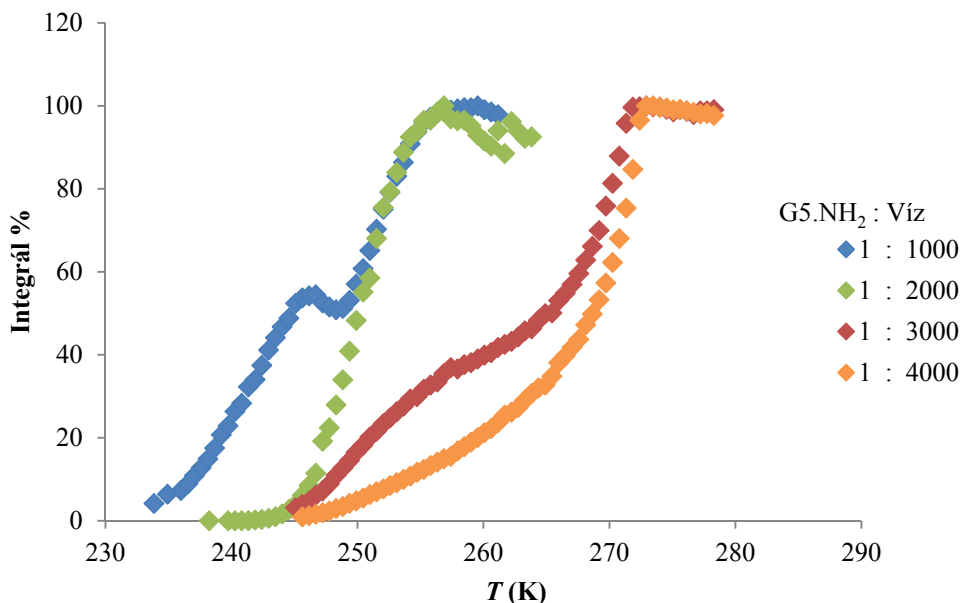


24. ábra: G5.NH<sub>2</sub> dipolárisan csatoló protonjai.

#### 4.1.2 G5.NH<sub>2</sub> dendrimer kölcsönhatása vízmolekulákkal, dendrimer gél pórusainak jellemzése

A PAMAM dendrimer molekulák belső szerkezete molekuladinamikai számítások szerint üregesnek tekinthető.<sup>48</sup> Az üregek létezésének kísérleti igazolása és méretének meghatározása fontos az alkalmazás szempontjából, hiszen az üreges szerkezet révén képesek lehetnek vendégmolekulákat kapszulálni, vagy nanorészecskék szintéziséhez templátot képezni. A dendrimerek belső üregeinek jellemzésére vizsgálták a molekulába bejutó vízmolekulák mennyiségét.<sup>43</sup> Korábban mi is meghatároztuk, hogy egy G5.NH<sub>2</sub> dendrimer molekulával 3700 vízmolekula mozog együtt.<sup>31</sup>

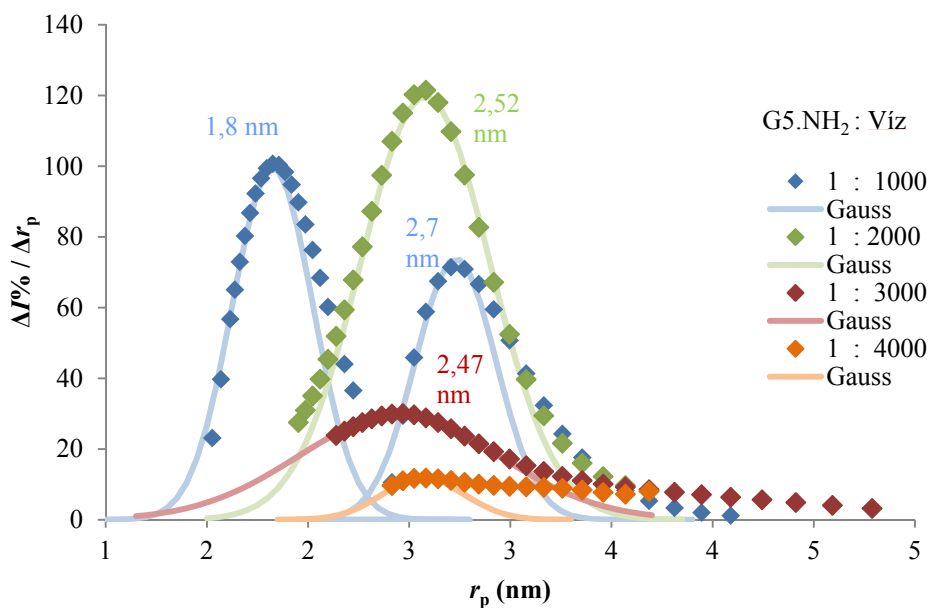
A dendrimer belső szerkezetét és vízmolekulákkal való kölcsönhatását krioporozimetriás módszerrel jellemeztük. Arra próbáltunk választ találni, hogy van-e a dendrimer molekulában olyan hely, amit a vízmolekulák előnyben részesítenek. A liofilizált, szárított G5.NH<sub>2</sub> dendrimerhez növekvő mennyiségben vizet adva dendrimergélt hoztunk létre. A négy különböző víztartalmú minta (1000-4000 mol víz/dendrimer mol) krioporozimetriás mérése során felvett olvadásgörbéket mutatja a 25. ábra.



25. ábra: Különböző víztartalmú dendrimergélek olvadásgörbéi, a vízjel integrál a hőmérséklet függvényében.

Amennyiben 1000 vízmolekula van jelen dendrimer molekulánként, a víz olyan üregekben található a gélben, melyekben az olvadáspont 240 és 252 K körül alakul. A víz mennyiségét növelve (2000 vízmolekula/dendrimer) csak az a víz detektálható, melynek 250 K az olvadáspontja. 3000 vízmolekula esetében emellett az olvadáspont mellett megjelenik még egy olvadáspont 273 K-hez közel, mely azt jelzi, hogy már jelen van egy olyan vízréteg is, amelynek nulla az olvadáspont csökkenése. Még több vizet adagolva (4000 vízmolekula/dendrimer), a gél elveszíti a koherens struktúráját, folyni kezd, és az olvadásgörbékről eltűnnek a pórusokra jellemző jellegzetes olvadáspontok, csak a szabad vizet tudtuk detektálni.

Minden hőmérsékleti értéknél kiszámítottuk a pórusméretet a (6) egyenlet segítségével. A kapott kumulatív pórusméret-eloszlási görbét numerikusan deriváltuk és a 26. ábrán látható differenciális pórusméret-eloszlási görbékhez jutottunk.<sup>103, 106, 107</sup> Az ábrán folyamatos vonal jelöli a legjobban illeszkedő paraméterekkel számolt Gauss-eloszlást.

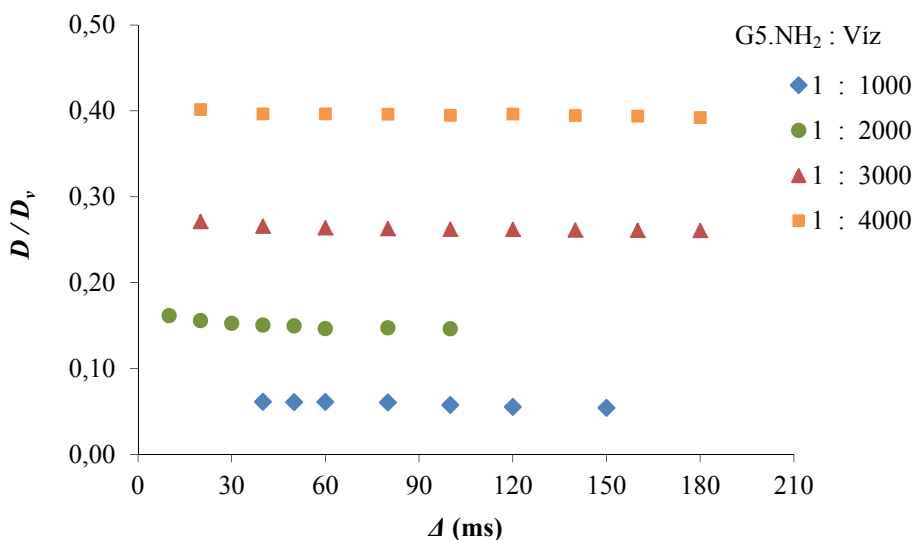


26. ábra: Különböző víztartalmú dendrimergélek differenciális pórusméret-eloszlási görbéi.

A pórusméret-eloszlási görbék alapján, a pórusok alakját gömbnek feltételezve, két jól definiálható pórusméret jellemzi a dendrimergélt (26. ábra). Amennyiben csak 1000 vízmolekula van jelen dendrimer

molekulánként, 1,8 nm és 2,7 nm sugarú pórusok is detektálhatóak. Ha a vízmolekulák száma 2000-re nő, csak 2,5 nm sugarú pórusok találhatók a gélben. 3000 vízmolekula esetén még mindig ez a pórusméret jellemző, de az eloszlás szélesebb. Amennyiben 4000 vízmolekulát adagolunk dendrimer molekulánként, az eloszlás görbe nagyon széles, de még mindig látható egy nem olyan jól definiálható maximum 2,6 nm körül. Ez esetben a makromolekulák körüli folyamatos vízréteg jelenléte jellemző.

A különböző víztartalmú mintákban megmértük az üregekben lévő víz diffúziós együtthatóját szobahőmérsékleten, különböző diffúziós időt alkalmazva. A 27. ábra a pórusban lévő víz relatív, szabad vízhez ( $D = 2,3 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) viszonyított diffúziós együtthatója látható a diffúziós idő függvényében.



27. ábra: A víz diffúziója különböző víztartalmú dendrimergélben a diffúziós idő függvényében.

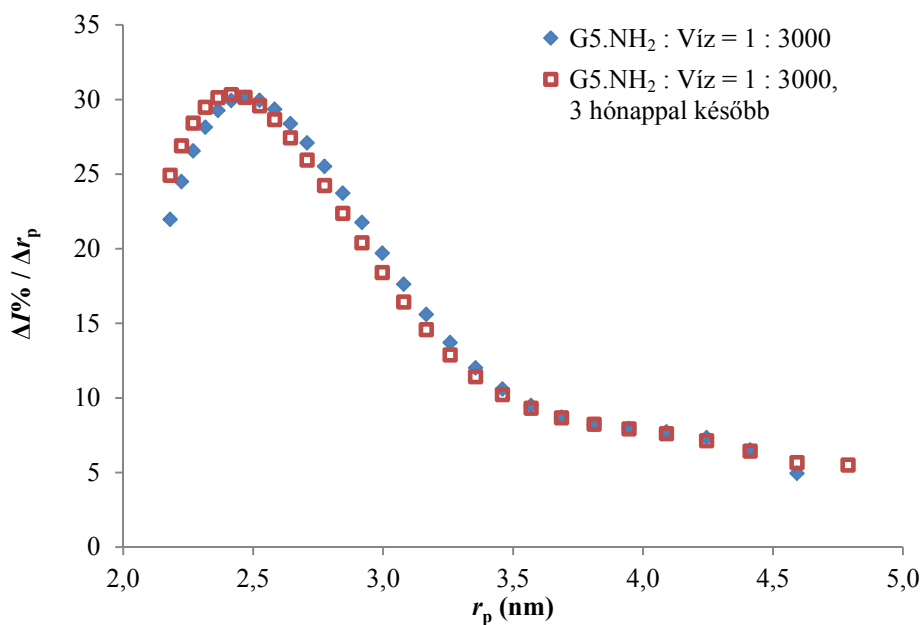
A víz molekulák diffúziós együtthatója növekszik a víz mennyiségével, de legnagyobb koncentrációnál is kisebb a szabad víz diffúziós együtthatójánál, és értéke független a diffúziós időtől. Ez azt jelenti, hogy a rendszer a gátolt diffúziós tartományban van, és a pórus fala átjárható a vízmolekulák számára, vagyis összefüggő a gél pórusrendszere.<sup>108-110</sup> A diffúziós együttható ismeretében, a (8) egyenlettel kiszámítható az az átlagos távolság, amit egy vízmolekula megtesz a dendrimergélben adott időtartam alatt. A mintakészítés és a mérés között eltelt legkevesebb idő 1 hét volt. 1000

víz-molekula/dendrimer aránynál mozognak lelassabban a víz-molekulák ( $D=1,4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ), ebben az esetben a víz-molekulák egy hét alatt megtett átlagos úthossza  $\sim 1 \text{ cm}$ -nek adódik. Ez igazolja azt, hogy a várakozási idő alatt megtörtént a víz diffúziója a dendrimergélbe.

$$\langle x^2 \rangle^{1/2} = (Dt)^{1/2} \quad (8)$$

ahol  $x$  az úthossz (m),  $D$  a diffúziós együttható ( $\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ ),  $t$  az idő (s).

Az előző megállítást és a mérés reprodukálhatóságát igazolja a 28. ábra is. Látható, hogy a 3000 víz-molekula/dendrimer arányú minta pórusméreteloszlása gyakorlatilag nem mutat változást 3 hónap alatt.

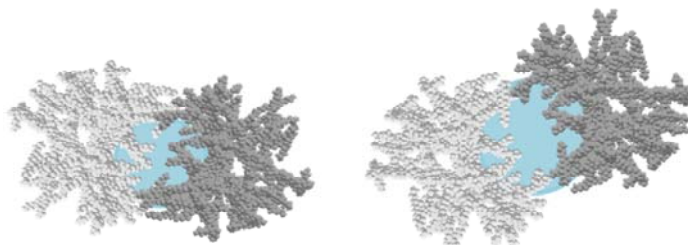


28. ábra: A 3000 víz-molekula/dendrimer arányú minta pórusméreteloszlása a mintakészítést követően és 3 hónap elteltével.

A kriporozimetriás eredmények tehát azt mutatják, hogy a dendrimergélben a víz 3,6 és 5,2-5,6 nm átmérőjű üregekben található. Az 5,2-5,6 nm-es pórus egészen addig megmarad, míg a dendrimer teljesen megtelik vízzel. A 3,6 nm átmérőjű pórusok gömbi térfogata  $24 \text{ nm}^3$ -nek adódik, amely közelíti a Li és munkatársai által megadott 16-21  $\text{nm}^3$  értéket.<sup>43</sup> Az  $\sim 5,4 \text{ nm}$ -es üregek térfogata  $82 \text{ nm}^3$ , amit összevetve az általunk

mért 110-130 nm<sup>3</sup> hidratált dendrimer térfogattal<sup>31</sup>, megállapíthatjuk, hogy az ekkora méretű pórus nem egy molekula belsejében alakul ki.

Azt feltételezzük, hogy legalább két dendrimer molekula fogja közre az üregeket, a 29. ábra szerint. A 4000 vízmolekula/dendrimer arányt elérve a jól definiálható pórusok eltűnnek, mivel a G5.NH<sub>2</sub> molekulák körül összefüggő vízréteg képződik, és az üregbe zárt víz mennyisége ehhez viszonyítva lecsökken. Emiatt úgy feltételezzük, hogy a meghatározott méretű üregek híg oldatban is jelen vannak.



29. ábra: Két G5.NH<sub>2</sub> dendrimer molekula által közrefogott, vízzel telt pórusok.

A 29. ábrán látható modell alapján az 5. generációs PAMAM dendrimerek esetében nem olyan jól definiálható belső üreg, mint nagyobb generációk esetében. Ez igazolja, hogy a közpenerációs dendrimereket nem merev felületű, hanem átjárható szerkezet jellemzi (6. ábra),<sup>30</sup> mely inkább a magban tömörödő (dense-core) modellel jellemezhető. A molekula belsejének elérhetősége teszi lehetővé, hogy ezek a makromolekulák alkalmasak lehetnek kismolekulák, nanorészecskék kapszulázására. A G5.NH<sub>2</sub> esetében azonban Gröhn és munkatársai nem tudtak egyértelműen állást foglalni az arany nanorészecskék kapszulázása mellett.<sup>91</sup> Így az általunk alkotott modell bizonyos esetekben segíthet a dendrimerek templát hatásának értelmezésében.

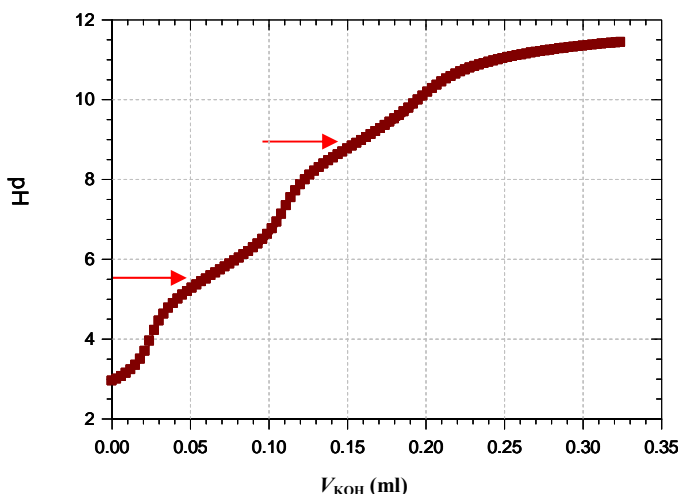
Összességében tehát meghatároztuk a G5 PAMAM dendrimergélben található pórusok méreteloszlását: 1000 vízmolekula/dendrimer aránynál 1,8 és 2,6 nm sugarú pórusokat találtunk; 2000 és 3000 vízmolekula/dendrimer aránynál már csak a nagyobb pórusok vannak jelen. 4000 vízmolekula/dendrimer arány esetén már meghatározó a dendrimer molekulákat körülvevő összefüggő vízréteg. Az eredmény jó egyezést mutat az általunk korábban meghatározott, modelltől függően kb. 3700-as hidratációs számmal. A víz diffúziós együtthatója minden esetben kisebb,



mint a tömbfázisú vize, vagyis a rendszer a gátolt diffúziós tartományban van, a pórusok összefüggőek, faluk átjárható a víz számára. A pórusméretek alapján, figyelembe véve a dendrimer kb. 6 nm-es sugarát, megállapítottuk, hogy a pórusokat a dendrimer molekulák közrefogják.

#### 4.1.3 G5.NH<sub>2</sub> dendrimer kölcsönhatása oxóniumionokkal

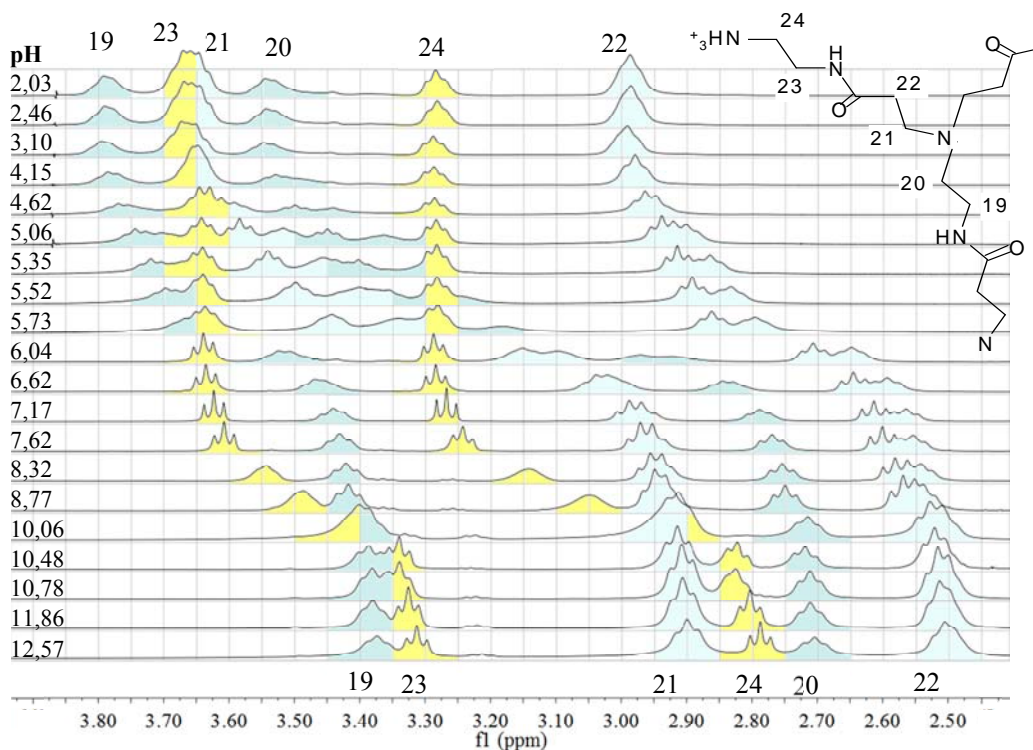
A PAMAM G5.NH<sub>2</sub> dendrimer potenciometriás titrálása során kapott titrálási görbe (30. ábra) illesztésével két csoportállandót tudtunk meghatározni, melyből az egyik a tercier ( $pK_{N(T)}=5,7(2)$ ), a másik a primer N-ek ( $pK_{N(P)}=8,9(2)$ ) protonálódásához rendelhető. Az illesztéssel a protonálódó csoportok száma is megadható: 119 db tercier illetve 123 db primer nitrogént találtunk, azaz a dendrimer gyakorlatilag megfelel a megadott szerkezetnek (teljesen szabályos szerkezet esetén: 126 db tercier és 128 db primer N).



30. ábra: A G5.NH<sub>2</sub> dendrimer titrálási görbéje  
( $c_{\text{KOH}} = 0,2 \text{ M}$ ,  $I = 0,2 \text{ M}$ ,  $T = 298 \text{ K}$ ).

A különböző pH-értékű dendrimeroldatok <sup>1</sup>H NMR spektrumain a protonok csúcsainak kémiai eltolódását vizsgálva a pH függvényében (31. ábra) jól látható, hogy a tercier N-ekhez közeli protonok (19, 20, 21, 22, kék színnel jelölve) illetve a primer N-ekhez közeli protonok (23, 24, sárga színnel jelölve) jelcsoportjai együtt mozognak. Míg a primer nitrogének körüli protonok kémiai eltolódása a pH 8-10 tartományban mutat jelentős

változást, addig a tercier nitrogének körüli protonok jelcsoportjai kisebb pH-tartományban (pH 4-7) „vándorolnak”, és jelkettőződést mutatnak.

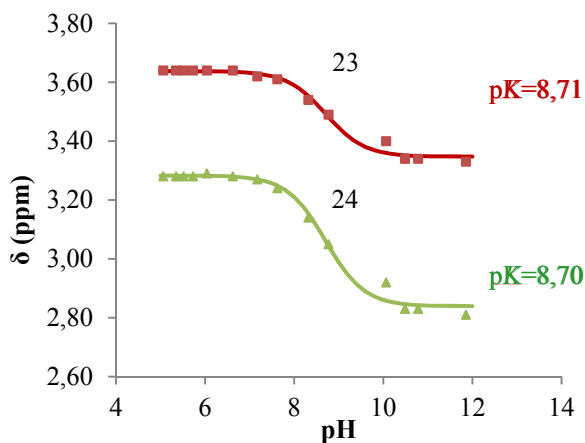


31. ábra: A G5.NH<sub>2</sub> dendrimer <sup>1</sup>H NMR spektruma a pH függvényében (10 mg/ml G5.NH<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O, T = 298 K).

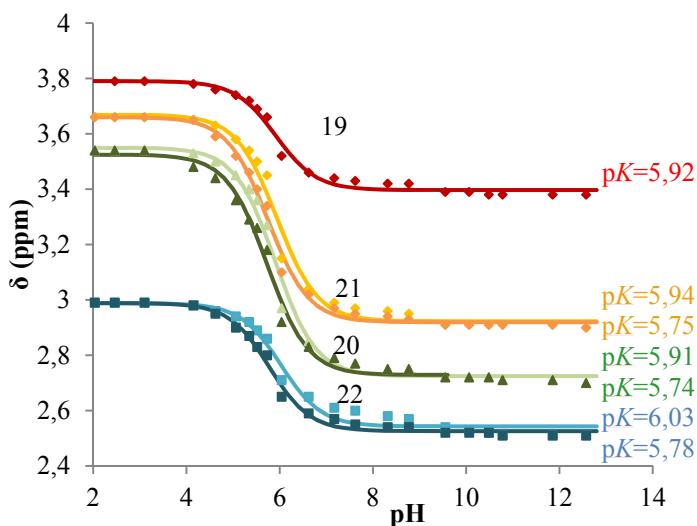
A 23-24 CH<sub>2</sub>-csoportokhoz tartozó csúcsok kémiai eltolódását a pH függvényében ábrázolva titrálási görbéhez hasonló ábrát kapunk (32. ábra), melynek inflexiós pontját illesztéssel számítva a láncvégi primer nitrogének protonálódási állandóját kapjuk. A két görbéből számított érték 8,71 és 8,70, melyek közelítenek a pH-potenciometriás mérésből számított 8,9-es pK-értékhez.

A 19-22 CH<sub>2</sub>-csoportokhoz tartozó csúcsok kémiai eltolódását a pH függvényében ábrázolva a görbe inflexiós pontja a tercier nitrogének pK-értékét adja meg (33. ábra). Ez esetben a megkettőződött csúcsok (20, 21, 22) mindkét tagját figyelembevettük. A 19-es protonokhoz rendelt csúcs jelszélessége megnő a protonálódás pH-tartományában, de megkettőződés nem figyelhető meg. A megkettőződött csúcsok nagyobb kémiai eltolódású

tagjához rendelhető protonok kevésbé árnyékoltak, az ezekhez közeli tercier nitrogének protonálódási állandója nagyobb ( $pK \approx 5,96$ ), vagyis erősebben kötik a protonokat.



32. ábra: A 23-24 CH<sub>2</sub>-jelek kémiai eltolódásának pH-függése (10 mg/ml G5.NH<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O,  $T = 298$  K).



33. ábra: A 19-22 CH<sub>2</sub>-jelek kémiai eltolódásának pH-függése (10 mg/ml G5.NH<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O,  $T = 298$  K).

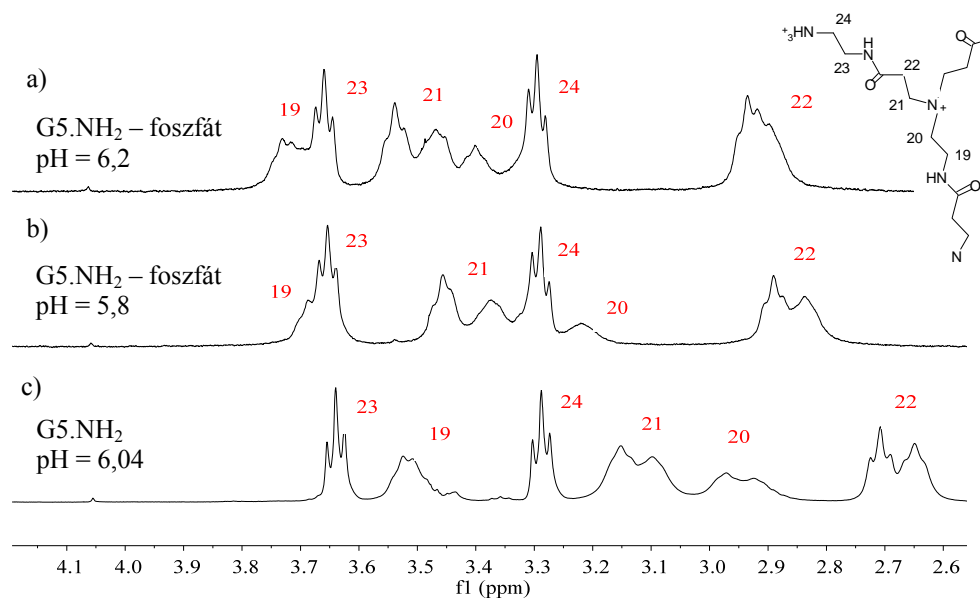
Az NMR titrálás megerősíti, hogy a pH-potenciometriával mért protonálódási állandók közül a  $pK=5,7$  a tercier, míg a  $pK=8,9$  a primer aminocsoportok protonálódásához rendelhető. Felmerül az a kérdés, hogy a protonálódás pH-tartományában megfigyelt kismértékű jelkettőződés mivel magyarázható. Erre a további eredmények tekintetében kapunk majd választ.

## 4.2 NH<sub>2</sub>-végcsoportú G5 PAMAM dendrimer ionokkal, kismolekulákkal való kölcsönhatásának vizsgálata

### 4.2.1 Foszfátionok beépülése a G5.NH<sub>2</sub> dendrimer molekulába

#### *<sup>1</sup>H NMR spektrum változása foszfátionok hatására*

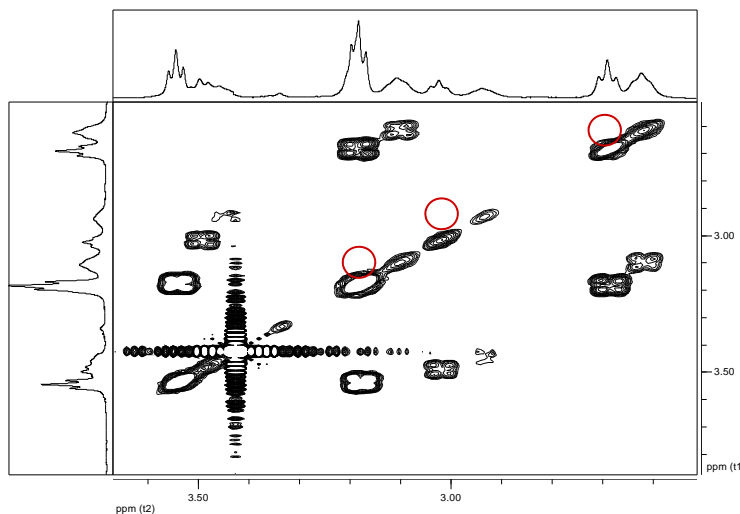
A G5.NH<sub>2</sub> vizes oldatban 6 körüli pH-értéken felvett <sup>1</sup>H NMR spektruma foszfátionok jelenlétében jelentősen módosul (34. ábra). A dendrimer tercier nitrogénje körüli protonok csúcsai (19, 20, 21, 22) nagyobb kémiai eltolódás értékeknél jelentkeznek, mely az adott protonok körüli kisebb mágneses árnyékolást jelenti.



34. ábra: A G5.NH<sub>2</sub> <sup>1</sup>H NMR spektruma foszfát jelenlétében (a, b) és nélküle (c) (10 mg/g G5.NH<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O, c<sub>H<sub>x</sub>PO<sub>4</sub></sub>=0,1 M, PO<sub>4</sub>/N<sub>(T+P)</sub>=1,5, T=298 K).

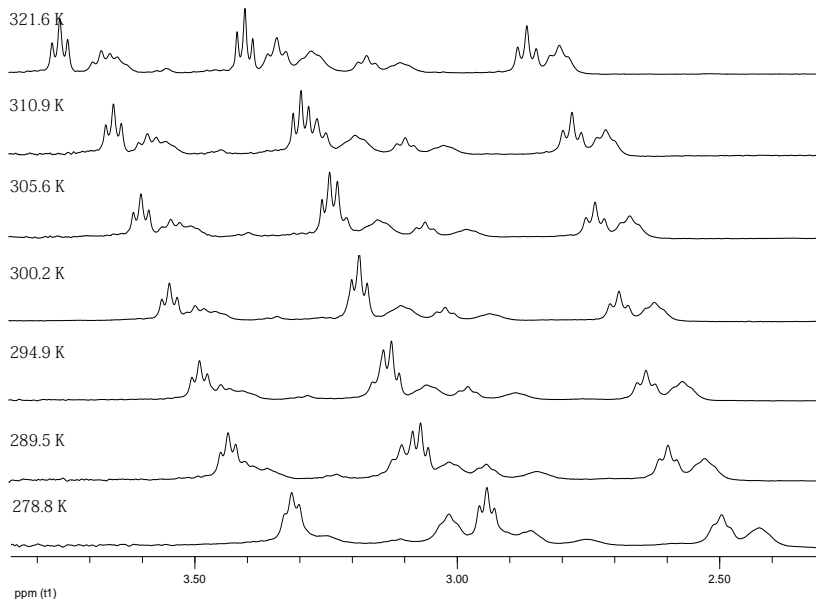
Emellett megfigyelhető, hogy az előzőekben leírt semleges körüli pH-n tapasztalt jelmegkettőződés a foszfátionok jelenlétében jelentősebb. A továbbiakban a nagyobb kémiai eltolódású jelet „a” jelzéssel, a kisebb kémiai eltolódású jelet „b”-vel jelöljük. Kisebb mértékben a 19-es típusú protonok csúcsa is tagolódik, de ez esetben nem tudtunk egyértelműen két külön jelet detektálni.

A jelenség értelmezésére elsőként a foszfát tartalmú dendrimer COSY spektrumát vizsgáltuk meg (35. ábra), de a kettőződött jelek között nem észleltünk keresztcsúcsot, így ezek nem AB dublettek.



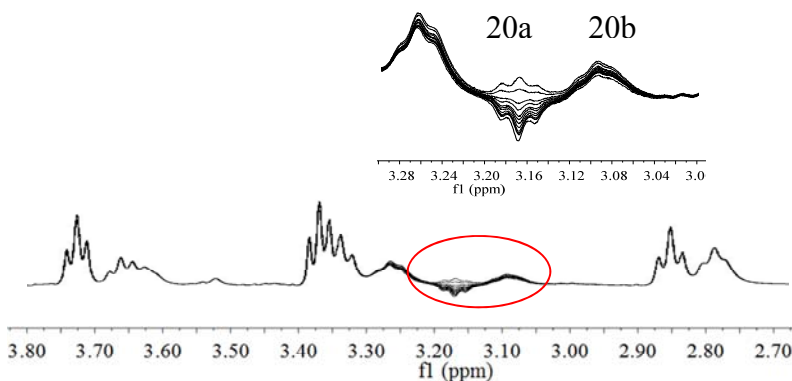
35. ábra: A G5.NH<sub>2</sub> COSY spektruma foszfát jelenlétében (10 mg/g G5.NH<sub>2</sub>, C<sub>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></sub>=0,023M, D<sub>2</sub>O, pH=6,4, T = 298 K).

Másik feltevésünk szerint a csúcsok szétválását kémiai cserefolyamat okozhatja. Ennek igazolására vizsgáltuk a spektrumot hőmérsékletváltozás hatására (36. ábra). A hőmérséklet növelésével a spektrum felbontása javul a kisebb rotációs-korrelációs idő miatt, de a csúcsok jelszélessége és a kettévált csúcsok kémiai eltolódásának különbsége nem változik. A csúcsok kettéválását tehát nem a szabad és a foszfáttal kölcsönhatásban álló tercier nitrogének közeli protonok különbözősége okozza. Megállapítható azonban, hogy a tercier nitrogén – foszfáttal kölcsönhatás a gyors kémiai csere tartományába sorolható, mivel egy jelet látunk a spektrumon.



36. ábra: A G5.NH<sub>2</sub> <sup>1</sup>H NMR spektruma hőmérsékletváltozás hatására foszfát jelenlétében (10 mg/g G5.NH<sub>2</sub>, c<sub>H<sub>x</sub>PO<sub>4</sub></sub> = 0,023 M, D<sub>2</sub>O, pH = 6,4, T = 279-322 K).

A jelek kettőződését nagy valószínűséggel a dendrimer kisebb és nagyobb generációjú helyein lévő protonok kémiai környezetének különbsége okozza. Ezt az elképzelést alátámasztja, hogy szelektív gerjesztéses NMR kísérlet során a kettévált csúcsok egyik tagját gerjesztve a csúcs másik tagja nem reagál a gerjesztésre (37. ábra).



37. ábra: A G5.NH<sub>2</sub> 20-as protonjainak szelektív gerjesztése (10 mg/g G5.NH<sub>2</sub>, c<sub>H<sub>x</sub>PO<sub>4</sub></sub>=0,023 M, D<sub>2</sub>O, pH=6,4, T = 298 K).

A csúcsokhoz tartozó protonok  $T_1$  relaxációs idejét meghatározva kimutatható, hogy a kettévált csúcsok (20, 21, 22) nagyobb kémiai eltolódású „a” tagja gyorsabban relaxál (1. táblázat). Feltételezhető, hogy ezek a protonok a molekula külső részében helyezkednek, a lokális rotációs-korrelációs idejük rövidebb. Ezt alátámasztja az is, hogy a nagyobb kémiai eltolódású jelek felbontása jobb.

1. táblázat: A G5.NH<sub>2</sub> dendrimer protonjainak  $T_1$  relaxációs ideje.

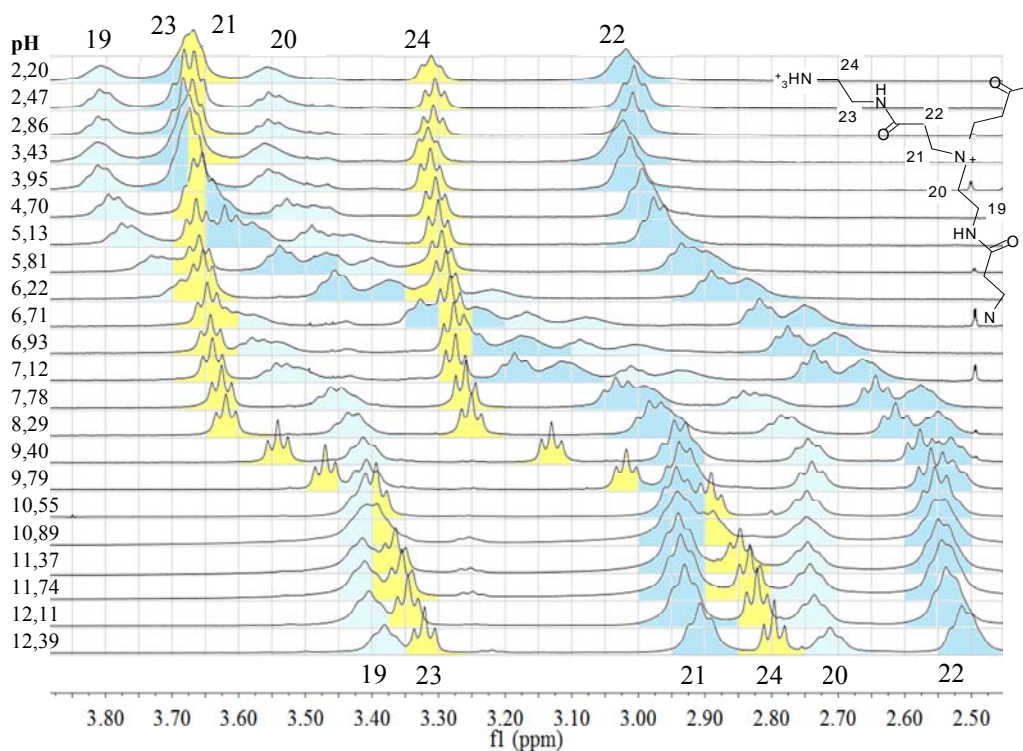
CH <sub>2</sub> -proton	$T_1$ relaxációs idő (s)	
23	0,679	
24	0,687	
19	0,395	
	‘a’	‘b’
22	0,401	0,425
21	0,331	0,391
20	0,335	0,405

### ***További NMR vizsgálatok***

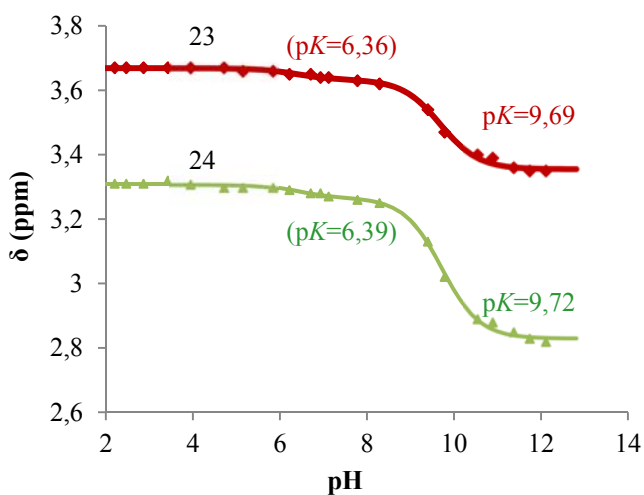
A továbbiakban a pH-változás hatását vizsgáltuk a G5.NH<sub>2</sub> – foszfát rendszerre, mely során az azonos foszfát (0,1 M) és dendrimer (10 mg/ml) koncentrációjú oldatok pH-értékét 2,2-12,4 között változtattuk.

#### *<sup>1</sup>H NMR spektrumok pH-függő változása:*

A különböző pH-értékű foszfátos dendrimeroldatok <sup>1</sup>H NMR spektrumait összehasonlítva megfigyelhető, hogy a dendrimer jellemzése során leírtakhoz hasonlóan, a terciér N-ekhez közeli protonok (19, 20, 21, 22, kék színnel jelölve) illetve a primer N-ekhez közeli protonok (23, 24, sárga színnel jelölve) jelcsoportjai együtt mozognak és különböző pH-tartományban mutat jelentős változást a csúcsok kémiai eltolódása (38. ábra).



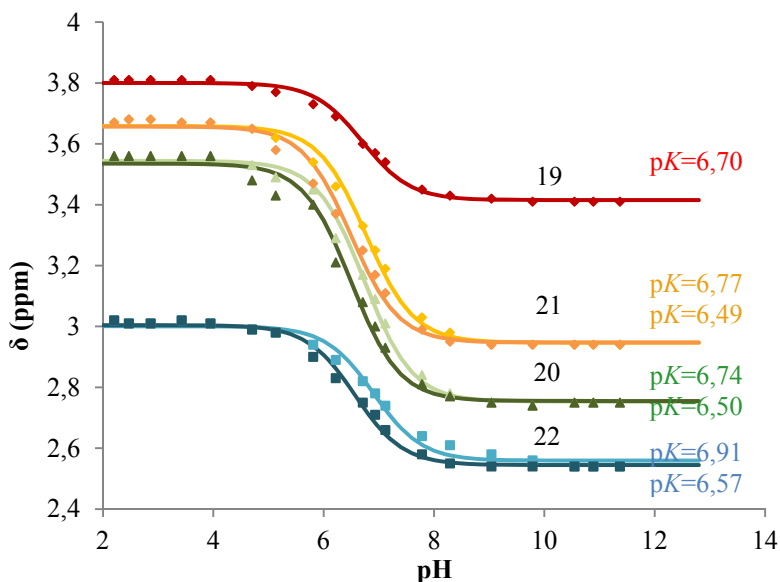
38. ábra: A G5.NH<sub>2</sub>  $^1\text{H}$  NMR spektruma pH-változás hatására foszfát jelenlétében (10 mg/ml G5.NH<sub>2</sub>,  $c_{\text{HXPO}_4} = 0,1 \text{ M}$ ,  $T=298 \text{ K}$ ).



39. ábra: A G5.NH<sub>2</sub> 23-24-es típusú protonjainak kémiai eltolódása a pH függvényében (10 mg/ml G5.NH<sub>2</sub>,  $c_{\text{HXPO}_4} = 0,1 \text{ M}$ ,  $T=298 \text{ K}$ ).



A 39. ábra a láncvégi primer nitrogének melletti 23-24-es típusú protonok pH-függő kémiai eltolódását mutatja. A mért értékek illesztése során kapott csoportállandó a foszfácionok jelenlétében nagyobb, azaz a primer nitrogének erősebben kötik a protonokat. A görbék illesztésekor két  $pK$ -értékkel értük el a legjobb eredményt, a második  $pK$ -értékeket (6,36 és 6,39) a tercier aminocsoportok protonálódásának hatásaként értelmeztük.



40. ábra: A G5.NH<sub>2</sub> 19-22-es típusú protonjainak kémiai eltolódása a pH függvényében (10 mg/ml G5.NH<sub>2</sub>, c<sub>H<sub>x</sub>PO<sub>4</sub></sub> = 0,1 M, T=298 K).

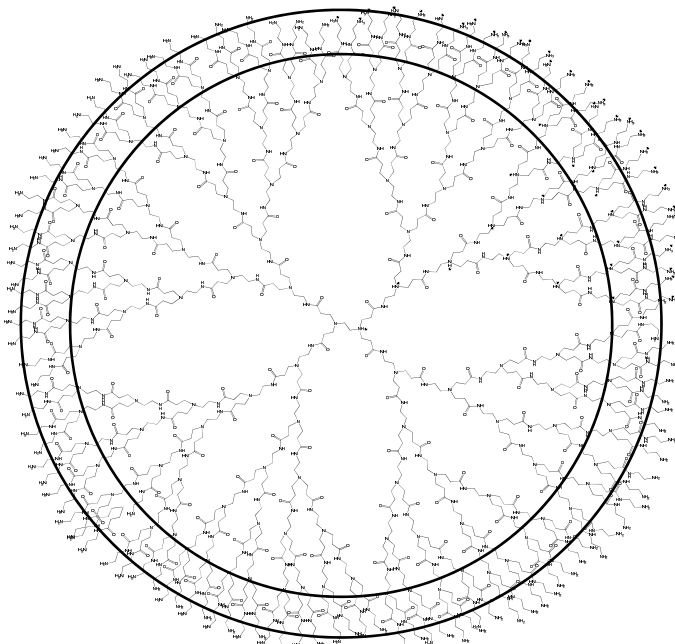
A láncközi tercier nitrogének protonálódása a tercier N körüli CH<sub>2</sub>-csoportokhoz (19-22) tartozó csúcsok eltolódása alapján követhető (40. ábra). A bizonyos pH-tartományban kettéváló csúcsokhoz a görbéket külön-külön illesztve, két  $pK$ -értéket számoltunk. A nagyobb kémiai eltolódású, kevésbé árnyékolt ('a') protonok közeli tercier nitrogén protonálódási állandója átlagosan  $pK \approx 6,75$ , míg a 'b' tag kémia eltolódásainak illesztése  $pK \approx 6,5$ -ös értéket ad. A 2. táblázat szemlélteti a csoportállandók értékét az összes csúcs kémiai eltolódás értékéből számítva foszfát jelenlétében és anélkül. Jól látható, hogy a tercier nitrogének protonálódási állandója is jelentősen nagyobb foszfácionok jelenlétében.

2. táblázat: A primer és tercier aminocsoportokra jellemző protonálódási állandók (10 mg/ml G5.NH<sub>2</sub>, c<sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></sub> = 0,1 M, T=298 K).

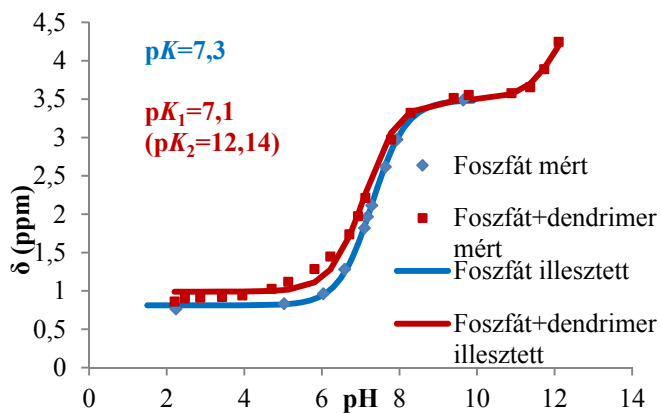
Csúcs	19	20a	20b	21a	21b	22a	22b	23	24
pK foszfáttal	6,70	6,74	6,50	6,77	6,49	6,91	6,57	9,69	9,72
pK foszfát nélkül	5,92	5,91	5,74	5,94	5,75	6,03	5,78	8,71	8,70

Az eddigi eredmények alapján a tercier aminocsoportokhoz közeli protonok NMR jeleinek protonálódás során történő megkettőződését a következő modell alapján értelmeztük. A dendrimer szerkezetét három zónára osztottuk (41. ábra):

- A külső zónát a terminális helyzetben lévő primer aminocsoportok alkotják.
- Az átmeneti zónát az ötödik generáció 19, 20, 21 és 22-es protonjai alkotják. E protonok <sup>1</sup>H NMR jelei a kisebb árnyékoltság miatt nagyobb kémiai eltolódásnál jelentkeznek. A hozzájuk közelebbi tercier aminocsoportok bázicitása is nagyobb (pK ≈ 6,75). A T<sub>1</sub> relaxációjuk rövidebb (T<sub>1</sub> = 0,33-0,4 s), a kisebb korrelációs idő miatt. Proton jeleik felbontása jobb.
- A belső zónát az 1-4 generáció 1-18-as protonjai jelentik, melyek száma megegyezik az átmeneti zóna protonjaiéval. Ezek a protonok kisebb kémiai eltolódású jelet adnak, és a mellettük lévő tercier aminocsoportok pK-értéke is kisebb (pK ≈ 6,5). Relaxációjuk lassabb (T<sub>1</sub> = 0,39-0,43 s) a protonálódási pH-tartományban, mint az átmeneti zóna protonjaié.

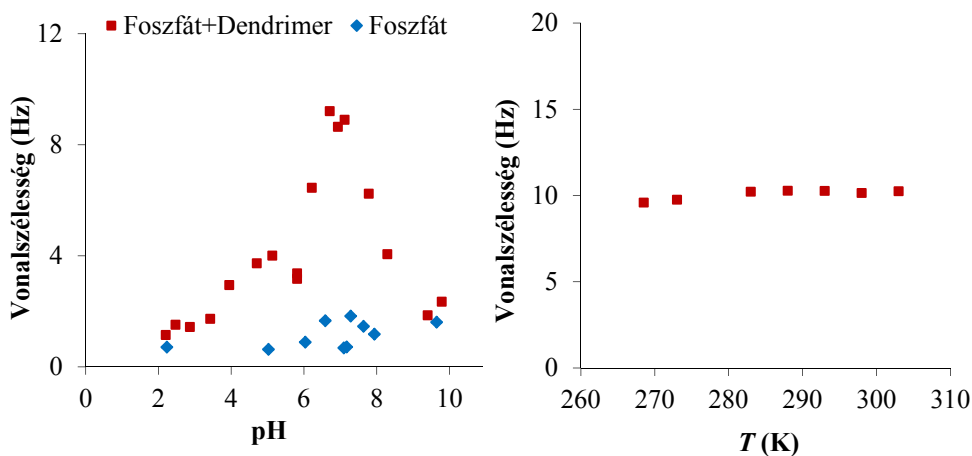
41. ábra: A G5.NH<sub>2</sub> dendrimer 3 zónás szerkezete.*<sup>31</sup>P NMR spektrumok pH-függő változása:*

NMR titrálással, a foszfát <sup>31</sup>P jelének kémiai eltolódását vizsgálva a pH függvényében, a foszfátionok protonálódása is nyomon követhető. A <sup>31</sup>P jel kémiai eltolódása alapján a foszfátionok második pK-ja 7,3 (42. ábra).

42. ábra: A foszfátionok <sup>31</sup>P kémiai eltolódása dendrimer jelenlétében és nélküle a pH függvényében (10 mg/ml G5.NH<sub>2</sub>, c<sub>H<sub>x</sub>PO<sub>4</sub></sub> = 0,1 M, T=298 K).

A 42. ábrán jól látható, hogy dendrimer jelenlétében a 4-7 közötti pH-tartományban rosszul illeszthető görbe a mért pontokra. A legjobb eredménnyel elvégzett illesztésből a  $\text{HPO}_4^{2-}$ -ionok protonálódására 7,1-es pK-érték, míg a  $\text{PO}_4^{3-}$ -ionoknál 12,14-es protonálódási állandó számolható, bár ez utóbbi érték a 12-es pH-érték feletti mérési pontok hiánya miatt igen bizonytalan.

A foszfát  $^{31}\text{P}$ -jelének vonalszélességét vizsgálva a pH függvényében érdekes változást tapasztaltunk. Míg foszfát pufferben a vonalszélesség nem mutat jelentős változást a pH-val (43. ábra), addig a dendrimer jelenlétében egyértelmű maximumot mutat az ábra semleges körüli pH-értéken. Ez arra utal, hogy ebben a pH-tartományban a foszfát speciális kölcsönhatásba lép a dendrimer molekulával. 6,4-es pH-értéknél a vonalszélesedés hőmérsékletfüggést nem mutatott.

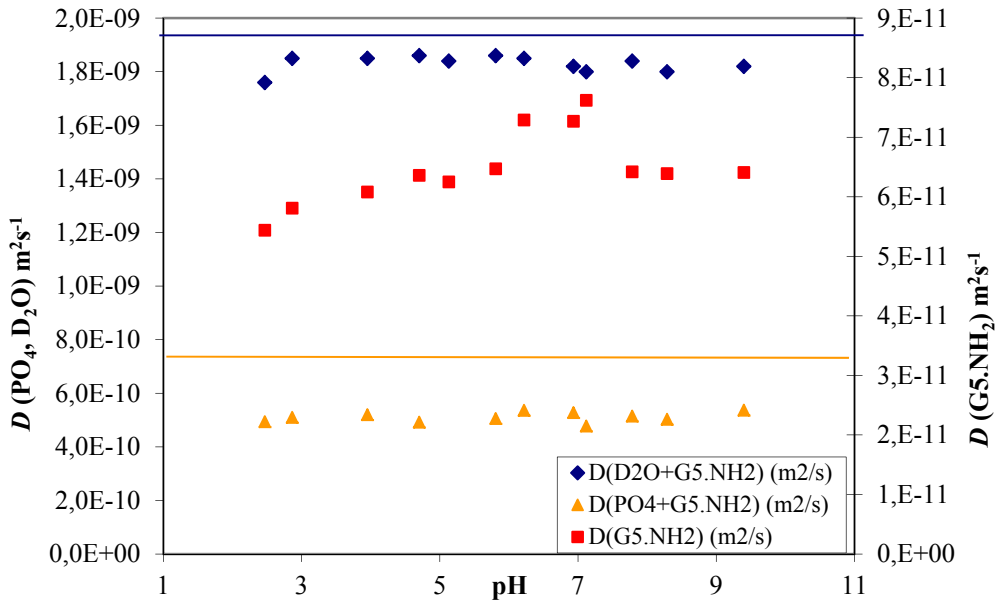


43. ábra: A foszfácionok pH-függő  $^{31}\text{P}$  vonalszélessége a dendrimer jelenlétében és anélkül, illetve a vonalszélesség a hőmérséklet függvényében (10 mg/ml  $\text{G5.NH}_2$ ,  $c_{\text{H}_2\text{PO}_4}=0,1 \text{ M}$ ,  $T=298 \text{ K}$ , illetve  $\text{pH}=6,4$ ,  $T=268-303 \text{ K}$ ).

A vonalszélesedést tehát nem kémiai cserefolyamat okozza, hanem relaxációs folyamat. A dendrimer molekulával kölcsönható foszfácionok (semleges körüli pH-n) lassabban mozognak, így a transzverzális relaxáció felgyorsul, és megnő a vonalszélesség.

### Diffúziós együttható változása a pH-val:

A diffúziómérések eredményét a 44. ábra szemlélteti. Jól látható, hogy a deuterált víz diffúziós együtthatója nem változik jelentősen a tiszta D<sub>2</sub>O-éhoz képest ( $1,93 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  kék vonallal jelölve), mivel a dendrimer koncentrációja kicsi ahhoz, hogy jelentősen gátolja az oldószer diffúzióját.<sup>31</sup>



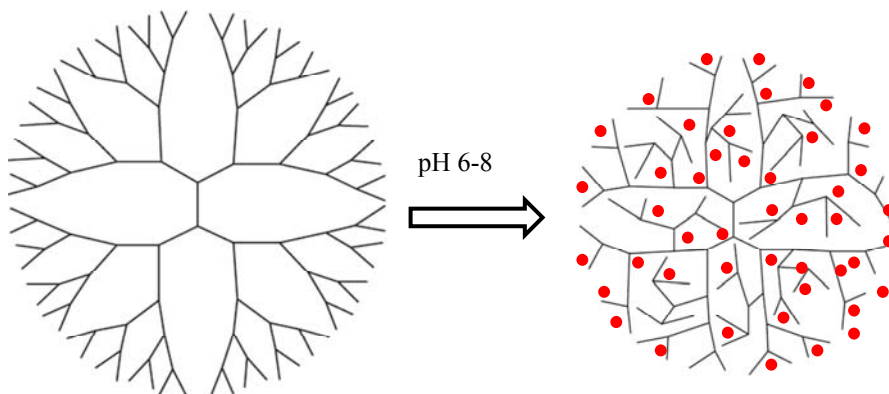
44. ábra: A G5.NH<sub>2</sub> – PO<sub>4</sub> – D<sub>2</sub>O rendszerben mért diffúziós együtthatók a pH függvényében (10 mg/ml G5.NH<sub>2</sub>,  $c_{\text{HXPO}_4} = 0,1 \text{ M}$ ,  $T=298 \text{ K}$ ,  $\Delta_{\text{G5.NH}_2} = 70 \text{ ms}$ ,  $\delta_{\text{G5.NH}_2} = 8 \text{ ms}$ ,  $\Delta_{\text{PO}_4} = 40 \text{ ms}$ ,  $\delta_{\text{PO}_4} = 10 \text{ ms}$ ,  $\Delta_{\text{H}_2\text{O}} = 10 \text{ ms}$ ,  $\delta_{\text{H}_2\text{O}} = 4 \text{ ms}$ ).

A foszfátionok diffúziója nem mutat jelentős eltérést a pH változásával, amely arra utal, hogy a mért pH-tartományban a foszfátionok azonos mennyisége mozog együtt a makromolekulával. A sárga vonallal jelölt szabad foszfát diffúziós együtthatójához képest ( $7\text{-}8 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) dendrimer jelenlétében jelentősen lelassul a foszfát mért diffúziója a dendrimer molekulával együtt mozgó foszfátionok miatt.

A dendrimer diffúziója azonban  $\text{pH} \approx 5,8\text{-}7,8$  között maximumot mutat ( $7,2\text{-}7,6 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ), feltehető, hogy ebben a pH-tartományban foszfát jelenlétében a molekula mérete kisebb. Ez igazolja Blaak és munkatársai állítását, miszerint kétértékű ellenionok csökkentik a dendrimer méretét, leárnyékolják a monomerek töltését.<sup>60</sup>

A foszfát nélküli dendrimer diffúziója ezzel szemben a pH csökkenésével folyamatosan csökken a  $7,5 \times 10^{-11}$  -  $6 \times 10^{-11}$   $\text{m}^2\text{s}^{-1}$  tartományban, ami a savas pH-n protonált aminocsoportok taszítása okozta méretnövekedéssel magyarázható.<sup>31</sup>

Az eddigi eredmények arra utalnak, hogy pH  $\approx$  6-8 tartományban valamilyen speciális kölcsönhatás jön létre a dendrimer és a hidrogénfoszfát-ionok között (45. ábra). pH 6-8 között a foszfátionok feltehetően a dendrimer belsejében találhatóak, ahol a tercier aminocsoportok pozitív töltését kompenzálják és csökkentik az azok közti taszítást. Ezáltal a makromolekula mérete csökken, diffúziós együtthatója pedig nő. A részben protonált tercier aminocsoportok és a  $\text{HPO}_4^{2-}$  illetve  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ -ionok között az elektrosztatikus kölcsönhatás mellett H-kötés is kialakulhat.



45. ábra: Foszfátionok beépülése a G5.NH<sub>2</sub> dendrimerbe (pH = 6-8).

Ebben a pH-tartományban <sup>31</sup>P jelszélesedést is tapasztaltunk, amit a dendrimerben lévő foszfát gyorsabb relaxációja okoz.

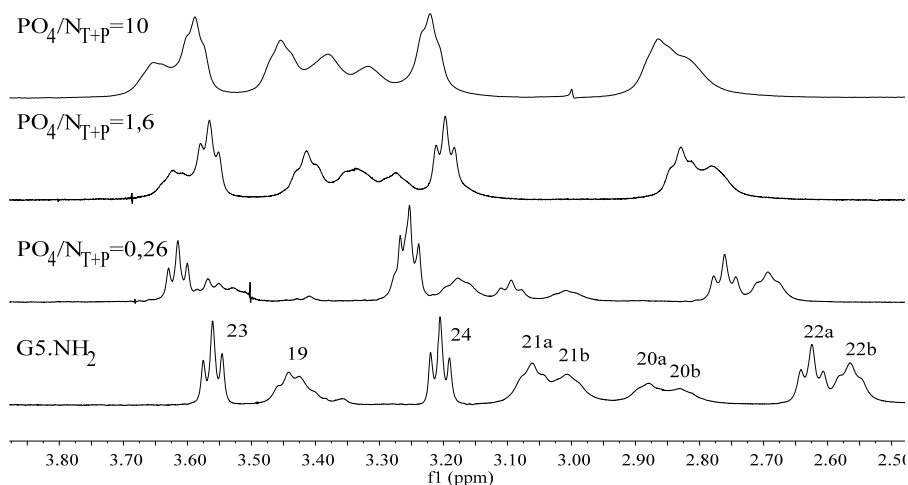
pH 6 alatt és pH 8 felett a foszfátionok együtt mozognak a dendrimerrel, de kívül helyezkednek el, hiszen a dendrimer diffúziója, mérete nem mutat jelentős eltérést, a foszfátionok diffúziója pedig itt is lassabb a szabad foszfáténál. Feltehetően egy gyengébb elektrosztatikus kölcsönhatás lép fel a  $\text{HPO}_4^{2-}$ -ionok és a részben protonált primer aminocsoportok (lúgos közeg), valamint a  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  és a dendrimer protonált csoportjai között (savas közeg).

A pH  $\approx$  6-8 közti kölcsönhatás további vizsgálatára ebben a pH-tartományban folytattunk vizsgálatokat.

### Kölcsönhatások semleges közegben

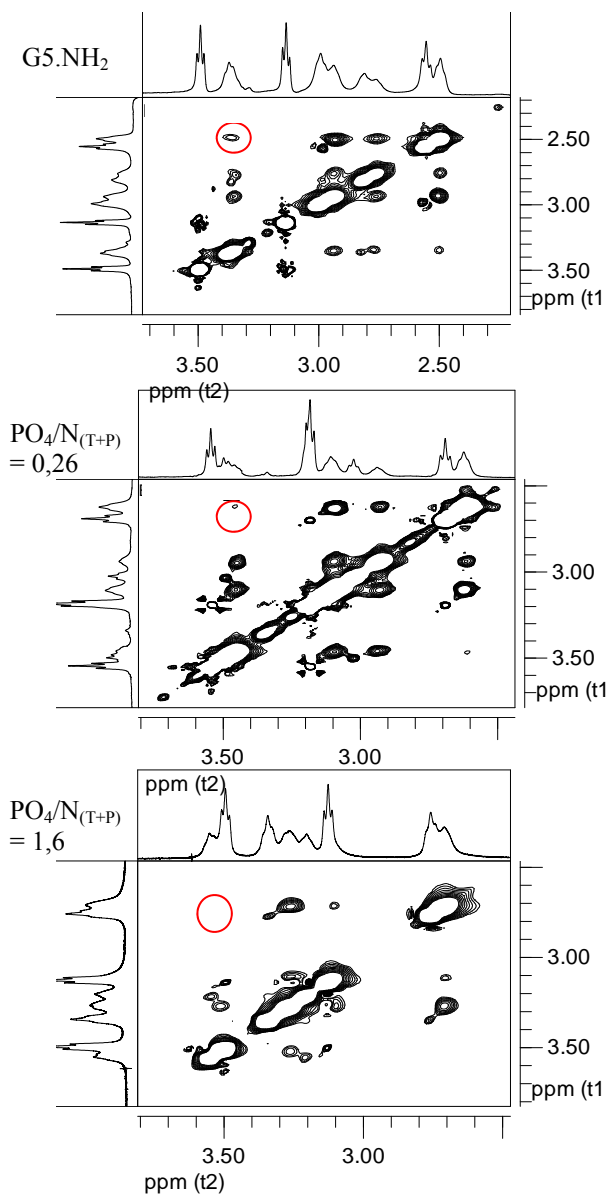
A PAMAM G5.NH<sub>2</sub> dendrimer foszfátionokkal való kölcsönhatását vizsgálva a legelső tapasztalatunk az volt, hogy a dendrimer <sup>1</sup>H NMR spektruma foszfátionok hozzáadására megváltozik. Mivel a további kísérletek azt mutatták, hogy a kölcsönhatás az 6-8 pH-tartományban a legerősebb, így a továbbiakban a foszfátion koncentrációjának hatását a dendrimer szerkezetére és a kölcsönhatás jellegére, ~6,4-es pH-értéken vizsgáltuk. A dihidrogén-foszfátionok koncentrációját úgy választottuk meg, hogy a mintában a foszfor illetve a dendrimerben lévő tercier (N<sub>(T)</sub>) és primer (N<sub>(P)</sub>) nitrogének aránya (PO<sub>4</sub>/N<sub>(T+P)</sub>) 0,26, 1,6 és 10 legyen.

Az így módon elkészített minták <sup>1</sup>H NMR spektrumát a 46. ábra szemlélteti. A foszfátmentes dendrimer proton spektrumához képest a tercier nitrogén körüli protonok (19, 20, 21, 22) csúcsainak kémiai eltolódása megnő, míg a primer nitrogénekhez közeli protonok csúcsai közel azonos kémiai eltolódásnál detektálhatók.



46. ábra: A G5.NH<sub>2</sub> <sup>1</sup>H NMR spektruma növekvő foszfátkoncentrációnál (10 mg/ml G5.NH<sub>2</sub>, c<sub>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></sub>=0,02; 0,14 ; 0,9 M, PO<sub>4</sub>/N<sub>(T+P)</sub>= 0,26; 1,6 ; 10, pH = 6,4, T = 298 K).

A legnagyobb foszfátkoncentrációnál felvett spektrumon a változás kisebb mértékű, feltehetően annak köszönhetően, hogy a túl nagy foszfátion felesleg már nem befolyásolja jelentősen a makromolekula szerkezetét, viszont az ionerősség jelentősen változik. Ez esetben a jelek tagoltsága kisebb, mely gyorsabb relaxációra utal. Ennek pontos okát még nem találtuk meg.



47. ábra: A G5.NH<sub>2</sub> NOESY spektruma növekvő foszfátkoncentrációnál (10 mg/ml G5.NH<sub>2</sub>, c<sub>H<sub>x</sub>PO<sub>4</sub></sub>=0,02 és 0,14 M, pH=6,4, keveredési idő 150 ms).

Előfordulhat, hogy a nagy ionkoncentráció miatt a végcsoportok visszahajlanak a molekula belsejébe és ezáltal magban tömörödő (dense-core) szerkezet alakul ki.<sup>25</sup> A tömörebb szerkezet miatt pedig megnő a csoportok rotációs-korrelációs ideje.<sup>26</sup>



A dendrimer térbeli szerkezetében bekövetkező változásokat a foszfátion-koncentráció növekedésével NOESY NMR mérések segítségével vizsgáltuk (47. ábra). Látható, hogy a 19-22-es típusú protonok közti keresztesűcs intenzitása foszfátion hozzáadására csökken, majd nagyobb foszfátion-koncentrációnál el is tűnik. Növekvő mennyiségű foszfát hatására tehát a tercier N-hez közeli protonok kissé távolabb kerülnek egymástól, vagyis a dendrimer belső szerkezete tágul.

A NOE keresztesűcsök felépülésének sebessége a korrelációban lévő protonok távolságáról adna információt. Ezek a vizsgálatok azonban nem jártak sikerrel.

Az eredmények tehát arra engednek következtetni, hogy a foszfátionok semleges közegben a tercier nitrogénekhez kötődnek specifikusan.

A 3. táblázatban a diffúziómérések eredményeit foglaltam össze. A dendrimer diffúziós együtthatója a foszfátionkoncentráció növelésével kismértékű növekedést mutat, vagyis a  $\text{HPO}_4^{2-}$ -ionok hatására mérete kissé csökken.

3. táblázat: A  $\text{G5.NH}_2 - \text{PO}_4 - \text{D}_2\text{O}$  rendszerben mért diffúziós együtthatók különböző foszfátionkoncentráció esetén (10 mg/ml  $\text{G5.NH}_2$ ,  $c_{\text{HxPO}_4} = 0,02$  és  $0,14$  M,  $\text{PO}_4/\text{N}_{(\text{T}+\text{P})} = 0,26$  és  $1,6$ ,  $\text{pH} = 6,4$ ,  $T = 298$  K).

<b>pH = 6,4</b>	<b><math>D(\text{G5.NH}_2)</math> (<math>\text{m}^2/\text{s}</math>)</b>	<b><math>D(\text{D}_2\text{O})</math> (<math>\text{m}^2/\text{s}</math>)</b>	<b><math>D(\text{HPO}_4^{2-})</math> (<math>\text{m}^2/\text{s}</math>)</b>	<b><math>\text{HPO}_4^{2-}</math> együtt mozog a dendrimerrel</b>
<b>„Szabad” részecske vizes oldatban</b>	$5,72 \times 10^{-11}$	$1,93 \times 10^{-9}$	$7,92 \times 10^{-10}$	-
<b>Dendrimer + foszfát vizes oldatban <math>\text{PO}_4/\text{N}_{(\text{T}+\text{P})} = 0,26</math></b>	$6,57 \times 10^{-11}$	$2,06 \times 10^{-9}$	$4,08 \times 10^{-10}$	52,26% 35 db
<b>Dendrimer + foszfát vizes oldatban <math>\text{PO}_4/\text{N}_{(\text{T}+\text{P})} = 1,6</math></b>	$6,83 \times 10^{-11}$	$1,87 \times 10^{-9}$	$5,34 \times 10^{-10}$	36% 145 db

A víz diffúziós értéke nem mutat szignifikáns eltérést. A szabad foszfáthoz képest  $D_{\text{HPO}_4^{2-}}$  értéke jelentősen lecsökken a dendrimer mellett, mely azzal magyarázható, hogy a  $\text{HPO}_4^{2-}$ -ionok egy része a

makromolekulával együtt mozog. Az alábbi számítással (9) megadható a diffúziós együtthatókból a dendrimerben együtt mozgó foszfátionok százalékos mennyisége.

$$D_{mért} = x_{DPO_4} D_D + x_{PO_4} D_{PO_4} \quad (9)$$

ahol  $D_{mért}$  a foszfátion diffúziós együtthatója dendrimer jelenlétében,  $x_{DPO_4}$  a foszfát móltörtje a dendrimerben,  $D_D$  a dendrimer diffúziós együtthatója,  $x_{PO_4}$  a szabad foszfát móltörtje míg  $D_{PO_4}$  a szabad foszfát diffúziós együtthatója.

Kisebb foszfátkoncentrációnál ( $PO_4/N_{(T+P)} = 0,26$ ,  $c = 0,02$  M) 52,26 %-nak, míg nagyobb koncentrációnál ( $PO_4/N_{(T+P)} = 1,6$ ,  $c = 0,14$  M) 36%-nak adódott a dendrimer belsejében lévő  $HPO_4^{2-}$ -ionok százalékos mennyisége, mely 35 illetve 145 db foszfátionnak (ill.  $H_2PO_4^-$ -nak) feleltethető meg dendrimer molekulánként. Ez azt jelenti, hogy 1,6-szoros foszfátfelesleg már telíti a dendrimer foszfátionokkal.

A foszfátionok helyének megállapítására a dendrimer molekula belsejében, további NMR vizsgálatokat végeztünk. A 2D HOESY kísérlet a különböző magok közötti mag Overhauser effektuson alapszik, így képes a térben közel lévő  $^{31}P$  és  $^1H$  magok közötti korreláció kimutatására. A nagyobb foszfáttartalmú (0,14 M) mintán végeztünk HOESY méréseket különböző keveredési időkkel ( $d8 = 0,5-2$  s), a spektrumok kiértékelése során azonban a  $^{31}P$  jel csak a víz  $^1H$  jelével adott egyértelmű keresztcsúcsot.

A szaturáció transzfer differencia (STD) kísérlet során a dendrimer protonjeleit besugárzását követően a telítés spindiffúzióval áterjed az egész molekulára és a vele kölcsönhatásban lévő foszfátionokra. A kötött és az oldatban lévő szabad foszfát közötti cserefolyamat következtében a foszfát jelének intenzitása lecsökken. Ezt a jelet egy távoli frekvencián történő besugárzásnál felvett referencia spektrumhoz hasonlítjuk. Három különböző pH-n ( $pH = 10,6; 6,5; 2,7$ ), kétféle foszfát/dendrimer aránynál ( $PO_4/N_{(T+P)} = 1,6; 10$ ) és többféle beállítással (loop counter) végeztünk kísérleteket, de reprodukálható eredményt nem sikerült elérni. Ennek oka az STD mérés sajátágaiban keresendő. Célszerű nagy ligandumfelesleg mellett végezni a kísérletet. A telítésátvitel akkor sikeres, ha a kötött és szabad ligandum közötti cserefolyamat megfelelő sebességű. Ha erősen kötődik a ligandum, vagyis lassú a csere, akkor a relaxáció végbemegy a telítésátvitel előtt. Ha túl gyors a csere (gyenge a kötés), akkor nem megy végbe a telítésátvitel megfelelő mértékben. Feltehetően az általunk vizsgált rendszer e feltételek

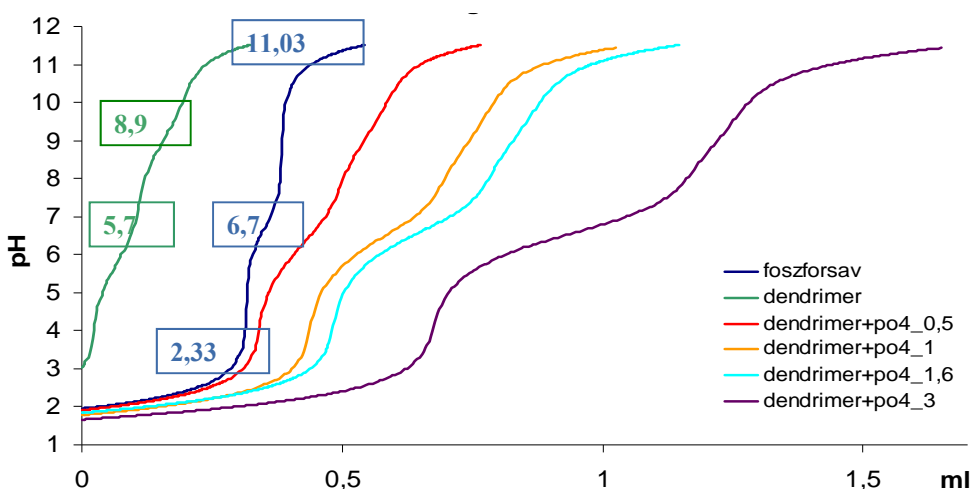
valamelyikének nem felelt meg. Bár ismereteink szerint más kutatócsoportok sem jártak sikerrel a  $^{31}\text{P}$ - $^1\text{H}$  STD-vel,<sup>111</sup> tervezzük a kísérletek folytatását, és egy alkalmas impulzusprogram kidolgozását.

A foszfátkoncentráció-függés során tehát azt tapasztaltuk, hogy a koncentráció növelésével egyre kisebb a dendrimer mérete a belső protonált csoportok közti taszítás csökkenése miatt, míg a tercier aminok környezetében távolodnak a dendrimer ágai. A  $\text{PO}_4/\text{N}_{(\text{T}+\text{P})}=1,6$  ( $c_{(\text{PO}_4)}=0,14$  M) aránynál a dendrimer feltöltődik foszfáttal. Ezek az eredmények alátámasztják, hogy a foszfáttal a tercier aminocsoportokkal kerülnek specifikus kölcsönhatásba.

### **pH-potenciometriás eredmények**

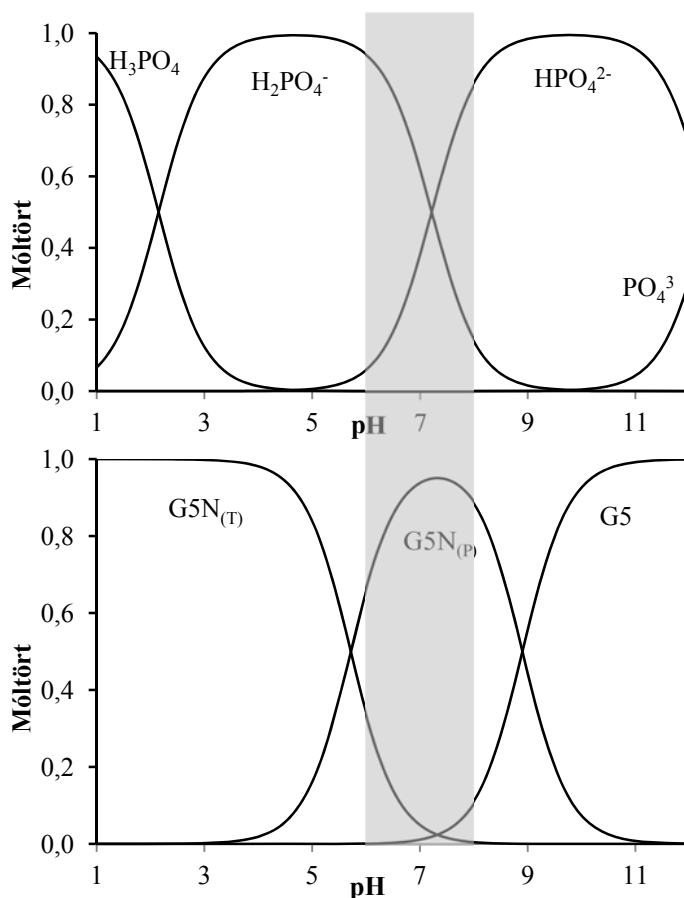
Az NMR mérések alapján feltételezett kölcsönhatás további jellemzésére pH-potenciometriás méréseket végeztünk. A korábbi mintákkal részben azonos foszfát-koncentrációjú mintákat titrálva a görbék kiértékelése során minden esetben a tercier aminocsoportok értékei mutattak jelentős eltérést.

A titrálási görbéket a 48. ábra szemlélteti összesítve. A foszforsav és G5.NH<sub>2</sub> dendrimer titrálása során számított csoport állandókat feltüntettem az ábrán.



48. ábra: A foszforsav és a különböző foszfáttartalmú G5.NH<sub>2</sub> dendrimer titrálási görbéi (0,2 M KOH,  $I = 0,2$  M KCl,  $T = 298$  K).

A 49. ábra a G5.NH<sub>2</sub> dendrimer és a foszfát eloszlási görbéjét mutatja külön rendszerként. A specifikus kölcsönhatás pH tartományában (pH = 6-8) a tercier aminocsoportok nagy része deprotonált, míg a primer aminocsoportok gyakorlatilag teljes mennyiségben protonált állapotban vannak.

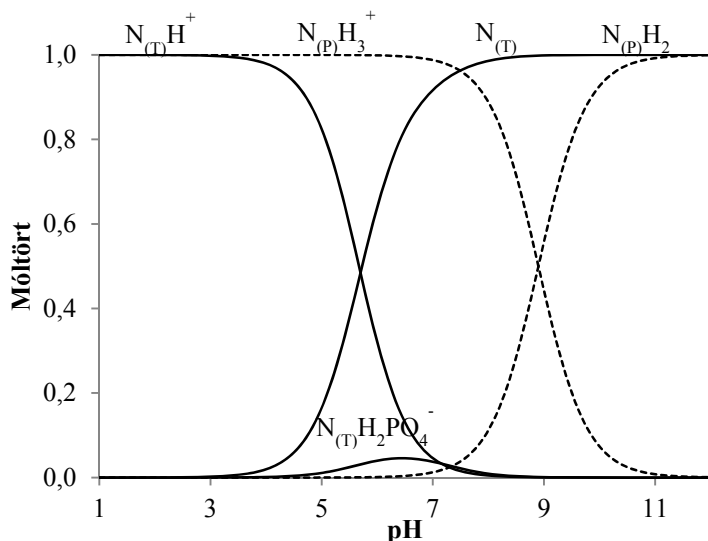


49. ábra: A G5.NH<sub>2</sub> dendrimer és a foszfátion protonálódása. A G5N<sub>(P)</sub> a primer aminocsoportok, míg a G5N<sub>(T)</sub> a tercier aminocsoportok protonálódását jelzi.

A különböző PO<sub>4</sub>/N<sub>(T+P)</sub> aránnyal (0,5, 1, 1,67, 3) elkészített minták titrálási görbéinek kiértékelése során, minden esetben arra az eredményre jutottunk, hogy a kiindulási részecskéket (a különböző mértékben protonált PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, valamint a tercier és primer N-ek) feltételezve a rendszerben, azok log $\beta$  és mennyiségi értékeit számítva az illesztés során, a tercier N értékei mutattak jelentős eltérést. Ez az NMR mérésekkel egybevágóan arra enged

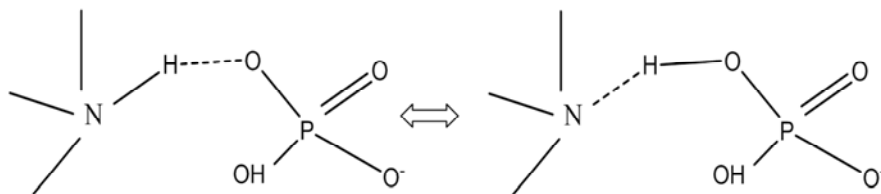
következtetni, hogy a foszfátionok jelenléte a tercier N-ek protonálódását befolyásolja jelentős mértékben.

Amennyiben egy  $\text{NH}_2\text{PO}_4$  összetételű részecske jelenlétét feltételezzük, amely tehát nagy valószínűséggel  $\text{N}_{(\text{T})}\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , úgy a mért görbék jól illeszthetők 19,0-19,6-os  $\log\beta$  értékkel. A részecske maximális mennyisége azonban mindössze 5,8-7,8% (10%-tól szokás szignifikánsnak tekinteni a részecske jelenlétét). Az 50. ábra a dendrimer tartalmú részecskék eloszlását mutatja az új részecske figyelembevételével.



50. ábra: A dendrimer tartalmú részecskék eloszlása a pH függvényében,  $\text{PO}_4/\text{N}_{(\text{T}+\text{P})} = 3$  aránynál.

Az új részecskét pH-tól függően egy protonálódott  $\text{N}_{(\text{T})}$  és egy  $\text{HPO}_4^{2-}$ -ion, vagy egy deprotonálódott  $\text{N}_{(\text{T})}$  és egy  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ -ion alkotja, melyek hidrogénkötésen keresztül kapcsolódnak (51. ábra). Így bizonyosan állíthatjuk, hogy az NMR mérések során, 6-8 pH-tartományban tapasztalt jelenségek ennek a kölcsönhatásnak köszönhetőek.



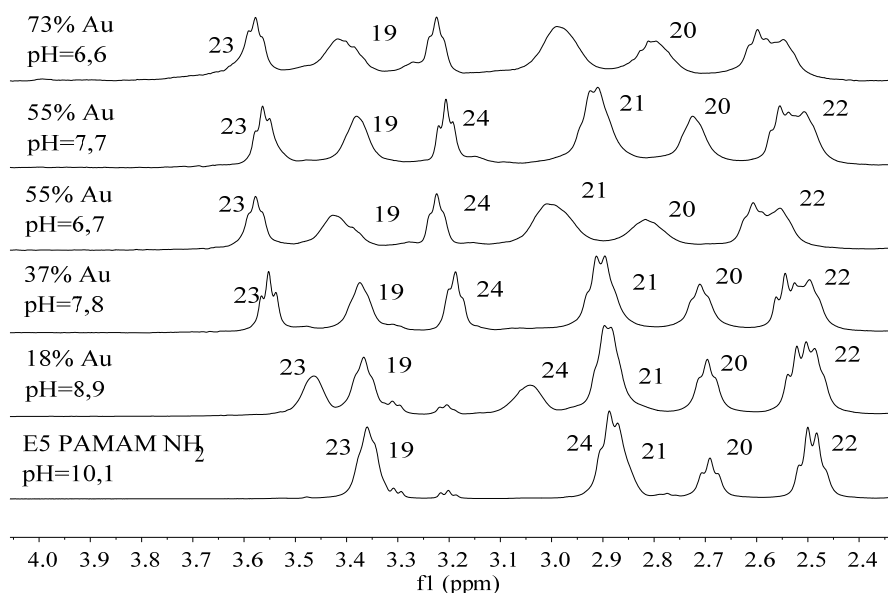
51. ábra: A foszfátionok és a tercier aminocsoportok lehetséges kapcsolódása.

## **4.2.2 G5.NH<sub>2</sub> dendrimer ionpár képzése Au<sup>III</sup>-ionokkal**

Az utóbbi időben intenzíven kutatják a PAMAM dendrimerekkel stabilizált arany nanorészecskéket<sup>36, 38, 39</sup>, melyek például röntgen kontrasztanyagként vagy génátvitelre alkalmazhatók<sup>87, 89, 94</sup>. A dendrimer által kapszulázott arany nanorészecskék (DEN) szintézise során az első lépésnek a fémionok és a dendrimer belsejében található tercier aminok közti komplexképződést tételezik fel.<sup>40</sup> Az ötödik generációs PAMAM dendrimerek (G5.NH<sub>2</sub>) esetében azonban a stabilizálás módja sem egyértelmű az irodalom szerint.<sup>91</sup>

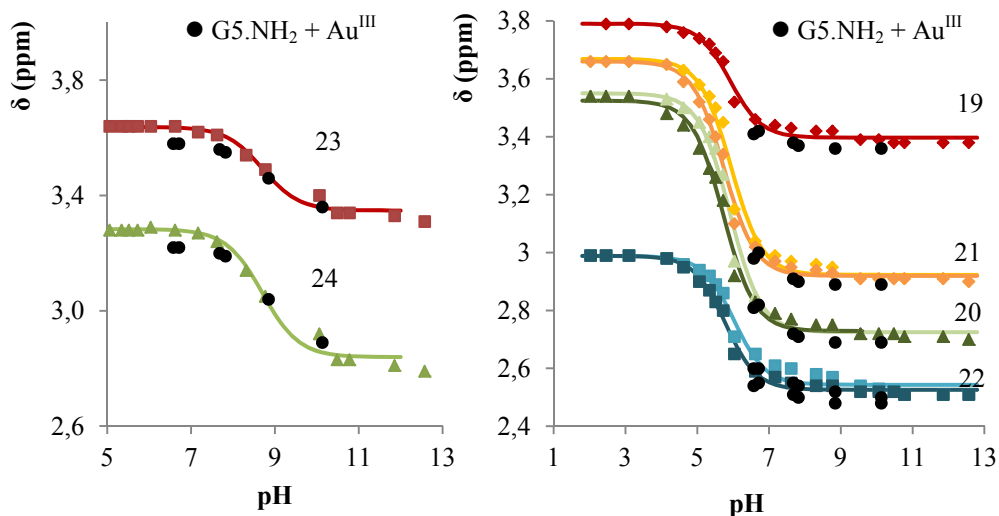
Az arany – dendrimer nanorészecskék szintézisét mi is elvégeztük a következő módon (*l.* 3.2.1 fejezet). A dendrimer molekulákhoz Au<sup>III</sup>-ionokat adtunk, majd az ionokat redukáltuk NaBH<sub>4</sub>-del. A kialakuló arany nanorészecskék (AuNP) és hibrid részecskék (AuNP és dendrimer) szerkezetére és méretére minden bizonnyal hatással van az arany(III)ionok és a dendrimer molekulák közötti kölcsönhatás. Így a hibrid részecske precízebb jellemzése érdekében vizsgáltuk a szintézis első lépését, az Au<sup>III</sup>-ionok (a reakció körülményei között [AuCl<sub>x</sub>(OH)<sub>4-x</sub>]<sup>-</sup>-ionok)<sup>112</sup> kölcsönhatását a G5.NH<sub>2</sub> molekulákkal.

Az Au<sup>III</sup>-ionok növekvő koncentrációja mellett felvettük a G5.NH<sub>2</sub> dendrimer <sup>1</sup>H NMR spektrumát, mely az 52. ábrán látható. Az Au<sup>III</sup> mennyiségét a dendrimer terminális aminocsoportjainak százalékában adtuk meg. A HAuCl<sub>4</sub> csökkenti a közeg pH-ját, és mint korábban láthattuk, a dendrimer protonálódása során a jelek kémiai eltolódása bizonyos pH-tartományokban jelentősen megváltozik, ami könnyen az Au<sup>III</sup> jelenlétének tulajdonítható. A kísérlet során, a pH hatását is igazolva, az 55% Au<sup>III</sup>-iont tartalmazó oldatot (pH = 6,4) visszalúgosítottuk (pH = 7,4), és a 37%-os oldattal (pH = 7,5) közel azonos spektrumot kaptunk.



52. ábra: G5.NH<sub>2</sub> dendrimer  $^1\text{H}$  NMR spektruma arany(III)ionok jelenlétében (24 mg/ml G5.NH<sub>2</sub>, Au<sup>III</sup>/N<sub>(T+P)</sub>=0,18-0,73, pH = 10,1-6,6,  $T = 298$  K).

Megvizsgáltuk az Au<sup>III</sup> hatását a protonjelek kémiai eltolódására a pH függvényében (53. ábra). A 23-as és 24-es CH<sub>2</sub>-csoportok protonjai semleges közeli pH-n kisebb kémiai eltolódást mutatnak. Ebben a pH-tartományban a G5.NH<sub>2</sub> terminális aminocsoportjai protonáltak, számos pozitív töltést adva a molekulának. A jelek kémiai eltolódásának csökkenése az arany(III)ionok hatására nagyobb árnyékoltságot jelez, amit az [AuCl<sub>x</sub>(OH)<sub>4-x</sub>]<sup>-</sup> anionok és a dendrimer NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-végcsoportjai közötti ionpárképződéssel magyaráztunk. A kölcsönhatás során az -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-ről a protonok az [AuCl<sub>x</sub>(OH)<sub>4-x</sub>]<sup>-</sup> irányába mozdulnak, így növelve az NH<sub>3</sub><sup>+</sup> melletti CH<sub>2</sub>-csoportok árnyékoltságát. A 19-22-es CH<sub>2</sub>-csoportok kémiai eltolódása kevésbé változik az Au<sup>III</sup>-ionok jelenlétében. Ez is ionpár képződésre utal, mivel a terciér aminocsoportoknak csak egy része protonált pH = 6 felett (pK = 5,7). Hozzánk hasonlóan Antonietti és munkatársai sem tapasztaltak klasszikus donor-akceptor kölcsönhatást, azaz klasszikus értelemben vett komplexképződést az Au<sup>III</sup> és polimer molekulák között a tetrakloro-aurátionok redukációját megelőzően.



53. ábra: A G5.NH<sub>2</sub> dendrimer <sup>1</sup>H NMR jeleinek kémiai eltolódás változása a pH függvényében, Au<sup>III</sup>-ionok jelenlétében (●) és nélkülük (24 mg/ml illetve 10 mg/ml G5.NH<sub>2</sub>).

Az Au<sup>III</sup> hatására a G5.NH<sub>2</sub> dendrimer diffúziós együtthatója ( $D = 5,9-6,4 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , Au<sup>III</sup>-koncentrációtól függően) nem változik számottevően.<sup>31</sup> 1:1 aránynál (100%) azt tapasztaltuk, hogy az aranyionokat a dendrimer redukálta.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az [AuCl<sub>x</sub>(OH)<sub>4-x</sub>]<sup>-</sup> komplexek valószínűleg a G5.NH<sub>3</sub><sup>+</sup> terminális csoportokhoz kötődnek, és ha redukáljuk őket, akkor a redukció kezdetén az elemi gócképződés és a gócnövekedés sebességének viszonya határozza meg a kialakuló aranykolloidok méretét.



### 4.2.3 Különböző módon funkcionizált G5 PAMAM dendrimerek kölcsönhatása doxorubicinnal (DOX)

A shanghai Donghua Egyetemen Xiangyang Shi és kutatócsoportja a doxorubicin (DOX) rákellenes gyógyszerhatóanyag különböző végcsoportú PAMAM dendrimerekkel alkotott adduktumát állította elő. A gyógyszerhatóanyag kioldódási kinetikáját és a rákos sejtekre kifejtett gátló hatását vizsgálták. A mi részünk ebben a munkában a doxorubicin-dendrimer kölcsönhatás jellemzése volt, amire NMR módszereket alkalmaztunk. Ebben az esetben az alap G5.NH<sub>2</sub> dendrimer nem alkalmazható toxicitása miatt, ezért három funkcionizált dendrimeret állítottunk elő:

- acetamid végcsoportú G5.NHCOCH<sub>3</sub> (G5.Ac),
- hidroxil végcsoportú, glicidollal funkcionizált G5.N(CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub> (G5.GlyOH)
- karboxil végcsoportú, borostyánkőssavval funkcionizált G5.NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH (G5.SAH) molekulákat.

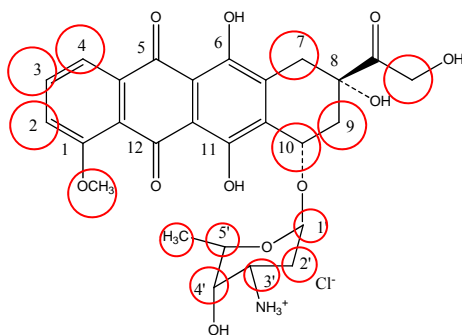
Ezekből egy meghatározott protokoll szerint a kínai kollégák preparátumokat készítettek, mi megvizsgáltuk a DOX tartalmukat és a DOX-szal való kölcsönhatás természetét.

Az előállított adduktumok vizsgálata előtt először a kölcsönhatás lehetőségét tanulmányoztuk. Ehhez a DOX-ot nagy koncentrációban (5 mg/ml) kevertük össze a G5.Ac dendrimerrel, és tanulmányoztuk a viselkedését.

#### ***Doxorubicin***

A doxorubicin (pH = 3) <sup>1</sup>H NMR spektruma az 57/a. ábrán látható. A molekula (54. ábra) protonjainak NMR csúcsait az irodalom alapján azonosítottuk.<sup>86</sup> A minta DOX·HCl D<sub>2</sub>O-ban való feloldásával készült.

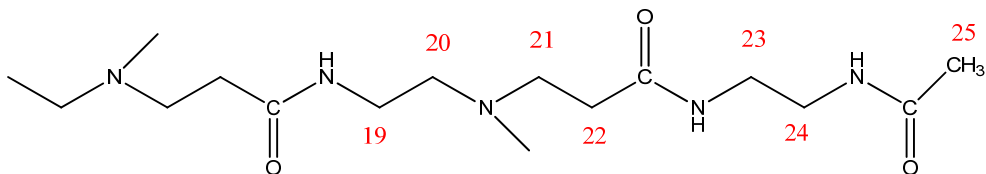
A doxorubicin DOSY NMR kísérlettel meghatározott diffúziós együtthatója  $D = 1,95 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  ( $\Delta = 30 \text{ ms}$ ,  $\delta = 6 \text{ ms}$ ).



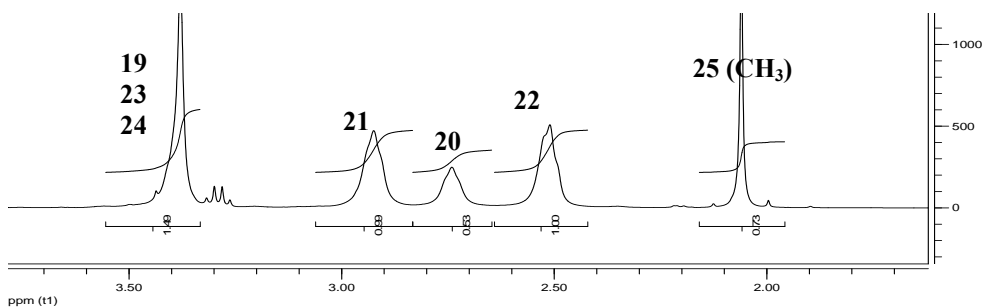
54. ábra: A doxorubicin (DOX·HCl) szerkezeti képlete, pirossal jelölve az  $^1\text{H}$  NMR spektrumon jelet adó protonok.

### A $G5.NHCOCH_3$ ( $G5.Ac$ ) – DOX egyensúlyi rendszer

Az 5. generációs PAMAM dendrimer láncvégi aminocsoportjait acetilcsoporttal funkcionálizálva olyan dendrimert kapunk, melynek terminális csoportja töltés nélküli acetilcsoport, míg a belső tercier aminok pH-tól függően pozitív töltésűek lehetnek. A  $G5.Ac$  szerkezeti képletét az 55. ábra szemlélteti. A dendrimer szerkezetéből adódóan 5 féle kémiai környezetben lévő protont különböztethetünk meg. Az ezekhez tartozó  $^1\text{H}$  NMR csúcsokat (56. ábra) az irodalom alapján azonosítottuk.<sup>113</sup>

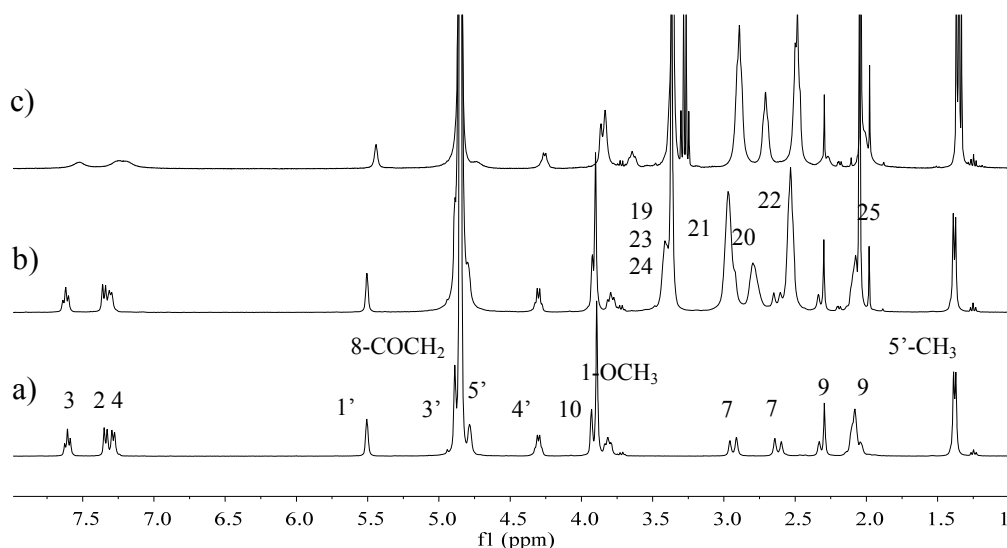


55. ábra: A  $G5.Ac$  láncvégi szerkezeti képlete.



56. ábra: A  $G5.Ac$   $^1\text{H}$  NMR jelei ( $G5.Ac$  – DOX minta,  $T=298\text{ K}$ ).

A G5.Ac doxorubicinnal készített, savas kémhatású ( $\text{pH} \approx 3$ ) vizes ( $\text{D}_2\text{O}$ ) oldatának  $^1\text{H}$  NMR spektrumát az 57/b. ábra mutatja. Az oldatot trietil-aminnal (TEA) lúgosítottuk ( $\text{pH} \approx 8$ ), az így felvett proton NMR spektrum az 57/c. ábrán látható. A savas mintához képest a lúgos minta NMR spektrumán az aromás régióban megjelenő csúcsok kiszélesedtek, valamint bizonyos jelek intenzitásaránya kissé változott. Ez arra utal, hogy a doxorubicin relaxációs ideje gyorsabb, feltehetően a makromolekulával kölcsönhatásba lép enyhén lúgos közegben. A kismértékű változást a dendrimer jeleinek kémiai eltolódásában a pH változásának tulajdonítjuk.

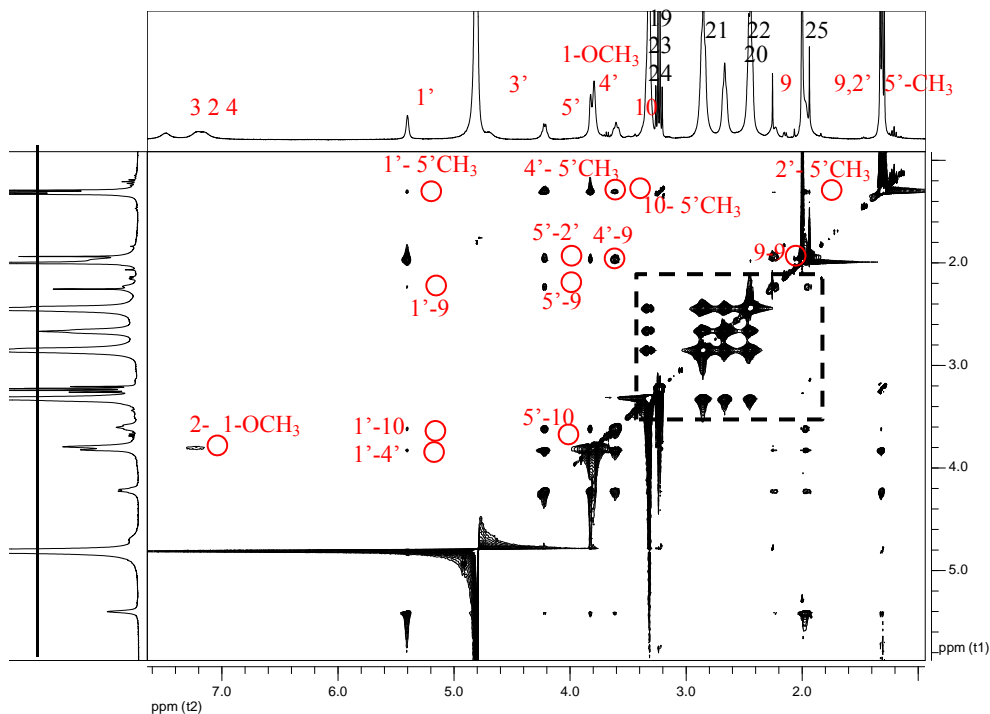


57. ábra: A DOX (a), a savas ( $\text{pH} \approx 3$ ) G5.Ac – DOX (b) és a lúgos ( $\text{pH} \approx 9,5$ ) G5.Ac – DOX – TEA (c)  $^1\text{H}$  NMR spektrumának összehasonlítása (5 mg/ml DOX, 10 mg/ml G5.Ac,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $T = 298$  K).

A kölcsönhatás mértékének további vizsgálatára NMR diffúziometriás kísérleteket végeztünk. A többkomponensű rendszerekben meghatároztuk a komponensek jelein mérhető diffúziós együtthatókat. A G5.NH<sub>2</sub> dendrimeré  $6,26 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ -nak, a DOX jelen mérhető érték  $1,54 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ -nak adódott enyhén lúgos közegben, míg  $\text{pH} = 3$ -on  $1,7 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ -nak ( $\Delta = 40$  ms,  $\delta = 8$  ms). Ezek a szabad doxorubicin diffúziós együtthatójánál kisebbek ( $1,95 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ), de a dendrimerénél nagyobbak, ami arra utal, hogy a doxorubicin molekuláknak csak egy része mozog együtt a dendrimer molekulával. Annak, hogy enyhén lúgos közegben a DOX lassabban mozog,

az lehet az oka, hogy a trietil-amint tartalmazó mintában a DOX részben még protonált állapotú, a dendrimer tercier nitrogénjei viszont teljesen deprotonáltak, így erősebb a kölcsönhatás, mint protonált állapotban.

A DOX és G5.Ac közötti kölcsönhatás helyének beazonosítására 2D NOESY spektrumot vettünk fel. A NOESY spektrumok lúgos és savas pH-n is hasonló eredményt adnak, az 58. ábra a G5.Ac – DOX – TEA rendszerről felvett spektrumot szemlélteti. Piros körrel jelöltem a COSY spektrumban nem található keresztcsúcsokat, vagyis amelyek dipoláris csatolást mutatnak.



58. ábra: A G5.Ac – DOX – TEA rendszer NOESY spektruma, piros színnel jelölve a doxorubicinhez tartozó keresztcsúcsok, fekete téglalappal a dendrimer keresztcsúcsai (5 mg/ml DOX, 10 mg/ml G5.Ac, D<sub>2</sub>O, T = 298 K, keveredési idő 500 ms).

A doxorubicin protonjai közti keresztcsúcsok a szerkezetre vonatkozóan azt mutatják, hogy a szénhidrát gyűrű a 9 és 10-es protonokhoz van térben közel. A DOX és a dendrimer protonjai egymással nem adnak keresztcsúcsot, azaz a DOX pozíciójáról nem kaptunk információt. A DOX protonjainak a diagonális csúcsokkal azonos fázisú keresztcsúcsai azonban arra utalnak,

hogy a doxorubicin molekulák nem kismolekulaként viselkednek (így anti-fázisú keresztcsúcsokat adnának), hanem a makromolekula részét képezik. A kölcsönhatás valószínűleg van der Waals típusú. Az oldatban kötött és szabad DOX molekulák is vannak, a köztük lévő kémiai csere gyors az  $^1\text{H}$  NMR időskálán, így nem látunk hozzájuk rendelhető szeparált csúcsokat. A cserefolyamattal fázisátvitel történik, NOE transzfer, amely kompenzálja a szabad DOX kismolekula ellentétes NOE fázisát.<sup>114</sup>

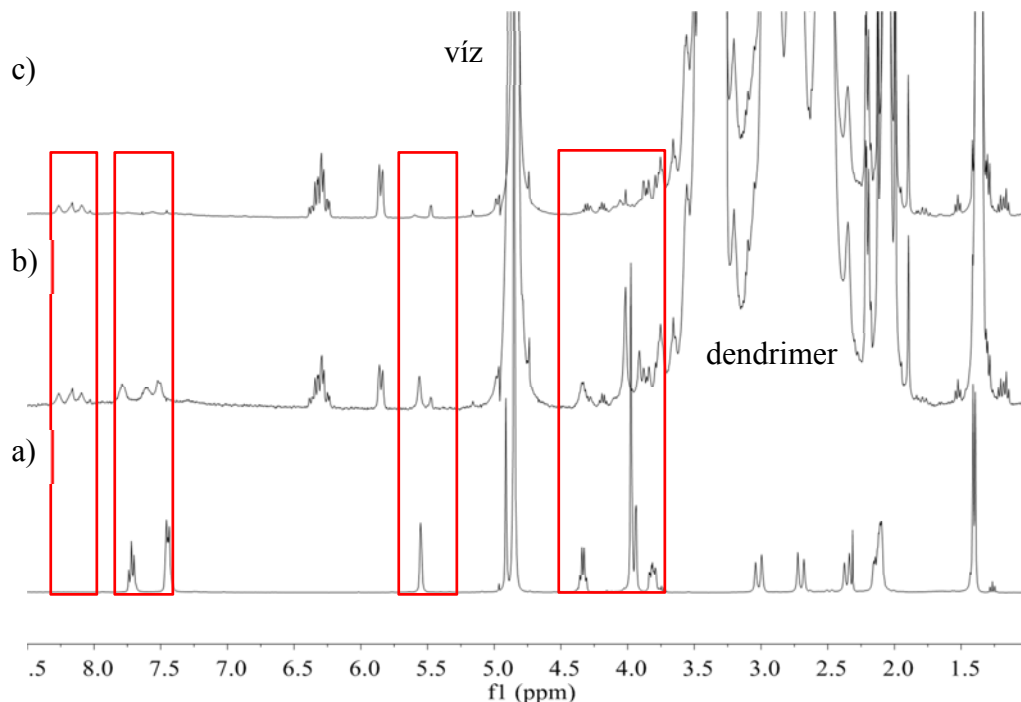
A kísérlet alapján megállapítható, hogy a DOX bizonyos mértékben részévé válhat a makromolekulának, azaz van esély arra, hogy szintézis körülmények között be lehet juttatni a hatóanyagot a dendrimerbe.

Ennek elérésére a doxorubicint metanolban oldottuk fel és semlegesítettük, majd ezt a dendrimeres vizes oldatához adagolva 24 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertük. Az elegyet dializáltuk és liofilizáltuk. A kapott szilárd anyagot Debrecenben elemeztük, míg a másik részével a biológiai kísérleteket Shanghai-ban végezték. Mindhárom szilárd preparátumot  $\text{D}_2\text{O}$ -ban oldottuk fel és tanulmányoztuk az NMR spektrumaikat.

#### ***a.) DOX – G5.NHCOCH<sub>3</sub> (G5.Ac)***

A DOX – G5.NHCOCH<sub>3</sub> szilárd minta vizes oldatáról ( $\text{D}_2\text{O}$ ) felvett  $^1\text{H}$  NMR spektrumon (59. ábra) megjelennek a doxorubicinra jellemző kémiai eltolódású igen kis intenzitású jelek, melyek sok esetben átlapolnak a dendrimer csúcsaival. Az aromás tartományban (7,3-8,3 ppm) azonban jól látszik, hogy a doxorubicin jelei szélesednek, és új jelcsoport is megjelenik 8-8,3 ppm között. Egy hónap elteltével a kisebb kémiai eltolódású aromás jelcsoport eltűnt a spektrumról és más jelek intenzitása is megváltozott (59. ábra).

A NOESY spektrumon a kis doxorubicin-koncentráció miatt nem látható keresztcsúcs a DOX proton jelei között. Csak a dendrimer tercier aminocsoportja körüli protonok mutatnak korrelációt. Így a kölcsönhatás helyét nem tudtuk meghatározni.

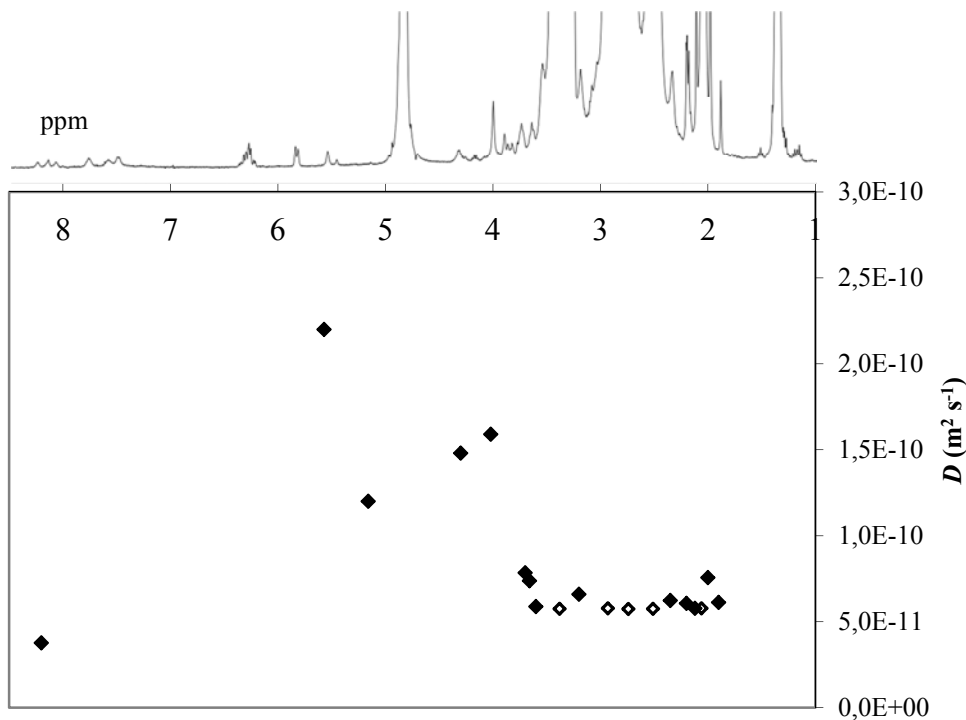


59. ábra: A doxorubicin  $^1\text{H}$  NMR spektruma (a), G5.Ac dendrimer jelenlétében a feloldást követően (b), és egy hónap elteltével (c) (dializált minta,  $T = 298\text{ K}$ )

A DOSY kísérlet kiértékelése során meghatároztuk az  $^1\text{H}$  NMR jelekhez rendelhető diffúziós együtthatókat, és a kémiai eltolódás függvényében ábrázoltuk azokat (60. ábra). A dendrimer jeleihez rendelt diffúziós együtthatók (az ábrán üres négyzettel jelölve) átlaga  $5,75 \times 10^{-11}\text{ m}^2\text{ s}^{-1}$ . A doxorubicin bizonyos proton jeleinél (2-4 ppm, aromás tartomány) számolt diffúziós együtthatók értéke közelít a dendrimeréhez.

Az erélyesebb reakciókörülmények között tehát a doxorubicin molekulák egy része a dendrimerhez erősen kötött, és együtt mozog azzal. Az ilyen módon kötött és a többi doxorubicin molekula között a kémiai csere lassú az  $^1\text{H}$  NMR időskálán, így szeparált csúcsokat látunk a spektrumon.

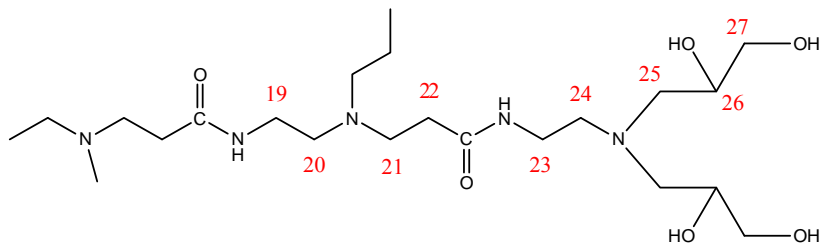
A lazábban kötött (vagy szabad) DOX jelek egy hónap utáni eltűnésének magyarázatát nem tudjuk megadni. Elképzelhető, hogy a szabad doxorubicin bomlik<sup>115</sup>, és csak lassan pótlódik a dendrimerből.



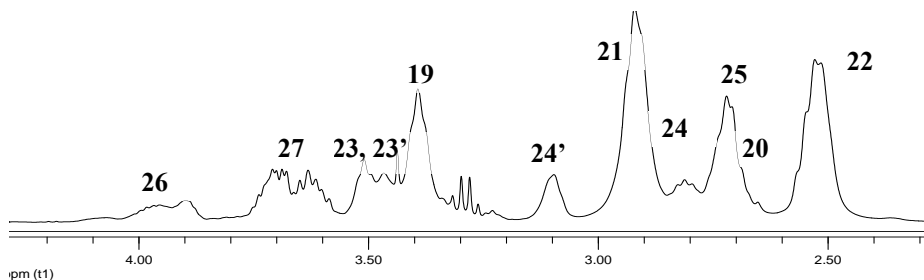
60. ábra: A G5.Ac – DOX rendszerben mért diffúziós együtthatók a kémiai eltolódás függvényében, a doxorubicin jelein (◆) és a dendrimer jelein (◇), ( $\Delta = 50$  ms,  $\delta = 10$  ms,  $T = 298$  K).

### b) DOX – G5.N(CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub> (G5.GlyOH)

Az ötödik generációs poli(amido-amin) dendrimer molekula láncvégi csoportjait glicidollal funkcionálizálva a terminális csoport hidroxilcsoport lesz (61. ábra), a dendrimer mérete pedig kis mértékben nő. A funkcionizált molekula <sup>1</sup>H NMR spektrumának (62. ábra) azonosítása Shi és munkatársai közleménye alapján történt.<sup>116</sup> A 23-23' illetve a 24-24' a glicidollal funkcionizált és a nem funkcionizált molekula protonjait jelöli.

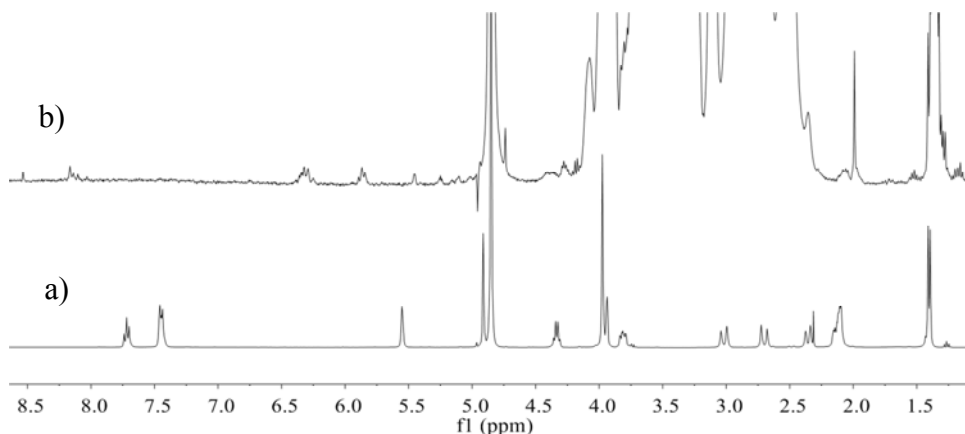


61. ábra: A G5.GlyOH láncvégi szerkezeti képlete.



62. ábra: A G5.GlyOH  $^1\text{H}$  NMR jelei  
(G5.GlyOH – DOX dializált minta,  $T = 298\text{ K}$ ).

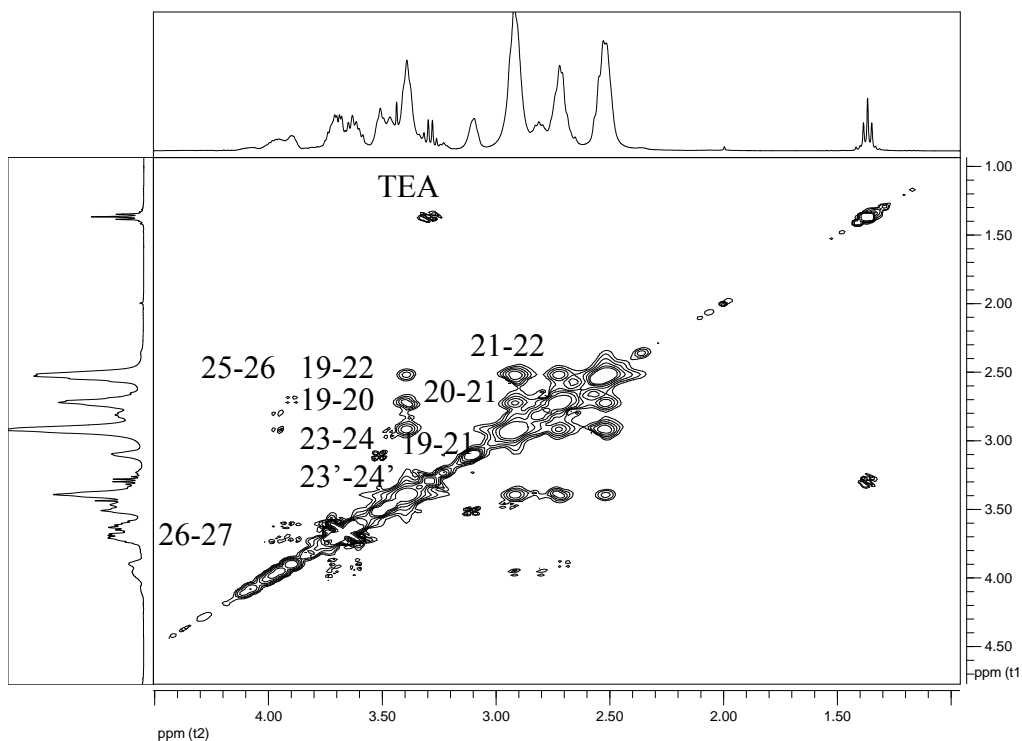
A dendrimerhez doxorubicint adva az  $^1\text{H}$  NMR spektrumon (63. ábra) kis intenzitású csúcsok jelennek meg az aromás tartományban (8-8,5 ppm), valamint a dendrimer jeleivel átfedésben is. Az 5,8 és 6,4 ppm-nél látható jelek valamilyen szennyező anyaghoz tartoznak, csak egymással adnak COSY keresztcsúcsot.



63. ábra: A DOX (a), a G5.GlyOH – DOX (b)  $^1\text{H}$  NMR spektrumának összehasonlítása (5 mg/ml DOX,  $T = 298\text{ K}$ ).

A minta NOESY spektrumán (64. ábra) a kis doxorubicin-koncentráció miatt csak a dendrimer molekula térben közel lévő protonjai mutatnak korrelációt. Negatív fázisú keresztcsúcsot adnak a szintézis során visszamaradt trietil-amin (TEA), mint kismolekula  $\text{CH}_2$ - és  $\text{CH}_3$ -protonjai. Pozitív a fázisa a makromolekula keresztcsúcsainak. A dendrimer–doxorubicin kölcsönhatást illetően azonban a NOESY spektrum nem nyújt információt.

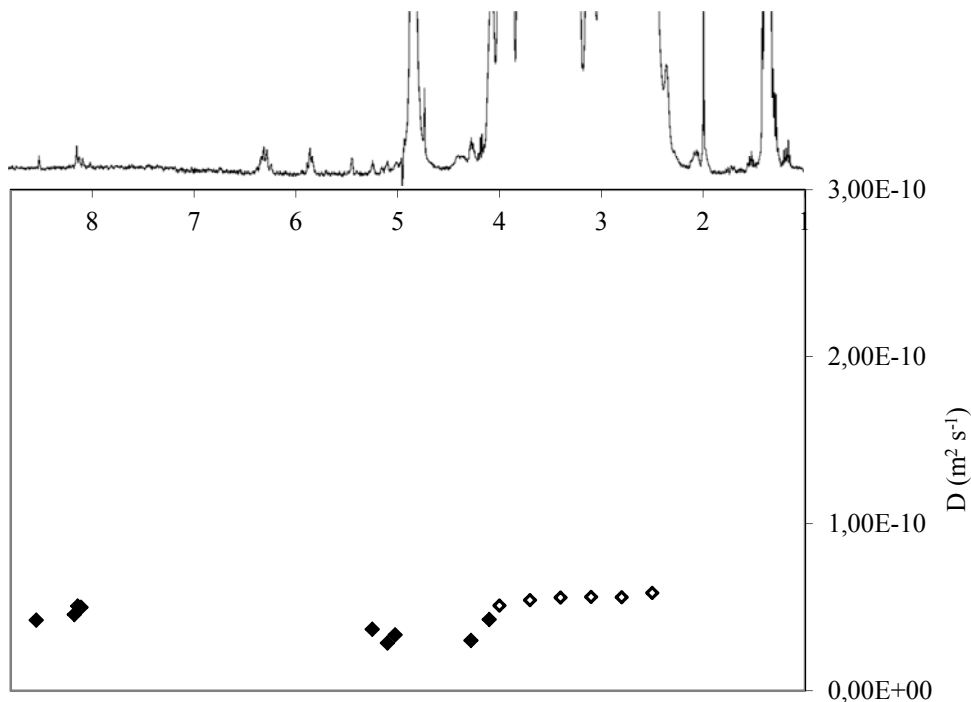




64. ábra: A G5.GlyOH – DOX NOESY spektruma  
(keveredési idő: 150 ms,  $T = 298$  K).

A 65. ábrán látható, hogy a doxorubicin csúcaihoz rendelt diffúziós együtthatók megközelítik a G5.GlyOH-ra mért értékeket, bár a kis intenzitású csúcsoknál a meghatározás igen pontatlan.

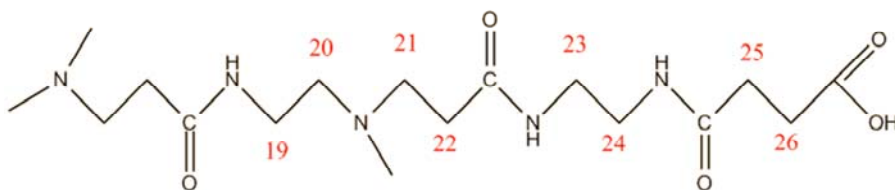
Összességében tehát a glicidollal funkcionizált, hidroxid terminális csoportú G5 PAMAM dendrimerbe erőteljesebb reakciókörülmények között igen kis mennyiségű doxorubicin juttatható be. A kölcsönhatás a kismolekula és a makromolekula között adataink alapján nem jellemezhető, de a kapszulázott gyógyszermolekulák együtt mozognak a dendrimerrel.



65. ábra: A G5-GlyOH – DOX minta  $^1\text{H}$  NMR jeleire jellemző diffúziós együtthatók a kémiai eltolódás függvényében, a doxorubicin (◆) és a dendrimer jelein (◇), ( $\Delta = 50$  ms,  $\delta = 10$  ms,  $T = 298$  K).

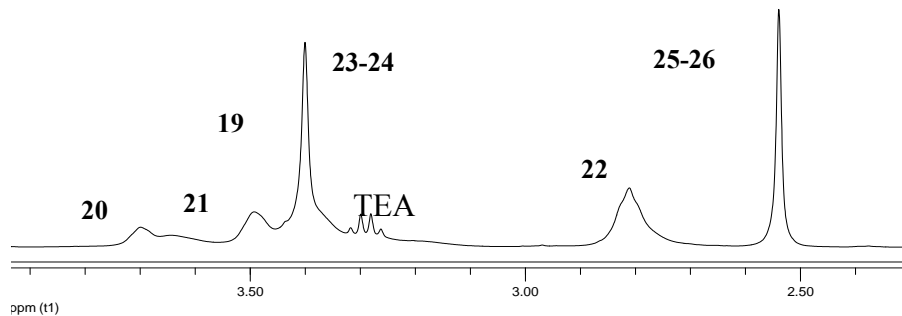
**c) DOX – G5.NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH (G5.SAH)**

A borostyánkőssavval funkcionálizált G5 PAMAM dendrimer (G5.SAH) (66. ábra) a protonálódási állandók alapján (karboxilcsoport  $pK = 4,6$ , tercier aminocsoport  $pK = 6,69$ ) semleges közeli pH-n számos negatív töltést ( $\sim 117$ ) hordoz a molekula „felületén”, a belső tercier aminocsoportok töltése nagyrészt semleges.<sup>31</sup>

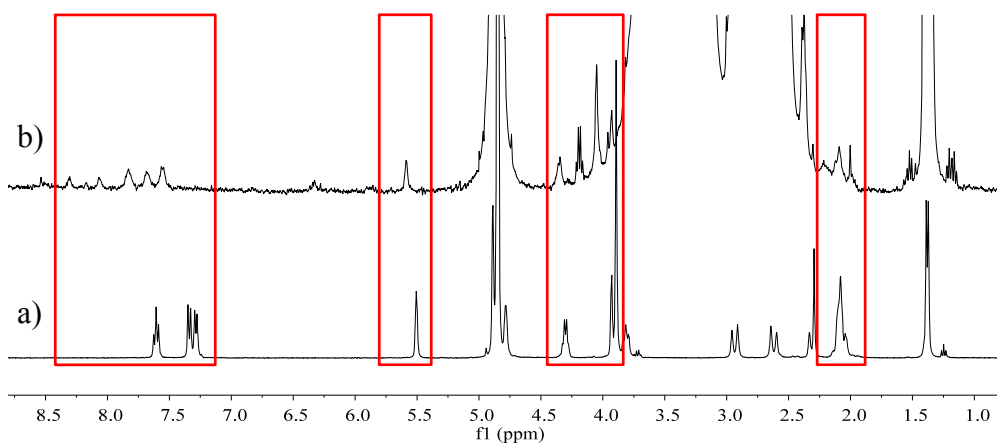


66. ábra: A G5.SAH dendrimer láncvégi szerkezete és a CH<sub>2</sub>- csoportok számozása.

A dendrimer  $^1\text{H}$  NMR spektrumát (67. ábra) dolgozatunkban azonosítottuk.<sup>31</sup> Doxorubicin jelenlétében a spektrumon megjelennek a gyógyszermolekulára jellemző kis intenzitású csúcsok (68. ábra).



67. ábra: A G5.SAH  $^1\text{H}$  NMR jelei (G5.SAH – DOX minta,  $T = 298$  K).

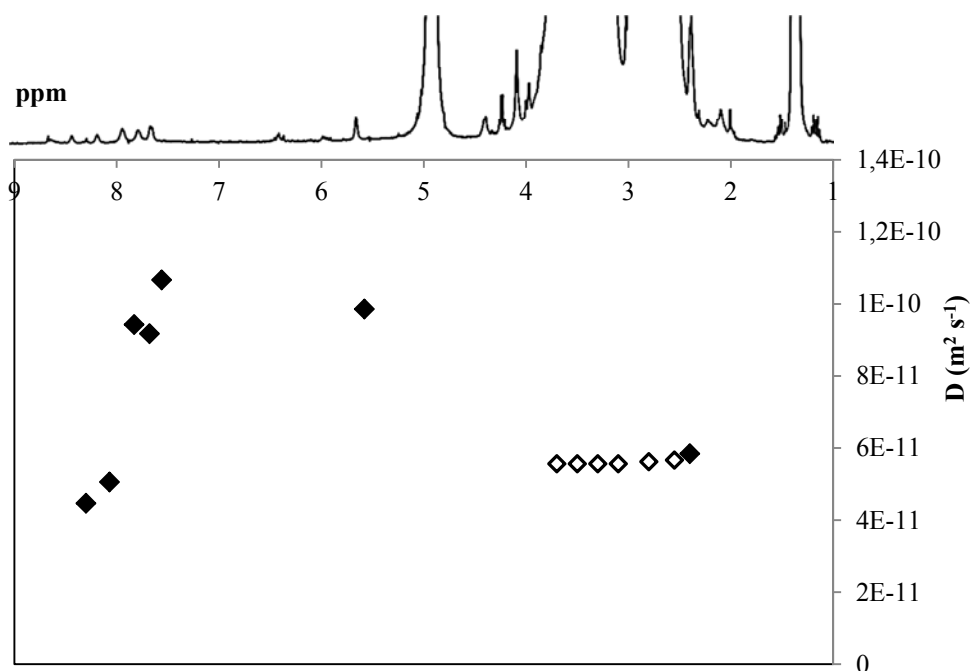


68. ábra: A DOX (a), a G5.SAH – DOX (b)  $^1\text{H}$  NMR spektrumának összehasonlítása ( $T = 298$  K).

Az aromás kémiai eltolódás tartományban két jelcsoport is feltűnik, melyből a nagyobb kémiai eltolódású jelekre a dendrimerhez közelítő diffúziós együtthatót ( $5,62 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) állapítottunk meg (69. ábra). Ezek a doxorubicin molekulák erősen kötődnek a dendrimerhez, a makromolekulával azonos sebességgel diffundálnak, és lassú csere folyamat van köztük és a többi gyógyszermolekula között. Elképzelhető, hogy ezt az erősebb kölcsönhatást a deprotonált tercier aminocsoportok és a doxorubicin molekulán található hidroxilcsoportok között kialakuló hidrogénkötések

okozzák. A NOESY spektrumon ez esetben is csak a dendrimerre jellemző keresztcsúcsok láthatók, a kismolekulával való kölcsönhatás helye nem azonosítható.

A másik aromás jelesoport (7,5-8 ppm) esetében megállapított diffúziós együttható  $\sim 9,7 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  (69. ábra), ami a szabad diffúziós együtthatótól ( $1,95 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) kisebb érték. Ez a diffúziós együttható feltehetően gyengébben kötött és szabad DOX molekulákra jellemző átlagérték. A közöttük lévő kémiai csere gyors az  $^1\text{H}$  NMR időskálán, így nem látunk hozzájuk rendelhető szeparált csúcsokat.



69. ábra: A G5.SAH – DOX minta  $^1\text{H}$  NMR jeleire jellemző diffúziós együtthatók a kémiai eltolódás függvényében a doxorubicin (◆) és a dendrimer jelein (◇), ( $\Delta = 50 \text{ ms}$ ,  $\delta = 10 \text{ ms}$ ,  $T = 298 \text{ K}$ ).

A doxorubicin cukor gyűrűjéhez kapcsolódó aminocsoport (protonálódási állandója  $pK = 8,15$ ) semleges közeli és enyhén lúgos közegben részben protonált állapotú, míg az aromás gyűrűhöz kapcsolódó hidroxilcsoport  $pK$ -ja 10,16.<sup>117</sup> Így kialakulhat elektrosztatikus kölcsönhatás a pozitívan töltött doxorubicin molekulák és a negatív töltésű dendrimer között.

A kísérleteink azt mutatják, hogy a doxorubicin citosztatikum képes adduktumot képezni a PAMAM dendrimerekkel. Legkevésbé a glicidol származékkal, míg nagyobb mértékben az acetil és karboxil végcsoportú dendrimerekkel. A szokásos kapszulázási reakciókörülmények között azonban viszonylag kevés DOX juttatható be a dendrimerekbe. Ennél hatékonyabbak a DOX „csomagolására” egyéb polimerek<sup>118</sup> és a liposzómák.<sup>119</sup>

A kölcsönhatások természetének tisztázása egy hosszabb kutatási projekt lesz, amit jelenleg is folytatunk a kínai partnereinkkel.

### 4.3 Arany nanorészecskék kölcsönhatása G5.NH<sub>2</sub> dendrimerrel

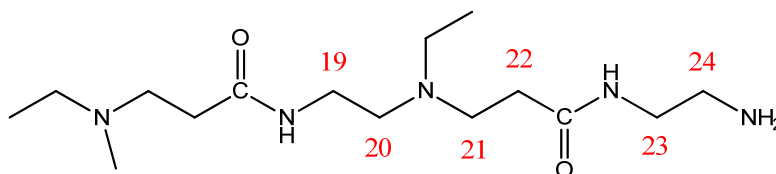
A nanotechnológiában igen elterjedt arany nanorészecskék (AuNP) biokompatibilitását különböző molekulákhoz való kapcsolással próbálják javítani. Többek között G5.NH<sub>2</sub> dendrimerekkel intra- és interdendrimer módon stabilizált arany nanorészecskéket (un. hibrid részecskéket) állítanak elő, és vizsgálják kontrasztanyagként való alkalmazhatóságukat.<sup>87, 88, 120</sup>

Különböző arany-dendrimer aránynál vizsgáltuk a létrejött hibrid nanorészecskéket. Az arany nanorészecskék és a G5.NH<sub>2</sub> dendrimerrel alkotott hibrid részecskék mért és számolt fizikai-kémiai tulajdonságait szemlélteti a 4. táblázat. A fém nanorészecskék átlagos mérete (*d*, nm) a 25:1, 50:1, 75:1 és 100:1 arany dendrimer kiindulási aránynál sorra 1,9, 2,2, 2,5 és 2,6 nm-nek adódott a korábban végzett TEM vizsgálatok alapján.<sup>94</sup> A nanorészecskék méretét a kínai kollégák UV/látható spektroszkópiával is igazolták.<sup>121</sup> A 4. táblázat legmeglepőbb adatai az egy AuNP-ben lévő arany atomok száma (*n*<sub>Au</sub>), ami lényegesen eltér a kezdeti arányoktól (*n*<sub>Au</sub><sup>III</sup>). Szintén korábbi mérések azt is igazolták, hogy a dendrimer primer aminocsoportjainak száma kevesebbnek mérhető a szokásos módszerekkel az arany nanorészecskék jelenlétében, vagyis a terminális csoportok mintegy fele nem hozzáférhető a szokásos biokémiai reagensek számára.<sup>94</sup>

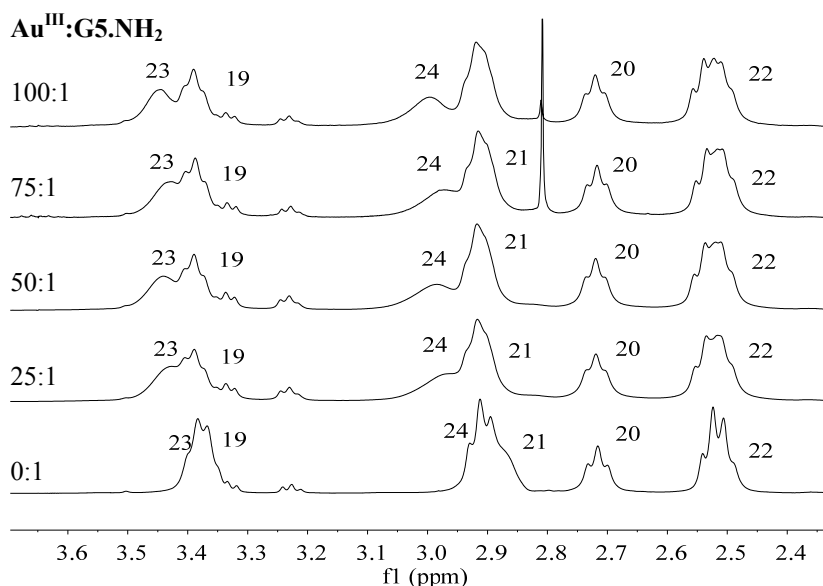
4. táblázat: Az előállított arany és hibrid nanorészecskék fizikai-kémiai tulajdonságai (*T* = 298 K).

Au/G5.NH <sub>2</sub> arány <sup>94</sup> ( <i>n</i> <sub>Au</sub> <sup>III</sup> )	Átl. TEM <i>d</i> (nm) <sup>94</sup>	Szabad NH <sub>2</sub> - csoportok száma <sup>94</sup>	Számolt Au/AuNP ( <i>n</i> <sub>Au</sub> )	<i>D</i> (m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )	<i>d</i> <sub>H</sub> (nm)
<b>0</b>	n/a	123,3	n/a	6,5 10 <sup>-11</sup> ( <sup>2</sup> )	6,2
<b>25</b>	1,9	67	210	5,3 10 <sup>-11</sup>	7,6
<b>50</b>	2,2	61,3	330	5,6 10 <sup>-11</sup>	7,1
<b>75</b>	2,5	55,3	480	5,3 10 <sup>-11</sup>	7,6
<b>100</b>	2,6	51,6	541	5,7 10 <sup>-11</sup>	7,0

Az arany nanorészecskék dendrimeren belüli elhelyezkedésének további vizsgálata céljából a dendrimerrel stabilizált arany nanorészecskéket újra feloldottuk ( $D_2O$ ) és nagy felbontású NMR méréseket végeztünk. A mintákról felvett  $^1H$  NMR spektrumokat a 71. ábra mutatja. A dendrimer terminális helyzetben lévő 23-as és 24-es  $CH_2$  csoportjának (70. ábra) proton jelei nagyobb kémiai eltolódás felé tolódnak, míg a többi nem változik. Ez az arany nanorészecske közelségére utal, vagyis az a dendrimer külső részében található.



70. ábra: A G5.NH<sub>2</sub> láncvégi szerkezete és a CH<sub>2</sub>-csoportok számozása.



71. ábra: Az arany hibrid nanorészecskék vizes oldatának ( $D_2O$ )  $^1H$  NMR spektruma. A legalsó az arany nanorészecskék nélküli dendrimer spektruma. Felfelé haladva 25, 50, 75 és 100 Au<sup>III</sup>-iont adagoltunk dendrimerenként a minta készítése során.

Az arany nanorészecskék sűrűségét azonosnak tekintve a tömbfázisú arany sűrűségével ( $\rho_{Au} = 19,32 \text{ g cm}^{-3}$ )<sup>122</sup>, kiszámoltuk a TEM méretből az aranyatomok átlagos számát az adott méretű nanorészecskében (4. táblázat,  $Au/AuNP = n_{Au}$ ). Az arany nanorészecskéket alkotó atomok száma ( $n_{Au}$ ) 5-8-

szorososa annak, mint amit a kezdetben hozzáadott Au<sup>III</sup>-ionok mennyisége alapján ( $n_{\text{Au}^{\text{III}}}$ ) várnánk. Egyes irodalmak szerint az arany nanorészecskék felépítése, kristályszerkezete eltérhet a tömbfázisú aranyétól, bár ezeknél a vizsgálatoknál tiolsoportot tartalmazó stabilizátort alkalmaztak.<sup>123, 124</sup> Azonban az ebből adódó sűrűségkülönbséget figyelembe véve is 3-5-ször több aranyatomból áll a nanorészecske, mint az egy dendrimerre jutó aranyionok száma. Ez azt jelentheti, hogy egy nanorészecske nem egy dendrimerhez kapcsolódik, hanem több dendrimerre jut egy arany nanorészecske, illetve lehetnek szabad dendrimer molekulák is a rendszerben.

Az NMR diffúziometriás kísérletek azt mutatták, hogy a hibrid nanorészecskék átlagos diffúziós együtthatója ( $D$ ,  $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ) kisebb a szabad dendrimerénél (4. táblázat). A diffúziós görbék egy exponenciális görbével jól illeszthetőek voltak (16. ábra), nem tudtuk elkülöníteni a szabad és a hibrid részecskét alkotó dendrimer molekulákat. Ennek alapján gyors kémiai cserefolyamat feltételezhető a diffúziós NMR időskálán a részecskék között. A 71. ábra, az NMR spektrumokon is csak egy-egy jelcsoport jellemzi a dendrimer adott protonjait, vagyis a cserefolyamat a kémiai eltolódás különbség időskáláján is gyorsnak tekinthető.

Ezeket a megfontolásokat tekintetbe véve a mért diffúziós együtthatókat a szabad dendrimer és a hibrid nanorészecske diffúziós együtthatójának átlagaként értelmeztük. Az alábbi modellt alkalmaztuk, melyben kulcsfontosságú, hogy  $n$  számú dendrimer molekula található a hibrid részecskében:



ahol  $n$  az egy arany nanorészecskével (Au) kölcsönhatásban lévő dendrimerek (D) száma. Így a mért átlagos diffúziós együttható:

$$D_{\text{mért}} = x_D D_D + x_{D_{\text{Au}}} D_{D_{\text{Au}}} \quad (11)$$

ahol  $x_D$  és  $x_{D_{\text{Au}}}$  a szabad és hibrid részecskében kötött dendrimer móltörtje, míg  $D_D$  és  $D_{D_{\text{Au}}}$  azok diffúziós együtthatója. A hibrid nanorészecske diffúziós együtthatójának ( $D_{D_{\text{Au}}}$ ) helyére behelyettesítve az Einstein-Stokes-egyenletet (1. egyenlet) a 12. formulához jutunk:

$$D_{\text{mért}} = x_D D_D + x_{D_{\text{Au}}} \frac{k_B T}{6\pi\eta R_{D_{\text{Au}}}} \quad (12)$$



ahol  $k_B$  a Boltzmann-állandó,  $T$  a hőmérséklet,  $\eta$  a közeg viszkozitása,  $R_{DAu}$  pedig a hibrid nanorészecske hidrodinamikai sugara. Ebből kifejezhető az  $R_{DAu}$ , a hibrid nanorészecske sugara:

$$R_{DAu} = \frac{x_{DAu} k_B T}{6\pi\eta(D_{mért} - x_D D_D)} \quad (13)$$

Amennyiben a dendrimerhez kezdetben hozzáadott  $Au^{III}$ -ionok dendrimer mólonkénti mennyiségét ( $n_{Au^{III}}$ ) elosztjuk az arany nanorészecskéket alkotó atomok számával ( $n_{Au}$ ), az eredmény megadja, hogy a dendrimer molekulák mekkora hányada van kölcsönhatásban arany nanorészecskével. Ha azt feltételezzük, hogy a hibrid nanorészecskében  $n = 1-5$  dendrimer található ( $D_1Au - D_5Au$  összetétel), akkor a hibrid részecskében kötött dendrimer móltörtjét az alábbi módon számolhatjuk ki:

$$x_{DAu} = n \frac{n_{Au(III)}}{n_{Au}} \quad (14)$$

Ezt és az előző (13, 14) összefüggést felhasználva kiszámoltuk minden  $Au^{III}$ /dendrimer aránynál a kötött dendrimer móltörtjét és a keletkező hibrid nanorészecske méretét különböző összetételek (1:1 – 1:5) esetén (5. táblázat).

5. táblázat: A kötött dendrimerék móltörtje és a hibrid nanorészecske mérete különböző arany-dendrimer és arany nanorészecske-dendrimer arány esetén.

	<b>25:1</b>		<b>50:1</b>		<b>75:1</b>		<b>100:1</b>	
<b>AuNP/ G5.NH<sub>2</sub></b>	$x_{D(G)}$	$d$ (nm)	$x_{D(G)}$	$d$ (nm)	$x_{D(G)}$	$d$ (nm)	$x_{D(G)}$	$d$ (nm)
<b>1:1</b>	0,12	<b>-11,2*</b>	0,15	<b>71,7</b>	0,16	<b>-34,0*</b>	0,18	<b>18,5</b>
<b>1:2</b>	0,24	<b>27,5</b>	0,30	<b>11,4</b>	0,31	<b>15,1</b>	0,37	<b>9,3</b>
<b>1:3</b>	0,36	<b>12,8</b>	0,45	<b>8,9</b>	0,47	<b>10,2</b>	0,55	<b>7,9</b>
<b>1:4</b>	0,48	<b>10,1</b>	0,61	<b>8,0</b>	0,63	<b>8,8</b>	0,74	<b>7,4</b>
<b>1:5</b>	0,60	<b>8,95</b>	0,76	<b>7,56</b>	0,78	<b>8,09</b>	0,92	<b>7,12</b>

\*A negatív átmérő azt jelzi, hogy az 1:1 arany nanorészecske–dendrimer összetétel nem lehet helyes.

Például, ha 25 arany(III)iont adtunk egy dendrimerhez, és feltételezzük, hogy 2 dendrimer fog közre egy arany nanorészecskét, akkor

$$x_{\text{DAu}} = 2 \times 25 / 210 = 0,24 \quad x_{\text{D}} = 1 - x_{\text{DAu}} = 0,76$$

$$R_{\text{DAu}} = 0,24 \times 1,38 \times 10^{-23} \times 298 / (6 \times 3,14 \times 1,1 \times 10^{-3} \times (5,3 \times 10^{-11} - 0,76 \times 6,5 \times 10^{-11})) =$$

$$= 13,8 \text{ nm} \quad d = 27,5 \text{ nm}$$

A hibrid nanorészecske kiszámított méretének realitása (5. táblázat) és az irodalom alapján határoztuk meg az arany nanorészecskét stabilizáló dendrimer molekulák számát.

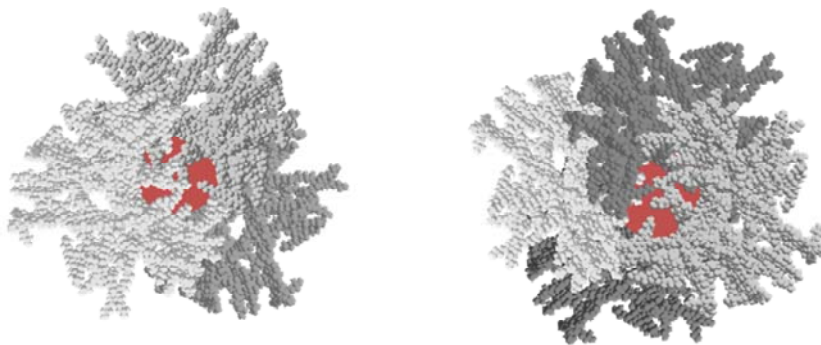
Egy makromolekula monomer diffúziós együtthatójához ( $D_1$ ) és méretéhez ( $R_1$ ) képest a dimer diffúziós együtthatójának ( $D_2$ ) és méretének ( $R_2$ ) becslésére kétféle elméleti megközelítés ismeretes. (1) Az egyik a dimert egy ellipszoidként kezeli (tengelyek aránya 2:1), amely a két gömb alakú molekula összekapcsolódásával jött létre. Ez esetben  $D_2/D_1 = 0,706$ , vagyis  $R_2/R_1 = 1/0,706 = 1,42$  a Stokes-Einstein egyenletnek megfelelően (1. egyenlet).<sup>125</sup> (2) A dimert olyan gömbnek tekintve, amelynek térfogata a monomer térfogatának kétszerese,  $D_2/D_1 = 0,79$ ,  $R_2/R_1 = 1,27$ .<sup>125-127</sup> Ezt a két modellt alkalmaztuk a  $D_2\text{Au}$  összetételű hibrid molekula lehetséges méretbeli szélsőértékeinek meghatározásakor. Mivel a  $G5.\text{NH}_2$  sugara 3,07 nm (4. táblázat),  $R_{D_2G}$  értéke 4,36 (1-es modell) nm és 3,9 nm (2-es modell) között változik. Így a  $D_2\text{Au}$  hibrid részecske átmérője 7,8 - 8,7 nm-nek várható. A második modell segítségével kiszámolható a  $D_3\text{Au}$ ,  $D_4\text{Au}$  és  $D_5\text{Au}$  hibrid részecskék mérete is, mely rendre 8,8, 9,8 és 10,5 nm-nek adódik. Van Dongen és munkatársai kísérleti úton is meghatározták különböző  $G5.\text{NH}_2$  oligomerek hidrodinamikai átmérőjét.<sup>32</sup> A 2-4 dendrimerből álló oligomerek esetén a méret 8-9,2 nm-nek adódott.

Az elméleti és kísérleti eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a  $D_1\text{Au}$ ,  $D_2\text{Au}$ ,  $D_5\text{Au}$  összetételeknél kapott eredmények nem reálisak (5. táblázat). A  $D_1\text{Au}$  és  $D_2\text{Au}$  összetételnél számolt átmérők túl nagyok,  $D_5\text{Au}$  összetételnél viszont túl kicsik. A hibrid részecskék mérete alapján tehát megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált rendszerekben a  $D_3\text{Au}$  vagy a  $D_4\text{Au}$  hibrid részecske összetétel a legvalószínűbb.

Számos irodalom szerint  $G5.\text{NH}_2$  jelenlétében 2-3 nm nagyságú arany nanorészecskék képződnek,<sup>36, 69, 87, 94, 121, 128</sup> melyek az alkalmazás során intradendrimer nanorészecskéként (DEN) viselkednek. Gröhn és munkatársai szerint 2-4 generációs ( $G2-4$ ) dendrimerek esetében interdendrimer arany

nanorészecskék képződnek, vagyis a dendrimer molekulák sztérikusan stabilizálnak, G6 felett pedig kapszulázás történik.<sup>91</sup> Az ötödik generációs dendrimerrel előállított nanorészecske jellemzését azonban nehézkesnek találták. Eredményeink szerint egy G5.NH<sub>2</sub> molekula nem képes az 1,8-2,6 nm méretű arany nanorészecskék kapszulázására, a templát hatás nem olyan erőteljes, mint nagyobb generációknál. Ezt alátámasztják a korábban bemutatott NMR krioporozimetriai mérések, melyek alapján 3,6 és 5,2-5,6 nm átmérőjű pórusokat találtunk dendrimer gélben. Értelmezésünk szerint legalább két dendrimer fog közre egy-egy üreget.

Az eredmények tehát azt mutatják, hogy a G5.NH<sub>2</sub> dendrimerrel előállított arany-tartalmú hibrid nanorészecskék átmenetet képeznek a sztérikus stabilizálás és a kapszulázás között. Sztérikus stabilizálás esetén sokkal nagyobb aranynanorészecskék képződnének, több dendrimeret adszorbeálva a felületen. Az <sup>1</sup>H NMR méréseink alapján azonban (71. ábra) a dendrimer részben kapszulázza arany nanorészecskéket. Az, hogy a primer aminocsoportok mintegy 50 %-a nem elérhető más reagens számára, is igazolja azt a modellt, miszerint egy arany nanorészecskét 3 vagy 4 dendrimer fog közre, részben kapszulázva azt, a 72. ábra szerint.



72. ábra: 3 és 4 dendrimer által kapszulázott arany nanorészecskék.

Összességében megállapítottuk, hogy különböző arany-dendrimer arányánál 3-4 G5.NH<sub>2</sub> molekula áll kölcsönhatásban egy arany nanorészecskével, melynek mérete 2-3 nm. A képződő hibrid nanorészecske mérete 8-10 nm a trimer és tetramer dendrimerekhez hasonlóan. A stabilizálás módja átmenetet képez a kapszulázás és a sztérikus stabilizálás között.

## 5 ÖSSZEFOGLALÁS

A dendrimerek szabályos, tervezhető szerkezetük és funkciós csoportjaik révén felfedezésük óta az érdeklődés középpontjában állnak. A poli(amido-amin) dendrimerek további kedvező tulajdonsága, hogy hidrofil karakterűek, valamint tercier és primer aminocsoportjaik protonálódásával számos pozitív töltéssel rendelkezhet egy-egy molekula. A funkciós csoportok és a dendrimer belsejében feltételezett üregek miatt a nagyobb generációjú (G5-G10) PAMAM dendrimerekhez különböző gyógyszerhatóanyagok, nanorészecskék, képkalkotásban használatos ágensek, kontrasztanyagok, vektor molekulák köthetők kovalens vagy nem kovalens módon. Ez lehetővé teszi a dendrimerek széleskörű felhasználását a komplexkémiában, az orvosi kémiában és különböző katalitikus reakciókban egyaránt. A PAMAM dendrimerek vizes oldatbeli viselkedésének és a különböző részecskékkel való kölcsönhatás jellegének ismerete kiemelt jelentőséggel bír.

Az említett megfontolások alapján doktori munkám során célul tűztük ki az 5. generációs  $\text{NH}_2$ -végcsoportú PAMAM dendrimer ( $\text{G5.NH}_2$ ) oldatbeli viselkedésének, oldószerrel ( $\text{H}_2\text{O}$ ), kisméretű ionokkal ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ,  $\text{Au}^{\text{III}}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ), molekulákkal (doxorubicin) és kolloidokkal (különböző méretű arany nanorészecskék, AuNP) való kölcsönhatásának vizsgálatát. A  $\text{G5.NH}_2$  számos primer aminocsoportja révén toxikus hatású az élő szervezetre, így ecetsav- ( $\text{G5.NHAc}$ ), és borostyánkősav-anhidriddel ( $\text{G5.SAH}$ ) illetve glicidollal ( $\text{G5.GlyOH}$ ) funkcionizált változatának kölcsönhatását vizsgáltuk doxorubicinnal.

Munkánk során a makromolekulák protonálódási folyamatait és a foszfátionokkal való kölcsönhatást pH-potenciometriás titrálással vizsgáltuk. A dendrimerek oldatbeli szerkezetének vizsgálatára és az inokkal, kismolekulákkal, kolloidokkal való kölcsönhatások jellemzésére különböző 1D és 2D NMR technikákat ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  NMR spektrumok és COSY, NOESY, HSQC, HMBC, DOSY) alkalmaztunk.

Azonosítottuk a  $\text{G5.NH}_2$  dendrimer különböző kémiai környezetben lévő protonjait az  $^1\text{H}$  NMR spektrumon, és megállapítottuk, hogy az az irodalomban számos esetben helytelenül szerepel. A makromolekula teljes körű NMR jellemzését elvégezve kimutattuk, hogy a NOESY spektrumon megjelenő dipoláris csatolást jelző keresztcsúcsok a tercier nitrogének körüli

protonok között mutatnak térbeli közelséget. A molekula nitrogénatomjait is azonosítottuk  $^{15}\text{N}$  NMR spektrumon.

A dendrimer struktúrában feltételezett üregek létezését, méretét teljesen új szempontból vizsgáltuk NMR krioporozimetriás mérésekkel. Megállapítottuk, hogy 1000 vízmolekula/dendrimer aránynál 1,8 és  $\sim 2,6$  nm sugarú pórusok találhatóak a dendrimergélben, míg 2000 és 3000 vízmolekula/dendrimer aránynál már csak a nagyobb pórusok vannak jelen. A 4000 vízmolekula/dendrimer arány esetén már nem definiálható jól a pórusos szerkezet, jelentős részben a tömbfázisú víz detektálható. Ezek az eredmények jó egyezést mutatnak az általunk korábban meghatározott, kb. 3700-as hidratációs számmal. A diffúziómérések szerint a pórusok fala átjárható a víz számára, és a rendszerben gátolt diffúzió jellemző. A méretviszonyok alapján megállapítottuk, hogy egy-egy üreget legalább két dendrimer együttesen hoz létre.

A G5.NH<sub>2</sub> dendrimer potenciometriás titrálása során kapott titrálási görbe illesztésével két csoportállandót tudtunk meghatározni, melyből az egyik a tercier ( $\text{p}K_{\text{N(T)}} = 5,7(2)$ ), a másik a primer nitrogének ( $\text{p}K_{\text{N(P)}} = 8,9(2)$ ) protonálódásához rendelhető. A protonálódó csoportok száma (119 db N<sub>(T)</sub> illetve 123 db N<sub>(P)</sub>) azt mutatja, hogy a dendrimer gyakorlatilag megfelel a gyártó által megadott elméleti szerkezetnek. A különböző pH-értékű dendrimer-oldatok  $^1\text{H}$  NMR spektrumain a tercier illetve a primer N-ekhez közeli protonok csúcsainak kémiai eltolódását vizsgálva a pH függvényében, bizonyítottuk a  $\text{p}K$ -értékek hovatartozását, és az adott aminocsoportok protonálódására jellemző  $\text{p}K$ -értékeket ezen a módon is meghatároztuk ( $\text{p}K_{\text{N(T)}} = 5,76$  illetve  $5,96$ ;  $\text{p}K_{\text{N(P)}} = 8,7$ ).

Többrétű NMR és pH-potenciometriás kísérletekkel igazoltuk, hogy a foszfátionok pH = 6-8 között a dendrimer belsejében is megtalálhatóak. A dendrimer szerkezetének elágazási pontjaiban lévő tercier nitrogénatomokhoz feltehetően hidrogénkötéssel kötődnek, a pH-val és foszfátkoncentrációval változó mértékben, változtatva ezáltal a makromolekula méretét, struktúráját, töltését. Az említett pH-tartomány alatt és felett a foszfátionok a dendrimerrel együtt mozognak, de a makromolekulán kívül, a protonált primer aminocsoportokkal vannak elektrosztatikus kölcsönhatásban. A  $^1\text{H}$  NMR jelek felhasadása és a relaxációs mérések alapján a dendrimer szerkezetét 3 zónára osztottuk (külső, átmeneti és belső), melyekben a protonok eltérően viselkednek.

A dendrimer templátú arany nanorészecskék képződésében fontos szerepe van a szintézis első lépését alkotó  $\text{Au}^{\text{III}}$  – dendrimer kölcsönhatásnak. Az  $\text{Au}^{\text{III}}$ -ionok ( $[\text{AuCl}_x(\text{OH})_{4-x}]^-$ ) jelenlétében, az egyre savasabb közegben csak a dendrimer külső protonjainak  $^1\text{H}$  NMR csúcsai mutattak kémiai eltolódás változást, a nagyobb árnyékoltság alapján pedig  $\text{N}_{(\text{P})}^+ - \text{Au}^{\text{III}}$  ionpár kialakulására következtettünk. A dendrimer stabilizált aranykolloidok képződését tehát nem előzi meg komplexképződés.

A kemoterapeutikumként számon tartott doxorubicin a diffúziometriás eredményeink alapján képes adduktumot képezni a különböző módon funkcionizált PAMAM dendrimerekkel (G5.Ac, G5.SAH, G5.GlyOH). Erősebb kölcsönhatást a G5.Ac és a G5.SAH dendrimerekkel tapasztaltunk. A szokásos kapszulázási reakciókörülmények között azonban viszonylag kevés DOX juttatható be a makromolekulákba.

Megállapítottuk, hogy a szabad és az arany nanorészecskét tartalmazó dendrimerek között gyors cserefolyamat áll fenn. Az átlagos diffúzió együttható értékekből, különböző dendrimer arany nanorészecske aránynál kiszámoltuk a hibrid nanorészecskék méretét. A hibrid részecskék 7-9 nm-es átmérője olyan struktúra kialakulásával magyarázható, melyben 3-4 dendrimer molekula fogja közre az arany nanorészecskéket. A minták  $^1\text{H}$  NMR spektrumai alapján megállapítható, hogy az arany nanorészecskével való kölcsönhatás a makromolekula külső protonjait érinti. Következtetésünk szerint a vizsgált hibrid nanorészecskék átmenetet képeznek a kapszulázott és sztérikusan stabilizált AuNP-k között.

A doktori munkám során elért eredmények hozzájárulhatnak a PAMAM dendrimerek különböző célú felhasználásaihoz, valamint bemutatják a legkülönbözőbb NMR módszerek alkalmazhatóságát kolloid rendszerek, polielektrolit jellegű makromolekulák vizsgálatára.

## 6 SUMMARY

Dendrimers have been in the center of interest since their discovery due to their symmetric and designable structure. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers have hydrophilic character and with the protonation of their primary and tertiary amino groups, the molecules can possess several positive charges. Because of the functional groups and the supposed cavities inside the macromolecule, PAMAM dendrimers are able to covalently or non-covalently bind drugs, nanoparticles, imaging and contrast agents and vector materials. It makes their extensive application in host-guest chemistry, medicine and catalytic chemistry possible. From this point of view the knowledge of the behavior of PAMAM dendrimers in aqueous solution and their interaction with different particles is a question of great importance.

The aim of our work was to study the characters of fifth generation PAMAM dendrimers with  $-NH_2$  terminal groups ( $G5.NH_2$ ) in solution and their interaction with the solvent ( $H_2O$ ), small ions ( $H_3O^+$ ,  $Au^{III}$ ,  $PO_4^{3-}$ ), molecules (doxorubicin) and colloids (gold nanoparticles, AuNP, of different size) in detail. As  $G5.NH_2$  is toxic, for the experiments with DOX functionalized dendrimers were used.

In our work, the protonation processes of the macromolecules and the interaction with phosphate ions were investigated with pH potentiometric titration. Different 1D and 2D NMR methods ( $^1H$ ,  $^{13}C$ ,  $^{15}N$  NMR and COSY, NOESY, HSQC, HMBC, DOSY) were used to characterize the structure of the dendrimer in aqueous solution and to get more insight into the interactions.

We performed the  $^1H$  NMR assignment of the protons being in the same chemical environment of the  $G5.NH_2$ , and determined that there are mistakes in the assignment in the literature. During a comprehensive NMR characterization we determined that the protons around the tertiary amines are close to each other in space according to the cross peaks in the NOESY spectrum showing dipolar coupling. Also the nitrogens of the dendrimer were assigned in the  $^{15}N$  NMR spectrum.

We investigated the supposed cavities in the structure of the dendrimers from a brand new point of view using NMR cryoporometry. We observed pores in the gel with 1.8 and  $\sim 2.6$  nm radii at 1000 water/dendrimer ratio. At 2000 and 3000 water/dendrimer ratio only the larger pores appeared. At the

largest (4000 H<sub>2</sub>O/G5.NH<sub>2</sub>) water content mainly the bulk water could have been detected. These results are in good accordance with the hydration number of 3700 of G5.NH<sub>2</sub>, published in our paper previously. According to diffusion experiments the wall of the pores are penetrable for water, and restricted diffusion characterizes the system. From the determined pore size and the size of the dendrimer molecule we determined that one cavity is defined by at least two dendrimers.

With pH potentiometric titration we could determine the group constant of the G5.NH<sub>2</sub> dendrimer for the primary ( $pK_{N(P)} = 8,9(2)$ ) and tertiary amines ( $pK_{N(T)} = 5,7(2)$ ) as well. The number of the protonated groups (119 tertiary and 123 primary amino groups) shows, that the structure of the macromolecule measures up to the theoretical structure. We carried out NMR titration experiments as well, and from the <sup>1</sup>H NMR chemical shifts of the protons near the tertiary and primary amines as a function of pH we found similar  $pK$  values ( $pK_{N(T)} = 5,76$  and  $5,96$ ;  $pK_{N(P)} = 8,7$ ) to the pH potentiometry.

A wide range of NMR and pH potentiometric experiments proved that phosphate ions are inside the dendrimer from about pH 6 to 7.5. They bind to the tertiary amines in the branching points supposedly by H-bonds and changes the size, structure and charge of the macromolecule. The bound amount of phosphate ions varies with pH and phosphate concentration. Below and above the mentioned pH range phosphates move together with the dendrimer, but they are outside and electrostatic interaction occurs with the protonated primary amines. From the duplication of <sup>1</sup>H NMR peaks and relaxation measurements we localized three zones (outer, transition and inner zones) in the dendrimer structure where protons behave differently.

In the synthesis of dendrimer templated gold nanoparticles the Au<sup>III</sup> ions-dendrimer interaction has an important role. In the presence of Au<sup>III</sup> ions ([AuCl<sub>x</sub>(OH)<sub>4-x</sub>]<sup>-</sup>) only the terminal protons of the G5.NH<sub>2</sub> dendrimer showed <sup>1</sup>H NMR chemical shift difference. On the basis of the higher shielding we concluded ion pair formation between the protonated primary amines and Au<sup>III</sup>-ions. Thus we found no complex formation before the formation of dendrimer templated gold nanoparticles.

Doxorubicin, a widely used chemotherapeutic agent, is able to form adduct with functionalized G5 PAMAM dendrimers according to our diffusion NMR results. Acetylated (G5.Ac), hydroxylated (G5.GlyOH) and



carboxylated (G5.SAH) dendrimers were investigated to eliminate the toxic effects of the terminal amino groups of G5.NH<sub>2</sub>. Under the conventional reaction conditions a relatively small amount of DOX can be encapsulated by the macromolecules.

We found fast exchange process between the free dendrimers and the bound dendrimers interacting with AuNPs. From the average diffusion coefficients we determined the size of the hybrid nanoparticles at different G5.NH<sub>2</sub>/AuNP ratio. We explained the size with a model of 3-4 dendrimer molecules surrounding and stabilizing the AuNP. The <sup>1</sup>H NMR spectra showed interaction in the outer part of the macromolecule. We discussed that the measured hybrid nanoparticles form a transition state between the encapsulated (DEN) and sterically stabilized (DSN) gold nanoparticles.

The achievements of my PhD thesis can contribute to the different utilizations of G5 PAMAM dendrimers. The results even show how a wide range of NMR methods can be used for the characterization of colloid systems and polyelectrolyte macromolecules.

## 7 TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

### **Az értekezés alapját képező publikációk:**

1. Mónika Kéri, Chen Peng, Xiangyang Shi and István Bányai  
NMR characterization of G5\_PAMAM.NH<sub>2</sub> entrapped atomic and molecular assemblies  
The Journal of Physical Chemistry B, 2015, *Epub változat, nyomtatás előtt* (IP:3,377)
2. Zhang M, Guo R, Kéri M, Bányai I, Zheng Y, Cao M, Cao X, Shi X  
Impact of dendrimer surface functional groups on the release of doxorubicin from dendrimer carriers.  
The Journal of Physical Chemistry B, 2014, 118 (6), 1696-706. (IP:3,377)

### **Az értekezésben nem tárgyalt közlemények:**

1. Mónika Kéri, László Palcsu, Marianna Túri, Enikő Heim, Andrea Cébely, István Bányai  
<sup>13</sup>C-NMR Analysis of Cellulose Samples of Different Preparation Methods  
Cellulose, 2015, *Revízió alatt*, (IP:3,476)
2. István Bányai, Mónika Kéri, Zoltán Nagy, Márta Berka and Lajos P. Balogh  
Self-diffusion of water and poly(amidoamine) dendrimers in dilute aqueous solutions  
Soft Matter, 2013, 9, 1645-1655 (IP: 4,151)
3. Kéri Mónika: Milyen halból főzzünk halászlevet? (Hortobágyi halastavakból vett halminták ICP analízise)  
Természet világa (Természettudományi Közlöny) 131.évf.8.sz. 2000
4. Kéri Mónika: A laboratórium régen és most  
Természet világa (Természettudományi Közlöny) 130.évf.6.sz. 1999

### **Poszterek:**

1. Zoltán Nagy\*, Mónika Kéri\*, István Bányai and Lajos Balogh  
PAMAM dendrimers in solution: Interactions with small molecules and ions  
10th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, ISABC,  
25-28 September, 2009, Debrecen, Hungary
2. István Bányai\*, Mónika Kéri\*, Zoltán Nagy, Márta Berka  
Dynamics and Hydration of PAMAM G5 dendrimers as PGSE NMR sees  
EUROMAR 2011 Conference, 21-25 August, 2011, Frankfurt am Main,  
Germany
3. Kéri Mónika\*, Dr. Ország István\*  
Az ivóvíz-tisztítási arzénos vasiszap ártalmatlanító technológiában képződő  
Ca<sub>10</sub>(As<sub>x</sub>P<sub>y</sub>O<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> (APHAP) jellemzése  
XI. Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai Konferencia, 2013. október  
2-4. Hajdúszoboszló
4. Kéri Mónika\*, Ország István\*, Horváth Szabolcs  
Ivóvíz-tisztítási arzénos vasiszap ártalmatlanító mobil technológia  
teljesítményoptimalása  
XI. Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai Konferencia, 2013. október  
2-4. Hajdúszoboszló

### **Előadások:**

1. Dr. Ország István\*, Kéri Mónika  
Ivóvíz arzénmentesítésének iszapkezelési és elhelyezési feladatai  
V. Regionális Innovációs Konferencia, 2009. május 22., Debrecen
2. Dr. Ország István, Kéri Mónika\*  
Az ivóvíz-tisztítási arzénos vasiszap ártalmatlanítása  
IX. Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai Konferencia,  
2009. október 7-9., Sopron
3. Kéri Mónika\*, Nagy Zoltán, Bányai István, Balogh Lajos  
PAMAM dendrimerek kölcsönhatása foszfát- és vanadátionokkal vizes  
oldatban  
MTA Kolloidkémiai és Anyagtudományi Munkabizottsági Ülés,  
2009. október 29-30., Mátrafüred

4. Bányai István\*, Kéri Mónika, Nagy Zoltán, Balogh Lajos  
Where are the phosphates in PAMAM\_NH2 dendrimers?  
Chemical Speciation in Solution and at Solid/Solution Interfaces,  
Symposium, 2010. szeptember 23-24., Umeå, Svédország
5. Kéri Mónika  
PAMAM dendrimerek kölcsönhatása foszfát- és vanadátionokkal vizes oldatban  
Doktoranduszok Fóruma, MTA Tudomány Napja konferencia sorozat,  
2010. november 4., Debrecen
6. Rácz András, Takács Anett, Kócs Tamara, Serra Bendegúz, Kéri Mónika, Tóth Imre, Bányai István\*  
Triklór-etilén oxidációja hidrogén-peroxiddal: katalízis vanádium komplexekkel  
MKE 1. Nemzeti Konferencia, 2011. május 22-25., Sopron
7. Prof István Bányai\*, Mónika Kéri, prof Lajos Peter Balogh  
Interaction of poly(amidoamine) dendrimers with small molecules in dilute aqueous solutions: Multinuclear NMR studies  
85th Colloid and Surface Science Symposium,  
2011. június 19-22. Montreal, Canada
8. Istvan Banyai\*, Monika Keri and Lajos P. Balogh  
Unexpected Dynamic Behavior of Hydrated Poly(Amidoamine) Dendrimers in Dilute Aqueous Solutions: Interaction with Small Molecules.  
7th International Dendrimer Symposium (IDS7),  
2011. június 26 - július 1, Gaithersburg, Maryland, USA
9. Kéri Mónika\*, Bányai István  
PAMAM dendrimerek kölcsönhatása foszfát- és vanadátionokkal vizes oldatban  
XXXIV. Kémiai Előadói Napok, 2011. november 2-4., Szeged
10. Bányai István\*, Kéri Mónika, Nagy Zoltán  
Unusual NMR methods for colloids  
2012. évi NMR Munkabizottsági Ülés, 2012. május 4-5., Balatonszemes
11. Mónika Kéri\*, Zoltán Nagy, Márta Berka, Krisztina László, István Bányai

Pore size distribution of RF polymer aerogels and gelated PAMAM dendrimer as seen by NMR cryoporosimetry

10th Conference on Colloid Chemistry, 2012. augusztus 29-31., Budapest

12. Bányai István\*, Nagy Zoltán, Kéri Mónika

Kolloidok a mágnesben: a szilárd- és folyadékfázis határán

2013. évi NMR Munkabizottsági Ülés, 2013. május 9-10., Pécs

13. István Bányai\*, Mónika Kéri, Krisztina László and Zoltán Nagy

Liquid NMR for solid state structures

DCIRM (Debrecen Colloquium on Inorganic Reaction Mechanisms),

2013. június. 11-15., Debrecen

14. M Kéri, C Peng, Z Nagy, X Shi, I Bányai\*

Cavities in G5\_PAMAM.NH2 Dendrimer. How do they exist?

8th International Dendrimer Symposium (IDS), 2013. június 23-27., Madrid

15. Mónika Kéri, Zoltán Nagy, István Bányai\*: Cavities in macromolecules: NMR cryoporometry approach

Mini - conference with Attila Szabo, 2014. június 20., Debrecen

16. Mónika Kéri\*, István Bányai, Zoltán Nagy

Dynamic interaction of phosphate ions with G5 PAMAM dendrimer

ECIRM (European Colloquium on Inorganic Reaction Mechanisms),

2014. június 17-20., Debrecen

17. Kéri Mónika\*, Xiangyang Shi, Nagy Zoltán, Bányai István

Arany kolloid kapszulázása dendrimerekben: nagy és kislebontású NMR vizsgálatok

MTA Kolloidkémiai Munkabizottsági Ülés, 2014. szeptember 25-26., Eger

18. Kéri Mónika\*, Bányai István

Porózus anyagok jellemzése NMR krioporozimetria és diffúziometria alkalmazásával

3. Környezetkémiai Szimpózium, 2014. október 9-10., Lajosmizse

\* az előadást illetve posztert bemutató személy

## 8 IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Aulenta, F.; Hayes, W.; Rannard, S., Dendrimers: a new class of nanoscopic containers and delivery devices. *Eur. Polym. J.* **2003**, *39*, 1741-1771.
2. Frechet, J. M. J., Dendrimers and other dendritic macromolecules: From building blocks to functional assemblies in nanoscience and nanotechnology. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **2003**, *41*, 3713-3725.
3. Klajnert, B.; Bryszewska, M., Dendrimers: properties and applications. *Acta Biochim. Pol.* **2001**, *48*, 199-208.
4. Scholl, M.; Kadlecova, Z.; Klok, H.-A., Dendritic and hyperbranched polyamides. *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 24-61.
5. Vögtle, F.; Richardt, G.; Werner, N., Introduction. In *Dendrimer Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2009; pp 1-24.
6. A. W. Bosman, H. M. J., and E. W. Meijer, About Dendrimers: Structure, Physical Properties, and Applications. *Chem. Rev.* **1999**, *1999*, 1665-1688.
7. Buhleier, E.; Wehner, W.; Vogtle, F., Cascade-Chain-Like And Nonskid-Chain-Like Sytnhese Of Molecular Cavity Topologies. *Synthesis* **1978**, 155-158.
8. Denkewalter, R. G.; Kolc, J.; Lukasavage, W. J. Surface modifying agents, metal chelating agents, substrates for drugs. **1981**.
9. Denkewalter, R. G.; Kolc, J.; Lukasavage, W. J. Preparation of lysine based macromolecular highly branched homogeneous compound. **1982**.
10. Denkewalter, R. G.; F., K. J.; Lukasavage, W. J. Macromolecular highly branched homogeneous compound **1983**.
11. Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P., A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym J* **1985**, *17*, 117-132.
12. Newkome, G. R.; Yao, Z. Q.; Baker, G. R.; Gupta, V. K., Micelles .1. Cascade molecules - A new approach to micelles - A 27 -Arborol. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2003-2004.
13. Wörner, C.; Mülhaupt, R., Polynitrile- and Polyamine-Functional Poly(trimethylene imine) Dendrimers. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1993**, *32*, 1306-1308.
14. de Brabander-van den Berg, E. M. M.; Meijer, E. W., Poly(propylene imine) Dendrimers: Large-Scale Synthesis by Heterogeneously Catalyzed Hydrogenations. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1993**, *32*, 1308-1311.

15. Hawker, C. J.; Frechet, J. M. J., Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7638-7647.
16. Moore, J. S.; Xu, Z., Synthesis of rigid dendritic macromolecules: enlarging the repeat unit size as a function of generation, permitting growth to continue. *Macromolecules* **1991**, *24*, 5893-5894.
17. Balogh, L., Dendrimer 101. In *Adv.Exp.Med.Biol.*, Chan, W. W., Ed. Springer New York: **2007**; Vol. 620, pp 136-155.
18. Tomalia, D. A.; Naylor, A. M.; Goddard, W. A., Starburst Dendrimers: Molecular-Level Control of Size, Shape, Surface Chemistry, Topology, and Flexibility from Atoms to Macroscopic Matter. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1990**, *29*, 138-175.
19. Vögtle, F.; Richardt, G.; Werner, N., Types of Dendrimers and their Syntheses. In *Dendrimer Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: **2009**; pp 81-167.
20. Ballauff, M.; Likos, C. N., Dendrimers in Solution: Insight from Theory and Simulation. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2004**, *43*, 2998-3020.
21. Naylor, A. M.; Goddard, W. A.; Kiefer, G. E.; Tomalia, D. A., Starburst dendrimers. 5. Molecular shape control. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2339-2341.
22. Prosa, T. J.; Bauer, B. J.; Amis, E. J.; Tomalia, D. A.; Scherrenberg, R., A SAXS study of the internal structure of dendritic polymer systems. *J. Polym. Sci. Pt. B-Polym. Phys.* **1997**, *35*, 2913-2924.
23. Prosa, T. J.; Bauer, B. J.; Amis, E. J., From stars to spheres: A SAXS analysis of dilute dendrimer solutions. *Macromolecules* **2001**, *34*, 4897-4906.
24. Stechemesser, S.; Eimer, W., Solvent-dependent swelling of poly(amido amine) starburst dendrimers. *Macromolecules* **1997**, *30*, 2204-2206.
25. Welch, P.; Muthukumar, M., Tuning the Density Profile of Dendritic Polyelectrolytes. *Macromolecules* **1998**, *31*, 5892-5897.
26. Meltzer, A. D.; Tirrell, D. A.; Jones, A. A.; Inglefield, P. T., Chain dynamics in poly(amidoamine) dendrimers: a study of proton NMR relaxation parameters. *Macromolecules* **1992**, *25*, 4549-4552.
27. S. Rosenfeldt, N. D., M. Ballauff, N. Werner, F. Vögtle, P. Lindner, Distribution of End Groups within a Dendritic Structure: A SANS Study Including Contrast Variation. *Macromolecules* **2002**, 8098-8105.
28. Maiti, P. K.; Cagin, T.; Wang, G.; Goddard, W. A., Structure of PAMAM dendrimers: Generations 1 through 11. *Macromolecules* **2004**, *37*, 6236-6254.

29. Opitz, A. W.; Wagner, N. J., Structural investigations of poly(amido amine) dendrimers in methanol using molecular dynamics. *J. Polym. Sci. Pol. Phys.* **2006**, *44*, 3062-3077.
30. Tomalia, D. A., Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 294-324.
31. Banyai, I.; Keri, M.; Nagy, Z.; Berka, M.; Balogh, L. P., Self-diffusion of water and poly(amidoamine) dendrimers in dilute aqueous solutions. *Soft Matter* **2013**, *9*, 1645-1655.
32. van Dongen, M. A.; Orr, B. G.; Holl, M. M. B., Diffusion NMR Study of Generation-Five PAMAM Dendrimer Materials. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 7195-7202.
33. Rosenfeldt, S.; Dingenouts, N.; Pötschke, D.; Ballauff, M.; Berresheim, A. J.; Müllen, K.; Lindner, P., Analysis of the Spatial Dimensions of Fully Aromatic Dendrimers. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2004**, *43*, 109-112.
34. Jansen, J. F. G. A.; de Brabander-van den Berg, E. M. M.; Meijer, E. W., Encapsulation of Guest Molecules into a Dendritic Box. *Science* **1994**, *266*, 1226-1229.
35. Chechik, V.; Zhao, M. Q.; Crooks, R. M., Self-assembled inverted micelles prepared from a dendrimer template: Phase transfer of encapsulated guests. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4910-4911.
36. Garcia, M. E.; Baker, L. A.; Crooks, R. M., Preparation and Characterization of Dendrimer–Gold Colloid Nanocomposites. *Anal. Chem.* **1998**, *71*, 256-258.
37. Gomez, M. V.; Guerra, J.; Myers, V. S.; Crooks, R. M.; Velders, A. H., Nanoparticle Size Determination by <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14634-14635.
38. Gomez, M. V.; Guerra, J.; Velders, A. H.; Crooks, R. M., NMR Characterization of Fourth-Generation PAMAM Dendrimers in the Presence and Absence of Palladium Dendrimer-Encapsulated Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *131*, 341-350.
39. Kim, Y.-G.; Oh, S.-K.; Crooks, R. M., Preparation and Characterization of 1–2 nm Dendrimer-Encapsulated Gold Nanoparticles Having Very Narrow Size Distributions. *Chem. Mater.* **2003**, *16*, 167-172.
40. Scott, R. W. J.; Wilson, O. M.; Crooks, R. M., Synthesis, Characterization, and Applications of Dendrimer-Encapsulated Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *109*, 692-704.
41. Vögtle, F.; Richardt, G.; Werner, N., (Special) Chemical Reactions of Dendritic Molecules. In *Dendrimer Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: **2009**; pp 195-252.



42. Balogh, L.; Tomalia, D. A., Poly(Amidoamine) Dendrimer-Templated Nanocomposites. 1. Synthesis of Zerovalent Copper Nanoclusters. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7355-7356.
43. Li, T.; Hong, K.; Porcar, L.; Verduzco, R.; Butler, P. D.; Smith, G. S.; Liu, Y.; Chen, W.-R., Assess the Intramolecular Cavity of a PAMAM Dendrimer in Aqueous Solution by Small-Angle Neutron Scattering. *Macromolecules* **2008**, *41*, 8916-8920.
44. Lee, I.; Athey, B. D.; Wetzel, A. W.; Meixner, W.; Baker, J. R., Structural Molecular Dynamics Studies on Polyamidoamine Dendrimers for a Therapeutic Application: Effects of pH and Generation. *Macromolecules* **2002**, *35*, 4510-4520.
45. Cakara, D.; Kleimann, J.; Borkovec, M., Microscopic Protonation Equilibria of Poly(amidoamine) Dendrimers from Macroscopic Titrations. *Macromolecules* **2003**, *36*, 4201-4207.
46. Böhme, U.; Klenge, A.; Hänel, B.; Scheler, U., Counterion Condensation and Effective Charge of PAMAM Dendrimers. *Polymers* **2011**, *3*, 812-819.
47. Lin, S.-T.; Maiti, P. K.; Goddard, W. A., Dynamics and thermodynamics of water in PAMAM dendrimers at subnanosecond time scales. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 8663-8672.
48. Maiti, P. K.; Çağın, T.; Lin, S.-T.; Goddard, W. A., Effect of Solvent and pH on the Structure of PAMAM Dendrimers. *Macromolecules* **2005**, *38*, 979-991.
49. Maiti, P. K.; Goddard, W. A., Solvent quality changes the structure of G8 PAMAM dendrimer, a disagreement with some experimental interpretations. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 25628-25632.
50. Liu, Y.; Bryantsev, V. S.; Diallo, M. S.; Goddard Iii, W. A., PAMAM Dendrimers Undergo pH Responsive Conformational Changes without Swelling. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2798-2799.
51. Chen, W.-R.; Porcar, L.; Liu, Y.; Butler, P. D.; Magid, L. J., Small Angle Neutron Scattering Studies of the Counterion Effects on the Molecular Conformation and Structure of Charged G4 PAMAM Dendrimers in Aqueous Solutions. *Macromolecules* **2007**, *40*, 5887-5898.
52. Juan, J. F.; Pavlos, E.; Amirhossein, A., Simulation study of the G=4 PAMAM dendrimer in water at different pH conditions. *Period. Polytech.-Chem. Eng.* **2014**, *58*, 49-53.
53. Manning, G. S., Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions I. Colligative Properties. *J. Chem. Phys.* **1969**, *51*, 924-933.
54. Kłos, J. S.; Sommer, J. U., Simulations of Terminally Charged Dendrimers with Flexible Spacer Chains and Explicit Counterions. *Macromolecules* **2010**, *43*, 4418-4427.

55. Zhang, H.; Dubin, P. L.; Kaplan, J.; Moorefield, C. N.; Newkome, G. R., Dissociation of Carboxyl-Terminated Cascade Polymers: Comparison with Theory. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 3494-3497.
56. Maiti, P. K.; Messina, R., Counterion distribution and zeta-potential in PAMAM dendrimer. *Macromolecules* **2008**, *41*, 5002-5006.
57. Huang, Q. R.; Dubin, P. L.; Moorefield, C. N.; Newkome, G. R., Counterion Binding on Charged Spheres: Effect of pH and Ionic Strength on the Mobility of Carboxyl-Terminated Dendrimers. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 898-904.
58. Gurtovenko, A.; Lyulin, S.; Karttunen, M.; Vattulainen, I., Molecular dynamics study of charged dendrimers in salt-free solution: Effect of counterions. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*.
59. Kłos, J. S.; Sommer, J. U., Simulations of Dendrimers with Flexible Spacer Chains and Explicit Counterions under Low and Neutral pH Conditions. *Macromolecules* **2010**, *43*, 10659-10667.
60. Blaak, R.; Lehmann, S.; Likos, C. N., Charge-induced conformational changes of dendrimers. *Macromolecules* **2008**, *41*, 4452-4458.
61. Hong, S.; Bielinska, A. U.; Mecke, A.; Keszler, B.; Beals, J. L.; Shi, X.; Balogh, L.; Orr, B. G.; Baker, J. R.; Banaszak Holl, M. M., Interaction of Poly(amidoamine) Dendrimers with Supported Lipid Bilayers and Cells: Hole Formation and the Relation to Transport. *Bioconjug Chem* **2004**, *15*, 774-782.
62. Duncan, R.; Izzo, L., Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2005**, *57*, 2215-2237.
63. Jevprasesphant, R.; Penny, J.; Jalal, R.; Attwood, D.; McKeown, N. B.; D'Emanuele, A., The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int. J. Pharm.* **2003**, *252*, 263-266.
64. Ziemba, B.; Matuszko, G.; Bryszewska, M.; Klajnert, B., Influence of dendrimers on red blood cells. *Cell Mol Biol Lett* **2012**, *17*, 21-35.
65. Chen, H.-T.; Neerman, M. F.; Parrish, A. R.; Simanek, E. E., Cytotoxicity, Hemolysis, and Acute in Vivo Toxicity of Dendrimers Based on Melamine, Candidate Vehicles for Drug Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10044-10048.
66. Kim, Y.; Klutz, A. M.; Jacobson, K. A., Systematic Investigation of Polyamidoamine Dendrimers Surface-Modified with Poly(ethylene glycol) for Drug Delivery Applications: Synthesis, Characterization, and Evaluation of Cytotoxicity. *Bioconjug Chem* **2008**, *19*, 1660-1672.
67. Kolhatkar, R. B.; Kitchens, K. M.; Swan, P. W.; Ghandehari, H., Surface Acetylation of Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimers Decreases Cytotoxicity while Maintaining Membrane Permeability. *Bioconjug Chem* **2007**, *18*, 2054-2060.

68. Majoros, I. J.; Myc, A.; Thomas, T.; Mehta, C. B.; Baker, J. R., PAMAM Dendrimer-Based Multifunctional Conjugate for Cancer Therapy: Synthesis, Characterization, and Functionality. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 572-579.
69. Shi, X.; Wang, S.; Sun, H.; Baker, J. R., Improved biocompatibility of surface functionalized dendrimer-entrapped gold nanoparticles. *Soft Matter* **2007**, *3*, 71-74.
70. Tziveleka, L.-A.; Psarra, A.-M. G.; Tsiourvas, D.; Paleos, C. M., Synthesis and characterization of guanidinylated poly(propylene imine) dendrimers as gene transfection agents. *J. Control. Release* **2007**, *117*, 137-146.
71. Malik, N.; Wiwattanapatapee, R.; Klopsch, R.; Lorenz, K.; Frey, H.; Weener, J.; Meijer, E.; Paulus, W.; Duncan, R., Dendrimers:: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J. Control. Release* **2000**, *65*, 133-148.
72. Morgan, M. T.; Nakanishi, Y.; Kroll, D. J.; Griset, A. P.; Carnahan, M. A.; Wathier, M.; Oberlies, N. H.; Manikumar, G.; Wani, M. C.; Grinstaff, M. W., Dendrimer-encapsulated camptothecins: Increased solubility, cellular uptake, and cellular retention affords enhanced anticancer activity in vitro. *Cancer Research* **2006**, *66*, 11913-11921.
73. Gillies, E. R.; Fréchet, J. M. J., Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 35-43.
74. Patri, A. K.; Kukowska-Latallo, J. F.; Baker Jr, J. R., Targeted drug delivery with dendrimers: Comparison of the release kinetics of covalently conjugated drug and non-covalent drug inclusion complex. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2005**, *57*, 2203-2214.
75. Muggia, F. M., Doxorubicin-Polymer Conjugates: Further Demonstration of the Concept of Enhanced Permeability and Retention. *Clin. Canc. Res.* **1999**, *5*, 7-8.
76. Wang, Y.; Guo, R.; Cao, X.; Shen, M.; Shi, X., Encapsulation of 2-methoxyestradiol within multifunctional poly(amidoamine) dendrimers for targeted cancer therapy. *Biomaterials* **2011**, *32*, 3322-3329.
77. Bakshi, M.; Sood, R.; Ranganathan, R.; Shin, P., ESR and NMR studies of poly (amidoamine) dendrimers with ionic surfactants in different media. *Colloid Polym Sci* **2005**, *284*, 58-65.
78. Islam, M. T.; Majoros, I. J.; Baker Jr, J. R., HPLC analysis of PAMAM dendrimer based multifunctional devices. *J. Chrom. B* **2005**, *822*, 21-26.
79. Choi, S. K.; Thomas, T. P.; Leroueil, P. R.; Kotlyar, A.; Van Der Spek, A. F. L.; Baker, J. R., Specific and Cooperative Interactions

- between Oximes and PAMAM Dendrimers as Demonstrated by  $^1\text{H}$  NMR Study. *J. Phys. Chem. B* **2012**.
80. Wang, T.; Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M., Applications of NMR spectral techniques for the study of macrocycle host-organic guest interactions. A short review. *J. Heterocycl. Chem.* **1994**, *31*, 1097-1114.
81. Kálmán, F. K.; Baranyai, Z.; Tóth, I.; Bányai, I.; Király, R.; Brücher, E.; Aime, S.; Sun, X.; Sherry, A. D.; Kovács, Z., Synthesis, Potentiometric, Kinetic, and NMR Studies of 1, 4, 7, 10-Tetraazacyclododecane-1, 7-bis (acetic acid)-4, 10-bis (methylenephosphonic acid)(DO2A2P) and its Complexes with Ca (II), Cu (II), Zn (II) and Lanthanide (III) Ions. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 3851-3862.
82. Chandra, S.; Dietrich, S.; Lang, H.; Bahadur, D., Dendrimer-Doxorubicin conjugate for enhanced therapeutic effects for cancer. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 5729-5737.
83. Hu, J.; Cheng, Y.; Wu, Q.; Zhao, L.; Xu, T., Host-Guest Chemistry of Dendrimer-Drug Complexes. 2. Effects of Molecular Properties of Guests and Surface Functionalities of Dendrimers. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 10650-10659.
84. Hrubý, M.; Koňák, Č.; Ulbrich, K., Polymeric micellar pH-sensitive drug delivery system for doxorubicin. *J. Control. Release* **2005**, *103*, 137-148.
85. Wang, Y.; Cao, X.; Guo, R.; Shen, M.; Zhang, M.; Zhu, M.; Shi, X., Targeted delivery of doxorubicin into cancer cells using a folic acid-dendrimer conjugate. *Polymer Chem.* **2011**, *2*, 1754-1760.
86. Wang, Y.; Wang, R.; Lu, X.; Lu, W.; Zhang, C.; Liang, W., Pegylated Phospholipids-Based Self-Assembly with Water-Soluble Drugs. *Pharm Res* **2010**, *27*, 361-370.
87. Wang, H.; Zheng, L.; Guo, R.; Peng, C.; Shen, M.; Shi, X.; Zhang, G., Dendrimer-entrapped gold nanoparticles as potential CT contrast agents for blood pool imaging. *Nanoscale Res Lett* **2012**, *7*, 1-8.
88. Shukla, R.; Bansal, V.; Chaudhary, M.; Basu, A.; Bhone, R. R.; Sastry, M., Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate Inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview. *Langmuir* **2005**, *21*, 10644-10654.
89. Shi, X.; Wang, S.; Meshinchi, S.; Van Antwerp, M. E.; Bi, X.; Lee, I.; Baker, J. R., Dendrimer-Entrapped Gold Nanoparticles as a Platform for Cancer-Cell Targeting and Imaging. *Small* **2007**, *3*, 1245-1252.
90. Ornelas, C.; Salmon, L.; Ruiz Aranzaes, J.; Astruc, D., Catalytically efficient palladium nanoparticles stabilized by "click" ferrocenyl dendrimers. *Chem. Comm.* **2007**, 4946-4948.

91. Gröhn, F.; Bauer, B. J.; Akpalu, Y. A.; Jackson, C. L.; Amis, E. J., Dendrimer Templates for the Formation of Gold Nanoclusters. *Macromolecules* **2000**, *33*, 6042-6050.
92. Hoffman, L. W.; Andersson, G. G.; Sharma, A.; Clarke, S. R.; Voelcker, N. H., New Insights into the Structure of PAMAM Dendrimer/Gold Nanoparticle Nanocomposites. *Langmuir* **2011**, *27*, 6759-6767.
93. Dékány, I., A kolloidkémiaiából a nantechnológiába. <http://www.kfki.hu/~cheminfo/osztaly/szekfoglalo/dekany2.pdf> **2007**.
94. Shan, Y.; Luo, T.; Peng, C.; Sheng, R.; Cao, A.; Cao, X.; Shen, M.; Guo, R.; Tomas, H.; Shi, X., Gene delivery using dendrimer-entrapped gold nanoparticles as nonviral vectors. *Biomaterials* **2012**, *33*, 3025-3035.
95. Shi, X.; Sun, K.; Baker, J. R., Spontaneous Formation of Functionalized Dendrimer-Stabilized Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 8251-8258.
96. Hoffman, L. W., Synthesis and characterization of gold nanoparticles in poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimer and potential therapeutic applications. *PhD Thesis* **2010**, Faculty of Science and Engineering of the Flinders University, Adelaide, South Australia.
97. Zhang, M.; Guo, R.; Kéri, M.; Bányai, I.; Zheng, Y.; Cao, M.; Cao, X.; Shi, X., Impact of Dendrimer Surface Functional Groups on the Release of Doxorubicin from Dendrimer Carriers. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 1696-1706.
98. Ammann, C.; Meier, P.; Merbach, A. E., A Simple Multi-Nuclear NMR Thermometer. *J. Magn. Reson.* **1982**, *46*, 319-321.
99. Thomas, W. A., Unravelling molecular structure and conformation—the modern role of coupling constants. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **1997**, *30*, 183-207.
100. Siegmara Braun, H.-O. K., Stefan Berger, 100 and More Basic NMR Experiments: A Practical Course. *Wiley VCH* **1996**.
101. Stejskal, E. O.; Tanner, J. E., Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *J. Chem. Phys.* **1965**, *42*, 288-292.
102. Mills, R., Self-diffusion in normal and heavy water in the range 1-45.deg. *J. Phys. Chem.* **1973**, *77*, 685-688.
103. Petrov, O. V.; Furó, I., NMR cryoporometry: Principles, applications and potential. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **2009**, *54*, 97-122.
104. Glasoe, P. K.; Long, F. A., Use of Glass Electrodes to Measure Acidities in Deuterium Oxide<sup>1,2</sup>. *J. Phys. Chem.* **1960**, *64*, 188-190.
105. Spectral Database for Organic Compounds, SDBS [http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre\\_index.cgi](http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi).

106. Strange, J. H.; Rahman, M.; Smith, E. G., Characterization of porous solids by NMR. *Phys. Rev. Let.* **1993**, *71*, 3589-3591.
107. Petrov, O.; Furó, I., A study of freezing–melting hysteresis of water in different porous materials. Part I: Porous silica glasses. *Micropor. Mesopor. Mat.* **2011**, *138*, 221-227.
108. Cho, C.-H.; Hong, Y.-S.; Kang, K.; Volkov, V. I.; Skirda, V.; Lee, C.-Y. J.; Lee, C.-H., Water self-diffusion in chlorella sp. studied by pulse field gradient NMR. *Magn. Res. Imaging* **2003**, *21*, 1009-1017.
109. Valiullin, R.; Skirda, V., Time dependent self-diffusion coefficient of molecules in porous media. *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 452-458.
110. Latour, L. L.; Svoboda, K.; Mitra, P. P.; Sotak, C. H., Time-dependent diffusion of water in a biological model system. *Proc. Nat. Ac. Sci.* **1994**, *91*, 1229-1233.
111. Ramirez-Gualito, K. E.; Berger, S., Determination of the Molecular Recognition Site of Phosphatases. The Use of the NMR Through the System  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ . *Euromar 2011 Conference* **2011**.
112. Elding L.I., G. A.-B., Kinetics, Mechanism and Equilibria for Halide Substitution Processes of Chloro Bromo Complexes of Gold(III). *Act. Chem. Scand. A* **1978**, *32*, 867-877.
113. Shukla, R.; Thomas, T. P.; Peters, J.; Kotlyar, A.; Myc, A.; Baker, J. J. R., Tumor angiogenic vasculature targeting with PAMAM dendrimer-RGD conjugates. *Chem. Comm.* **2005**, 5739-5741.
114. Lippens, R. M.; Cerf, C.; Hallenga, K., Theory and experimental results of transfer-NOE experiments. 1. The influence of the off rate versus cross-relaxation rates. *J. Magn. Res. (1969)* **1992**, *99*, 268-281.
115. Beijnen, J. H.; van der Houwen, O. A. G. J.; Underberg, W. J. M., Aspects of the degradation kinetics of doxorubicin in aqueous solution. *Int. J. Pharm.* **1986**, *32*, 123-131.
116. Shi, X.; Lesniak, W.; Islam, M. T.; Muñiz, M. C.; Balogh, L. P.; Baker Jr, J. R., Comprehensive characterization of surface-functionalized poly(amidoamine) dendrimers with acetamide, hydroxyl, and carboxyl groups. *Colloid. Surface.A* **2006**, *272*, 139-150.
117. Sturgeon, R. J.; Schulman, S. G., Electronic absorption spectra and protolytic equilibria of doxorubicin: Direct spectrophotometric determination of microconstants. *J. Pharm. Sci.* **1977**, *66*, 958-961.
118. Kwon, G. S.; Kataoka, K., Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **1995**, *16*, 295-309.
119. Gabizon, A.; Chemla, M.; Tzemach, D.; Horowitz, A. T.; Goren, D., Liposome Longevity and Stability in Circulation: Effects on the in vivo Delivery to Tumors and Therapeutic Efficacy of Encapsulated Anthracyclines. *J. Drug Target.* **1996**, *3*, 391-398.

120. Wang, H.; Zheng, L.; Peng, C.; Guo, R.; Shen, M.; Shi, X.; Zhang, G., Computed tomography imaging of cancer cells using acetylated dendrimer-entrapped gold nanoparticles. *Biomaterials* **2011**, *32*, 2979-2988.
121. Guo, R.; Wang, H.; Peng, C.; Shen, M.; Pan, M.; Cao, X.; Zhang, G.; Shi, X., X-ray Attenuation Property of Dendrimer-Entrapped Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *114*, 50-56.
122. Greenwood N. N. , E. A., *Chem. of the Elements*. 1997.
123. Lu, Y.; Wang, L.; Chen, D.; Wang, G., Determination of the Concentration and the Average Number of Gold Atoms in a Gold Nanoparticle by Osmotic Pressure. *Langmuir* **2012**, *28*, 9282-9287.
124. Ackerson, C. J.; Jadzinsky, P. D.; Sexton, J. Z.; Bushnell, D. A.; Kornberg, R. D., Synthesis and bioconjugation of 2 and 3 nm-diameter gold nanoparticles. *Bioconjug Chem.* **2010**, *21*, 214-218.
125. Nesselova, I. V.; Fedotov, V. D., Self-diffusion and self-association of lysozyme molecules in solution. *BBA Protein Struct. M.* **1998**, *1383*, 311-316.
126. Ramzi, A.; Scherrenberg, R.; Brackman, J.; Joosten, J.; Mortensen, K., Intermolecular interactions between dendrimer molecules in solution studied by small-angle neutron scattering. *Macromolecules* **1998**, *31*, 1621-1626.
127. Levay, B., Studies on self-association equilibria by self-diffusion measurements. *J. Phys. Chem.* **1973**, *77*, 2118-2121.
128. Myers, V. S.; Weir, M. G.; Carino, E. V.; Yancey, D. F.; Pande, S.; Crooks, R. M., Dendrimer-encapsulated nanoparticles: New synthetic and characterization methods and catalytic applications. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1632-1646.