

Введение Разветвленные полимеры, благодаря способности к самоорганизации, привлекают интерес исследователей не только как интересные объекты фундаментальных исследований, но и как перспективные функциональные материалы нового поколения [1-6]. Уникальные физико-химические свойства таких соединений обусловлены возможностями целенаправленного регулирования их структуры еще на стадии синтеза [7]. Поведение разветвленных полимерных систем в растворе обусловлено параметрами исходной архитектуры макромолекул, а именно количеством разветвлений, расстоянием между ними, их длиной, химической природой компонентов сложной макромолекулы, которая определяет гибкость макроцепей, их отзыв на различные внешние факторы (качество растворителя, температура и т.д.) [7]. Отличие в химической природе блоков привитых цепей может способствовать их разделению на макроуровне [8]. Для разветвленных полиэлектролитов количество переменных параметров, влияющих на структуру макромолекулы, существенно увеличивается по сравнению с их неионогенными аналогами [9-14]. Конформационные изменения, которые приводят к изменениям размера, компактности макромолекул, дополнительно контролируются pH среды, ионной силой раствора, что расширяет спектр их использования как умных материалов ("smart materials"). Теоретические [7-14] и экспериментальные [3-6, 15-18] исследования молекулярной структуры разветвленных полимеров, позволяют рассматривать их как наноструктурированные полимерные системы [7, 18-19]. Особенное внимание теоретиков привлекают полимерные щетки – это физическая модель разветвленного полимера с большим количеством привитых цепей. Полимерные щетки, как особый класс, были впервые описаны в работах лауреата Нобелевской премии P.G. de Gennes [20-21] в 80-х годах прошлого столетия. Интенсивные теоретические исследования разветвленных полимерных систем продолжаются до наших дней [7-14]. Большинство реальных разветвленных полимеров являются более сложными системами, чем теоретические модели, поэтому апробация теории часто проводится на самих простых реальных системах – звездообразных полимерах. Их можно рассматривать как сферические полимерные щетки. В теоретических работах показано, что при увеличении количества "лучей" в звездообразной молекуле от 3 к 270, компактность макромолекулы увеличивается настолько, что макромолекула напоминает твердую сферу, а конформация привитых цепей изменяется от практически статистической к максимально вытянутой [1, 9-12]. Целью представленного исследования было получение разветвленных водорастворимых сополимеров с узким молекулярно-массовым распределением, отвечающих теоретической модели сферической полимерной щетки, при варьировании количества прививок, а также исследование их молекулярной структуры в разбавленных растворах с акцентом на перспективу их применения в нанотехнологиях. Экспериментальная часть

Разветвленные сополимеры

синтезировали методом радикальной привитой полимеризации с использованием окислительно-восстановительной системы Ce(IV)/HNO_3 . Полиакриламид прививали на сертифицированные Декстраны разной молекулярной массы производства Serva с характеристиками $M_w = 2 \cdot 10^4$ та $M_w = 7 \cdot 10^4$ г/моль (далее Д20 и Д70, соответственно). Церий аммоний нитрат от Aldrich использовали как инициатор реакции. Акриламид (АА) от Reanal дважды перекристализовывали из хлороформа перед использованием. Полиакриламид (ПАА), синтезированный с использованием Ce(IV) использовали для сравнительных исследований. Для идентификации синтезованных образцов и определения их молекулярных параметров использовали ^1H ЯМР-спектроскопию, гель-проникающую хроматографию (SEC) и вискозиметрию. ^1H ЯМР спектры записывали на спектрометре Gemini-200BB (200 МГц). SEC анализ был проведен с использованием мультidetекторного прибора, состоящего из насоса LC-10AD SHIMADZU (скорость потока 0,5 мл/мин), автоматического инжектора WISP 717+ from WATERS, 3 колонок 30 cm-Shodex OH-pak (803HQ, 804HQ, 806HQ), мультиуглового детектора рассеивания света (LS) Down HELEOS від WYATT TECHNOLOGY и дифференционного рефрактометра R410 от WATERS (Rf). Как элюент использовали 0,1М раствор NaNO_3 . Молекулярную массу (LS детектор) сополимеров проводили по методу Зимма [22], используя инкремент показателя преломления $\frac{dn}{dc}$ для ПАА, так как по условиям синтеза, содержание декстрановой копоненты в образцах не превышала около 5 %, более того $\frac{dn}{dc}$ для декстрана и ПАА близкие по величине [22]. Характеристическую вязкость определяли вискозиметрическим методом при $298,0 \pm 0,1$ К с использованием вискозиметра Оствальда. Результаты анализировали согласно уравнению Хаггинса [23]: Разветвленные полиэлектролиты были получены щелочным гидролизом синтезованных сополимеров и линейного ПАА по схеме: Пробы образцов отбирали в процессе гидролиза через 7,5; 15; 30 и 60 мин. Содержание карбоксилатных групп в составе макромолекулы модифицированного сополимера определяли потенциометрическим титрованием [24]. Анионные производные переводили в Н-форму ($\text{pH} = 2$), потом титровали раствором NaOH . Используя значение $\frac{dn}{dc}$, а также молекулярную массу Д-ПАА и ПАА, определенную методом SEC-LS, рассчитывали степень конверсии неионогенных образцов Д-ПАА и ПАА в ионную форму по формуле: где $n_{\text{ПАА}}$ – количество акриламидных звеньев в навеске полимера (моль/г). Синтез привитых сополимеров Д-ПАА Декстран растворяли в воде (молярная концентрация была одинаковой для всех синтезов). Для удаления кислорода через раствор пропускали аргон, потом вводили рассчитанное количество инициатора. Акриламид прибавляли через 20 мин. после введения инициатора, согласно исследованиям по оптимизации методики синтеза [25]. Известно, что Ce(IV) выступает в роли окислителя полисахарида [26, 27]. Результат реакции окисления-восстановления - образование свободных радикалов на

полисахаридной цепи. Варьируя соотношение инициатор / основа можно регулировать число привитых цепей [28]. Мольное соотношение N соответствует теоретическому количеству прививок. В представленной работе $N = 5; 10; 15$ та 20 . Количество акриламида, которое вводили в реакционную смесь, было одинаковым для всех синтезов. Полученные сополимеры в дальнейшем обозначены, как Д20-ПААН и Д70-ПААН.

Сравнительный анализ хроматограмм и 1H ЯМР спектров позволил сделать вывод, что были синтезированы сополимеры без примеси гомополимера. Синтез наночастиц серебра Наночастицы серебра синтезировали *in situ* в матрицах линейного полиакриламида и разветвленных сополимеров Д-ПААН при $20^\circ C$ по методике: 0.25 мл $0.3M$ $AgNO_3$ добавляли к 5 мл водного раствора полимера ($C=0.5$ г/л) и перемешивали 20 мин. Потом вводили 5 мл $0.1 M$ $NaBH_4$. Образование наночастичек идентифицировали за появлением темно-коричневого цвета раствора. Для синтеза использовали полимерные матрицы в ионной и неионной формах. $AgNO_3$ та $NaBH_4$ от Aldrich использовали без дополнительной очистки. UV-Vis спектры золей серебра снимали с использованием Varian Cary 50 Scan UV-Visible спектрофотометра. Идентификацию наночастиц и определение их размера проводили с использованием просвечивающего электронного микроскопа (TEM) JEOL (Japan) Jem-1000CXII. Образцы готовили распылением разбавленного золя на медной сетке. Результаты и обсуждение В таблице 1 представлены молекулярные параметры сополимеров, определенные методом SEC-LS-Rf. Концентрации, используемые для характеристики образцов методом SEC-LS-Rf, были на порядок ниже концентрации кроссовера C^* , поэтому молекулярные параметры, представленные в таблице 1, отвечают молекулярным параметрам индивидуальных макромолекул. Анализируя таблицу 1, можно заметить, что $Mw_{Д-ПАА5} > Mw_{Д-ПАА10} > Mw_{Д-ПАА15} > Mw_{Д-ПАА20}$ для обеих серий сополимеров. Известно [26], что ионы $Ce(IV)$ восстанавливаются до $Ce(III)$ с образованием радикалов на звеньях декстрана либо с его гибелью (реакция обрыва цепи). Обрыв на цепях ПАА, которые растут, происходит тем эффективнее, чем больше начальная концентрация ионов $Ce(IV)$. Таким образом, при увеличении концентрации $Ce(IV)$ в системе (для увеличения количества прививок) происходит уменьшение молекулярной массы сополимеров. Таблица 1 – Молекулярные параметры сополимеров Д-ПАА, определенные методом SEC-LS-Rf и вискозиметрии

Образец	$Mw \times 10^{-6}$	Rg, nm	Mw/Mn	$[\eta], dl/g$	$n, \%$
Д70-ПАА5	2,15	85	1,72	4,77	3,36
Д70-ПАА10	1,70	71	1,66	3,68	4,29
Д70-ПАА15	1,57	67	1,81	3,59	4,67
Д70-ПАА20	1,43	64	1,98	2,50	5,15
Д20-ПАА5	1,60	67	1,63	1,25	1,27
Д20-ПАА10	0,95	51	1,62	1,98	2,15
Д20-ПАА15	0,77	46	1,81	1,46	2,67
Д20-ПАА20	0,94	50	1,67	1,52	2,17
ПАА	1,4	68	2,40	-	-

- При сравнении молекулярных параметров сополимеров серии Д20-ПАА та Д70-ПАА видно, что значения Mw для образцов Д20-ПАА ниже, чем для Д70-ПАА (табл.1). Это еще раз подтверждает вывод [25],

сделанный нами для похожих систем, что декстран в процессе сополимеризации сохраняет конформацию компактного клубка. Нельзя исключать наличие внутримолекулярных сшивок внутри декстранового клубка в процессе инициирования реакции, что не позволяет макромолекуле разворачиваться в процессе роста привитых цепей, как это было показано в теоретических работах [29]. Очевидно, что доступность ОН-групп макромолекулы декстрана для ионов Ce(IV) и мономера АА разная внутри и на поверхности макроклубка. Количество доступных "поверхностных" ОН- групп будет больше для Д70, чем для Д20, что связано с размерами макроклубка. Учитывая содержание полисахаридной компоненты в сополимерах (n, %) (табл. 1), а также то, что декстран сохраняет конформацию компактного клубка в процессе синтеза, можно сделать вывод о том, что сополимеры Д-ПАА отвечают теоретической модели сферической полимерной щетки [7] с декстрановым ядром и ПАА привитыми цепями и являются звездообразными полимерами. В теоретических работах показано, что разветвленные полимерные системы более компактны по сравнению с из линейными аналогами [2, 8]. Компактность разветвленных макромолекул можно оценить по параметру R_g^2/M_w [29] (табл.1). Чем больше значение R_g^2/M_w , тем меньше компактность макромолекулярного клубка. На рис. 1 представлена зависимость R_g^2/M_w от M_w . Как для систем Д20-ПАА, так и для Д70-ПАА, компактность увеличивается с увеличением количества привитых цепей. Но для Д70-ПАА значение тангенса угла наклона зависимости $R_g^2/M_w = f(M_w)$ в четыре раза больше, чем для систем Д20-ПАА (рис. 1). Таким образом, на компактность макромолекулярного клубка сополимеров Д70-ПАА влияют 2 фактора - конформация привитых цепей и их количество, а для сополимеров серии Д20-ПАА, очевидно, только количество. Этот вывод подтверждают результаты, опубликованные нами раньше [28], о том, что для сополимера Д20-ПАА с 6 привитыми цепями, их конформация приближается к червякообразной, а для Д70-ПАА - грибообразной. Полученные результаты согласуются с выводами, сделанными для теоретической модели полимерной щетки о факторах, которые определяют компактность ее структуры. Рис. 1 - Зависимость R_g^2/M_w^{103} от M_w для сополимеров Д20-ПАА и Д70-ПАА. Для подтверждения разной структуры синтезированных разветвленных полимеров, был проведен гидролиз разветвленных сополимеров и линейного ПАА в одинаковых условиях. Очевидно, разная компактность макроклубков должна влиять на процесс прохождения гидролиза, а именно на степень превращения карбамидных групп в карбоксилатные. Степень конверсии образцов от времени гидролиза представлена в таблице 2. Степень конверсии значительно выше для разветвленных сополимеров в сравнении с линейным ПАА. С увеличением количества прививок степень конверсии увеличивается. Таблица 2 - Степень конверсии неионогенных со полимеров: Д20-ПАА, Д70-ПАА и ПАА при разном времени гидролиза

Образец	А, %	Время гидролизу, мин.	7.5	15	30	60	Д70-ПАА5
Д20-ПАА							
Д70-ПАА							
ПАА							

27 32 35 43 Д70-ПАА20 33 34 37 52 Д20-ПАА5 19 31 35 40 Д20-ПАА20 20 21 36 50

ПАА - 21 28 34 Очевидно, это связано с увеличением компактности макроклубка, а значит с более высокой локальной концентрацией функциональных групп в разветвленной макромолекуле. Перспективы использования разветвленных сополимеров Д-ПАА в нанотехнологиях Одним из методов получения стабильных золей серебра является восстановление ионов серебра в присутствии полимерной матрицы [29 - 31]. Известно, что условия синтеза и химическая природа полимерной матрицы могут влиять на размер и стабильность золя. В качестве полимерных матриц в большинстве случаев используются линейные и природные полимеры, и только в последние годы начали появляться работы по использованию блок-сополимеров и полимеров нелинейного строения. Целью представленного исследования было сравнение эффективности полимерных матриц одной химической природы линейного и нелинейного строения для *in situ* синтеза наночастиц серебра. На рис. 2 представлены результаты исследования золей серебра, синтезированных в разветвленных полимерных матрицах разной компактности и в линейном ПАА. Рис. 2 – UV-Vis спектры золей Ag, синтезированных в матрицах: 1 – Д70-ПАА5, 2 – Д20-ПАА5, 3 – ПАА, 4 – Д70-ПАА5ан, 5 – Д20-ПАА5ан, 6 – ПААан. $\frac{[AA\text{ мономер}]}{[Ag^+]} = 5$ При соотношении $\frac{[AA\text{ мономер}]}{[Ag^+]} = 5$ нет выраженного различия золей, полученных в линейной и разветвленных матрицах в неионной форме. Но для анионных полимерных матриц оптическая плотность золя Ag значительно ниже в сравнении с неионными образцами и наблюдается различие между разветвленной и линейной матриц. В анионной разветвленной матрице наблюдалось появление незначительного количества осадка через 2-3 дня после синтеза, в дальнейшем система оставалась стабильной на протяжении 24 месяцев. Для анионного линейного ПАА стабильная коллоидная система не была получена, все серебро выпадало в осадок. В UV-Vis спектрах золей Ag, полученных в Д70-ПАА5ан матрице, проявляется сдвиг максимума плазмонного резонанса в низковолновую область в сравнении с золем Ag, образованным в Д20-ПАА5ан матрице. Это свидетельствует об образовании частичек Ag меньшего размера. То есть молекулярная структура разветвленной матрицы влияет на размер синтезированных наночастиц. Исследование стабильности и агрегации в наносистемах проводили методом ТЕМ, сравнивая снимки, полученные на 2 день и через 24 месяца после синтеза. На рис. 3 (а, б) представлены ТЕМ изображения золей, синтезированных в неионогенной разветвленной полимерной матрице. Natalia NP Ar-S4-1 [1] 121116 Nataliya Kutsevol Ech 3 K1 8D BC04102012_0011-Acquire CCD Image Display-Acquire CCD -1 а б Рис. 3 – ТЕМ изображения наночастичек серебра, синтезованных в полимерной матрице Д70-ПАА5: (а)- 2-й день после синтеза, (б)- 24 месяца после синтеза Исследование золей на второй день после синтеза показали, что наночастицы имели размер 8-20 нм. Распределение наночастичек по размерам имеет вид бимодали (Рис. 3).

Повторный ТЕМ анализ наносистем был проведен через 24 месяца после синтеза (рис. 2, б). В наносистемах, синтезированных в линейной неионной ПАА матрице наблюдалось появление незначительного количества осадка, а наносистемы, синтезированные в разветвленной неионной матрице оставались стабильными (без осадка), но был выявлен эффект "растворения" частичек среднего размера при сохранении бимодального характера распределения (рис. 4). Рис. 4 – Распределение наночастичек серебра по размерам, синтезированных в матрице сополимера Д70-ПАА5 на 2-й день после синтеза ТЕМ исследования показали отличие зольей серебра, синтезированных в разветвленных анионных полимерных матрицах, от зольей, синтезированных в неионных матрицах, которое не было выявлено при UV-vis исследованиях. На микрофотографиях зольей, синтезированных в анионных разветвленных полимерных матрицах наряду с наночастицами, размер которых такой же, как и для зольей, синтезированных в неионной полимерной матрице (Рис. 3), заметны очень маленькие частички. Причину отличия наносистем, синтезированных в неионогенной и ионогенной полимерных матрицах, надо искать в отличиях их химической природы. Две полимерные матрицы отличаются только тем, что в Д70-ПААан после гидролиза часть карбамидных групп превращается в карбоксилатные. Очевидно, диспергирование ионов серебра происходит как на карбамидных группах, как и в неионогенном образце полимерной матрицы, так и на карбоксилатных группах гидролизованного образца разветвленного сополимера. Результаты наводят на мысль, что диспергирование ионов серебра происходит более полно на карбоксилатных группах, благодаря сильным электростатическим взаимодействиям. В процессе восстановления, в полимерной гидролизованной матрице образуются наночастицы двух размеров. На карбамидных группах такие же, как и в неионогенном образце, а также наночастицы значительно меньшего размера – на карбоксилатных группах. ТЕМ исследования наносистем через 24 месяца после синтеза показали еще одно отличие в системах, синтезированных в неионных и ионных матрицах. Наносистемы, синтезированные в разветвленных анионных полимерных матрицах более склонны к агрегации, хотя появление осадка не наблюдали через 24 месяца. Таким образом, исследование зольей серебра, синтезированных *in situ* в полимерных матрицах разной структуры показали, что наночастицы имеют сферическую форму с размером преимущественно 10-20 нм, причем эффективность их образования и стабильность во времени зависит от молекулярных параметров полимерной матрицы, а также от ее химической природы. Известно, что макромолекулы водорастворимых полимеров, благодаря их биосовместимости с клетками и живыми тканями и возможностью их загрузки лекарственными формами, являются перспективными для доставки лекарственных препаратов к специфическим участкам организма. Целевая доставка лекарств в наноконтейнерах имеет свои преимущества: 1)

наноконтейнеры дают возможность доставлять лекарственные субстанции непосредственно в опухолевые клетки, способные поглощать наноконтейнеры.

2) наноконтейнеры позволяют снизить побочное влияние лекарств на здоровые ткани. Очевидно, что сополимеры Д-ПАА могут быть использованы как носители (наноконтейнеры) для эффективной доставки терапевтических препаратов в опухолевые клетки. Поглощение наноконтейнеров клетками происходит благодаря фагоцитозу. Как модельный объект была использована культура мышьих макрофагов J774. Показано, что декстран-полакриламидные наноконтейнеры не были цитотоксичными. Это позволило перейти к их “загрузке” препаратами, которые убивают раковую клетку, в частности цис-платином, который является химиотерапевтическим цитотоксическим препаратом. Был проведен синтез комплексов сополимера Д70-ПАА5 и его анионного производного (степень гидролиза – 35%) с цис-платином. ИК спектры цис-платина, сополимера Д70-ПАА5 и продукта их взаимодействия показали отсутствие взаимодействия негидролизованного сополимера с цис-платином, а на спектрах продукта взаимодействия цис-платина и Д70-ПАА5ан регистрируются изменения соотношений интенсивности полос поглощения карбамидных и карбоксильных групп в области 1500-1750 см⁻¹ и полос поглощения в области 1250-1450 см⁻¹, что свидетельствует об образовании комплекса цис-платина с карбоксильными группами сополимера. Проверка цитотоксичности платиносодержащих комплексов проводилась в диапазоне концентраций 0,01-0,1 мкг/мкл. Показано, что для платиносодержащих наноконтейнеров самый высокий процент живых клеток наблюдался при концентрации 0,01 мкг/мкл (на 1х10⁶ клеток в 1 см³), а именно 78%, а при концентрации 0,1 мкг/мкл – 18%. Высокая эффективность действия препарата позволяет в будущем испытать наночастишки на первичных М3-М5 лейкемичных культурах клеток человека и продолжить исследования по использованию разветвленных полимеров Д-ПААп как носителей для целевой доставки противоопухолевых препаратов. Выводы Таким образом, разветвленные полимерные системы, благодаря особенностям молекулярной структуры, являются интересными объектами не только фундаментальных исследований, но и перспективными функциональными материалами нового поколения. Такие полимерные системы характеризуются более компактной структурой и более высокой локальной концентрацией функциональных групп в сравнении с их линейными аналогами близкой молекулярной массы. Проведенные исследования подтвердили эффективность использования разветвленных полимеров в нанотехнологиях как матриц для формирования наночастишек серебра и их стабилизации, а также как носителей для адресной доставки лекарств.