



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Υβριδικά Αυτο-Οργανούμενα Νανοσυστήματα από
Συμπολυμερή κατά Συστάδες**

**ΕΛΕΝΗ ΒΛΑΣΣΗ
ΔΙΠΛ. ΧΗΜΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2015

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Υβριδικά Αυτο-Οργανούμενα Νανοδομημένα από Συμπολυμερή κατά Συστάδες

ΕΛΕΝΗ ΒΛΑΣΣΗ

A.M.: 001118

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Πίσπας Αστέριος, Ερευνητής Α' ΕΙΕ

Πιτσικάλης Μαρίνος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Μαυρομούστακος Θωμάς, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Παρασκευοπούλου Πατρίνα, Επικ. Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Πίσπας Αστέριος, Διευθ. Ερευνητής Α' ΕΙΕ

Πιτσικάλης Μαρίνος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Σακελλαρίου Γιώργος, Επικ. Καθηγητής ΕΚΠΑ

Χατζηχρηστίδη Μαργαρίτα, Επικ. Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 30/10/2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν η δομή και οι ιδιότητες υβριδικών αυτο-οργανούμενων συστημάτων που αποτελούνται από συμπολυμερή κατά συστάδες και ανόργανα ή βιολογικά υλικά (όπως φάρμακα, νουκλεϊκά οξέα ή πρωτεΐνες κ.ά.). Με αφορμή τις ιδιαίτερες και ενδιαφέρουσες ιδιότητες των συμπολυμερών κατά συστάδες πραγματοποιήθηκαν σειρές συνθέσεων που βασίζονται στην 2-μεθυλο-2-οξαζολίνη (2-methyl-2-oxazoline, MeOx) ή το αιθυλενοξείδιο (ethylene oxide, EO). Πρωταρχικώς, πραγματοποιήθηκε μερική υδρόλυση των βαθμωτών συμπολυμερών (gradient copolymers) πολυ(2-μέθυλο-2-οξαζολίνη)ς και πολύ(2-φαίνυλο-2-οξαζολίνη)ς (poly(2-methyl-2-oxazoline)-grad-poly(2-phenyl-2-oxazoline), MPOx), κατά την οποία εισάγονται κατιοντογενείς ομάδες αιθυλενιμίνης (ethylene imine, -EI) στις αλυσίδες των αρχικών συμπολυμερών. Πραγματοποιήθηκε μελέτη της δομής και των ιδιοτήτων τους σε διάφορα βιολογικά διαλύματα όπως υδατικά, αλατούχα φωσφορικά ρυθμιστικά (phosphate buffered saline, PBS) καθώς και της σύμπλεξης των διαλυμάτων αυτών με τις πρωτεΐνες εμβρυϊκού ορού βοοειδούς (fetal bovine serum, FBS) και με το δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (deoxyribonucleic acid, DNA).

Ακολούθησαν η σύνθεση μιας σειράς συμπολυμερών κατά συστάδες από πολυ(αιθυλενοξείδιο) και πολυ(2-φαίνυλο-2-οξαζολίνη) (PEO-b-PPhOx), με κατιοντικό πολυμερισμό και με απαρχητή το τοσυλικό-πολυ(αιθυλενοξείδιο) (PEO-tosylate). Μετά τον χαρακτηρισμό των συμπολυμερών με διάφορες μεθόδους (^1H NMR, GPC, FTIR), μελετήθηκαν τα υδατικά τους διαλύματα.

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε σύνθεση τεταρτοταγοποιημένων πολυμερών που βασίζονται σε διαφορετικές αρχιτεκτονικές πολυ(χλωρομεθυλοστυρενίου) (poly(chloromethylstyrene), PCMS) χρησιμοποιώντας το 1-βουτυλο-ιμιδαζόλιο (1-butyl-imidazole, NBIZ) ως παράγοντα τεταρτοταγοποίησης. Αφού αναλύθηκαν τα μοριακά τους χαρακτηριστικά, μελετήθηκε η συμπεριφορά αυτών των πολυμερών, σε υδατικά μέσα (μεταβάλλοντας παραμέτρους όπως η ιοντική ισχύς, η θερμοκρασία, το pH και η συγκέντρωση) και άλλα βιολογικά διαλύματα (PBS, PBS-FBS). Η μελέτη της δομής και των ιδιοτήτων πραγματοποιήθηκε και για τα σύμπλοκα που σχηματίζονται με το DNA, για να διερευνηθεί τυχόν χρήση αυτών των συστημάτων στη βιοτεχνολογία (π.χ. ως νανοφορείς πρωτεϊνών και γονιδίων).

Εν κατακλείδι, σειρές συμπολυμερών κατά συστάδες (HMPOx, PEO-b-PPhOx και PI-b-PEO) μελετήθηκαν ως προς την αλληλεπίδραση με DNA, φάρμακα (όπως η ινδομεθακίνη), μαγνητικά νανοσωματίδια (όπως $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) και σύμπλοκα νικελίου. Αφού ευρέθησαν οι κατάλληλες αναλογίες των συστατικών που οδηγούν σε σταθερά υβριδικά κολλοειδή συστήματα, ακολούθησε ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός (με μεθόδους σκεδάσεως φωτός, φθορισμομετρίας, φασματοσκοπίας) σε υδατικά, PBS και PBS-FBS διαλύματα.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Υβριδικά Νανοσυστήματα Συμπολυμερών κατά Συστάδες

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Συμπολυμερή κατά συστάδες, αυτο-οργάνωση, νανοδομημένα υβριδικά συστήματα, ιδιότητες σε διαλύματα, σύμπλοκα, εγκλωβισμός

ABSTRACT

In this thesis, the structure and properties of hybrid self-organized systems consisted of diblock copolymers and inorganic or biological compounds (e.g. drugs, nucleic acids or proteins) have been studied. Because of the particular and interesting properties of the diblock copolymers, a series of syntheses based on 2-methyl-2-oxazoline (MeOx) or ethylene oxide (EG or EO) were performed. First of all, partial hydrolysis of poly(2-methyl-2-oxazoline)-grad-poly(2-phenyl-2-oxazoline) copolymers was performed, during which cationic groups of ethylenimine (EI) were introduced to the chains of the initial copolymers. Their structure and properties were investigated in various biological solutions such as aqueous and phosphate buffered saline (PBS). Their complexation with the proteins of the fetal bovine serum (FBS) and the deoxyribonucleic acid (DNA) was also studied.

Another synthesis series using cationic polymerization with the PEO-tosylate as a macroinitiator, resulted in the PEO-b-PPhOx diblock copolymers. After the characterization of the diblock copolymers with several methods (^1H NMR, GPC, FTIR) their aqueous solutions were investigated.

Additionally, synthesis of quaternized polymers was done based on different architectures of poly(chloromethylstyrene) (PCMS) using 1-butyl-imidazole (NBIZ) as a quaternization agent. After the analysis of their molecular characteristics, the behaviour of these polymers in aqueous media was investigated (as a function of parameters such as ionic strength, temperature, pH and concentration) and in other biological solutions (PBS, PBS-FBS). The structure and properties study was done also for the complexes formed with DNA, in order to explore possible applications in biotechnology (e.g. as protein and gene nano-carriers).

In conclusion, series of diblock copolymers (HMPOx, PEO-b-PPhOx and PI-b-PEO) were studied in their interaction with DNA, drugs (e.g. indomethacin), magnetic nanoparticles (as $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles) and nickel complexes. After the proper proportions of the ingredients for stable colloidal systems were found, the physico-chemical characterization in aqueous, PBS and FBS solutions was performed (using light scattering and spectroscopy methods).

SUBJECT AREA: Hybrid Nanosystems of Block Copolymers

KEYWORDS: Diblock copolymers, Self-organization, nano-structured hybrid systems, solution properties, complexes, encapsulation

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς τον Ερευνητή Α' του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ) Δρ. Αστέριο Πίσπα, όχι μόνο για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με την έρευνα πάνω στον Τομέα των Πολυμερών στο Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας (ΙΘΦΧ) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ) όσο και για τις επιστημονικές του συμβουλές, την καθοδήγηση και την άψογη συνεργασία μας καθ' όλη τη διάρκεια της ολοκλήρωσης της διατριβής. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Δρ. Ερμόλαο Ιατρού (Καθηγητή ΕΚΠΑ), Δρ. Μαρίνο Πιτσικάλη (Καθηγητή ΕΚΠΑ), Δρ. Πατρίνα Παρασκευοπούλου (Επικ. Καθηγήτρια ΕΚΠΑ), Δρ. Γιώργο Σακελλαρίου (Επικ. Καθηγητή ΕΚΠΑ) και Δρ. Μαργαρίτα Χατζηχρηστίδη (Επικ. Καθηγήτρια ΕΚΠΑ) για την ευκαιρία που μου έδωσαν να διεξάγω έρευνα πάνω στον Τομέα των Πολυμερών. Νιώθω βαθύτατη ευγνωμοσύνη και δε δύναμαι να λησμονήσω την Δρ. Ελένη Αρχοντάκη (Επίκουρος Καθηγήτρια ΕΚΠΑ), τους Δρ. Θωμά Μαυρομούστακο ((Αναπληρωτή Καθηγητή ΕΚΠΑ)), Δρ. Γεώργιο Μούσδη (Ερευνητή Β' του ΕΙΕ), και Δρ. Νικόλαο Ψαρουδάκη (Αναπληρωτή Καθηγητή ΕΚΠΑ) για την υποστήριξη και τις χρήσιμες συμβουλές τους, τις πλούσιες γνώσεις τους και την πολύτιμη βοήθειά τους, κάθε φορά που τη χρειάστηκα. Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον μεταδιδάκτορα Αριστείδη Παπαγιαννόπουλο για την υποστήριξη, την πολύτιμη συμπαράσταση που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας αλλά και τη δημιουργία ευχάριστου κλίματος στο εργαστήριο. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου (Θεόδωρο και Αγγελική) και τον αδερφό μου (Ιωάννη), που ήταν πάντα δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια, με στήριζαν και μου έδιναν κουράγιο και δύναμη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	27
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
1.1 Εισαγωγή – Γενικά για τη Νανοτεχνολογία και τις Νανοεπιστήμες	27
1.2 Ορισμοί περί πολυμερών και αυτό-οργάνωσης.....	28
1.3 Παραδείγματα Αμφίφιλων Συμπολυμερών	39
1.4 Υβριδικές νανοδομές	43
1.5 Σύνθεση πολυμερών	57
Χημική τροποποίηση πολυμερών.....	59
Κατιοντικός πολυμερισμός.....	63
1.6 Τεχνικές χαρακτηρισμού.....	66
1.6.1 Σκέδαση φωτός (Light Scattering, LS)	66
1.6.1.1 Στατική σκέδαση φωτός (Static Light Scattering, SLS).....	66
1.6.1.2 Δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)	68
1.6.1.3 Ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός (Electrophoretic Light Scattering, ELS)	70
1.6.2 Φασματοσκοπικές τεχνικές	71
1.6.2.1 Φασματοσκοπία φθορισμού ή Φθορισμομετρία (Fluorescence Spectroscopy, FS).....	71
1.6.2.2 Φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού-υπερύθρου (Ultra Violet-Visible-Near Infra Red ή UV-Vis-NIR spectroscopy)	72
1.6.2.3 Φασματοσκοπία υπερύθρου (Fourier Transform- InfraRed Spectroscopy, FT-IR)	73
1.6.2.4 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR).....	74

1.6.3 Χρωματογραφικές τεχνικές	75
1.6.3.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC).....	75
1.6.4 Τεχνικές μικροσκοπίας.....	77
1.6.4.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)	77
1.6.4.2 Ηλεκτρονική Μικροσκοπική Διέλευσης (Transmission Electron Microscope, TEM)	78
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	79
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	79
2.1 Χημικά Αντιδραστήρια, παρασκευή HMPOx και συμπλόκων τους με πρωτεΐνες και DNA	79
2.1.1 Χημικά Αντιδραστήρια για την υδρόλυση των βαθμωτών συμπολυμερών πολυ(2-μεθυλο-2-οξαζολίνη)s- grad- πολυ(2-φαινυλο-2-οξαζολίνη)s	79
^a από ¹ H NMR σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (chloroform-d, CDCl ₃)	79
2.1.2 Παρασκευή HMPOx βαθμωτών συμπολυμερών	80
2.1.3 Παρασκευή HMPOx διαλυμάτων	81
2.2 Χημικά Αντιδραστήρια, Παρασκευή QIm και συμπλόκων τους με πρωτεΐνες και DNA.....	82
2.2.1 Χημικά Αντιδραστήρια για την παρασκευή τεταρτοταγών πολυμερών ιμιδαζολίου βασισμένων σε πολυ(χλωρομεθυλο στυρένιο) (poly(chloromethyl styrene), PCMS)	82
2.2.2 Σύνθεση τεταρτοταγών πολυμερών ιμιδαζολίου βασισμένων σε πολυ(χλωρομεθυλο στυρένιο).....	83
2.2.3 Παρασκευή QIm διαλυμάτων	84
2.3 Χημικά Αντιδραστήρια, Παρασκευή PEG-b-PPhOx και συμπλόκων τους με τις πρωτεΐνες του FBS.....	86
2.3.1 Αντιδραστήρια σύνθεσης σειράς PEG-b-PPhOx.....	86
2.3.2 Καθαρισμός του διαλύτη, του μακροαπαρχητή και του μονομερούς.....	86

2.3.3 Σύνθεση συμπολυμερών PEG-b-PPhOx	86
2.3.4 Παρασκευή διαλυμάτων PEG-b-PPhOx.....	88
2.4 Υβριδικά νανοσυστήματα με σύμπλοκα νικελίου και των συμπλόκων τους με τις πρωτεΐνες του FBS.....	89
2.4.1 Πρώτες ύλες για την παρασκευή νανοϋβριδικών συστημάτων με σύμπλοκα νικελίου	89
2.4.2 Παρασκευή υβριδικών διαλυμάτων με σύμπλοκα νικελίου	91
2.5 Υβριδικά νανοσυστήματα με μαγνητικά σωματίδια καθώς και των συμπλόκων τους με τις πρωτεΐνες του FBS	92
2.5.1 Πρώτες ύλες για την παρασκευή νανουβριδικών συστημάτων με μαγνητικά σωματίδια.....	92
2.5.2 Παρασκευή υβριδικών διαλυμάτων με μαγνητικά σωματίδια	93
2.6 Πειραματικές διατάξεις για χαρακτηρισμό πολυμερών και υβριδικών συστημάτων	94
2.6.1 Πειραματική διάταξη φασματοσκοπικών τεχνικών	95
2.6.1.1 Πειραματική διάταξη φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)	95
2.6.1.2 Πειραματική διάταξη φασματοσκοπίας υπερύθρου (Fourier Transform-InfraRed Spectroscopy, FT-IR).....	95
2.6.1.3 Πειραματική διάταξη φασματοσκοπίας φθορισμού ή φθορισμομετρία .	96
2.6.1.4 Πειραματική διάταξη φασματοσκοπίας υπεριώδους – ορατού- υπερύθρου (Ultra Violet-Visible-Near Infrared Red ή UV-Vis-NIR spectroscopy)	97
2.6.2 Πειραματική διάταξη σκέδασης φωτός.....	98
2.6.2.1 Πειραματική διάταξη Δυναμικής & Στατικής σκέδασης φωτός.....	98
2.6.2.2 Πειραματική διάταξη ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός.....	98
2.6.1 Πειραματική διάταξη χρωματογραφικών τεχνικών	99
2.6.1 Πειραματική διάταξη χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC)	99
2.6.4 Πειραματική διάταξη Τεχνικών μικροσκοπίας	99

2.6.4.1 Πειραματική διάταξη ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM)....	99
2.6.4.2 Πειραματική διάταξη ηλεκτρονικής Μικροσκοπικής Διαπερατότητας (TEM).....	99
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	101
3.1 Αποτελέσματα και Συζήτηση για τα υβριδικά HMPOx νανοσυστήματα	101
3.1.1 Παρασκευή και χαρακτηρισμός των υδρολυμένων βαθμωτών HMPOx...	101
3.1.2 Χαρακτηρισμός των υδατικών διαλυμάτων των βαθμωτών HMPOx συμπολυμερών	104
3.1.3 Αποτελέσματα υβριδικών συστημάτων αποτελούμενων από HMPOx και πρωτεΐνες του FBS	110
3.1.4 Αποτελέσματα υβριδικών συστημάτων αποτελούμενων από HMPOx και DNA	113
3.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση για τα υβριδικά QIm νανοσυστήματα	118
3.2.1 Παρασκευή και χαρακτηρισμός των τεταρτοταγών QIm	118
3.2.2 Μελέτες αυτο-οργάνωσης των QIm πολυμερών σε υδατικά και PBS διαλύματα.....	122
3.2.3 Συμπλοκοποίηση QIm με τις πρωτεΐνες του FBS και DNA	130
3.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση για τα PEG- b- PPhOx νανοσυστήματα	134
3.3.1 Σύνθεση και μοριακός χαρακτηρισμός των αμφίφιλων συμπολυμερών PEG-b-PPhOx	134
3.3.2 Αυτο-οργάνωση των PEG-b-PPhOx συμπολυμερών σε υδατικά και βιολογικά μέσα.....	139
3.3.3 Αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών του FBS διαλύματος με τα PEG-b-PPhOx συμπολυμερή.....	146
3.4 Αποτελέσματα και Συζήτηση για τα υβριδικά νανοσυστήματα με σύμπλοκα νικελίου.....	147
3.4.1 Αποτελέσματα και Συζήτηση για τα διαλύματα που εμπεριέχουν δισυσταδικά συμπολυμερή και σύμπλοκα νικελίου	148

3.4.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση για την αλληλεπίδραση των συμπλόκων συμπολυμερούς/ νικελίου με πρωτεΐνες του FBS διαλύματος.....	162
3.5 Αποτελέσματα και Συζήτηση για τα υβριδικά νανοσυστήματα με μαγνητικά σωματίδια	163
3.5.1 Αποτελέσματα και Συζήτηση για τα διαλύματα που εμπεριέχουν δισυσταδικά συμπολυμερή και μαγνητικά σωματίδια $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	164
3.5.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση για τα διαλύματα που εμπεριέχουν δισυσταδικά συμπολυμερή/ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ με πρωτεΐνες του FBS διαλύματος	170
3.5.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση για τα διαλύματα που εμπεριέχουν δισυσταδικά συμπολυμερή/ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ με <i>ινδομεθακίνη</i>	173
Συμπεράσματα	178
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	180
Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια	182
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	185
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	188

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 2.1: Αντίδραση υδρόλυσης των βαθμωτών συμπολυμερών MPOx.....	80
Σχήμα 2.2. Συσκευή υδρόλυσης των MPOx δειγμάτων.....	81
Σχήμα 2.3: Αντίδραση παρασκευής τεταρτοταγών πολυμερών ιμιδαζολίου (α) των QIm-PCMS ομοπολυμερών, (β) των τυχαίων συμπολυμερών QIm-PS-co-PCMS ή/ και των συμπολυμερών κατά συστάδες QIm-PS-b-PCMS	84
Σχήμα 2.4: Αντίδραση ανοίγματος δακτυλίου για την παραγωγή PEG-b-PPhOx	87
Σχήμα 2.5: Χημική δομή του συμπολυμερούς κατά συστάδες (α) PEG-b-PPhOx και (β) PI-b-PEO	90
Σχήμα 2.6: Χημική δομή του συμπλόκου νικελίου (α) τετραμεθυλαμμωνίου (Me ₄)N[Ni(dmeodddt)]=Bis[5,6-dimethoxy-5,6-dihydro-1,4-dithiine-2,3-dithiolate] Nickel tetramethylammonium, (β) τετραβουτυλαμμωνίου (Bu ₄)N[Ni(dddtt) ₂]=Tetrabutylammonium bis(5,6-dihydro-1,4-dithiine-2,3-dithiole) nickel και (γ) [Ni(pddt) ₂]=Bis(6,7-dihydro-5H-[1,4] dithiepine-2,3-dithiole) nickel	91
Σχήμα 2.7: Σχηματική απεικόνιση των μαγνητικών NPs με γ-Fe ₂ O ₃ στον πυρήνα και ελαϊκό οξύ ως κορώνα.....	92
Σχήμα 2.8: TEM εικόνα των δειγμάτων MagnNPs	93
Σχήμα 2.9: Χημική δομή του (α) Py και (β) P3P.....	97
Σχήμα 3.1: Το φάσμα ¹ H NMR (300kHz, D ₂ O) του συμπολυμερούς HMPOx3	103
Σχήμα 3.2: Η συνάρτηση κατανομής μεγέθους συναρτήσει της R _h , για τα υδατικά διαλύματα των συμπολυμερών (α) HMPOx1 και (β) HMPOx3	106
Σχήμα 3.3: (α) Η ένταση σκέδασης (με ■ και □ είναι τα I _{PBS-FBS} (MHz) και I (MHz) αντίστοιχα), (β) η υδροδυναμική ακτίνα και το ζήτα δυναμικό (με ▲ και ▼ είναι R _h (nm) και ζ _p (mV) αντίστοιχα) του HMPOx3 σε διάλυμα PBS-FBS.....	112
Σχήμα 3.4: Συνάρτηση κατανομής μεγέθους f(R _h) για τα νανοσυστήματα των HMPOx3 σε PBS-FBS διαλύματα με αναλογίες PBS/FBS (v/v%): (a) 5-95, (b) 10-90 και (c) 20-80	113
Σχήμα 3.5: Αποτελέσματα DLS των σύμπλοκων HMPOx/DNA σε διαλύματα PBS (με HMPOx1 και HMPOx3 να αφορούν τα (α) και (β) αντίστοιχα). Η συγκέντρωση του DNA ήταν σταθερή και ίση με 10 ⁻³ g/ml.....	114
Σχήμα 3.6: Συνάρτηση κατανομής μεγέθους f(R _h) για το σύστημα HMPOx3/DNA σε PBS για συγκεντρώσεις πολυμερούς: (a) C=8·10 ⁻⁵ g/ml, (b) C =1.3·10 ⁻⁴ g/ml, (c) C =1.7·10 ⁻⁴ g/ml και (d) C =2.5·10 ⁻⁴ g/ml.....	115

Σχήμα 3.7: (α) Ένταση και υδροδυναμική ακτίνα από DLS και (β) ζ-δυναμικό των HMPOx1/DNA συμπλόκων σε PBS διαλύματα	116
Σχήμα 3.8: Φάσματα του ^1H NMR των πολυμερών: (α) QIm-PCMS2 και (β) QIm-PS-co-PCMS σε διαλύτη DMSO- d_6	119
Σχήμα 3.9: ^1H NMR (300MHz) φάσμα του QIm-PS-b-PCMS σε CD $_3$ OD- d_4	121
Σχήμα 3.10: Τα φάσματα ATR- FTIR των (a) PCMS and (b) QIm-PCMS2 πολυμερών	121
Σχήμα 3.11: Διάγραμμα συνάρτησης κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ έναντι της υδροδυναμικής ακτίνας $R_h(\text{nm})$ για τα υδατικά διαλύματα των (a) QIm-PCMS1, (b) QIm-PCMS2, (c) QIm-PS-b-PCMS και (d) QIm-PC-co-PCMS πολυμερών, με $C=10^{-3}\text{g/ml}$ και σε γωνία σκέδασης 90°	124
Σχήμα 3.12: Διαγράμματα σκεδαζόμενης έντασης και υδροδυναμικής ακτίνας των υδατικών διαλυμάτων των: (α) QIm-PCMS2 και (β) QIm-PS-co-PCMS πολυμερών (με $C_{\text{QIm}}=10^{-3}\text{g/ml}$) συναρτήσει της C_{NaCl}	127
Σχήμα 3.13: Φάσμα UV-ορατού για υδατικά QIm-PCMS2 διαλύματα ($C_{\text{NaCl}}=0.1\text{M}$) ...	128
Σχήμα 3.14: (α) Φάσματα φθορισμού και (β) έντασης φθορισμού στα 313nm για QIm-PCMS2 υδατικά διαλύματα ως συνάρτηση της C_{NaCl}	129
Σχήμα 3.15: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός των QIm-PCMS2/ DNA συμπλόκων σε PBS διαλύματα (με $C_{\text{QIm}}=5 \times 10^{-4}\text{g/ml}$ και C_{DNA} να ποικίλει)	132
Σχήμα 3.16: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός των QIm-PS-co-PCMS/ DNA συμπλόκων σε PBS διαλύματα (με $C_{\text{QIm}}=5 \times 10^{-4}\text{g/ml}$ και διαφορετικές C_{DNA})	133
Σχήμα 3.17: SEC φάσμα του (a) PEG-b-PPhOx1, (b) PEG-b-PPhOx2 και (c) PEG-b-PPhOx4 διδυσταδικού πολυμερούς	136
Σχήμα 3.18: Το φάσμα ^1H NMR του PEG-b-PPhOx3 διδυσταδικού συμπολυμερούς σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο CDCl $_3$	138
Σχήμα 3.19: Συναρτήσεις κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ έναντι $R_h(\text{nm})$ για τα (a) PEG-b-PPhOx1, (b) PEG-b-PPhOx2 και (c) PEG-b-PPhOx3 συμπολυμερή σε υδατικά διαλύματα ($C=10^{-3}\text{g/ml}$) σε γωνία σκέδασης 90°	141
Σχήμα 3.20: Διάγραμμα εξάρτησης της έντασης σκέδασης I (kHz) και της υδροδυναμικής ακτίνας $R_h(\text{nm})$ από τη θερμοκρασία του φιλτραρισμένου υδατικού διαλύματος του PEO-b-PPhOx3 διδυσταδικού συμπολυμερούς.	142
Σχήμα 3.21: Σύγκριση των CONTIN δεδομένων των PEG-b-PPhOx3 συμπολυμερών σε υδατικά διαλύματα που προέκυψαν από το πρωτόκολλο I και II (και αναφέρονται ως (a) και (b) αντίστοιχα)	144

Σχήμα 3.22: Συνάρτηση κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ έναντι της υδροδυναμικής ακτίνας, για το PEG-b-PPhOx3 δισυσταδικό συμπολυμερές σε (b) PBS και (c) PBS (90%) - FBS (10%) διαλύματα. Το γράφημα (a) αναφέρεται σε PBS-FBS διαλύματα χωρίς συμπολυμερές απεικονίζοντας τους πληθυσμούς των πρωτεϊνών και των συσσωματωμάτων τους που υπάρχουν στο FBS.....	146
Σχήμα 3.23: Φάσματα UV-ορατού των (I) $(Me_4)N[Ni(dmeoddtdt)]$, (II) $(Bu_4)N[Ni(dddtdt)_2]$ και (III) $[Ni(pddtdt)_2]$ συμπλόκων (a) όταν είναι μόνα τους σε THF, (b) παρουσία PEG-b-PPhOx και (c) παρουσία PI-b-PEO συμπολυμερών σε THF	149
Σχήμα 3.24: Συνάρτηση κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ για τα υδατικά διαλύματα των (a) PEG-b-PPhOx και (b) PI-b-PEO συμπολυμερών (χωρίς σύμπλοκα νικελίου με $C_{πολυμ.}=1mg/ml$ και γωνία σκέδασης 90°).	151
Σχήμα 3.25: Τα UV-Vis-NIR φάσματα των (a) PEG-b-PPhOx/ $(Me_4)N[Ni(dmeoddtdt)]$ σε THF, (b) $(Me_4)N[Ni(dmeoddtdt)]$ σύμπλοκα ενσωματωμένα στο PEG-b-PPhOx συμπολυμερές σε H_2O (1 μέρα) και (c) $(Me_4)N[Ni(dmeoddtdt)]$ σύμπλοκα ενσωματωμένα στο PEG-b-PPhOx συμπολυμερές σε H_2O (13 μέρες). Η αναλογία μάζας (mg του συμπολυμερούς)/(mg των Ni αυτών συμπλόκων) ήταν 10/1	152
Σχήμα 3.26: (α) Η ένταση της σκέδασης και η υδροδυναμική ακτίνα συναρτήσει του χρόνου (t), (β) η συνάρτηση κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ για τα υδατικά διαλύματα PI-b-PEO/ $(Me_4)N[Ni(dmeoddtdt)]$ με αναλογία μάζας (mg συμπολυμερές)/ (mg Ni συμπλοκών) να είναι 10/ 1.....	153
Σχήμα 3.27: Τα UV-Vis-NIR φάσματα των (a) PI-b-PEO/ $(Me_4)N[Ni(dmeoddtdt)]$ σε THF διάλυμα, (b) $(Me_4)N[Ni(dmeoddtdt)]$ σύμπλοκα εθυλακωμένα στο PI-b-PEO συμπολυμερές σε H_2O (1 μέρα), (c) $(Me_4)N[Ni(dmeoddtdt)]$ σύμπλοκα ενσωματωμένα στο PI-b-PEO σε H_2O (13 μέρα). Η αναλογία μαζών (mg συμπολυμερούς)/ (mg Ni συμπλόκων) είναι 10 προς 1	154
Σχήμα 3.28: DLS αποτελέσματα: (α) Η ένταση της σκέδασης και η υδροδυναμική ακτίνα σε σχέση με το χρόνο, (β) η συνάρτηση κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ για τα υδατικά διαλύματα του PI-b-PEO/ $(Me_4)N[Ni(dmeoddtdt)]$ νανοσυστήματος. Η αναλογία μάζας (mg συμπολυμερούς)/ (mg Ni συμπλόκων) είναι 10 προς 1.....	155
Σχήμα 3.29: Τα UV-Vis-NIR φάσματα των (a) PEG-b-PPhOx/ $(Bu_4)N[Ni(dddtdt)_2]$ σε THF, (b) $(Bu_4)N[Ni(dddtdt)_2]$ σύμπλοκο ενθυλακωμένο στο PEG-b-PPhOx πολυμερές σε H_2O (1 μέρα) και (c) $(Bu_4)N[Ni(dddtdt)_2]$ σύμπλοκο έγκλεισμένο στο PEG-b-PPhOx σε H_2O (13 μέρες).....	156
Σχήμα 3.30: DLS αποτελέσματα: (α) Η ένταση της σκέδασης του φωτός και η υδροδυναμική ακτίνα των νανοσωματιδίων συναρτήσει του χρόνου, (β) η συνάρτηση	

κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ για τα υδατικά διαλύματα των PEG-b-PPhOx/ (Bu ₄ N)[Ni(dddtt) ₂] πολυσυμπλόκων με αναλογία μαζών (mg συμπολυμερούς)/(mg Ni συμπλόκων) να είναι 10: 1.....	157
Σχήμα 3.31: Τα UV-Vis-NIR φάσματα των (a) PI-b-PEO/ (Bu ₄ N)[Ni(dddtt) ₂] πολυσυμπλόκων σε THF, (b) (Bu ₄ N)[Ni(dddtt) ₂] σύμπλοκο ενθυλακωμένο στο PI-b-PEO συμπολυμερές σε H ₂ O (1 μέρα) και (c) (Bu ₄ N)[Ni(dddtt) ₂] σύμπλοκο έγκλειστο στο PI-b-PEO δισυσταδικό σε H ₂ O (13 μέρες).....	158
Σχήμα 3.32: Απεικόνιση DLS αποτελεσμάτων: (α) Η σκεδαζόμενη ένταση και η R_h με την πάροδο του χρόνου, (β) η συνάρτηση κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ για τα υδατικά διαλύματα του PI-b-PEO/ (Bu ₄ N)[Ni(dddtt) ₂] πολυσυμπλόκου. Η αναλογία μαζών (mg συμπολυμερούς)/ (mg Ni συμπλόκων) ήταν 10 προς 1.....	158
Σχήμα 3.33: Τα UV-Vis-NIR φάσματα των (a) PEO-b-PPhOx/ Ni[(pddt) ₂] σε THF, (b) ενθυλακωμένα Ni[(pddt) ₂] σύμπλοκα στα PEO-b-PPhOx συμπολυμερή σε H ₂ O (1 μέρα) και (c) εγκιβωτισμένα Ni[(pddt) ₂] σύμπλοκα στα PEO-b-PPhOx σε H ₂ O (13 ημέρες). Η αναλογία μαζών (mg συμπολυμερούς)/ (mg Ni συμπλοκών) ήταν 10 προς 1.....	159
Σχήμα 3.34: (α) Η σκεδαζόμενη I και η R_h ακτίνα σε συνάρτηση με το χρόνο, (β) η συνάρτηση κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ για τα υδατικά διαλύματα PEO-b-PPhOx/ Ni[(pddt) ₂] με αναλογία μαζών (mg συμπολυμερούς)/ (mg Ni συμπλοκών) που είναι 10 προς 1.....	160
Σχήμα 3.35: Τα UV-Vis-NIR δεδομένα των (a) PI-b-PEO/ Ni[(pddt) ₂] σε THF, (b) ενθυλακωμένα Ni[(pddt) ₂] στο PI-b-PEO συμπολυμερές σε H ₂ O (1 ημέρα) και (c) εγκιβωτισμένα Ni[(pddt) ₂] σύμπλοκα στο PI-b-PEO σε H ₂ O (13 ημέρες). Η αναλογία μαζών (mg συμπολυμερούς)/ (mg Ni συμπλόκων) είναι 10: 1.....	160
Σχήμα 3.36: (α) Η ένταση της σκέδασης και η υδροδυναμική ακτίνα σε συνάρτηση με το χρόνο, (β) η συνάρτηση κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ για τα υδατικά διαλύματα του PI-b-PEO/ Ni[(pddt) ₂] με αναλογία μαζών (mg συμπολυμερούς)/ (mg Ni συμπλόκων) να είναι 10 προς 1.....	161
Σχήμα 3.37: DLS αποτελέσματα: (α) Η ένταση της σκέδασης του φωτός και (β) η υδροδυναμική ακτίνα των B (▲), C (■) και D (●) νανοσυστημάτων σε PBS.....	162
Σχήμα 3.38: (α) Η ένταση της σκέδασης του φωτός και (β) η υδροδυναμική ακτίνα των B (▲), C (■) και D (●) νανοσυστημάτων σε PBS/ FBS (90/10v/v %) διαλύματα.....	163
Σχήμα 3.39: (α) Η ένταση της σκέδασης του φωτός και (β) η υδροδυναμική ακτίνα των υδατικών διαλυμάτων των: (■) PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.1), (□) PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.2), (●) PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.2) και (○) PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.5) νανοσυστημάτων.....	165

Σχήμα 3.40: CONTIN διαγράμματα για (a) PEG-b-PPhOx συμπολυμερή χωρίς μαγνητικά σωματίδια, καθώς για (b) PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.1) και (c) PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.2) νανοσυστήματα σε απεσταγμένο νερό. Στα (b) και (c) σχήματα, η μη διακεκομμένη και η διακεκομμένη γραμμή συμβολίζουν το σύστημα νανοσωματιδίων αυτό στη 1η μέρα και στη 13η μέρα αντίστοιχα	166
Σχήμα 3.41: Η συνάρτηση κατανομής μεγέθους σε σχέση με την R_h , για (a) PI-b-PEO συμπολυμερή χωρίς μαγνητικά σωματίδια, (b) PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.2) και (c) PI-b-PEO /MagnNPs (10/0.5) νανοσυστήματα σε απεσταγμένο νερό. Στα (b) και (c) σχήματα, η μη διακεκομμένη και η διακεκομμένη γραμμή συμβολίζουν το αυτό σύστημα νανοσωματιδίων στη 1η μέρα και στη 13η μέρα αντίστοιχα.....	167
Σχήμα 3.42: (α) Η ένταση της σκέδασης του φωτός και (β) η υδροδυναμική ακτίνα των: (■) PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.1), (□) PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.2), (●) PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.2) και (○) PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.5) νανοσυστημάτων των PBS διαλυμάτων.....	169
Σχήμα 3.43: Η συνάρτηση κατανομής μεγέθους εν σχέσει με την υδροδυναμική ακτίνα για τα PEG-b-PPhOx/MagnNPs νανοσυστήματα σε PBS διαλύματα, όταν αυτά (a) δεν έχουν μαγνητικά σωματίδια (Πρωτόκολλο II) και όταν έχουν εγκλεισμένα μαγνητικά νανοσωματίδια (b) σε αναλογία (10/0.1) και (c) σε αναλογία (10/0.2) σε PBS. Στα (b) και (c) σχήματα, η μη διακεκομμένη και η διακεκομμένη γραμμή συμβολίζουν το αντίστοιχο σύστημα νανοσωματιδίων στη 1η μέρα και στη 13η μέρα αντίστοιχα.....	169
Σχήμα 3.44: Η συνάρτηση κατανομής μεγέθους συναρτήσει της υδροδυναμικής ακτίνας για τα PI-b-PEO/MagnNPs σε PBS διαλύματα, όταν αυτά (a) δεν έχουν μαγνητικά σωματίδια (Πρωτόκολλο II) και όταν έχουν εγκλεισμένα μαγνητικά νανοσωματίδια (b) σε αναλογία (10/0.2) και (c) σε αναλογία (10/0.5) σε PBS. Στα (b) και (c) σχήματα, η μη διακεκομμένη και η διακεκομμένη γραμμή συμβολίζουν το αντίστοιχο σύστημα νανοσωματιδίων στη 1η μέρα και στη 13η μέρα αντίστοιχα.....	170
Σχήμα 3.45: Η ένταση σκέδασης του φωτός συναρτήσει του χρόνου των: (■) PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.1), (□) PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.2), (●) PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.2) και (○) PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.5) νανοσυστημάτων σε PBS-FBS διαλύματα	171
Σχήμα 3.46: Η $f(R_h)$ συναρτήσει της R_h (nm) για τα (I) PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.2) και (II) PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.5) σε PBS-FBS διάλυμα. Τα (a) και (b) συμβολίζουν το σύστημα νανοσωματιδίων στην 1η και στη 13η μέρα αντίστοιχα.....	172

Σχήμα 3.47: Η $f(R_h)$ συναρτήσει της R_h (nm) για τα (I) PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.1) και (II) PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.2) νανοσυστήματα σε PBS-FBS διαλύματα. Τα (a) και (b) συμβολίζουν το σύστημα νανοσωματιδίων την 1η και τη 13η μέρα αντίστοιχα	172
Σχήμα 3.48: UV-vis φάσματα απορρόφησης για το PI-b-PEO/MagnNPs νανοσύστημα σε νερό, (a) χωρίς ινδομεθακίνη και (b) με IND	173
Σχήμα 3.49: Η ένταση της σκέδασης του φωτός των: (■) PEG-b-PPhOx/MagnNPs/IND (10/0.1/1), (□) PEG-b-PPhOx/MagnNPs/IND (10/0.1/1), (●) PI-b-PEO/MagnNPs/IND (10/0.2/1) και (○) PI-b-PEO/MagnNPs/IND (10/0.2/2) νανοσυστημάτων σε απεσταγμένο νερό	175
Σχήμα 3.50: Η συνάρτηση $f(R_h)$ συναρτήσει της R_h (nm) των: (I) PEG-b-PPhOx/MagnNPs/IND νανοσυστημάτων με αναλογίες μαζών (a) (10/0.1/2) και (b) (10/0.1/1) και των (II) PI-b-PEO/MagnNPs/IND νανοσυστημάτων με αναλογίες μαζών (a) (10/0.2/2) και (b) (10/0.2/1) σε υδατικά διαλύματα. Οι συνεχείς και οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν το σύστημα νανοσωματιδίων στην 1η και στη 13η μέρα αντίστοιχα	175
Σχήμα 3.51: Η ένταση της σκέδασης του φωτός συναρτήσει του χρόνου των PI-b-PEO/MagnNPs/IND (10/0.2/1) νανοσυστημάτων σε : (■) PBS και (□) PBS-FBS (10%) διαλύματα	176
Σχήμα 3.52: Η $f(R_h)$ συναρτήσει της R_h (nm) για τα PI-b-PEO/MagnNPs/IND (10/0.2/1) νανοσυστήματα σε: (I) PBS (II) PBS-FBS(10%). Το (a) και (b) είναι το PBS-FBS(10%) διάλυμα (χωρίς κάποια προσθήκη, όπως πολυμερή, μαγνητικά σωματίδια, ινδομεθακίνη) και το νανοσύστημα που παρουσιάζεται στο (I) αντίστοιχα. Τα (c) και (d) αφορούν το PI-b-PEO/MagnNPs/IND (10/0.2/1) νανοσύστημα σε PBS-FBS(10%) διαλύματα για χρόνο $t=0$ ημέρες και 13 ημέρες αντίστοιχα.....	177
Σχήμα Π1: Η σκεδαζόμενη ένταση και η υδροδυναμική ακτίνα του PEG-b-PPhOx3 συμπολυμερούς σε υδατικά μη φιλτραρισμένα διαλύματα συναρτήσει (α) της συγκέντρωσης και (β) της θερμοκρασίας.....	186

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: (α) ΑΒ δισυσταδικό συμπολυμερές, (β) Κυκλικό ΑΒ συμπολυμερές ¹⁰	28
Εικόνα 1.2: ΑΒ γραμμικό (α) κατά συστάδες (δισυσταδικό), (β) βαθμωτό συμπολυμερές ¹⁷ , με ● και ○ τα Α και Β μονομερή αντίστοιχα.....	29
Εικόνα 1.3: Γενική σχηματική αναπαράσταση σχηματισμού πολυμερικού μικκυλίου σε νερό ²¹	31
Εικόνα 1.4: Απεικόνιση μορφολογίας μικκυλίων (α) σφαιρικών, (β) ράβδου (ή/ και κυλινδρικών), (γ) αντίστροφων μικκυλίων (reversed micelles) και (δ) ελασμάτων ^{20, 23, 24}	33
Εικόνα 1.5: Αναπαράσταση ενός σταθερού κολλοειδούς συστήματος ²⁵	34
Εικόνα 1.6: Σχηματική αναπαράσταση σχηματισμού συμπλόκων πολυηλεκτρολυτών (PECs).....	37
Εικόνα 1.7: Σχηματική απεικόνιση των διαγραμμάτων φάσεων για πολυμερικά διαλύματα με τη θερμοκρασία (Τ) συναρτήσει του κλάσματος όγκου του πολυμερούς (polymer volume fraction, φ). Τα (α) και (β) αφορούν τις συμπεριφορές της χαμηλής κρίσιμης θερμοκρασίας διαλύματος και της υψηλής κρίσιμης θερμοκρασίας διαλύματος αντίστοιχα	38
Εικόνα 1.8: Πολυμερικά νανοσωματίδια με κορώνα από PEG (ή PEO) για την μεταφορά φαρμάκων ⁴²	40
Εικόνα 1.9: Η σχηματική παρουσίαση της διαδικασίας παράδοσης γονιδίου από κατιοντικά πολυμερή ⁴⁴	41
Εικόνα 1.10: Σχηματικό διάγραμμα ενός πολυλειτουργικού υβριδικού νανοσυστήματος	44
Εικόνα 1.11: Σχηματικό διάγραμμα της άμεσης μεθόδου σύζευξης (της σύνθεσης υβριδίων)	45
Εικόνα 1.12: Σχηματικό διάγραμμα ενός υβριδικού δενδριμερούς βασισμένου στη σύνθεση ενός υβριδίου	46
Εικόνα 1.13: (α) Συστημική παροχή φαρμάκου, (β) μαγνητική στόχευση ⁹¹	50
Εικόνα 1.14: Γενική απεικόνιση 1, 2 διθειολενίων (1, 2- DT)	52
Εικόνα 1.15: Χημική δομή της ινδομεθακίνης	56
Εικόνα 1.16: Σχηματική αναπαράσταση των φάσεων μιας αλυσωτής αντίδρασης πολυμερισμού (κλασσικός ριζικός πολυμερισμός): (Α) Μονομερές πριν την έναρξη της	

αντίδρασης, (B)-(Γ) Πολυμερισμός μονομερών στα ενεργά κέντρα και ακαριαία αύξηση του μήκους της αλυσίδας, (Δ) Περάτωση της αντίδρασης ⁷	59
Εικόνα 1.17: Διάφορες διεργασίες που προκύπτουν από διαφορετικούς βαθμούς λειτουργικότητας των πρόδρομων ουσιών	60
Εικόνα 1.18: Όξινη υδρόλυση της PEOx σε LPEI.....	62
Εικόνα 1.19: Κλασσική αντίδραση τριτοταγών αμινών με βάση αλκυλιωτικούς παράγοντες.....	63
Εικόνα 1.20: Φάσμα φωτός συναρτήσει του μήκους κύματος ή της συχνότητας της ακτινοβολίας	73
Εικόνα 1.21: Παράδειγμα χρωματογραφήματος αποκλεισμού μεγεθών ¹⁶³	77
Εικόνα 1.22: Παράδειγμα οργάνου ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης.....	77
Εικόνα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση των υπερμοριακών συσσωματωμάτων που σχηματίστηκαν από τα κατιονικά συμπολυμερή HMPOx σε υδατικά μέσα.	107
Εικόνα 3.2: Ενδεικτική τυπική SEM εικόνα από τα υδατικά διαλύματα του δείγματος HMPOx1 σε πλακίδιο πυριτίου ($C=10^{-4}$ g/ml)	108
Εικόνα 3.3: SEM απεικόνιση των HMPOx3/DNA συμπλόκων σε PBS διάλυμα ($C=3.3 \cdot 10^{-4}$ g/ml)	117
Εικόνα 3.4: Αντίδραση για τη σύνθεση των συμπολυμερών κατά συστάδες πολυ(αιθυλενοξειδίου)-b-πολυ(2-φαινυλο-2- οξαζολίνης).....	134
Εικόνα 3.4: SEM εικόνα του PEG-b-PPhOx3 συμπολυμερούς σε φιλτραρισμένο υδατικό διάλυμα ($C=10^{-3}$ g/ml).....	143
Εικόνα 3.5: Σχηματική αναπαράσταση που δείχνει την ενθυλάκωση των συμπλόκων νικελίου στα νανοσωματίδια του δισυσταδικού συμπολυμερούς	150
Εικόνα 3.6: TEM απεικόνιση των υδατικών διαλυμάτων των PEG-b-PPhOx/ MagnNPs (10/0.1) νανοσυστημάτων, όπου φαίνονται κυρίως οι πυρήνες των νανοσωματιδίων με μικρά σκούρα να είναι τα μαγνητικά.....	168
Εικόνα 3.7: Απεικόνιση PEG-b-PPhOx/MagnNPs/IND ή PI-b-PEO/MagnNPs/IND νανοσυστημάτων σε διαλύματα.	173
Εικόνα 3.8: Υδατικά διαλύματα των PEG-b-PPhOx/MagnNPs/IND (10/0.1/2) και PI-b-PEO/MagnNPs/ IND (10/0.2/2) νανοσυστημάτων	174

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1: Μοριακά χαρακτηριστικά των προδρόμων MPOx βαθμωτών συμπολυμερών.....	79
Πίνακας 2.2: Μοριακά χαρακτηριστικά των τριών προδρόμων πολυμερών που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση.....	83
Πίνακας 2.3: Ποσότητες και συνθήκες για τη σύνθεση των συμπολυμερών κατά συστάδες PEG-b-PPhOx.....	87
Πίνακας 2.4: Ποσότητες και συνθήκες πολυμερισμού των PEG-b-PPhOx – Πρόσθετα πειράματα.....	88
Πίνακας 2.5: Μοριακά χαρακτηριστικά των χρησιμοποιηθέντων στην υποενότητα αυτή συμπολυμερών κατά συστάδες	90
Πίνακας 3.1: Μοριακά χαρακτηριστικά των βαθμωτών MPOx και HMPOx συμπολυμερών	102
Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός και φθορισμού των HMPOx συμπολυμερών σε υδατικά διαλύματα (με pH 7 και $C=10^{-2}$ g/ml)	105
Πίνακας 3.3: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός και φθορισμομετρίας για HMPOx συμπολυμερή σε PBS	109
Πίνακας 3.4: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός και φθορισμομετρίας για HMPOx συμπολυμερή σε PBS-FBS (90/10% v/v)	111
Πίνακας 3.5: Μοριακά χαρακτηριστικά των προδρόμων και των QIm πολυμερών, που βασίζονται σε PCMS.....	118
Πίνακας 3.6: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός για τα υδατικά διαλύματα των QIm πολυμερών σε pH~ 7.....	123
Πίνακας 3.7: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός για τα QIm πολυμερή ($C=10^{-3}$ g/ml) σε PBS (pH=7.4, I=0.15M)	130
Πίνακα 3.8: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός για τα QIm/FBS πολυμερή σε PBS διάλυμα	131
Πίνακας 3.9: Συνθήκες σύνθεσης και μοριακά χαρακτηριστικά των PEG-b-PPhOx συμπολυμερών.....	134
Πίνακας 3.10: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός για υδατικά διαλύματα PEG-b-PPhOx συμπολυμερών	140
Πίνακας 3.11: LS αποτελέσματα των PEG-b-PPhOx συμπολυμερών σε διαλύματα PBS	145

Πίνακας Α: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.....	180
Πίνακας Β: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους.....	182
Πίνακας Π1: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός για υδατικά μη φιλτραρισμένα διαλύματα των PEG-b-PPhOx συμπολυμερών.....	185
Πίνακας Π2: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός για τα μη-φιλτραρισμένα διαλύματα PBS των PEG-b-PPhOx συμπολυμερών.....	186

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ) το διάστημα Μαΐου 2012 - Οκτωβρίου 2015 υπό την επίβλεψη του Δρ. Α. Πίσπα και είχε ως σκοπό τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό υβριδικών νανοσυστημάτων από συμπολυμερή κατά συστάδες. Εν μέρει, χρηματοδοτήθηκε στα πλαίσια της πράξης «Θαλής – Πανεπιστήμιο Πατρών – Ανάπτυξη Πολυ-λειτουργικών Μαγνητικών Νανοσωματιδίων για τη Στοχευμένη Χορήγηση Αντικαρκινικών Φαρμάκων» του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση» (ΕΠΕΔΒΜ) που συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο -ΕΚΤ) και Εθνικούς πόρους με MIS: 380212 και Φ.Κ.: D563.

Δηλώνω υπεύθυνα, ότι η παρούσα διδακτορική διατριβή είναι αυθεντική εξ' ολοκλήρου και δεν περιέχει υλικό δημοσιευμένο από άλλους συγγραφείς, εκτός των περιπτώσεων όπου αναφέρονται οι ανάλογες βιβλιογραφίες. Επιπλέον, κανένα μέρος της διατριβής αυτής δεν έχει υποβληθεί για την απονομή οποιουδήποτε τίτλου από άλλο Ερευνητικό Ίδρυμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Εισαγωγή – Γενικά για τη Νανοτεχνολογία και τις Νανοεπιστήμες

Με την νανοτεχνολογία και τις νανοεπιστήμες¹ δίνεται η δυνατότητα κατανόησης και ελέγχου υλικών σε κλίμακα ατόμου και μορίου (1-100nm) με στόχο την παραγωγή δομών με πρωτότυπες ιδιότητες και λειτουργίες που οφείλονται στο μέγεθός τους, στο σχήμα τους ή/ και στη σύστασή τους. Οι ιδιότητες (φυσικές, χημικές, οπτικές και ηλεκτρικές) των νανοϋλικών διαφέρουν από αυτές των ίδιων υλικών σε συμβατική κλίμακα (όπως ο κόσμος που ζούμε, μακρόκοσμος). Υπάρχουν δύο βασικές οδοί πρόσβασης στον νανόκοσμο: (α) η μοριακή κατασκευή η οποία αφορά το χειρισμό μεμονωμένων ατόμων (εργαζόμενοι από κάτω προς τα πάνω, bottom-up design ^{2,3}) και (β) η υπερσμίκρυνση η οποία παράγει ολοένα και μικρότερες συσκευές (δουλεύοντας από πάνω προς τα κάτω, top-down design ^{2,4}).

Είναι γνωστό, ότι καθώς μειώνεται το μέγεθος ενός σωματιδίου, γίνεται μεγαλύτερο το ποσοστό των ατόμων του βρίσκονται στην επιφάνειά του σε σύγκριση με το αντίστοιχο ποσοστό που βρίσκονται στο εσωτερικό του. Με άλλα λόγια, ο λόγος επιφάνειας προς όγκο του υλικού γίνεται πολύ μεγάλος. Ως αποτέλεσμα παρατηρείται μεγαλύτερη αντιδραστικότητα των υλικών, επιτρέποντας νέες μοναδικές εφαρμογές^{1,3,5,6}. Η νανοτεχνολογία λοιπόν, έχει χαρακτήρα διεπιστημονικό, αφού συνδυάζεται άριστα με τις υπόλοιπες επιστήμες των οποίων οι δομές που τις απαρτίζουν μετρώνται και αυτές στην ίδια κλίμακα (νανοκλίμακα), όπως η κβαντική και μοριακή φυσική, η χημεία, η βιολογία, η πληροφορική και η μικροηλεκτρονική. Οι δυνατότητες εξέλιξης οι οποίες προσφέρουν τα εργαλεία της νανοτεχνολογίας, αφενός υπόσχονται να επιλύσουν πολλές παγκόσμιες προκλήσεις που απασχολούν τον σύγχρονο άνθρωπο (όπως ζητήματα προστασίας του περιβάλλοντος, τηλεπικοινωνίας, ιατρικής, ενέργειας) και αφετέρου εγείρουν πολλά ερωτήματα σχετικά με το κατά πόσο είναι απόλυτα εφικτή η εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στα πλαίσια της καθημερινότητας του ανθρώπου χωρίς την ύπαρξη ηθικά αμφιλεγόμενων ζητημάτων ^{1,3}.

1.2 Ορισμοί περί πολυμερών και αυτό-οργάνωσης

Τα συμπολυμερή (copolymers)⁷ είναι μακρομοριακές ενώσεις δύο ή περισσότερων διαφορετικών ειδών μικρών χημικών ενώσεων ή μονομερικών δομικών μονάδων (monomers, monomeric-repeating units). Οι διαφορετικές αυτές δομικές ομάδες συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικό δεσμό και το μακρομόριο ονομάζεται συμπολυμερές. Η σχετική τοποθέτηση των διαφορετικών μονομερών στην αλυσίδα, η οποία ελέγχεται από τον τρόπο σύνθεσής τους, καθορίζει και το είδος του συμπολυμερούς.

Τα αδρομερή ή συσταδικά ή κατά συστάδες συμπολυμερή (block copolymers)⁷⁻⁹ είναι αυτά που περιέχουν περισσότερο ή λιγότερο μεγάλες ομάδες από μονάδες του ίδιου πολυμερούς και εξ ορισμού, τα διαφορετικά είδη των επαναλαμβανόμενων μονάδων εντοπίζονται σε διακριτές συστάδες κατά μήκος της κύριας πολυμερικής αλυσίδας. Παράδειγμα της μορφής των συμπολυμερών κατά συστάδες που αποτελούνται από δύο «αδρά» ομοπολυμερικά τμήματα ή δύο διακριτές αλληλουχίες των Α και Β είναι – AAABBBB– (Εικόνα 1.1 (α)). Όσον αφορά την αρχιτεκτονική τους, τα συσταδικά συμπολυμερή μπορούν να διαχωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Στη γραμμική αρχιτεκτονική, όλες οι συστάδες είναι διατεταγμένες κατά μήκος μιας μακρομοριακής αλυσίδας. Από την άλλη μεριά (μη γραμμική αρχιτεκτονική) όταν οι συστάδες συνδέονται με μη-γραμμικό τρόπο σχηματίζεται μία ποικιλία σχημάτων, όπως τα αστεροειδή δισυσταδικά, τα κυκλικά δισυσταδικά συμπολυμερή (Εικόνα 1.1(β)) κ.ά.



(α)



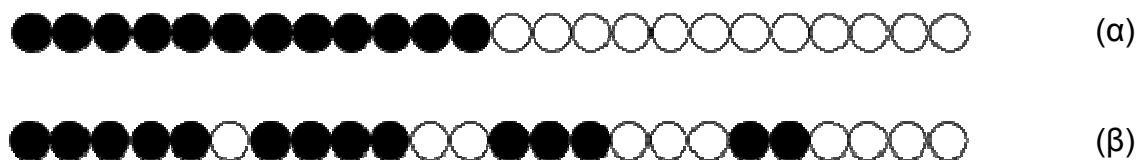
(β)

Εικόνα 1.1: (α) AB δισυσταδικό συμπολυμερές, (β) Κυκλικό AB συμπολυμερές¹⁰.

Τα τελευταία χρόνια, τα συμπολυμερή κατά συστάδες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον μιας και έχουν χαρακτηριστικές ιδιότητες¹⁰⁻¹³, προσφέροντας νέες δυνατότητες στο σχεδιασμό των μακρομορίων. Η παρασκευή των νέων αυτών και πιο εξελιγμένων συμπολυμερών στηρίζεται στη χρήση σύγχρονων και ελεγχόμενων τεχνικών σύνθεσης πολυμερών¹¹ οι οποίες επιτρέπουν την επιλεκτική τροποποίηση πολυμερών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζουν ο ανιοντικός, ο κατιονικός και ο ριζικός πολυμερισμός (υποκεφάλαιο 1.5) με τους οποίους μπορούν να συντεθούν νέα αμφίφιλα

συμπολυμερή κατά συστάδες. Η αυτοοργάνωση των συμπολυμερών κατά συστάδες, που περιέχουν δύο ασύμβατες συστάδες, στην αμιγή κατάσταση πραγματοποιείται μέσα από μια συνύπαρξη δυνάμεων: από την μια, απωστικές δυνάμεις μεταξύ των δύο ασύμβατων συστάδων, και από την άλλη, ελκτικές δυνάμεις λόγω του ομοιοπολικού δεσμού που ενώνει τις δύο συστάδες μεταξύ τους. Σε μακροσκοπική κλίμακα, τα συμπολυμερή κατά συστάδες δε μπορούν να διαχωριστούν σε φάσεις εξαιτίας της σύνδεσής τους με ομοιοπολικό δεσμό, αλλά λόγω της θερμοδυναμικής ασυμβατότητας των διαφορετικών συστάδων, σε μικροσκοπική κλίμακα, δύνανται να σχηματίσουν μικροφάσεις σε κλίμακα νανομέτρων και να έχουν πολύ καλά καθορισμένες-διατεταγμένες δομές σε στερεά μορφή. Η μορφολογία του κατά συστάδες συμπολυμερούς σε στερεά μορφή μπορεί να καθοριστεί (και επομένως να ρυθμιστεί) από τα μοριακά χαρακτηριστικά, όπως το μοριακό βάρος του, η χημική σύσταση, το κατά όγκο ποσοστό της κάθε συστάδας στο πολυμερές, η αρχιτεκτονική και οι θερμοδυναμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστάδων. Για παράδειγμα, η γεωμετρική δομή που μπορεί να δημιουργήσει ένα κατά συστάδες συμπολυμερές (στην στερεά αμιγή κατάσταση ανάλογα με το κλάσμα όγκου του ομοιοπολυμερούς A) είναι μορφή σφαιρών, κυλίνδρων, διπλού γυροειδούς και φύλλων.

Μια άλλη ενδιαφέρουσα κατηγορία συμπολυμερών είναι τα βαθμωτά (gradient copolymers)¹⁴⁻¹⁷. Τα συμπολυμερή αυτά ορίζονται ως πολυμερικά συστήματα δύο συστατικών στα οποία η συγκέντρωση του ενός συστατικού μεταβάλλεται κατά συνεχή τρόπο από το ένα άκρο στο άλλο. Στην Εικόνα 1.2, αναπαριστάται η συγκέντρωση κατά μήκος της αλυσίδας που ποικίλλει με διαφορετικούς τρόπους για τα AB δισυσταδικά και βαθμωτά συμπολυμερή.



Εικόνα 1.2: AB γραμμικό (α) κατά συστάδες (δισυσταδικό), (β) βαθμωτό συμπολυμερές¹⁷, με ● και ○ τα A και B μονομερή αντίστοιχα.

Για παράδειγμα, στα βαθμωτά συμπολυμερή πολυ(στυρενίου-4- υδροξυστυρενίου) (styrene/4- hydroxystyrene, S/HS) και πολυ(ακρυλικού η-βουτυλεστέρα- μεθακρυλικού

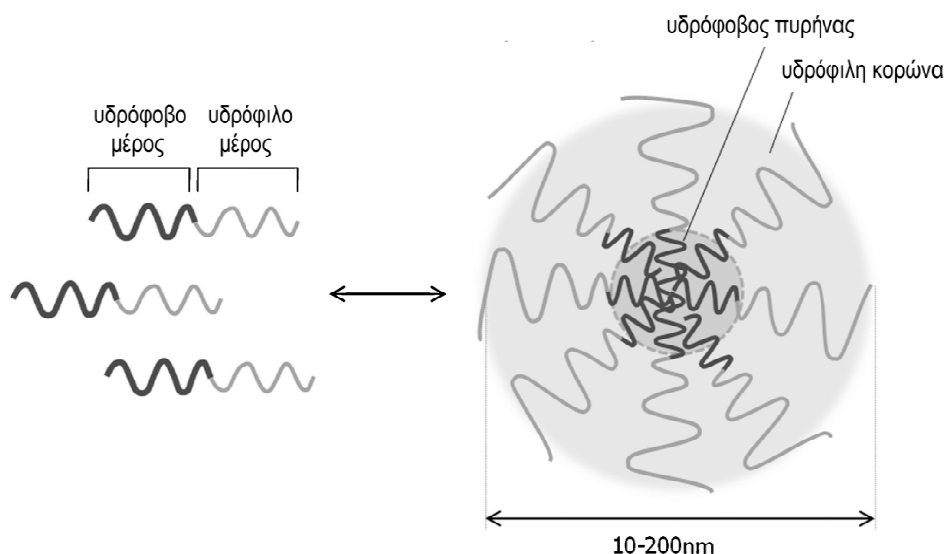
μεθυλεστέρα) (poly(n-butyl acrylate-co-methyl methacrylate, S/NBA) ^{18, 19} λόγω της κατανομής σύστασης κατά μήκος της αλυσίδας, οι απωστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονομερών διαφορετικής σύστασης μεταβάλλονται ομαλά κατά μήκος της αλυσίδας. Αυτή η δομή είναι διαφορετική από την περίπτωση των δισυσταδικών συμπολυμερών, όπου οι απωστικές αλληλεπιδράσεις περιορίζονται στην ένωση των συστάδων, και των τυχαίων συμπολυμερών (random copolymers), όπου οι απωθητικές αλληλεπιδράσεις διανέμονται σ' όλη την αλυσίδα. Η σταδιακή αλλαγή στη σύσταση κατά μήκος των αλυσίδων των βαθμωτών συμπολυμερών έχει ως αποτέλεσμα όχι μόνο τις λιγότερες ενδο-αλυσιδικές αλλά και δια-αλυσιδικές αλληλεπιδράσεις απώθησης σε σύγκριση με τα συμπολυμερή κατά συστάδες, που οδηγεί σε μοναδική συμπεριφορά των πρώτων στην αμιγή κατάσταση. Ο ρυθμός προσθήκης του δεύτερου μονομερούς επηρεάζει τις ιδιότητες του πολυμερισμού και άρα του σχηματιζόμενου πολυμερούς.

Έχει αποδειχθεί ότι τα βαθμωτά συμπολυμερή παρουσιάζουν μια ενδιάμεση συμπεριφορά σε σύγκριση με εκείνη των συμπολυμερών κατά συστάδες και των τυχαίων συμπολυμερών. Τα βαθμωτά συμπολυμερή έχουν υψηλότερη κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων (critical micelle concentration, CMC) σε εκλεκτικούς διαλύτες και ευρύτερες περιοχές θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης σε σύγκριση με τα συμπολυμερή κατά συστάδες.

Υπάρχουν πολλές τεχνικές σύνθεσης βαθμωτών συμπολυμερών, όπως για παράδειγμα μέσω του ζωντανού ή ψευδο-ζωντανού πολυμερισμού (συμπεριλαμβανομένων του κατιοντικού πολυμερισμού και της μετάθεσης διάνοιξης δακτυλίου), του ελεγχόμενου ριζικού πολυμερισμού (controlled radical polymerization, CRP) κ.ά. Τα βαθμωτά συμπολυμερή αναμένεται να χρησιμοποιούνται σε ποικίλες δυνητικές εφαρμογές όπως στη βελτίωση των μηχανικών και οπτικών ιδιοτήτων των υλικών, στην επίτευξη συμβατότητας των μη αναμίξιμων πολυμερών, στην διαδικασία της τήξης ως αποτελεσματικοί συμβατοποιητές ανάμειξης, σε ακουστικές αποσβέσεις κ.ά.

Τα αμφίφιλα συμπολυμερή (amphiphilic copolymers) ²⁰ περιέχουν δύο (ή περισσότερα) διαφορετικά μέρη που διαφοροποιούνται έντονα στην αλληλεπίδραση τους με τον διαλύτη στον οποίο βρίσκονται. Το ένα μέρος (λυόφιλο) βιώνει έντονες απώσεις μεταξύ των μονομερών του (ή ισοδύναμα βρίσκεται σε καλό διαλύτη) και το άλλο μέρος (λυόφοβο) βιώνει έντονες έλξεις μεταξύ των μονομερών του (ή ισοδύναμα βρίσκεται σε κακό διαλύτη). Ως εκ τούτου, τα μόρια αυτά εξαναγκάζονται σε επίτευξη ενός (θερμοδυναμικά) προνομιακού σχήματος (π.χ. μικκύλιο, συσσωμάτωμα, Εικόνα 1.3)

όταν διαλύονται σε ένα καλό διαλύτη για τη μία συστάδα (π.χ. νερό στην περίπτωση συμπολυμερούς με υδρόφιλο και υδρόφοβο μέρος).



Εικόνα 1.3: Γενική σχηματική αναπαράσταση σχηματισμού πολυμερικού μικκυλίου σε νερό ²¹.

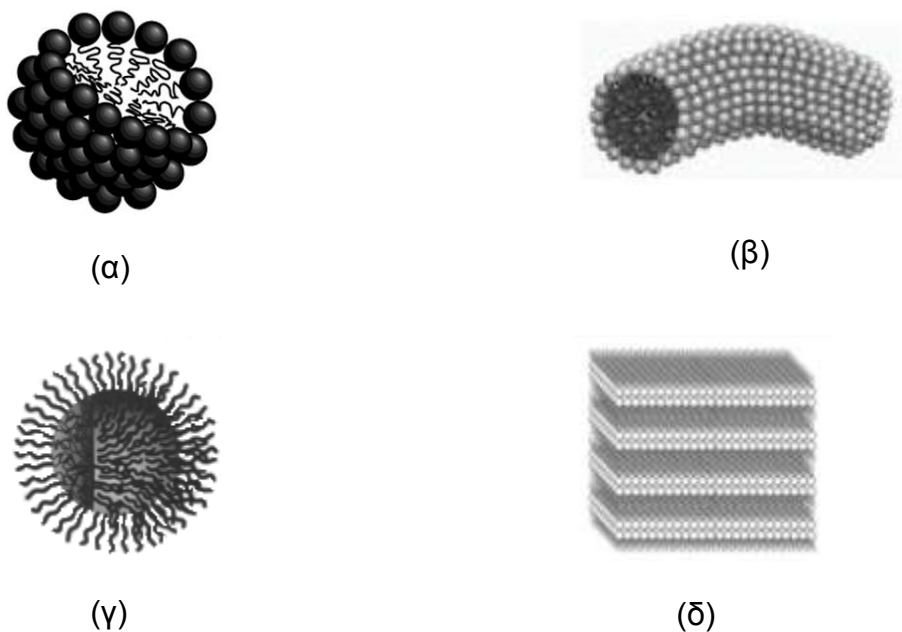
Το αποτέλεσμα είναι τα αμφίφιλα συμπολυμερή να μπορούν να αυτο-οργανώνονται τόσο σε διεπιφάνειες όσο και σε διαλύματα. Με αυτόν τον τρόπο, μπορούν να τροποποιηθούν σε μεγάλο βαθμό οι διεπιφανειακές ιδιότητες και να ενισχυθούν σημαντικά η συμβατότητα ή ο διαχωρισμός.

Πριν από τρεις και περισσότερες δεκαετίες, εκτός από τα εμβολιασμένα συμπολυμερή, εμφανίστηκε μια νέα κατηγορία αμφίφιλων μορίων, αυτή των συσταδικών συμπολυμερών. Παρουσία μη-πολικών και πολικών διαλυτών η αυτο-οργάνωση περιλαμβάνει τον σχηματισμό των περιοχών των υδρόφοβων ομάδων (σε επαφή με τον μη πολικό διαλύτη) και των περιοχών των υδρόφιλων ομάδων¹ (σε επαφή με το νερό ή άλλο πολικό διαλύτη ή υδρόφιλη επιφάνεια). Έτσι, τα δύο μέρη του ίδιου μορίου θα αλληλεπιδρούν διαφορετικά σε πολικό και μη πολικό διαλύτη. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα αμφίφιλα συμπολυμερή είναι εκείνα που αποτελούνται από υδρόφιλα μέρη και από υδρόφοβα μέρη. Τα αμφίφιλα μόρια γενικότερα μπορεί να είναι είτε μικρού είτε μεγάλου μοριακού βάρους. Για παράδειγμα, μικρά αμφίφιλα μόρια είναι οι

¹ Παραδείγματα γνωστών υδρόφιλων λειτουργικών ομάδων είναι: τα καρβοξυλικά οξέα/ άλατα, τα σουλφονικά οξέα/ άλατα, τα φωσφορικά οξέα/ άλατα, τα υδροξύδια, οι αμίνες και τα άλατα των αμινών. Σε αντίθεση το μέθυλο $-CH_3$ είναι υδρόφοβη ομάδα. Βέβαια, το φορτίο ή και το πεχά (pH) μπορεί να επηρεάζουν την υδροφιλικότητα.

επιφανειοδραστικές ουσίες (surfactants) και τα λιπίδια ενώ τα δισυσταδικά συμπολυμερή είναι μεγάλα μακρομόρια.

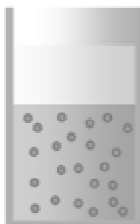
Όπως προαναφέρθηκε, το ενδιαφέρον των μεγάλων αμφίφιλων μορίων (των βαθμωτών και των κατά συστάδες συμπολυμερών) ²², λόγω της συσχέτισης των αδιάλυτων ομάδων τους, έγκειται στη δυνατότητα αυτο-οργάνωσής τους στα διαλύματα. Αποτελεί λοιπόν πρόκληση, ο έλεγχος και η ρύθμιση της μορφολογίας των συστατικών και των συνθηκών που οδηγούν στην επιθυμητή μικροδομή. Βέβαια, η κινητήρια δύναμη της αυτο-οργάνωσης εξαρτάται από το συγκεκριμένο κάθε φορά σύστημα και σε γενικές γραμμές, αυτή η δύναμη αποδίδεται στο «υδρόφοβο αποτέλεσμα» (hydrophobic effect). Υπάρχει η εντροπική δυσμενής διάταξη (εντροπικό κόστος) των μορίων του νερού στην περιοχή των αλυσίδων υδρογονάνθρακα που μετριάζεται από τη συσχέτιση και το διαχωρισμό μικροφάσεων των αδιάλυτων χαρακτηριστικών ομάδων, σχηματίζοντας υδρόφοβες περιοχές με διαστάσεις κολλοειδούς. Οι υδρόφοβες περιοχές διαλυτοποιούνται από τις περιβάλλουσες υδρόφιλες ομάδες. Για παράδειγμα, για μη ιοντικά συσταδικά συμπολυμερή, η κινητήρια δύναμη της αυτο-οργάνωσης εξαρτάται από το διαλύτη. Σε υδατικό διάλυμα αυτή η κινητήρια δύναμη είναι συνήθως εντροπικής προέλευσης (π.χ. για το PEO-PPO-PEO), ενώ σε οργανικούς διαλύτες (π.χ. για PS-PEO) η ενθαλπική συνεισφορά κυριαρχεί. Το τελικό μέγεθος των μικκυλίων είναι μια έκφραση της βέλτιστης θερμοδυναμικής κατάστασης, στην οποία το άθροισμα των παραγόντων (π.χ. τέντωμα αλυσίδας, μεσοεπιφανειακή τάση, αλληλεπιδράσεις απώθησης μεταξύ των ομάδων της κορώνας) ελαχιστοποιείται. Ενώ συνήθως τα μικκύλια έχουν σφαιρική γεωμετρία, έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχουν και άλλες μορφολογίες (Εικόνα 1.4) όπως ράβδοι (rods), ελάσματα/ φύλλα (lamellae), και λοιπές μορφολογίες συσσωματωμάτων (aggregates).



Εικόνα 1.4: Απεικόνιση μορφολογίας μικκυλίων (α) σφαιρικών, (β) ράβδου (ή/ και κυλινδρικών), (γ) αντίστροφων μικκυλίων (reversed micelles) και (δ) ελασμάτων. ^{20 23 24}

Συνήθως λοιπόν, τα αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες μπορούν να σχηματίσουν ευκολότερα μικκύλια πυρήνα-κελύφους (core-shell micelles), ή συσσωματώματα μεγέθους κολλοειδών. Αυτή η ιδιότητα, τους δίνει το προβάδισμα έναντι των άλλων συμπολυμερών, για να εξεταστούν σε ποικίλες χρήσεις όπως ως μεταφορείς φαρμάκων, (ή μιμητές κυττάρων), βάση πορωδών υλικών κλπ. Η φύση του διαλύτη, και η χημική σύσταση των μακρομορίων ρυθμίζουν τη σχέση των μακρομορίων (ενδο-μοριακές και δια-μοριακές αλληλεπιδράσεις). Επίσης, ενδέχεται αυτές οι αυτο-οργανούμενες δομές να είναι ευαίσθητες και στη μεταβολή του pH ή της ιοντικής ισχύος ή της θερμοκρασίας όπου σε τέτοιες περιπτώσεις μικρές αλλαγές του περιβάλλοντος προκαλούν δραματικές μεταβολές των φυσικών ιδιοτήτων των σωματιδίων. Για παράδειγμα στο συσταδικό σύστημα πολυ(στυρενίου-b-4-βινιλοπυριδίνης) βρωμιούχου αιθιδίου (poly(styrene-b-4-vinyl pyridine) ethidium bromide, PS-b-P4VpEtBr) ²⁰ μεταβάλλονται οι ηλεκτροστατικές απώσεις του στέμματος των μικκυλίων κατά την προσθήκη του άλατος. Σε χαμηλή περιεκτικότητα άλατος, οι ηλεκτροστατικές συσχετίσεις κυριαρχούν στη διαμόρφωση της αλυσίδας και περιορίζουν την ανάπτυξη των μικκυλίων. Καθώς αυξάνεται η περιεκτικότητα άλατος, οι ηλεκτροστατικές απωθήσεις προασπίζονται/θωρακίζονται (screening), και ο αριθμός συσσωμάτωσης αυξάνεται. Σε μέτρια περιεκτικότητα σε αλάτι, οι ιδιότητες των μικκυλίων επηρεάζονται κυρίως από τις συστάδες που σχηματίζουν τον πυρήνα.

Πέρα από τις γνωστές φάσεις, υπάρχει μια ενδιάμεση κατάσταση μεταξύ των κυρίως φάσεων και των μοριακά διεσπαρμένων συστημάτων. Ως κολλοειδή (Εικόνα 1.5)^{25 26 27} χαρακτηρίζονται τα συστήματα διασποράς, τα οποία αφορούν αυτήν την ενδιάμεση κατάσταση και περιέχουν μικροσκοπικά σωματίδια (1-1000nm) καθώς βρίσκονται ανάμεσα στα ομογενή (μοριακά) διαλύματα και τα ετερογενή συστήματα διασποράς (αιωρήματα).



Εικόνα 1.5: Αναπαράσταση ενός σταθερού κολλοειδούς συστήματος ²⁵.

Τα κολλοειδή αποτελούνται από την «διασπειρόμενη φάση» (ασυνεχής) που κατανέμεται ομοιόμορφα και από το «μέσο διασποράς» (συνεχής φάση, διαλύτης). Το γάλα (γαλάκτωμα, emulsion), οι μπογιές-μελάνη (λύμα), οι καπνοί (στερεό λύμα) και η ομίχλη (υγρό λύμα) είναι μερικά παραδείγματα κολλοειδών συστημάτων. Τα κολλοειδή συστήματα είναι γενικώς θερμοδυναμικά ασταθή καθώς τα κολλοειδή σωματίδια έχουν μεγάλη επιφάνεια και η θερμοδυναμική ισορροπία επιτάσσει μείωση της ελεύθερης επιφανειακής ενέργειας. Παρόλα αυτά συνήθως είναι κινητικά σταθερά. Με βάση την συνάφεια των φάσεων (ή αλλιώς τη σχέση τους προς το διαλύτη), τα κολλοειδή διακρίνονται σε λυοφοβικά και λυοφιλικά (ή υδροφοβικά και υδροφιλικά αν το μέσο διασποράς είναι το νερό). Σε αντίθεση με τα λυόφιλα κολλοειδή, στα λυόφοβα δεν υπάρχει συνάφεια μεταξύ της εσωτερικής φάσης και του μέσου διασποράς (όχι ισχυρή επιδιαλύτωση) και εύκολα εγκαταλείπουν την κολλοειδή κατάσταση της διασποράς. Τα λυόφοβα κολλοειδή αποκτούν κυρίως το φορτίο τους (το οποίο τα σταθεροποιεί) από προσρόφηση ιόντων και καταβυθίζονται (κροκιδώνονται) με την προσθήκη μικρών ποσοτήτων ηλεκτρολυτών. Κατά την προσθήκη αυτή εξουδετερώνεται ή ελαττώνεται το φορτίο ώστε το συνολικό φορτίο του κινούμενου σωματιδίου (ζ-δυναμικό) να είναι κοντά στο μηδέν, οπότε υπερισχύουν οι ελκτικές δυνάμεις van der Waals απέναντι στις ηλεκτρικές απωστικές δυνάμεις. Από την άλλη μεριά, τα λυόφιλα κολλοειδή αποκτούν κυρίως το φορτίο τους από διάσπαση ομάδων που μπορούν να δώσουν ιόντα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα των λυόφιλων κολλοειδών αποτελούν οι πρωτεΐνες που

αποκτούν το φορτίο τους από τον ιονισμό των καρβοξυλομάδων και αμινομάδων για να δώσουν COO^- ($\text{R-COOH} + \text{OH}^- \leftrightarrow \text{R-COO}^- + \text{H}_2\text{O}$) και NH_3^+ ($\text{R-NH}_2 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{R-NH}_3^+$). Ο ιονισμός των ομάδων αυτών, και επομένως το καθαρό φορτίο, εξαρτάται από το pH του διαλύματος. Σε χαμηλό pH τα μόρια της πρωτεΐνης είναι φορτισμένα θετικά ενώ σε υψηλό pH είναι φορτισμένα αρνητικά. Σε μια κρίσιμη τιμή pH παρατηρείται ηλεκτρική ουδετερότητα, η ηλεκτροφορητική ευκινησία της πρωτεΐνης είναι μικρή, και το σημείο αυτό λέγεται ισοηλεκτρικό σημείο (Ι.Σ.). Στο Ι.Σ. λόγω της ηλεκτρικής ουδετερότητας ευνοείται η σύγκρουση των κολλοειδών σωματιδίων και συνεπώς η συσσωμάτωσή τους προς μεγαλύτερα σωματίδια και η κατακρήμνισή τους με τη μορφή ιζήματος. Το ισοηλεκτρικό σημείο εξαρτάται από τη φύση της πρωτεΐνης και επιτρέπει την ταυτοποίηση και τον διαχωρισμό τους μέσα από ένα μίγμα πρωτεϊνών.

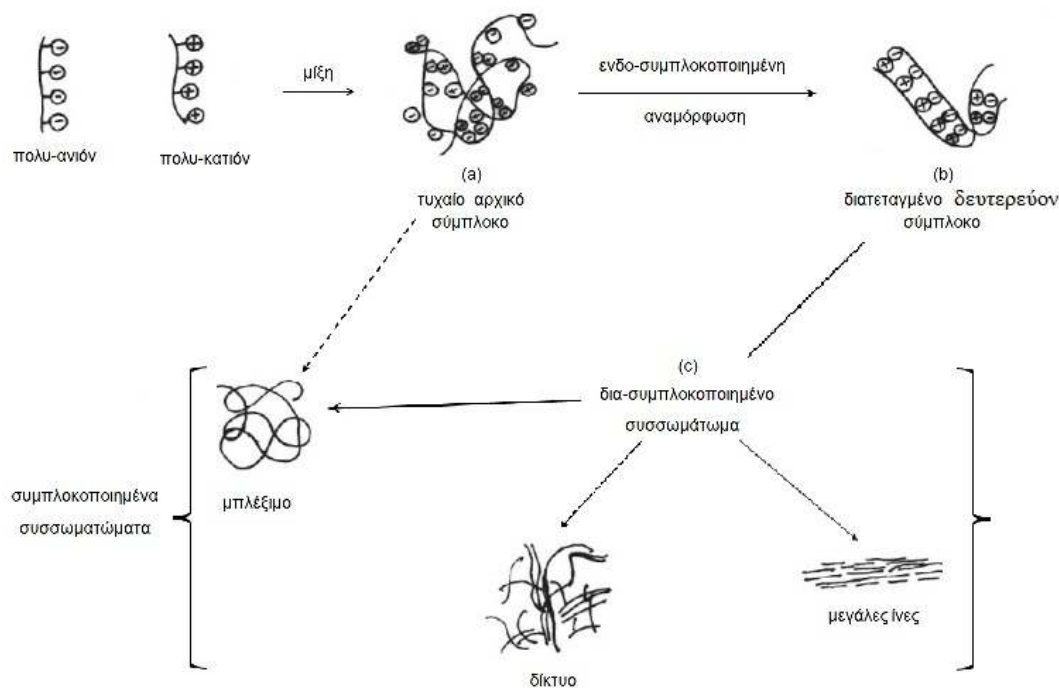
Τα πολυμερή που περιέχουν ένα καθαρό θετικό ή αρνητικό φορτίο σε ουδέτερο πεχά (pH) ονομάζονται πολυηλεκτρολύτες (polyelectrolytes)^{28, 29} και είναι γενικά διαλυτά στο νερό. Η διαλυτότητά τους οδηγείται από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του νερού και του φορτισμένου μονομερούς. Παραδείγματα τέτοιων πολυμερών περιλαμβάνουν DNA, πρωτεΐνες, ορισμένα παράγωγα πολυμερών κυτταρίνης κ.λπ.

Οι πολυηλεκτρολύτες^{30 31} ταξινομούνται σε διάφορους τύπους. Με βάση την προέλευση κατατάσσονται σε φυσικούς πολυηλεκτρολύτες, συνθετικούς πολυηλεκτρολύτες και χημικώς τροποποιημένα βιοπολυμερή. Με βάση τη σύνθεση χωρίζονται σε ομοπολυμερή και συμπολυμερή. Με βάση τη μοριακή αρχιτεκτονική διακρίνονται σε γραμμικούς (linear), διακλαδισμένους (branched) ή/ και σε σταυροδεμένους (cross linked) κατηγορίες. Με βάση την ηλεκτροχημεία μπορούν να ταξινομηθούν σε πολυοξέα/ πολυανιόντα (polyacids/ polyanions) (π.χ. νουκλεϊκό οξύ, πηκτίνη), σε πολυβάσεις/ πολυκατιόντα (polybases/ polycations) (π.χ. πολυ(L-λυσίνη)) και σε πολυαμφολύτες (polyampholytes). Οι πολυαμφολύτες δηλαδή περιέχουν τόσο όξινες όσο και βασικές ομάδες και είναι θετικά φορτισμένοι σε χαμηλό pH και αρνητικά φορτισμένοι σε υψηλό pH.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα σύμπλοκα μεταξύ πολυηλεκτρολυτών (polyelectrolyte complexes, PECs) αντίθετου φορτίου^{32, 33}. Όσον αφορά τις ιδιότητες και το μηχανισμό σχηματισμού των συμπλόκων από αυτούς μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, υπήρξαν θεωρίες που προτείνονται με βάση τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις και τις ελεύθερες ενέργειες ανάμιξης των Flory-Huggins. Σε γενικές γραμμές, οι δομικοί σκελετοί (ραχοκοκκαλίες, backbones) των δύο πολυμερών δεν είναι συμβατές μεταξύ τους και απωθούν η μια την άλλη, ωστόσο, το κλάσμα φορτίου, δηλαδή το

ποσοστό των φορτισμένων μονομερών κάθε αλυσίδας, των πολυμερών καθορίζει τον τύπο της αλληλεπίδρασης που πρόκειται να συμβεί μεταξύ των πολυμερών. Όταν το κλάσμα του φορτίου είναι χαμηλό, η απώθηση του δομικού σκελετού του πολυμερούς (παράμετρος αλληλεπίδρασης του Flory) είναι κυρίαρχη και το διάλυμα διαχωρίζεται σε δύο φάσεις που η καθεμία περιέχει ως επί το πλείστον ένα από τα δύο πολυμερή. Για το υψηλό κλάσμα φορτίου, οι ελκυστικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερών κυριαρχούν και αυτά σχηματίζουν ένα σύμπλοκο και καθιζάνουν. Στο ενδιάμεσο εύρος του κλάσματος φορτίου, η κατάσταση ισορροπίας μπορεί να είναι μια μεσόφαση όπου τα δύο πολυμερή διαχωρίζονται μόνο μικροσκοπικά. Ανάλογα με τη στοιχειομετρία του μίγματος (τις σχετικές συγκεντρώσεις, τα σχετικά μήκη αλυσίδας και τις πυκνότητες φορτίου), παρατηρεί κανείς κυρίως δύο τύπους σύνθετων σχηματισμών, έναν μακροσκοπικό διαχωρισμό φάσης μεταξύ του διαλύτη και των πολυμερών και μια μερική συσσωμάτωση των πολυμερικών αλυσίδων.

Η διαδικασία σχηματισμού των PECs περιλαμβάνει κυρίως 3 στάδια, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.6. Για το πρώτο στάδιο (πρωταρχικός σχηματισμός συμπλόκου) ευθύνονται οι δυνάμεις Coulomb. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει τη διαδικασία σχηματισμού εντός των ενδο-συμπλόκων που αφορά το σχηματισμό των νέων δεσμών και/ ή τη διόρθωση των παραμορφώσεων των αλυσίδων του πολυμερούς. Το τρίτο στάδιο είναι η διαδικασία συσσωμάτωσης δια-συμπλόκων, η οποία περιλαμβάνει την δευτερογενή συσσωμάτωση των πρωτογενών συγκροτημάτων-συμπλόκων, κυρίως μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.



Εικόνα 1.6: Σχηματική αναπαράσταση σχηματισμού συμπλόκων πολυηλεκτρολυτών (PECs).

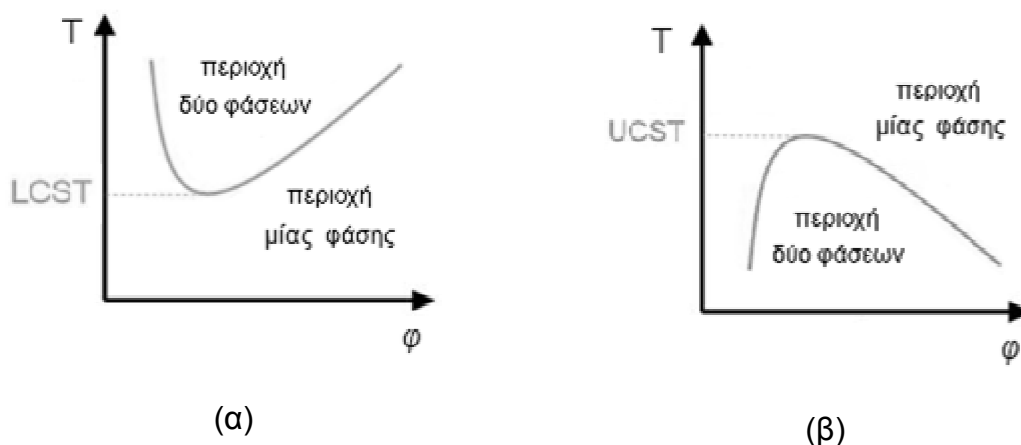
Τον σχηματισμό των PECs μπορεί να επηρεάσουν ένας αριθμός παραμέτρων³³, όπως η θέση του ιόντος, η πυκνότητα του φορτίου, η συγκέντρωση του πολυηλεκτρολύτη, το pH, η ιοντική ισχύ, οι συνδιαλύτες και η θερμοκρασία. Για παράδειγμα, αυξάνοντας την ιοντική ισχύ με την προσθήκη ενός ανόργανου άλατος, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις αποδυναμώνονται και μειώνεται η συμπλοκοποίηση (complexation) μεταξύ των πολυϊόντων, λόγω της θωράκισης των αντίθετων φορτίων των μακρομορίων από τα ιόντα χαμηλού μοριακού βάρους.

Με βάση λοιπόν, τα παραπάνω αντιλαμβάνεται κάποιος τους λόγους που οι πολυηλεκτρολύτες έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας τις τελευταίες δεκαετίες. Παραδείγματα πιθανών εφαρμογών τους είναι ως μεμβράνες, για επικάλυψη σε ταινίες και ίνες, για απομόνωση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων, ως μικροκάψουλες για την μεταφορά/ παράδοση φαρμάκων κ.ά.

Είναι γνωστό³⁴, ότι η διαλυτότητα των πρωτεϊνών σε υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα εξαρτάται από την κατανομή υδρόφιλου και υδρόφοβου περιεχομένου σε αμινοξέα στην επιφάνεια της πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες που έχουν υψηλό περιεχόμενο σε υδρόφοβα αμινοξέα στην επιφάνειά τους, εμφανίζουν χαμηλή διαλυτότητα σε υδατικό διαλύτη. Από την άλλη μεριά, η επιφάνεια πρωτεΐνης με φορτισμένα και πολικά υπολείμματα αλληλεπιδρά με τις ιονικές ομάδες στο διαλύτη αυξάνοντας την διαλυτότητά της. Οι

απωστικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις σχηματίζονται όταν οι πρωτεΐνες διαλύονται σε ένα διάλυμα ηλεκτρολύτη. Αυτές οι δυνάμεις μεταξύ πρωτεϊνών εμποδίζουν τη συσσωμάτωση και διευκολύνουν τη διάλυση. Μετά τη διάλυση σε ένα διάλυμα ηλεκτρολύτη, αντισταθμιστικά ιόντα μεταναστεύουν προς διαλύτη φορτισμένα υπολείμματα επιφανείας επί της πρωτεΐνης, σχηματίζοντας μία άκαμπτη μήτρα αντιθέτων ιόντων στην επιφάνεια της πρωτεΐνης.

Τα θερμο-ανταποκρινόμενα πολυμερή (thermoresponsive polymers) χωρίζονται σε δύο κατηγορίες^{35, 36}, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.7. Η πρώτη κατηγορία (Εικόνα 1.7(α)) αφορά πολυμερή με χαμηλή κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος (lower critical solution temperature, LCST) όπως την πολυ(αιθυλενο γλυκόλη) (poly(ethylene glycol), PEG), το πολυ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο) (poly(N- isopropylacrylamide), PNIPAM) ενώ η δεύτερη αναφέρεται στη συμπεριφορά της υψηλής κρίσιμης θερμοκρασίας διαλύματος, (upper critical solution temperature, UCST).



Εικόνα 1.7: Σχηματική απεικόνιση των διαγραμμάτων φάσεων για πολυμερικά διαλύματα με τη θερμοκρασία (T) συναρτήσει του κλάσματος όγκου του πολυμερούς (polymer volume fraction, φ). Τα (α) και (β) αφορούν τις συμπεριφορές της χαμηλής κρίσιμης θερμοκρασίας διαλύματος και της υψηλής κρίσιμης θερμοκρασίας διαλύματος αντίστοιχα.

Στην πρώτη περίπτωση (Εικόνα 1.7(α)), αυξάνοντας τη θερμοκρασία παρατηρείται μείωση της διαλυτότητας των πολυμερών στο νερό. Το γεγονός αυτό αντιτίθεται στη γενική τάση των πολυμερών όπου αύξηση της θερμοκρασίας συνεπάγεται και αύξηση της διαλυτότητάς τους σε διαλύτες. Κάθε παράγοντας που ενδυναμώνει τις ελκτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τμημάτων των μακρομοριακών αλυσίδων τείνει να

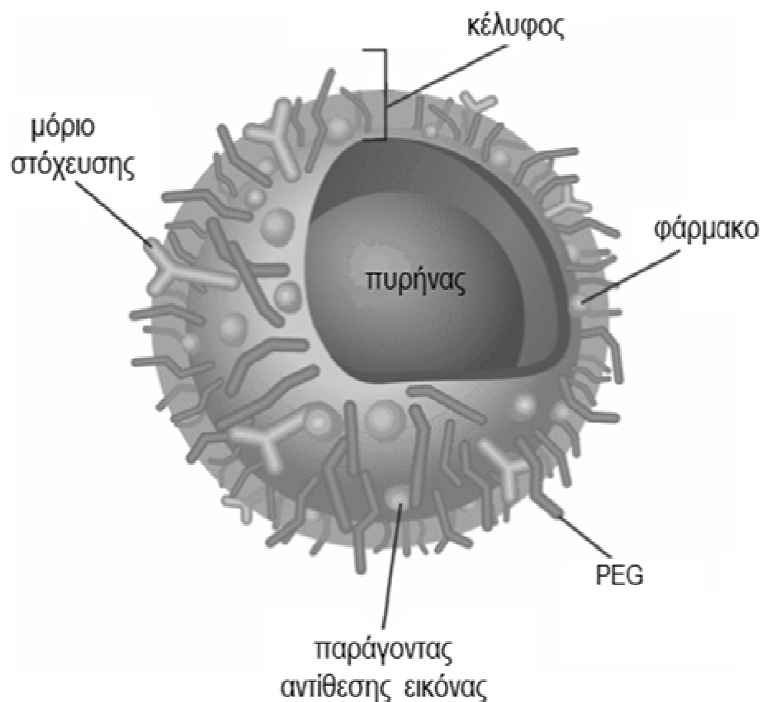
χαμηλώνει τη LCST. Σε αντίθεση με τις παραμέτρους που οδηγούν σε αύξηση της χαμηλής κρίσιμης θερμοκρασίας διαλύματος, αφού ευνοούνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του διαλύτη και των τμημάτων των πολυμερών. Επίσης, η προσθήκη αλάτων ή η αύξηση του μοριακού βάρους των πολυμερών μειώνουν τη LCST. Στη δεύτερη περίπτωση (Εικόνα 1.7(β)), για θερμοκρασίες υψηλότερες της UCST, επιτυγχάνεται σταθερή ομογενής κατάσταση για τα διαλύματα των πολυμερών. Εν κατακλείδι, μπορεί να δημιουργηθούν τα λεγόμενα σχιζοφρενή θερμο-ανταποκρινόμενα συμπολυμερή, τα οποία συνδυάζουν τόσο τη χαμηλή κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος όσο και την υψηλή κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος. Η διαλυτότητα τέτοιων συμπολυμερών εξαρτάται από το ποια θερμοκρασία, (η LCST ή η UCST), είναι υψηλότερη από την άλλη.

1.3 Παραδείγματα Αμφίφιλων Συμπολυμερών

Τα πολυμερικά μικύλλια σχηματίζονται αυθόρμητα όταν αμφίφιλα επιφανειοδραστικά ή πολυμερικά μόρια τοποθετηθούν συνήθως σε υδατικό περιβάλλον και έχουν δομή πυρήνα– κελύφους. Ο πυρήνας του μικυλλίου είναι υδρόφοβος και εκεί δεσμεύονται αμφίφιλα ή μικρής υδατοδιαλυτότητας φάρμακα με απλό εγκλωβισμό ή με ομοιοπολική σύνδεση. Για παράδειγμα, ο πυρήνας περιβάλλεται από υδρόφιλο πολυμερές (π.χ. PEG ή PEO) το οποίο με τη σειρά του προσδίδει στο μικύλλιο μεγάλη σταθερότητα. Το πολυμερές αυτό παρατείνει την κυκλοφορία του μικυλλίου στο αίμα εμποδίζοντας τη φαγοκυττάρωσή του και ταυτόχρονα αυξάνει τη συσώρευσή του στον ιστό – στόχο (καρκινικό).

Σε πολλά βιοδιασπώμενα και in-situ συστήματα χορήγησης φαρμάκων, το υδρόφιλο πολυ(αιθυλενοξειδίο) (PEO ή PEG), έχει λάβει ιδιαίτερη προσοχή τις τελευταίες δεκαετίες (όπως φαίνεται στο γενικό Εικόνα 1.8) ^{37 11}. Αυτό οφείλεται στις μοναδικές ιδιότητες που έχει ο συνθετικός αυτός πολυαιθέρας, όπως η βιοσυμβατότητα και η μη τοξικότητα ενώ παράλληλα είναι γνωστό ότι νανοσωματίδια επικαλυμμένα με PEG είναι μη ανιχνεύσιμα από το ανοσοποιητικό σύστημα (stealth ιδιότητες, δηλ. προκαλούν χαμηλή ανοσολογική απόκριση) ^{9,18,38,39}. Επίσης, τα πολυμερή PEOs είναι μη ιοντικές και διαλυτές ενώσεις στο νερό σε θερμοκρασίες κάτω των 98°C (συμπεριφορά LCST) ⁴⁰. Βέβαια, η θερμοκρασία αυτή μπορεί να αυξάνεται ελαφρώς με τη μείωση του μοριακού βάρους του πολυμερούς. Πολλές μελέτες σχετικές με PEG συμπολυμερή έχουν δημοσιευθεί ^{7,21,41,63}, όπως κατά συστάδες πολυ(αιθυλενοξειδίου) με πολυ(οξειδίο στυρενίου) (poly(ethylene oxide)-b-poly(styrene oxide), PEO-b-PSO), με πολυ(βουτυλενοξειδίο) (poly(ethylene oxide)- b-poly(butylene oxide), PEO-b-PBO), με

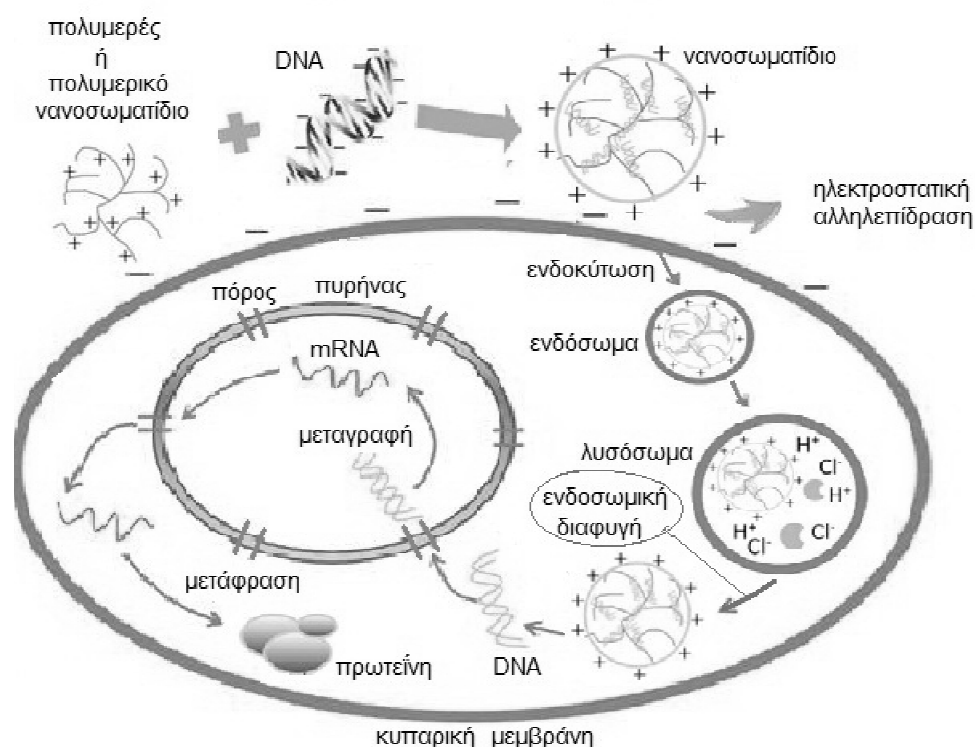
πολυ(στυρένιο) (poly(ethylene oxide)-*b*-poly(styrene), PEO-*b*-PS) και με πολυ(καπρολακτόνη) (poly(ethylene glycol)-*b*-poly(caprolactone), PEG-*b*-PCL), και περιλαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με τις ιδιότητές τους σε υδατικά μέσα ²¹, όπως το μέγεθος των σωματιδίων και της μορφολογίας.



Εικόνα 1.8: Πολυμερικά νανοσωματίδια με κορώνα από PEG (ή PEO) για τη μεταφορά φαρμάκων⁴².

Εκτός από την πολυ(αιθυλενογλυκόλη) που χρησιμοποιείται στα περισσότερα συστήματα, ως εναλλακτικά υδρόφιλα πολυμερή έχουν μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί και άλλα όπως για παράδειγμα η πολυ(αιθυλινιμίνη) (poly(ethylenimine) ή polyaziridine, PEI). Πιο συγκεκριμένα, η PEI η οποία έχει μοναδικές ιδιότητες (υψηλή πυκνότητα κατιοντικού φορτίου) χρησιμοποιείται σε διάφορους τομείς (όπως απορροπτικά, κόλλες, καλλυντικά επεξεργασία ύδατος κ.ά.) ενώ τελευταία αποτελεί ένα από τους γνωστούς αποτελεσματικούς φορείς γονιδίων² (Εικόνα 1.9).

² Τα κατιοντικά πολυμερή που έχουν καλή βιοαποικοδομησιμότητα και χαμηλή τοξικότητα, μπορούν να είναι φορείς του γονιδίου δημιουργώντας πολυσύμπλοκα με πρωτεΐνες κλπ. Αυτά πυροδοτούν την απελευθέρωση των νουκλεϊνικών οξέων, τη δομική ποικιλομορφία και τη σχετικά υψηλότερη αποτελεσματικότητα απελευθέρωσης σε σύγκριση με τα λιποσώματα. Η διαδικασία απελευθέρωσης γονιδίου από τέτοια πολυμερή περιγράφεται στην Εικόνα 1.9. Αρκετά πολυμερή συστήματα (συχνά κατιοντικά, αυτά με θετικά φορτισμένες αμινομάδες) μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα με DNA μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των θετικά φορτισμένων αμινομαδών του πολυμερούς και των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων της αλυσίδας του DNA.



Εικόνα 1.9: Η σχηματική παρουσίαση της διαδικασίας παράδοσης γονιδίου από κατιοντικά πολυμερή ⁴⁴.

Όπως άλλα κατιοντικά πολυμερή, τα συστήματα με PEI, έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν (πολυ)σύμπλοκα με DNA, αποτελώντας έτσι, μη-ϊικούς φορείς γονιδίων. Οι μη-ϊικοί φορείς παρουσιάζουν ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με τους ιϊικούς ⁴⁵ (viral gene vectors), όπως η απλή παραγωγή μεγάλης κλίμακας και η χαμηλή ανοσογονικότητα υποδοχής και βοηθούν στο να ξεπεραστούν τα προβλήματα των ιϊκών φορέων (π.χ. δημιουργία ανοσολογικής απόκρισης, καρκινογένεσης και μεταλλάξεων). Παλιότερα οι μη ιϊικοί φορείς είχαν ως μειονέκτημα σε σύγκριση με τους ιϊικούς, τα χαμηλά επίπεδα ελευθέρωσης (εισάγοντας νουκλεϊκά οξέα σε κύτταρα) και έκφρασης του γονιδίου. Πρόσφατα σχεδιάστηκαν μόρια μη ιϊικών φορέων με αποδόσεις ελευθέρωσης παρόμοιες με εκείνες των ιών (δηλαδή υψηλές) ⁴⁶⁻⁴⁸. Μια ποικιλία από πολυμερή βασισμένα σε PEI έχουν μελετηθεί ^{45,48} για την αποτελεσματικότητά τους στην ελευθέρωση γονιδίων και έχει αναφερθεί ότι το κατιοντικό αυτό μη ιϊικό πολυμερές έχει υψηλή κυτταροτοξικότητα σε πολλές κυτταρικές σειρές. Πιο συγκεκριμένα, η αποτελεσματικότητα ελευθέρωσης των γονιδίων και η κυτταροτοξικότητα του PEI εξαρτάται από το μοριακό βάρος. Έχει αποδειχθεί ότι PEI με μοριακό βάρος μεγαλύτερο

των 25 kDa εμφανίζει υψηλή αποδοτικότητα ελευθέρωσης των γονιδίων και κυτταροτοξικότητας ενώ από την άλλη πλευρά, για PEI χαμηλότερου μοριακού βάρους (δηλαδή < 1.8 kDa) εμφανίζει χαμηλή έως καθόλου ελευθέρωση και κυτταροτοξικότητα⁴⁹⁻⁵². Βέβαια, η πολυ(αιθυλινιμίνη) μπορεί να έχει είτε γραμμική είτε διακλαδισμένη μορφή⁵³. Η γραμμική PEI έχει υψηλότερη αποτελεσματικότητα ελευθέρωσης γονιδίων τόσο σε πειράματα αποσπασμένων μερών εκτός του ζωντανού οργανισμού (*in vitro*) όσο και σε έναν έμβιο οργανισμό (*in vivo*), σε σύγκριση με την αντίστοιχη διακλαδισμένη ίδιου μοριακού βάρους. Οι διακλαδισμένες πολυ(αιθυλενιμίνες) που έχουν περισσότερες πρωτοταγείς αμίνες ανά πολυμερές είναι θεωρητικά πιο τοξικές από την αντίστοιχη γραμμική. Οι πρωτοταγείς αμίνες της PEI⁵⁴ συμμετάσχουν στο σχηματισμό συμπλόκων με DNA μέσα από την ιοντική αλληλεπίδραση με τις φωσφορικές ομάδες του DNA. Από την άλλη μεριά, οι δευτερογενείς και τριτογενείς αμίνες της πολυ(αιθυλενιμίνης) παρουσιάζουν μια σημαντική ενδοσωμική διαταραχή μετά από την ενδοκυττάρωση (όπου τα κύτταρα απορροφούν μόρια όπως πρωτεΐνες, καταβροχθίζοντάς τα) λόγω της επίδρασης του ρυθμιστικού διαλύματος (buffering effect) σε pH μικρότερο του 7.4 (που είναι των φυσιολογικών συνθηκών)⁵⁴. Η παρουσία του αζώτου σε κάθε τρίτο άτομο του δομικού σκελετού, επιτρέπει μια αξιοσημείωτη ρυθμιστική ικανότητα για ένα ευρύ φάσμα τιμών pK_a . Ο προτεινόμενος μηχανισμός της ελευθέρωσης που περιλαμβάνει την εισροή των πρωτονίων, μαζί με τα αντισταθμιστικά ιόντα χλωρίου του ενδοσώματος, αυξάνει την επίδραση σπόγγου πρωτονίων (proton sponge effect). Ο αυξημένος όγκος θραύει τελικά το ενδόσωμα απελευθερώνοντας έτσι το γονίδιο^{55,56}. Η ρυθμιστική ικανότητα της PEI είναι απαραίτητη για την παράδοση του γονιδίου⁵⁷.

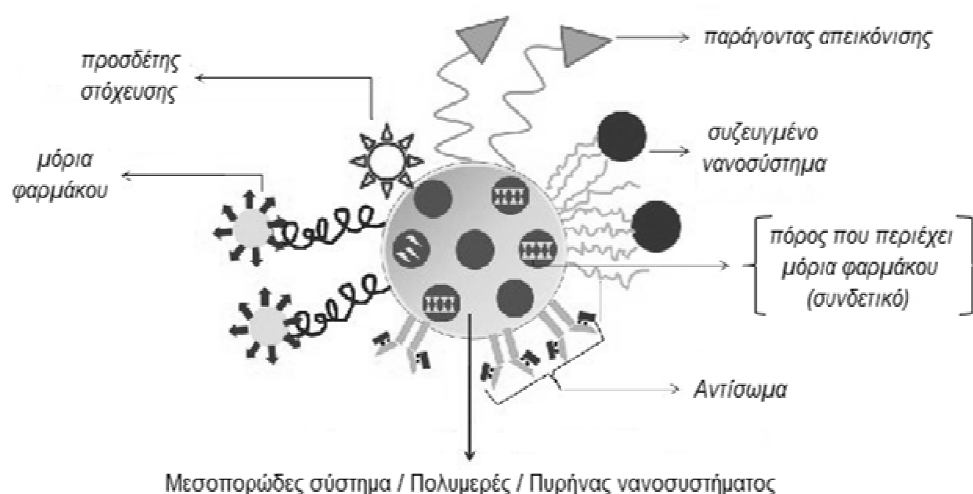
Τα πολυμερή PEI μπορούν να παραχθούν με υδρόλυση πολυ(οξαζολινών). Από το 1960, έχει καταγραφεί μεγάλο ενδιαφέρον για τις οξαζολίνες και τα παράγωγά τους και κυρίως τις 2-υποκατεστημένες οξαζολίνες (2- substituted oxazolines). Μονομερή που υποκαθίστανται στην 4- ή 5-θέση είναι πιο δύσκολο να πολυμεριστούν, λόγω του στερεοχημικού συνωστισμού. Οι πολυμερισμοί των οξαζολινών πραγματοποιούνται συνήθως μέσω ενός ζωντανού κατιοντικού μηχανισμού ανοίγματος δακτυλίου (living cationic ring-opening mechanism, CROP), ο οποίος δίδει καλώς καθορισμένα πολυμερή με στενή μέση κατανομή μοριακού βάρους. Ένα από τα ελκυστικά χαρακτηριστικά πολυ(οξαζολινών)⁵⁸⁻⁶⁰ είναι η ευκολία παρασκευής συμπολυμερών (π.χ. κυρίως συμπολυμερή κατά συστάδες) και η δομή της μονομερικής μονάδας μοιάζει με την αντίστοιχη αρκετών αμινοξέων (ισομερικές δομές). Απλά αλλάζοντας το μήκος της αλκυλο- πλευρικής ομάδας, η φύση των πολυμερών μπορεί να μεταβληθεί από

υδρόφιλη (με μέθυλο- και αίθυλο υποκαταστάτες) σε υδρόφοβη (με μακρύτερες αλκυλο-, άρυλο- και φαίνυλο- πλευρικές ομάδες). Επιπλέον, το μήκος της αλκυλο- ομάδας έχει σημαντική επίπτωση σχετικά με τις θερμικές ιδιότητες και τις ιδιότητες επιφάνειας ^{61 62}. Λόγω της πολυχρηστικότητάς τους, οι οξαζολίνες δύνανται να σχηματίσουν λειτουργικά υλικά και νανοδομές, αυξάνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο το ενδιαφέρον για την κατηγορία των υλικών αυτών. Η βιοσυμβατότητα των πολυ(οξαζολινών) είναι αποδεδειγμένη, σε βαθμό που ο όρος «ψευδοπεπτίδιο» επινοήθηκε για να δείξει τη στενή δομική ομοιότητα μεταξύ των πολυοξαζολινών και των πολυπεπτιδίων. Οι πολυ(οξαζολίνες) μπορούν να συζευχθούν με πρωτεΐνες και μικρά μόρια φαρμάκων διατηρώντας την ενεργότητά τους να εμβολιαστούν σε λιποσωμικές διπλοστιβάδες, να σχηματίσουν μικκύλια- μεταφορείς ή να ακινητοποιηθούν σε επιφάνειες φτιάχνοντας αντι-ρυπαντικές συσκευές ⁶¹. Όλοι αυτοί οι παράγοντες, έχουν προκαλέσει το ενδιαφέρον για τον πολυμερισμό των οξαζολινών με αποτέλεσμα να προκύπτουν πολυμερή προσανατολισμένων προς πιθανές εφαρμογές ⁶³. Ένα μεγάλο εύρος εμπορικά διαθέσιμων εφαρμογών των πολυ(οξαζολινών) έχει αναφερθεί σε πατέντες συμπεριλαμβανομένων σκευασμάτων κόλλας ή επικαλύψεων, σταθεροποιητών χρωστικών ουσιών σε μελάνια, καταλυτών καθώς και εφαρμογών προσωπικής φροντίδας ⁶¹. Λόγω των ανωτέρω πλεονεκτημάτων, τα αμφίφιλα συμπολυμερή από πολυ(οξαζολίνες) έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεταφορά ή διαλυτοποίηση πολλών υδρόφοβων φαρμάκων προερχόμενων από διαφορετικές κατηγορίες ενώσεων (όπως π.χ. πολυπεπτίδια, αναστολείς πρωτεάσης και αντιβιοτικά) μέσω πολυμερικών μικυλλίων.

1.4 Υβριδικές νανοδομές

Η τεχνολογία υβριδικών νανοςύνθετων υλικών ^{64,65} αναφέρεται στο σχεδιασμό, τη σύνθεση και τη βελτιστοποίηση υλικών που αποτελούνται από συνδυασμό συστατικών με συμπληρωματικές ή κάποιες φορές και αντίθετες ιδιότητες. Οι νανοδομές που συνδυάζουν οργανικά και ανόργανα είδη, εμφανίζουν συνεργατικές υβριδικές ιδιότητες τις οποίες δεν μπορούν να έχουν τα σύνθετα παραδοσιακά υλικά. Τα υβριδικά υλικά είναι συστήματα που συνήθως εμφανίζουν μεγάλη σταθερότητα και δημιουργούν δεσμούς με άλλα οργανικά και ανόργανα υλικά. Τα μεν οργανικά είδη ενδέχεται να είναι πολυμερή, πρωτεΐνες/ δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA), επιφανειοδραστικές ενώσεις σε αντίθεση με τα ανόργανα τα οποία μπορεί να είναι νανოსωματίδια μετάλλων ή οξειδίων τους και ανόργανα άλατα/ σύμπλοκα. Συνδυάζοντας λοιπόν, τις ιδιότητες των

παραπάνω ειδών (οργανικών- οργανικών, ανόργανων- οργανικών, ανόργανων- ανόργανων), που το καθένα είδος διαθέτει μοναδικά και καινούρια πλεονεκτήματα, επιτυγχάνεται ένας υψηλότερος βαθμός λειτουργικότητας των πολλαπλών νανοϋλικών (nanomaterials, NMs) ή νανοϋβριδικών υλικών (nanohybrids, NHs). Τα υβριδικά νανοϋλικά- νανοσυστήματα (Εικόνα 1.10) είναι πολυλειτουργικά με την έννοια ότι μπορούν να αποφέρουν περισσότερες της μιας λειτουργίες, με συνέργεια. Λόγω των ενδιαφέροντων μηχανικών, μαγνητικών, οπτικών ή και ηλεκτρικών ιδιοτήτων τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μεγάλο εύρος εφαρμογών συμπεριλαμβανομένων της βιοτεχνολογίας- βιοϊατρικής (π.χ. μεταφοράς φαρμακομορίων), των τεχνολογιών διεργασιών διαχωρισμού κλπ. Για παράδειγμα, η θεραπευτική εφαρμογή είναι ένας συνδυασμός των λειτουργιών ανίχνευσης, στόχευσης και παράδοσης επιφέροντας ένα αποτελεσματικό πολυλειτουργικό νανοςύστημα.

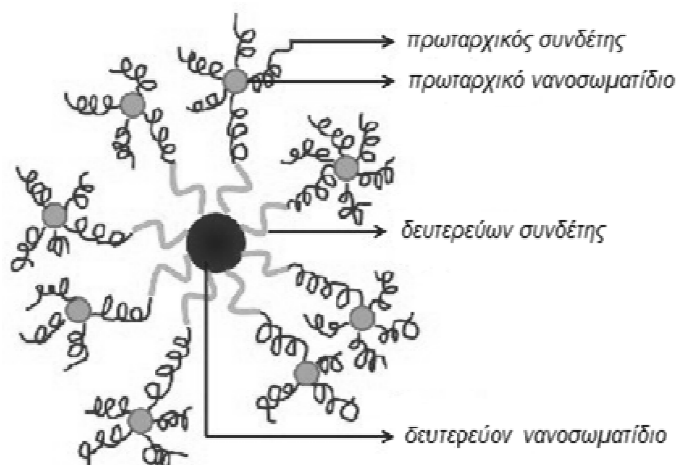


Εικόνα 1.10: Σχηματικό διάγραμμα ενός πολυλειτουργικού υβριδικού νανοςυστήματος.

Οι συνθετικές προσεγγίσεις για την ανάπτυξη ενός πολυλειτουργικού νανοςυστήματος μπορούν να χωριστούν σε τρεις γενικές κατηγορίες:

1) Άμεση σύζευξη (conjugation). Στη διαδικασία αυτή, τα νανოსωματίδια με διαφορετικές λειτουργικές ομάδες μπορεί να συνδέονται ομοιοπολικά για να σχηματίσουν το υβρίδιο ⁶⁶. Εάν η άμεση (απευθείας) αντίδραση μεταξύ των λειτουργικών ομάδων δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί, τότε με την προσθήκη σταυροδεσμών ή αποστατών, πραγματοποιείται αυτό το είδος σύζευξης (Εικόνα 1.11)

⁶⁷.



Εικόνα 1.11: Σχηματικό διάγραμμα της άμεσης μεθόδου σύζευξης (της σύνθεσης υβριδίων).

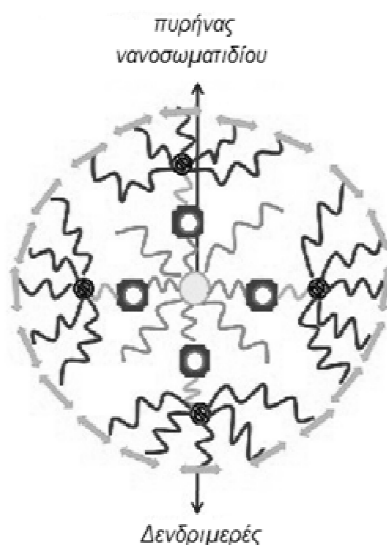
2) Ανόργανη Σύνθεση. Τα ανόργανα νανোসωματίδια παρασκευασμένα σε διάφορα στάδια- φάσεις από διαφορετικά υλικά σχηματίζονται από μια άμεση διαδρομή χημικής σύνθεσης. Για παράδειγμα, ετεροδιμερή (heterodimer)³ νανোসωματίδια μαγνητικών και ημιαγωγικών υλικών έχουν αναπτυχθεί με μία μέθοδος χημικής σύνθεσης σε μία φιάλη με την αξιοποίηση εσφαλμένου ταιριάσματος του πλέγματος και επιλεκτικής ανόπτησης σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία ⁶⁸. Ομοίως, οι νανοκρύσταλλοι FeCo/ κελύφους γραφίτη με προηγμένες μαγνητικές και οπτικές ιδιότητες, έχουν συντεθεί με μια μέθοδο κλιμακούμενης χημικής εναπόθεσης ατμών και έχει διερευνηθεί η πιθανή χρήση τους για ολοκληρωμένη διάγνωση και για θεραπευτικές εφαρμογές ⁶⁹.

3) Εγκλωβισμός/Ενθυλάκωση (encapsulation). Αυτή η γενική στρατηγική λειτουργεί συμπληρώνοντας τα σωματίδια της μήτρας, τα οποία έχουν κανάλια κατάλληλων μεγεθών πόρου, με διαφορετικά προσχηματισμένα νανোসωματίδια. Η ενθυλάκωση μπορεί να υποδιαιρεθεί σε δύο περιπτώσεις: σε εκείνη που εδράζεται στη πυριτία και σε εκείνη που βασίζεται σε πολυμερή. Στην εργασία αυτή η εστίαση πραγματοποιήθηκε στη δεύτερη περίπτωση.

Τα υλικά εγκλεισμού τα οποία γενικά χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό, εκτείνονται από τα φυσικά πολυμερή έως τα συνθετικά οργανικά/ ανόργανα μόρια ⁷⁰. Κατά την

³ Ετεροδιμερές (heterodimer) είναι ένα διμερές, κυρίως ένα βιολογικά ενεργό, που προέρχεται από δύο ή περισσότερα διαφορετικά μονομερή. Βέβαια, το διμερές (dimer) είναι ένα μόριο που αποτελείται από δύο πανομοιότυπα μισά, σχηματιζόμενο από την ένωση δύο ιδανικών- ταυτόσημων μορίων, κάποιες φορές με ένα μόνο άτομο που ενεργεί ως γέφυρα.

προσέγγιση αυτή, συντίθενται σφαίρες πολυμερούς μεγέθους 50-500 nm, κενού πυρήνα που είναι αρκετά μεγάλος ώστε να φιλοξενήσει περισσότερα από ένα είδος νανοσωματιδίων. Η δύναμη δράσης ενός σταθερού συζυγούς σχηματισμού είναι η ελκτική ηλεκτροστατική δύναμη. Για να αποφευχθεί η τυχόν απόσβεση των ατομικών ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων που μπορεί να επιτευχθεί λόγω της σύζευξης, εφαρμόζονται στρατηγικές προετοιμασίας, έτσι ώστε διαφορετικού είδους νανοσωματίδια να παραμείνουν χωρικά διαχωρισμένα το ένα από το άλλο μέσα σε νανοκάψουλες⁷¹, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.12.



Εικόνα 1.12: Σχηματικό διάγραμμα ενός υβριδικού δενδριμερούς βασισμένου στη σύνθεση ενός υβριδίου.

Στην παρούσα εργασία, αναλύονται οι υβριδικές νανοδομές που αποτελούνται από συμπολυμερή είτε με ανόργανα, είτε με βιολογικά υλικά και οργανικά φάρμακα.

(Α) Υβριδικές νανοδομές από συμπολυμερή με ανόργανα υλικά.

Όπως προαναφέρθηκε, η προσθήκη ανόργανων ουσιών⁷² σε πολυμερικά υλικά είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη για τη βελτίωση των ιδιοτήτων του συστήματος. Τέτοιες είναι για παράδειγμα, η εξέλιξη των μηχανικών, χημικών και ηλεκτρικών ιδιοτήτων, η μείωση της διαπερατότητας από αέρια, η αύξηση της αντίστασης σε θερμότητα, η μείωση του κόστους του υλικού κ.ά.. Παραδείγματα ανόργανων υλικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι μαγνητικά σωματίδια και σύμπλοκα νικελίου.

Είναι πολύ σημαντική η διαδικασία της επένδυσης – επικάλυψης του μαγνητικού πυρήνα του νανοσωματιδίου με κάποιο βιοσυμβατό υλικό ⁷³, είτε φυσικό (όπως οι πρωτεΐνες) είτε συνθετικό (όπως η δεξτράνη). Για παράδειγμα, οι πολυμερικές ενώσεις αυτές «τυλίγονται» γύρω από τον μαγνητικό πυρήνα, δημιουργούν ένα επιπλέον στρώμα προσφέροντας πολλά πλεονεκτήματα (π.χ. ενίσχυση αντοχής στην οξείδωση, κολλοειδή σταθερότητα υπό φυσιολογικές συνθήκες, αντίσταση στη φαγοκυττάρωση, μηχανική σταθερότητα, βιοσυμβατότητα). Βέβαια, το υλικό που θα επιλεγεί (όπως το PEG) ως επένδυση μπορεί να είναι βιοσυμβατό, όμως αυτό δεν σημαίνει κατ' ανάγκη ότι και το τελικό νανοσωματίδιο που θα προκύψει θα είναι βιοσυμβατό.

Τα μαγνητικά νανοσωματίδια έχουν σημαντικές ιδιότητες: (α) βιοσυμβατότητα, (β) εύκολα τροποποιήσιμη επιφάνεια όπου μπορούν να προσκολληθούν βιομόρια και φάρμακα, (γ) πολύ μικρό μέγεθος που έχει ως αποτέλεσμα την εύκολη ενδοκυττάρωση τους, (δ) μαγνητικές ιδιότητες που τα καθιστούν ικανά να μεταφέρονται στον ιστό- στόχο με την επίδραση εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και (ε) απλή σύνθεση. Έτσι, τα μαγνητικά νανοσωματίδια (magnetic nanoparticles, MNPs ή MagnNPs) ⁷² βρίσκονται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος στις εφαρμογές της βιοϊατρικής και της βιομηχανίας και παρασκευάζονται με ποικίλες μεθόδους (π.χ. υδροθερμική σύνθεση, θερμόλυση προδρόμων, τεχνική συγκαταβύθισης κ.ά.). Ενώ οι μόνιμοι μαγνήτες χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικές εφαρμογές, τα μαλακά μαγνητικά υλικά με υψηλού κορεσμού μαγνήτιση, μεγαλύτερη διαπερατότητα και πολύ μικρή διάχυση ενέργειας χρησιμοποιούνται στις τηλεπικοινωνίες και στα ηλεκτρονικά ⁷⁴. Μαγνητικά νανοσωματίδια έχουν έρθει στο προσκήνιο ως ευέλικτα υλικά για διαφορετικές εφαρμογές έχοντας καλύτερη απόδοση από εκείνη των ογκωδών αναλόγων τους. Τα μαγνητικά νανοσωματίδια με μαγνητισμό υψηλής παραμένουσας μαγνήτισης βρίσκουν εφαρμογές σχετικές με τη μαγνητική αποθήκευση ⁷⁵, εν συγκρίσει με τα υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια (superparamagnetic nanoparticles), τα οποία έχουν μηδενική παραμένουσα μαγνήτιση και συνεκτικότητα, και είναι κατάλληλα σε βιοϊατρικές εφαρμογές ^{76, 77, 78} όπως η στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων. Η αποτελεσματική χρήση των τελευταίων MNPs εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων που σχετίζονται με το μέγεθος και το μαγνητισμό των βιοσυμβατών νανοσωματιδίων. Παράμετροι όπως οι φυσικοχημικές ιδιότητες των φορτωμένων με φάρμακο MNPs, η ένταση του πεδίου, το βάθος του ιστού- στόχου, ο ρυθμός της ροής του αίματος, και η αγγειακή παροχή, παίζουν ρόλο στον καθορισμό της αποτελεσματικότητας της χορήγησης φαρμάκων.

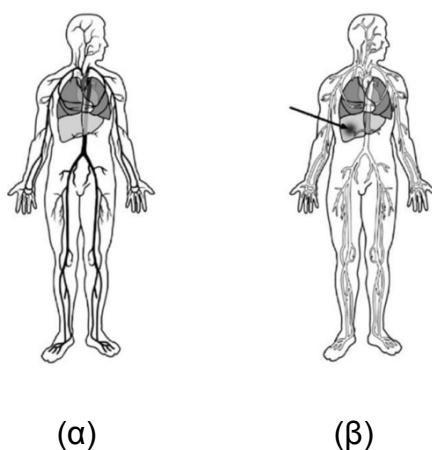
Ο σίδηρος που είναι το πιο άφθονο χημικό στοιχείο κατά μάζα του πλανήτη Γη (το τέταρτο πιο άφθονο στοιχείο στον στερεό φλοιό της), έχει θερμοκρασία τήξης 1535 °C. Όπως και τα υπόλοιπα χημικά στοιχεία της ομάδας 8, ο σίδηρος βρίσκεται σε σχετικά μεγάλο εύρος αριθμών οξείδωσης (-2 έως +6), με πιο συνηθισμένους τους +2 και +3. Επίσης, ο σίδηρος είναι πολύ ευαίσθητος στην παρουσία οξυγόνου (οξειδώνεται στον κανονικό ατμοσφαιρικό αέρα, δίνοντας οξείδια του σιδήρου) και νερού. Βέβαια, το οξείδιο του σιδήρου καταλαμβάνει μεγαλύτερο όγκο σε σύγκριση με το κομμάτι μεταλλικού (δηλαδή στοιχειακού) σιδήρου από το οποίο προήλθε. Το οξείδιο του σιδήρου (III), δεν είναι μόνο ένα σημαντικό βιομηχανικό υλικό αλλά και ένα βολικό συστατικό για γενική μελέτη του πολυμορφισμού και των αμοιβαίων πολύμορφων αλλαγών στα νανοσωματίδια. Τα οξείδια του σιδήρου με δομή πυρήνα/ κελύφους, συνήθως χρησιμοποιούνται ως πηγές των μαγνητικών υλικών⁷⁹. Αυτά τα οξείδια έχουν πολλά κρυσταλλικά πολύμορφα γνωστά ως α-Fe₂O₃ (αιματίτης, hematite), β-Fe₂O₃, γ-Fe₂O₃ (μαγκεμίτης, maghemite), ε-Fe₂O₃, Fe₂O₃ (μαγνητίτης, magnetite) κ.ά.^{80, 81}. Παρ' όλα αυτά, μόνο ο μαγκεμίτης^{82, 83} και ο μαγνητίτης^{84, 79} βρέθηκαν να έχουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον σε ότι αφορά τις βιοεφαρμογές, όπως τη μεταφορά φαρμάκων και την απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού ως παράγοντες αντίθεσης ή σκιαγράφησης (Magnetic Resonance Imaging –MRI- contrast agents)^{85, 86, 78, 87}. Το ενδιαφέρον για σύμπλεξη-συμπλοκοποίηση συμπολυμερών με μαγνητικά σωματίδια (όπως γ-Fe₂O₃)⁸⁴ έχει ενταθεί τις τελευταίες δεκαετίες αφού συνδυάζουν τις ιδιότητες των πολυμερών με τη λειτουργικότητα των οξειδίων των μετάλλων (μαγνητικές ιδιότητες). Οι χημικές και ηλεκτρικές ιδιότητες καθιστούν την κατηγορία των υλικών αυτών κατάλληλη και σε πεδία αγωγίμων πολυμερών, κολλοειδών κρυστάλλων, λεπτών μεμβρανών και οθονών.

Υπενθυμίζεται ότι ο μαγκεμίτης⁸⁸ έχει παρόμοια δομή με αυτή του μαγνητίτη αλλά μόνο τα 5/6 των συνολικών τετραεδρικών και οκταεδρικών θέσεων καταλαμβάνονται από άτομα σιδήρου. Σε θερμοκρασία δωματίου ο μαγνητίτης οξειδώνεται σε μαγκεμίτη με αργό ρυθμό, οδηγώντας σε ασθενέστερο μαγνητισμό. Η βασική διαφορά του με τον μαγνητίτη είναι ότι όλα τα κατιόντα σιδήρου του μαγκεμίτη βρίσκονται στην τρισθενή κατάσταση (Fe⁺³). Τα υπερπαραμαγνητικά νανοσυστήματα προτιμώνται λόγω της ικανότητάς τους να μαγνητίζονται μετά την έκθεσή τους σε ένα μαγνητικό πεδίο, αλλά δεν έχουν μόνιμη μαγνήτιση αν το πεδίο απενεργοποιηθεί. Βέβαια, ο υπερπαραμαγνητισμός προκαλείται από θερμικές επιδράσεις στο υλικό. Στα υπερπαραμαγνητικά σωματίδια, οι θερμικές διακυμάνσεις είναι αρκετά ισχυρές για να

απομαγνητίσουν αυθόρμητα μια κεκορεσμένη οργάνωση, ως εκ τούτου αυτά τα σωματίδια έχουν μηδενικό συνεκτικό πεδίο και δεν έχουν υστέρηση.

Για την *in vitro* (εκτός του ζωντανού οργανισμού) εφαρμογή, τα τρία σημαντικά χαρακτηριστικά της μαγνητικά ελεγχόμενης μεταφοράς/απόδοσης γονιδίων είναι (α) η δραστικά χαμηλότερη δοσολογία φαρμακομορίου, (β) ο σημαντικά μειωμένος χρόνος επώασης που απαιτείται για την επίτευξη υψηλής μετάδοσης απόδοσης και (γ) η δυνατότητα παράδοσης γονιδίου σε κύτταρα που διαφορετικά είναι μη προσβάσιμα. Το μέγεθος των σωματιδίων του οξειδίου του σιδήρου (III)⁸⁴ μπορεί να ελέγχεται τόσο από τη θερμοκρασία της αντίδρασης όσο και από την περιεκτικότητα σε σίδηρο, και μια αύξησή τους οδηγεί σε αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων και σε πιθανή εμφάνιση των κρυσταλλικών δομών ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ή $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

Τα υβριδικά νανοσυστήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως στοχευμένοι παράγοντες απεικόνισης (σκιαγραφικό μέσο). Τα συστήματα αυτά είναι ανιχνεύσιμα με απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (magnetic resonance imaging, MRI) και φθορισμού (fluorescence imaging, FI). Η κλινική διάγνωση με μαγνητική τομογραφία είναι μια δημοφιλής και μη επεμβατική μέθοδος για την απεικονιστική διάγνωση διαφόρων ασθενειών⁸⁹ (μέσω σκιαγραφικών μέσων). Για να μεταφερθούν τα σκιαγραφικά νανოსωματίδια σε συγκεκριμένες θέσεις στο ανθρώπινο σώμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Όταν μαγνητικά νανοσυστήματα μεταφέρουν και φάρμακα, υφίσταται μαγνητική στόχευση φαρμάκων (MDT, Εικόνα 1.13)⁹⁰. Η επιλεκτική αυτή συσσώρευση είναι ιδιαίτερα ελκυστική για χρήση στη θεραπεία του καρκίνου, όπου η χημειοθεραπεία ή η ακτινοθεραπεία έχουν μικρό θεραπευτικό περιθώριο με παρενέργειες (αιματολογικές, ηπατικές, κ.λπ.).



Εικόνα 1.13: (α) Συστημική παροχή φαρμάκου, (β) μαγνητική στόχευση ⁹¹.

Από την άλλη, η απεικόνιση φθορισμού είναι η οπτικοποίηση φθορίζουσών χρωστικών ή πρωτεϊνών που δρουν ως επισημάνσεις σε μοριακές διαδικασίες ή δομές. Με αυτόν τον τρόπο, μπορεί να εκφραστούν οι μοριακές αλληλεπιδράσεις σε κύτταρα και ιστούς μέσω ενός ευρέως φάσματος των πειραματικών παρατηρήσεων.

Η υπερθερμία ⁴ αποτελεί μια μέθοδο για τη θεραπεία του καρκίνου και κλινικά ορίζεται ως η ανύψωση της θερμοκρασίας τοπικά, πέρα από το φυσιολογικό σε εύρος 42°C έως 45°C, ή συστηματικά σε όλο το σώμα σε εύρος 41.5°C– 41.8°C χωρίς να προκαλεί σοβαρά τοξικά φαινόμενα⁹²⁻⁹⁴. Ως μέθοδος όσον αφορά τον τρόπο δράσης διαφέρει από το θερμο-καυτηριασμό και τη χειρουργική διαθερμία. Οι δύο αυτές μέθοδοι χρησιμοποιούν θερμοκρασίες άνω των 45°C και βασίζονται στην άμεση καταστροφή των κυττάρων, ενώ η υπερθερμία έχει βιολογικό τρόπο δράσης που στηρίζεται στην αυτόλυση των κυττάρων και στην αδυναμία πολλαπλασιασμού τους. Όταν πρόκειται για θεραπευτικούς σκοπούς, οι μεσολαβητές θερμότητας μεγέθους νανομέτρων, έχουν σαφή πλεονεκτήματα έναντι των μακροσκοπικών πηγών θερμότητας. Αυτοί είναι αρκετά μικροί ώστε να διασχίσουν βιολογικούς φραγμούς, δημιουργώντας θερμότητα πολύ κοντά στα κύτταρα-στόχους. Τα μαγνητικά νανοσωματίδια (συμπεριλαμβανομένου του γ- Fe₂O₃) ^{95- 97} είναι ένα παράδειγμα τέτοιων μεσολαβητών θερμότητας λόγω της ικανότητάς τους να θερμαίνουν όταν υποβάλλονται σε υψηλής συχνότητας μαγνητικό

⁴Η υπερθερμία εφαρμόζεται με βάση κατευθυντήριες γραμμές σε συνδυασμό με την ακτινοθεραπεία ή/ και τη χημειοθεραπεία επαυξάνοντας σημαντικά το θεραπευτικό κέρδος τους, σε περιπτώσεις όπως π.χ. επιφανειακοί όγκοι, μελανώματα δερματικά, μεταστατικοί καρκίνοι στο ήπαρ ή στο περιτόναιο, περιοχές με υποτροπή σε επανακτινοβολήση κ.ά..

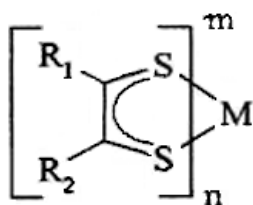
πεδίο. Έχουν βρεθεί δύο μηχανισμοί μετατροπής της μαγνητικής ενέργειας σε θερμότητα: εσωτερικοί (που προέρχονται από την ενέργεια ανισοτροπίας, τείνοντας να προσανατολίζουν τις μαγνητικές ροπές σε συγκεκριμένες κατευθύνσεις, Néel μηχανισμός) και εξωτερικοί (που οφείλονται στο ιξώδες του υγρού φορέα, εμποδίζοντας τις θερμικές διακυμάνσεις του ίδιου του σωματιδίου, Brownian μηχανισμός). Αυτοί οδηγούν σε υστέρηση φάσης μεταξύ του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου και της κατεύθυνσης των μαγνητικών ροπών του σωματιδίου, δημιουργώντας έτσι θερμικές απώλειες^{97, 98}. Στις παραμέτρους που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των νανομαγνητών (π.χ. $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)⁹⁸, να δρουν ως μεσολαβητές θερμότητας, περιλαμβάνεται το μέγεθος των σωματιδίων, το ιξώδες του διαλύτη, η μαγνητική ανισοτροπία, η συχνότητα και το πλάτος του μαγνητικού πεδίου. Πάνω από διάμετρο 15 nm μαγνητικών σωματιδίων $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (για συχνότητα πεδίου 700 kHz)⁹⁷, μειώνεται η μετρούμενη ειδική απώλεια ισχύος (specific loss power, SLP) με την αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων.

Εκτός από το σίδηρο (Fe , $4s^2$, $3d^6$), ως στοιχείο μετάπτωσης⁵ της πρώτης σειράς είναι και το νικέλιο (Ni , $4s^2$, $3d^8$). Οι κοινές ιδιότητες των στοιχείων μετάπτωσης⁹⁹ συνοψίζονται ως εξής: έχουν μεταλλικό χαρακτήρα, έχουν πολλούς αριθμούς οξείδωσης, είναι συνήθως σκληρά και ανθεκτικά, έχουν υψηλές πυκνότητες, είναι καλοί αγωγοί της θερμότητας και της ηλεκτρικής ενέργειας, είναι παραμαγνητικά (έλκονται από το μαγνητικό πεδίο διότι διαθέτουν μονήρη ηλεκτρόνια), σφυρηλατούνται ή κάμπτονται εύκολα, σχηματίζουν σύμπλοκα ιόντα, σχηματίζουν έγχρωμες ενώσεις, έχουν υψηλά σημεία τήξης (εξαίρεση ο υδράργυρος που είναι υγρό σε θερμοκρασία δωματίου), έχουν την ικανότητα να καταλύουν αντιδράσεις (όντας λιγότερο αντιδραστικά από τα αλκαλικά μέταλλα) κ.λπ.. Το νικέλιο είναι αργυρόλευκο μέταλλο, με υψηλή ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα και σημείο τήξης 1452 °C. Ως στοιχείο είναι ανθεκτικό στον αέρα και στο νερό υπό συνήθεις θερμοκρασίες όταν είναι συμπαγές. Επίσης το νικέλιο, ηλεκτροαποτίθεται ως προστατευτικό επίστρωμα και είναι μέτρια ηλεκτροθετικό. Ως σιδηρομαγνητικό υλικό (όχι τόσο όσο ο σίδηρος) αντιδρά πολύ αργά με το φθόριο (και τα φθορίδια) και στις αντιδράσεις ανταλλαγής του επικρατούν προσεταιριστικοί μηχανισμοί. Το νικέλιο (II) έχει μια ισχυρή τάση να προσθέτει έναν

⁵ Στοιχεία μετάπτωσης ονομάζονται όλα τα χημικά στοιχεία που βρίσκονται μεταξύ των Ομάδων II και III και ανήκουν στον d- τομέα του Περιοδικού Πίνακα. Πρόκειται για 24 μεταλλικά χημικά στοιχεία και η ονομασία τους οφείλεται στο γεγονός ότι τα άτομα των στοιχείων αυτών διαθέτουν ηλεκτρόνια σθένους σε περισσότερες από μία ενεργειακές στάθμες. Τα χημικά αυτά στοιχεία έχουν πολλές κοινές ιδιότητες διότι στην ηλεκτρονιακή δομή τους, το τελευταίο ηλεκτρόνιο εισέρχεται σε εσωτερική στιβάδα, ενώ η εξωτερική στιβάδα σε όλα σχεδόν τα στοιχεία αυτά παραμένει με 2 ηλεκτρόνια.

επιπλέον υποκαταστάτη και να σχηματίζει ένα μεγάλο αριθμό συμπλόκων⁶ με αριθμούς ένταξης 3 έως 6. Ακόμη, το Ni(II) μπορεί να σχηματίσει πολλά πενταενταγμένα (με δομή τετραγωνικής πυραμίδας ή τριγωνικής διπυραμίδας) καθώς και τετραενταγμένα (επίπεδα τετραγωνικά και τετραεδρικά) σύμπλοκα. Μαλακοί υποκαταστάτες, όπως ο φώσφορος (P) και το θείο (S) δίνουν τετραενταγμένα είδη με μία ισχυρή προτίμηση για επίπεδη τετραγωνική στερεοχημεία.

Τα 1, 2 διθειολένια είναι σύμπλοκες ενώσεις με γενικό τύπο, που φαίνεται και στην Εικόνα 1.14, όπου R₁, R₂ οργανικοί υποκαταστάτες, M μέταλλο, n= 2 και m= 0, -1, -2. Τα συγκεκριμένα n και m αφορούν το μέταλλο του νικελίου. Όταν τα R₁, R₂ είναι ίδια ονομάζονται συμμετρικά διθειολένια, ενώ όταν είναι διαφορετικά λέγονται ασύμμετρα.



Εικόνα 1.14: Γενική απεικόνιση 1, 2 διθειολενίων (1, 2- DT).

Από το 1960, τα διθειολενικά σύμπλοκα μετάλλων μετάπτωσης (transition metal dithiolene complexes)^{100- 102} και κυρίως τα μεταλλικά 1, 2 διθειολενικά (1, 2-DT) σύμπλοκα έχουν προσελκύσει την προσοχή των επιστημόνων^{51, 52,103-106}. Τα σύμπλοκα αυτά των 1, 2 διθειολενικών (1, 2-dithiolene, 1, 2-DT) περιέχουν διθειολενικούς συνδέτες οι οποίοι μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα με πενταμελείς δακτυλίους. Τα μέταλλα μετάπτωσης (π.χ. W, Mo, Ni κ.λπ.) συμμετέχουν ενεργά στην αυτο-οργάνωση των διθειολενικών, συνήθως μέσω της αντίδρασης ενός μεταλλικού σουλφιδό- (S²⁻) είδους με ένα αλκύνιο ή υδρογονάνθρακα σε ισοδύναμη κατάσταση οξειδωσης. Μεταξύ των διαφόρων μελετών για τα 1, 2 διθειολενικά σύμπλοκα, έχουν δημοσιευθεί πολλές έρευνες σχετικές με τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό 1, 2 διθειολενικών συμπλόκων νικελίου (Ni 1, 2-DT)¹⁰⁶⁻¹¹⁰. Λόγω των ιδιαίτερων δομικών, μοριακών, οπτικών, ηλεκτροχημικών (οξειδοαναγωγής και χημικής δραστηριότητας) ηλεκτρονικών και φασματοσκοπικών ιδιοτήτων, τα Ni 1, 2-DT έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορες εφαρμογές (όπως κατάλυση, οπτική, επιστήμη των υλικών κ.ά.).

⁶Συνήθως ως σύμπλοκες ενώσεις θεωρούμε τις ενώσεις στις οποίες υπάρχει ένα άτομο ή ιόν μεταλλικού στοιχείου, με το οποίο είναι ενωμένα διάφορα ιόντα, άτομα, ομάδες ατόμων ή και μόρια (οργανικά ή ανόργανα), που χαρακτηρίζονται ως περιφερειακοί υποκαταστάτες.

(B) Υβριδικές νανοδομές από συμπολυμερή με βιολογικά υλικά και οργανικά φάρμακα.

Για πολλές δεκαετίες, η θεραπευτική αγωγή μιας ασθένειας στηριζόταν στην λήψη φαρμάκων από τους ασθενείς σε διάφορες μορφές, όπως ταμπλέτες, κάψουλες, δισκία, κρέμες, σιρόπια κ.ά.. Οι μορφές αυτές είναι γνωστές ως συμβατικά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Στις μέρες μας, η νανοϊατρική έχει ως σκοπό τη διάγνωση και πρόληψη των ασθενειών καθώς και τη βελτίωση της θεραπευτικής προσέγγισης πολλών παθήσεων, μέσω της χρήσης νέων υλικών.

Ο συνδυασμός πολυμερούς με μόριο φαρμάκου έχει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι της καθαρής χρήσης ενός μορίου φαρμάκου, όπως η δυνητικά αυξημένη διαλυτότητα των αδιάλυτων φαρμάκων ή φαρμάκων χαμηλής διαλυτότητας στο νερό, η βελτίωση της φαρμακογενετικής, η προστασία από την υποβάθμιση και την αδρανοποίηση που θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί κατά τη μεταφορά και την κυκλοφορία του φαρμάκου, η μειωμένη αντιγονική δραστηριότητα, η δυνατότητα να συνδυάσει ένα φάρμακο με άλλα λειτουργικά συστατικά (π.χ. σκιαγραφικά μέσα) κ.ά..

Η εμφάνιση των αλληλεπιδράσεων φορτίων μεταξύ των ιοντικών πολυμερών και των φαρμάκων θεωρήθηκε ως αρνητική περίπτωση, όταν τα ιοντικά πολυμερή χρησιμοποιούνται ως έκδοχα σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Σε αυτά τα συστήματα, η απελευθέρωση των φαρμάκων μπορεί να επηρεαστεί έντονα ¹¹¹ από την εμφάνιση των αλληλεπιδράσεων φορτίων. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια ^{28, 31}, αυτά τα αρνητικά γεγονότα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πολυμερούς-φαρμάκου και πολυμερούς-πολυμερούς έχουν αξιοποιηθεί θετικά για την ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκου. Τις τελευταίες δεκαετίες ³¹ λοιπόν, συντέθηκαν πολυμερή που ανταποκρίνονται με κάποιο επιθυμητό τρόπο στις μεταβολές της θερμοκρασίας, του pH, του ηλεκτρικού ή/ και του μαγνητικού πεδίου. Η κινητήρια δύναμη των μεταβάσεων αυτών, περιλαμβάνει ερεθίσματα όπως την εξουδετέρωση των φορτισμένων ομάδων (είτε μεταβάλλοντας το pH είτε με την προσθήκη ενός αντίθετα φορτισμένου πολυμερούς), τις αλλαγές στην αποτελεσματικότητα του δεσμού υδρογόνου (με την αύξηση της θερμοκρασίας ή της ιοντικής ισχύος), την κατάρρευση των υδρογελών (hydrogels) και την αλληλοδιείσδυση στο πολυμερικό δίκτυο. Αυτοί οι τύποι πολυμερών όχι μόνο μετατρέπουν τις δραστικές ουσίες σε μη επιβλαβείς μορφές που μπορεί να χορηγηθούν, αλλά επίσης έχουν συγκεκριμένη επίδραση στην βιοκατανομή, βιοδιαθεσιμότητα ή απορρόφηση των δραστικών ουσιών και ως εκ τούτου, παίζουν όλο και μεγαλύτερο ρόλο στη σύγχρονη φαρμακευτική τεχνολογία.

Τα σύμπλοκα πολυηλεκτρολύτη (PECs) αφορούν τη συσχέτιση συμπλόκων που σχηματίζονται μεταξύ αντίθετα φορτισμένων σωματιδίων (όπως π.χ. πολυμερούς-πολυμερούς, πολυμερούς-φαρμάκου, πολυμερούς-φαρμάκου-πολυμερούς, πολυμερούς-πρωτεϊνών κ.ά.). Αυτά σχηματίζονται λόγω της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των αντίθετα φορτισμένων πολυϊόντων. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να αποφευχθεί η χρήση των παραγόντων χημικής σταυρόδεσης, μειώνοντας την πιθανή τοξικότητα και τις άλλες ανεπιθύμητες επιδράσεις τους. Τα σύμπλοκα πολυηλεκτρολύτη τα οποία σχηματίζονται μεταξύ ενός πολυ-οξέος και μιας πολυ-βάσης, επηρεάζονται ελάχιστα με τη μεταβολή του pH του μέσου διάλυσης.

Όπως προαναφέρθηκε, τα κατιονικά πολυμερή έχουν αποδειχθεί ¹¹² ως αποτελεσματικοί φορείς για την παράδοση νουκλεϊκών οξέων σε στοχευμένα κύτταρα, σχηματίζοντας σύμπλοκα με τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA, μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Έτσι σε αυτά τα σύμπλοκα- σωματίδια πραγματοποιείται εγκλεισμός των νουκλεϊκών οξέων στον πυρήνα τους, θωρακίζοντάς τα από τις πρωτεΐνες ορού, τις νουκλεάσες, και άλλους παράγοντες μετουσίωσης που υπάρχουν στη συστηματική κυκλοφορία. Αυτά τα σωματίδια συνήθως φέρουν ένα καθαρό θετικό φορτίο, το οποίο τους επιτρέπει να αλληλεπιδρούν με την αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια του κυττάρου, την προσροφητική μεσολαβούμενη ενδοκύτωση από ερέθισμα και έτσι, να αποκτήσουν πρόσβαση στο κύτταρο. Βέβαια, για να είναι τα εν λόγω σωματίδια θεραπευτικά, αυτά θα πρέπει να ξεφύγουν από την ενδοσωμική- λυσοσωμική οδό διακίνησης, να εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα, και να απελευθερώσουν το εγκλειστο φορτισμένο θεραπευτικό προϊόν ώστε να αλληλεπιδράσουν με τον επιθυμητό ενδοκυτταρικό στόχο (Εικόνα 1.9).

Για παράδειγμα, η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αντίθετα φορτισμένων πολυμερών έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός συμπλόκου (complex), το οποίο αποκαλείται σύμπλοκο πολυηλεκτρολύτη. Αυτά τα σύμπλοκα πολυηλεκτρολυτών πληρούν το προφίλ των απαιτήσεων των βιοσυμβατών πολυμερικών συστημάτων⁷ και μπορούν να προσαρμοστούν ώστε να αποκριθούν σε διάφορες απαιτήσεις, όπως ως φορείς ουσιών και ως συστήματα δραστικών ουσιών.

Εκτός από φορτισμένα σωματίδια, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ουδέτερα νανοσωματίδια. Γενικότερα, το μέγεθος και οι επιφανειακές ιδιότητες των

⁷Οι ξένοι φυσικοί πολυηλεκτρολύτες (πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, νουκλεϊνικά οξέα) και τα δομικά τους ανάλογα (πολυπεπτίδια, πολυνουκλεοτίδια) εκδηλώνουν στον οργανισμό ιδιότητες αντιγόνων. Αυτό σημαίνει ότι τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αναγνωρίζουν τα ειδικά θραύσματά τους και ανταποκρίνονται, παράγοντας δομικά συμπληρωματικές πρωτεΐνες, δηλαδή αντισώματα που τα παρεμποδίζουν.

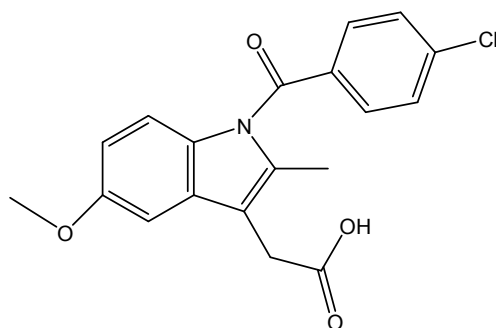
νανοσωματιδίων (nanoparticles, NPs) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον οψονινοποίηση του αίματος ⁸, την εκκαθάριση- αποβολή και την πρόσληψη των κυττάρων. Μεγαλύτερα σωματίδια των 200 nm φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικά στην ενεργοποίηση του ανθρώπινου συμπληρωματικού συστήματος, και ως εκ τούτου, απομακρύνονται πιο γρήγορα από το σώμα σε σχέση με τα μικρότερα σωματίδια ¹¹⁴. Ως εκ τούτου, τα μη τοξικά συστήματα παροχής νανο- φαρμάκου θα πρέπει να είναι επαρκούς μεγέθους ώστε να εγκλωβίζουν υψηλή ποσότητα του θεραπευτικού παράγοντα αλλά και να ξεφεύγουν την πρόωρη αποβολή από το σώμα.

Επιπλέον, τα αυτο-οργανούμενα και βιοσυμβατά πολυμερικά μικκύλια ²¹ έχουν θεωρηθεί ως πολλά υποσχόμενα για τη χρήση τους, ως έξυπνα βιοϋλικά. Βέβαια για να χρησιμοποιηθούν σε τέτοιες εφαρμογές πρέπει να εκπληρώνουν κάποια συγκεκριμένα κριτήρια: (i) να είναι αρκετά μικρά (~10- 200 nm) ώστε να μπορούν να διεισδύσουν αποτελεσματικά μέσα σε ιστό, (ii) να είναι «μη αναγνωρίσιμα» από το σύστημα μονοπύρηνων φαγοκυττάρων (mononuclear phagocyte system, MPS) για ένα επαρκές χρονικό διάστημα, αρκετό για να επιτρέψει τη συσσώρευση στον ιστό- στόχο, (iii) να εξαλειφθούν από τον οργανισμό είτε μετά από αποικοδόμηση είτε με διάλυση, (iv) να εντοπίσουν και να αλληλεπιδράσουν με τα κύτταρα- στόχους, (v) να έχουν σταθερότητα που μπορεί να ρυθμιστεί, (vi) να βελτιώσουν το φαρμακοκινητικό προφίλ (pharmacokinetic profile, PK) του έγκλειστου φορτισμένου φαρμάκου, (vii) να έχουν υψηλή ικανότητα φόρτωσης, και (viii) να συντεθούν εύκολα και κατά το δυνατόν, ανέξοδα.

Όσον αφορά τις καρκινικές παθήσεις (για τη θεραπεία όγκων) ^{77, 115}, τα μαγνητικά νανοσωματίδια (MNPs) μπορούν να χρησιμοποιηθούν με τρεις διαφορετικούς τρόπους: (α) συγκεκριμένα αντισώματα μπορούν να συζευχθούν με τα σωματίδια αυτά, ώστε να δεθούν εκλεκτικά με τους σχετικούς υποδοχείς και να αναστείλουν την ανάπτυξη του όγκου, (β) τα στοχευόμενα μαγνητικά νανοσωματίδια (targeted MNPs) μπορούν να χρησιμοποιηθούν με την υπερθερμία (στη θεραπεία όγκων) και (γ) τα φάρμακα μπορούν να φορτωθούν στα MNPs για στοχευμένη θεραπεία. Υπάρχουν πολλές προοπτικές για τη μελλοντική χρήση της μαγνητοδιαμόλυνσης.

⁸Εάν τα νανοσωματίδια χορηγούνται με ενδοφλέβια ένεση, τότε αλληλεπιδρούν άμεσα με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Η προσρόφηση των πρωτεϊνών στην επιφάνεια των σωματιδίων ονομάζεται οψονοποίηση. Το ποσό των προσροφημένων πρωτεϊνών βασίζεται στο μέγεθος των νανοσωματιδίων, το φορτίο και την υδροφοβικότητα της επιφάνειάς τους. Αύξηση του μεγέθους, του φορτίου και της υδροφοβικότητας των σωματιδίων, αυξάνει την ικανότητα προσρόφησης των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη φαγοκυττάρωση ονομάζονται οψονίνες (τέτοιες π.χ. είναι η ανοσοσφαιρίνη G (IgG), η φιβρονεκτίνη κ.ά.), ενώ εκείνες που αναστέλλουν τη φαγοκυττάρωση καλούνται δυσοψονίνες.

Από το 1940, έχουν αρχίσει να ανακαλύπτονται αντικαρκινικοί παράγοντες- φάρμακα ^{116, 117} συμπεριλαμβανομένης της ταξόλης, της βινκριστίνης, της ετοποσίδης και της ινδομεθακίνης κ.ά. Η ινδομεθακίνη (indomethacin, IND), που είναι γνωστή και ως 2-{1-[(4-χλωροφαίνυλο) καρβόνυλο]-5-μέθοξυ-2-μέθυλο-1H-ινδόλο-3-yl} ακετικό οξύ (2-{1-[(4-Chlorophenyl)carbonyl]-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl} acetic acid, INN) είναι παράγωγο του ινδολεϊκού οξέος και σχετίζεται δομικά και φαρμακολογικά με την σουλινδάκη. Ανήκει στην κατηγορία των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs). Όσον αφορά τη χημική της δομή ανάμεσα στα μη στεροειδη αντιφλεγμονώδη φάρμακα, η ινδομεθακίνη είναι ένα καρβο- και ετεροκυκλικό ακετικό οξύ ¹¹⁸⁻¹²⁰ με δομή που φαίνεται στην Εικόνα 1.15.



Εικόνα 1.15: Χημική δομή της ινδομεθακίνης.

Η ινδομεθακίνη είναι κρυσταλλική καφε-κίτρινη σκόνη, με ελαφρά οσμή και ευαισθησία στο φως. Είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό, αλλά πολύ διαλυτή σε οινόπνευμα, χλωροφόρμιο, αιθέρα. Επίσης, έχοντας $pK_a = 4.5$, είναι ασταθής σε αλκαλικά διαλύματα (αποσυντιθέμενη σε ισχυρώς αλκαλικό περιβάλλον) και σταθερή σε ουδέτερο ή ελαφρά όξινο περιβάλλον.

Έχει αναλγητικές και αντιπυρετικές ιδιότητες και δρα ¹²¹ μειώνοντας τις ορμόνες που προκαλούν φλεγμονή, πυρετό και πόνο στο σώμα, συμπτώματα που προκαλούνται από πολλές καταστάσεις (όπως αρθρίτιδα, αγκυλωτική σπονδυλίτιδα, τενοντίτιδα κ.ά.). Για παράδειγμα ¹²², οι προσταγλανδίνες⁹ PGE2 και PGF2a, μειώνονται τόσο στην εγκεφαλική ροή του αίματος (cerebral blood flow, CBF) όσο και στον ρυθμό μεταβολισμού του οξυγόνου στον εγκέφαλο (cerebral metabolic rate for

⁹ Οι προσταγλανδίνες αφορούν μια μεγάλη ομάδα βιολογικά δραστικών, ακόρεστων λιπαρών οξέων με 20 άτομα άνθρακα. Πρόκειται για τοπικές ορμόνες που σχηματίζονται ταχέως, δρουν στην γειτονική περιοχή παραγωγής τους και στην συνέχεια διασπώνται και καταστρέφονται από ένζυμα. Αποτελούν σημαντικούς μεσολαβητές της φλεγμονής και η παραγωγή τους αναστέλλεται από μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα. Οι προσταγλανδίνες επηρεάζουν ένα ευρύ αριθμό βιολογικών διαδικασιών, όπως της αγγειοδιαστολής, του βρογχόσπασμου κ.τ.λ..

oxygen,CMR02). Αυτό το γεγονός δείχνει ¹²³ ότι η ινδομεθακίνη ανέστειλε το σχηματισμό ενός προϊόντος κυκλοοξυγενάσης, την προστακυκλίνη. Η τελευταία εντοπίζεται σε αγγειακό ιστό και στη μεσολάβηση της αγγειοδιαστολής σε άλλους ιστούς από τον εγκέφαλο.

Επειδή τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs) μειώνουν τη σύνθεση των προσταγλανδινών, διεξήχθη μια σειρά από πειραματικές μελέτες σε τρωκτικά για να εκτιμηθεί εάν μπορούν να αναστείλουν ή να εμποδίσουν την ανάπτυξη μορφών καρκίνου όπως του ορθοκολικού καρκίνου. Ανάμεσα στα NSAIDs που δοκιμάστηκαν ¹²⁴⁻¹²⁷, είναι και η ινδομεθακίνη, όπου ανέστειλε αποτελεσματικά ορθοκολικούς όγκους (colorectal tumours) σε ποντίκια.

Η ινδομεθακίνη σε μη τοξικές συγκεντρώσεις, βρέθηκε να ενισχύει την τοξικότητα ενός εύρους χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, όπως η δοxorουβικίνη, η επιρουμπικίνη και η βινκριστίνη. Η ινδομεθακίνη ¹²⁷ ενδέχεται να έχει την ικανότητα να ενισχύει την τοξικότητα της αδριαμυκίνης στην κυτταρική σειρά 2008 του ωοθηκικού καρκινώματος (varian carcinoma cell line 2008), την επιμολυσμένη με την πολυφαρμακευτική αντίσταση που σχετίζεται με πρωτεΐνη 2 ή 3 (multidrug resistance- associated protein 2 or 3, MRP2 or MRP3). Η τοξικότητα της ταξόλης και της ταξοτέρης ¹²⁷, που είναι αντινεοπλασματικά (ή αντικαρκινικά ή κυτταροστατικά) φάρμακα, φαίνεται να ενισχύεται από την ινδομεθακίνη και τη σουλινδάκη για ορισμένες κυτταρικές σειρές ωστόσο μπορεί να υπάρχει εναλλακτικός ή πρόσθετος μηχανισμός ενίσχυσης της τοξικότητας από το ταξάνιο, που είναι φυτικό αλκαλοειδές. Η σισπλατίνη, που είναι ένας χημειοθεραπευτικός παράγοντας με αντινεοπλασματική δραστηριότητα για τη θεραπεία π.χ. του λεμφώματος και του καρκίνου των ωοθηκών, μπορεί να δεσμεύει και να επεμβαίνει στη σύνθεση του DNA. Η τοξικότητά της μειώθηκε παρουσία της ινδομεθακίνης για πολλές κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένων των DLKP, DLKPC14 και 2008.

1.5 Σύνθεση πολυμερών

Αρχικώς, κατά τον Carothers (1936) ¹²⁸, οι αντιδράσεις πολυμερισμού ταξινομούνται, ανάλογα με τα προϊόντα τους, σε αντιδράσεις πολυσυμπύκνωσης και πολυπροσθήκης. Σε αντίθεση με τις αντιδράσεις πολυπροσθήκης, στις αντιδράσεις πολυσυμπύκνωσης εκτός από τα πολυμερή σχηματίζονται και ενώσεις μικρού μοριακού βάρους (όπως

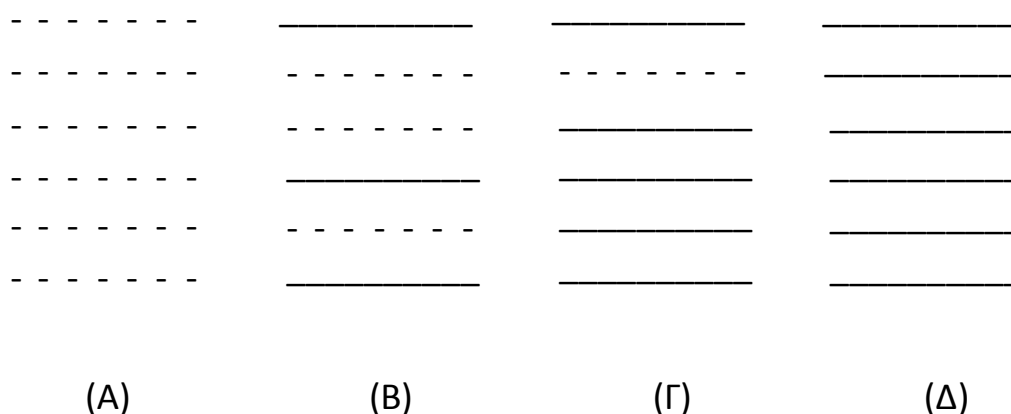
νερό, αμμωνία, υδροχλώριο κ.ά.). Αργότερα, σύμφωνα με τον Flory (1953)¹²⁹, οι αντιδράσεις πολυμερισμού, ανάλογα με το μηχανισμό τους χωρίστηκαν^{7, 9, 130, 131} σε σταδιακές και αλυσωτές.

Στις σταδιακές αντιδράσεις, το πολυμερές σχηματίζεται σταδιακά από αντιδράσεις δραστικών ομάδων (όπως $-\text{COCl}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{NCO}$ κ.ά.). Αυτές οι αντιδράσεις χωρίζονται σε εκείνες όπου τα μονομερή διαθέτουν δύο όμοιες και δύο διαφορετικές δραστικές ομάδες. Υπάρχουν τέσσερις κυρίως τύποι σταδιακών αντιδράσεων, που οδηγούν σε πολυμερή με σχετικά μεγάλο μοριακό βάρος ($M_n \sim 30,000$), οι οποίοι είναι: η αντίδραση Schotten-Baumann (ενός διχλωριδίου διοξέος και μιας διόλης ή διαμίνης), η άμεση αντίδραση διοξέος και διόλης ή διαμίνης (με τη βοήθεια καταλύτη και σε σχετικά μεγάλες θερμοκρασίες), η μετεστεροποίηση (αντίδραση διεστέρα και διόλης), η αντίδραση διόλης και διισοκυανικού εστέρα.

Στις αλυσωτές αντιδράσεις πολυμερισμού, χρησιμοποιούνται ορισμένες χημικές ενώσεις (γνωστές ως απαρχητές), όπως το βενζοϋλο-υπεροξειδίο, το βουτυλολίθιο κ.ά.. Με αυτές τις αντιδράσεις, πολυμερίζονται κυρίως, βινυλικά ($\text{CH}_2=\text{CX}\Psi$) και διενικά ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CX}=\text{CH}_2$) πολυμερή. Οι απαρχητές προκαλούν ομολυτική ή ετεροπολική ανόρθωση, ανάλογα με το πόσοι άνθρακες του διπλού δεσμού έχουν π- ηλεκτρόνια και έτσι διακρίνεται σε πολυμερισμό με ελεύθερες ρίζες και ιοντικό πολυμερισμό αντίστοιχα. Για παράδειγμα, αναλόγως τον υποκαταστάτη (ομάδα X και Ψ) του μονομερούς $\text{CH}_2=\text{CX}\Psi$, ευνοείται ο ανιοντικός, κατιοντικός και με ελεύθερες ρίζες πολυμερισμός. Αν λοιπόν ο υποκαταστάτης είναι δέκτης (π.χ. $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{OR}$, $-\text{CONH}_2$ κτλ) ή δότης (λιγότερο ηλεκτροαρνητικός του C π.χ. Li, ακλύλια $-\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$) ηλεκτρονίων τότε ευνοείται ο ανιοντικός (-I επαγωγικό φαινόμενο) ή κατιοντικός (+I επαγωγικό φαινόμενο) πολυμερισμός αντίστοιχα. Στην περίπτωση που ο υποκαταστάτης συμπεριφέρεται ουδέτερα (ούτε δότης ούτε δέκτης ηλεκτρονίων) γίνεται χρήση απαρχητή που δίνει ελεύθερες ρίζες (πολυμερισμός με ελεύθερες ρίζες).

Ο αλυσωτός πολυμερισμός είναι αντίδραση προσθήκης, που οδεύει με ταχύτατο ρυθμό (ολοκληρώνεται σε χρόνο της τάξης των 10^{-6} s) προσθέτοντας διαδοχικά ανά ένα μόριο μονομερούς στην κύρια πολυμερική αλυσίδα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.16(A), στις αντιδράσεις αυτές, η έναρξη της αντίδρασης απαιτεί κάποιο δραστικό κέντρο διέγερσης (ενεργό κέντρο όπως ανιόν, κατιόν, ελεύθερη ρίζα) για την υλοποίηση του σταδίου της προόδου. Το μόνο αντιδρών είδος είναι το μονομερές το οποίο προστίθεται στο ενεργό άκρο της αυξανόμενης σε μήκος αλυσίδας και το οποίο συνήθως έχει διπλό δεσμό ή ένωση περιέχουσα δακτύλιο. Επιτυγχάνεται λοιπόν, πολυμερισμός των μονομερών

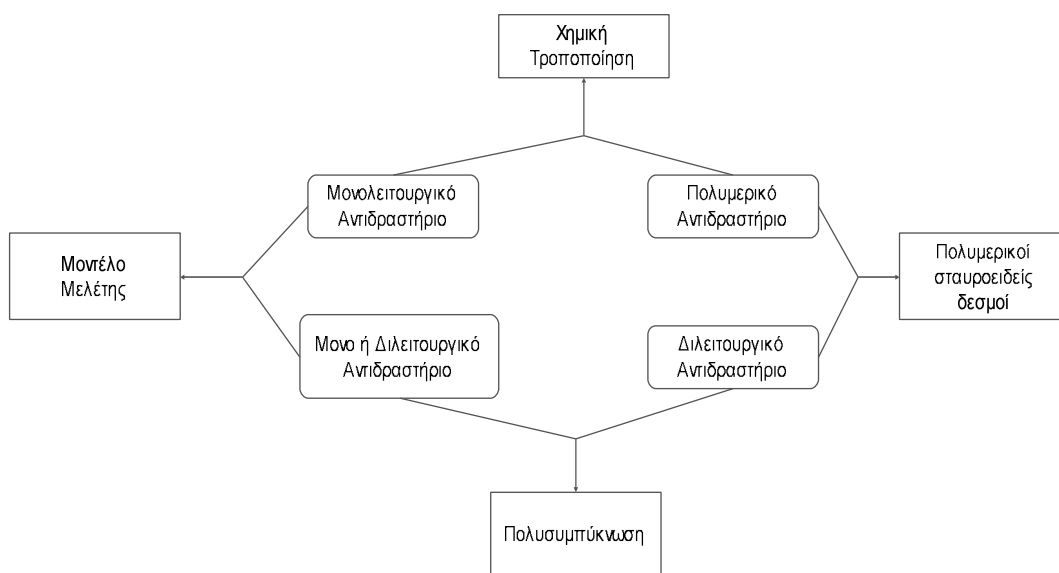
(Εικόνα 1.16 (B), (Γ)) πάνω στα ενεργά κέντρα και η ποσότητα του μονομερούς ελαττώνεται διαρκώς κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (όπου συναντάμε μίγμα μονομερών και αλυσίδων). Η διάνοιξη του (διπλού ή τριπλού) δεσμού τον οποίο φέρουν στο μόριό τους τα μονομερή, επιτυγχάνεται με την προσθήκη μονομερών αρχικά στον εκκινητή/ καταλύτη και στη συνέχεια στο άκρο της (αυξανόμενης σε μήκος) αλυσίδας. Η περάτωση της αντίδρασης πραγματοποιείται με την κατανάλωση του μονομερούς (Εικόνα 1.16(Δ)).



Εικόνα 1.16: Σχηματική αναπαράσταση των φάσεων μιας αλυσωτής αντίδρασης πολυμερισμού (κλασσικός ριζικός πολυμερισμός): (Α) Μονομέρες πριν την έναρξη της αντίδρασης, (Β)-(Γ) Πολυμερισμός μονομερών στα ενεργά κέντρα και ακαριαία αύξηση του μήκους της αλυσίδας, (Δ) Περάτωση της αντίδρασης⁷.

Χημική τροποποίηση πολυμερών

Στις αρχές του 19^{ου} αιώνα ^{132, 133}, επινοήθηκε αρχικά, η χημική τροποποίηση των φυσικών πολυμερών (όπως η κυτταρίνη, το καουτσούκ κ.ά.) και αργότερα, με τη χημική τροποποίηση των πολυμερών συντέθηκαν πολυμερή για επωφελείς καθορισμένες εφαρμογές. Έτσι, απέτελεσε μια ευέλικτη, τεχνολογικά εφικτή και οικονομικά βιώσιμη εναλλακτική λύση για τη σύνθεση νέων πολυμερών. Υπάρχουν διάφορες διεργασίες που προκύπτουν από τη λειτουργικότητα των πρόδρομων ουσιών όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.17.



Εικόνα 1.17: Διάφορες διεργασίες που προκύπτουν από διαφορετικούς βαθμούς λειτουργικότητας των πρόδρομων ουσιών.

Η χημική τροποποίηση συχνά περιλαμβάνει αντιδράσεις σε ένα περιβάλλον ελεύθερου διαλύτη. Για παράδειγμα χρησιμοποιώντας αντιδραστική εξώθηση, παρέχονται τόσο περιβαλλοντικά πλεονεκτήματα όσο και οικονομικά, λόγω της χρήσης του συμβατικού εξοπλισμού επεξεργασίας. Ωστόσο, η χημική τροποποίηση σε μια πιο γενική έννοια, μπορεί να περιλαμβάνει επιφανειακή ή αμιγή τροποποίηση σε κατάσταση τήξης, ή σε διάλυμα. Ένα παράδειγμα που έχει εφαρμοστεί χημική τροποποίηση είναι τα πολυδιένια. Το πιο κλασικό παράδειγμα τροποποίησης αποτελεί η διαδικασία βουλκανισμού η οποία μετατρέπει ένα άχρηστο υλικό (καουτσούκ) σε ένα προϊόν με εντυπωσιακές μηχανικές ιδιότητες (όπως η αντίσταση στη θερμότητα, το φως, τη χημική αντίσταση κ.ά.).

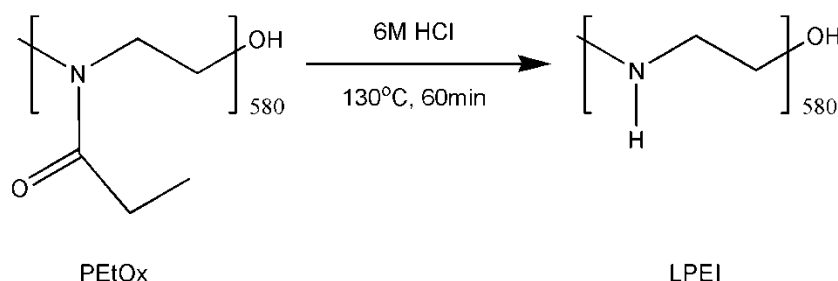
Ένα καλά καθορισμένο και κατάλληλα επιλεγμένο πολυμερές μετασχηματίζεται χημικά σε ένα άλλο πολυμερές με τη χρήση γνωστών οργανικών αντιδράσεων. Αφού η χημική φύση του πολυμερούς μεταβάλλεται, θα αλλάξουν και οι ιδιότητές του διαφέροντας αισθητά από εκείνες του πρόδρομου πολυμερούς. Η χημική τροποποίηση μπορεί να εκτελεσθεί είτε σε ολόκληρο το συμπολυμερές είτε επιλεκτικά σε μία από τις συστάδες, χρησιμοποιώντας την κατάλληλη χημική πορεία. Ο μετασχηματισμός της πρόδρομης συστάδας σε μία νέα, που έχει την επιθυμητή χημική σύσταση (και ιδιότητες), πρέπει να ολοκληρωθεί χωρίς να προκαλέσει αποικοδόμηση, δικτύωση και γενικότερα οποιεσδήποτε παράπλευρες αντιδράσεις οι οποίες μπορούν να επιδενώσουν τα υπόλοιπα μοριακά χαρακτηριστικά των συμπολυμερών. Ο αριθμός των δομικών

μονάδων στο νέο συμπολυμερές και σε κάθε συστάδα καθώς και η μοριακή αρχιτεκτονική του επιλέγεται αυτόματα. Αυτά τα μοριακά χαρακτηριστικά, μαζί με τη κατανομή μοριακών βαρών, πρέπει κανονικά να παραμείνουν αμετάβλητα. Η σύνθεση συμπολυμερών κατά συστάδες με χημική τροποποίηση πρόδρομων συντεθειμένων συμπολυμερών πρέπει να αντιμετωπισθεί ως ένας άλλος τρόπος για την επέκταση των διαθέσιμων πολυμερικών υλικών (τα οποία δεν μπορούν να παραχθούν με απευθείας πολυμερισμό).

Στις μέρες μας λοιπόν ¹³⁴, οι τεχνικές χημικής τροποποίησης συμπολυμερών περιλαμβάνουν ένα εύρος μετασχηματισμών, όπως αντιδράσεις υδρογόνωσης, χημικής υδρογόνωσης, υδρόλυσης, μετατροπής σε τεταρτοταγές άτομο αζώτου (τεταρτοταγοποίηση, quaternization), υδροβορίωσης-οξείδωσης, εποξειδωσης, χλωρο-βρωμομεθυλίωσης υδρο-πυτιπίωσης, επέκτασης της αλυσίδας, σύνδεσης δεσμών, διακλάδωσης, ελεγχόμενης υποβάθμισης κ.ά.. Στην παρούσα εργασία επικεντρώθηκε το ενδιαφέρον στην υδρόλυση και στη μετατροπή σε τεταρτοταγές άτομο αζώτου.

(Α) Υδρόλυση ¹³³ ονομάζεται μια χημική αντίδραση η οποία περιλαμβάνει το σπάσιμο ενός δεσμού σε ένα μόριο χρησιμοποιώντας νερό. Η αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα κυρίως μεταξύ ενός ιόντος και των μορίων του νερού και συχνά αλλάζει το pH του διαλύματος. Στη χημεία, υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι της υδρόλυσης: υδρόλυση άλατος, όξινη υδρόλυση και βασική υδρόλυση. Το νερό μπορεί να δράσει ως ένα οξύ ή μία βάση σύμφωνα με τη θεωρία Bronsted-Lowry. Αν αυτό δρα ως οξύ, το μόριο του νερού αποτελεί δότης ενός πρωτονίου H^+ ή ιόντος H_3O^+ . Αντίθετα αν το νερό δρα ως βάση, αποτελεί δέκτη ενός πρωτονίου H^+ ή ιόντος H_3O^+ . Η υδρόλυση συνήθως, εφαρμόζεται για την σύνθεση συστάδων που φέρνουν ομάδες καρβοξυλίου, υδροξυλίου και αμίνης. Αυτές οι ομάδες, παρούσες στις πρόδρομες συστάδες σε κατάλληλη προστατευμένη μορφή, μπορούν να αποπροστατευτούν υπό ήπιες όξινες ή βασικές συνθήκες ανάλογα με την επιθυμητή δραστικότητα. Για παράδειγμα, οι συστάδες πολυ(μεθακρυλικού οξέος) (poly(methacrylic acid), PMA) μπορούν να σχηματιστούν με όξινη υδρόλυση των πολυ(μεθακρυλικών) tert -βουτυλεστέρων (poly(methacrylic) tert-butyl ester) συστάδων. Αντίστοιχα, τα συμπολυμερή κατά συστάδες πολυστυρένιο-πολυ(μεθακρυλικό οξύ) (polystyrene-b- polymethacrylic acid, PS-b-PMA) μπορούν να προέλθουν από την υδρόλυση των πρόδρομων συμπολυμερών κατά συστάδες πολυστυρένιο-b-πολυ(μεθακρυλικός τριτοαταγής βουτυλεστέρας) (PS-b-PtBMA) ¹³⁵. Άλλες ομάδες προστασίας όπως σίλυλο- ή πυράνυλο ομάδες μπορούν να αποτελέσουν τις πρόδρομες ομάδες για την $-COOH$ ομάδα.

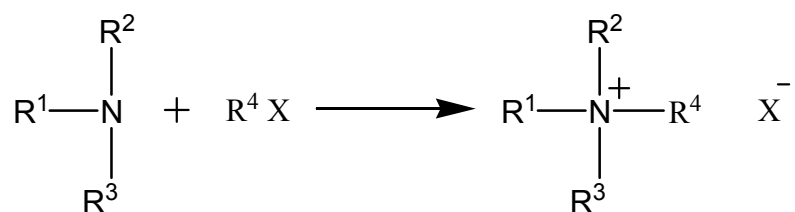
Ένα άλλο τυπικό παράδειγμα όξινης υδρόλυσης¹³⁶ αποτελεί αυτή της πολυ(2-αιθυλο-2-οξαζολίνης) (poly(2-ethyl-2-oxazoline), PEtOx) σε γραμμική πολυαιθυλενιμίνη (linear poly(ethylene imine, LPEI). Συνοπτικά οι συνθήκες και η χημική αντίδραση αποτυπώνονται στην Εικόνα 1.18.



Εικόνα 1.18: Όξινη υδρόλυση της PEtOx σε LPEI.

(B) Οι **αμίνες** είναι οι αζωτούχες οργανικές ενώσεις με μία τουλάχιστον αμινομάδα, δηλαδή $-NH_2$ ή $-NH-$ ή $>N-$, ως κύρια χαρακτηριστική ομάδα. Οι βασικές τριτοταγείς αμίνες παρούσες σε μία από τις συστάδες των συμπολυμερών μπορούν να μετατραπούν σε τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα με την αντίδραση με οξέα, όπως HCl, ή αλκυλικά αλογονίδια¹³⁷. Για παράδειγμα, η πολυ(2-βινυλοπυριδίνη) των δισυσταδικών συμπολυμερών πολυστυρενίου- πολυ(2-βινυλοπυριδίνη) (polystyrene- b- poly(2- vinyl pyridine), PS-b-P2VP)^{138, 139} μετασχηματίζονται σε τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα παρουσία HCl, CH_3I ή βενζυλοχλωριδίου, δίνοντας κατιοντικές πολυηλεκτρολυτικές συστάδες. Τα νέα συμπολυμερή μπορούν να διαλυθούν στο νερό σε αντίθεση με τα πρόδρομα πολυμερικά υλικά που είναι αδιάλυτα σε υδατικά μέσα. Εναλλακτικά,¹³⁸ όταν το αντιδραστήριο που μετατρέπει το άτομο του αζώτου σε τεταρτοταγές είναι μία κυκλοαλκυλοσουλτόνη ή λακτόνη, μετατρέπεται η τριτοταγής αμινομάδα σε μία διπολική ομάδα. Οι ομάδες τριτοταγών αμινών μπορούν επίσης να μετατραπούν σε N-O ομάδα με συνέπεια τον σχηματισμό υδατοδιαλυτών συστάδων από πρόδρομες υδρόφοβες αλυσίδες.

Εν γένει, η αντίδραση τεταρτοταγοποίησης¹⁴⁰ πραγματοποιείται σε θερμοκρασία μεταξύ 80 και 100°C εξαρτώμενη από το ιζώδες και κατά συνέπεια από τον διαλύτη. Στην Εικόνα 1.19 αναπαρίσταται μια τέτοια αντίδραση στη γενική της μορφή.



Εικόνα 1.19: Κλασσική αντίδραση τριτοταγών αμινών με βάση αλκυλιωτικούς παράγοντες.

Τα R^1 , R^2 και R^3 αναπαριστούν μία τουλάχιστον μακριά αλκυλο- αλυσίδα, μία μακριά αλκυλο- αλυσίδα ή μία κοντή άλκυλο ομάδα (όπως η μέθυλο). Η R^4 ομάδα αφορά το άλκυλο ή άρυλο μέρος ενός αλκυλιωτικού παράγοντα.

Κατιοντικός πολυμερισμός

Στον κατιοντικό πολυμερισμό, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, η διάνοιξη διπλού δεσμού επιτυγχάνεται όταν ο εκκινητής φέρει κατιόν (ομοιογενής κατάλυση, κατιοντικές αντιδράσεις). Πρέπει οι υποκαταστάτες (X και Ψ) να είναι δότες ηλεκτρονίων και εξ' ορισμού πυρηνόφιλα ή βασικά. Ουσιαστικά, η προσβολή του μονομερούς από ηλεκτρονιόφιλες ουσίες, προκαλεί διάσπαση του διπλού δεσμού του μονομερούς και την παραγωγή καρβοκατιόντος. Γενικά, τα ενεργά καρβοκατιόντα είναι πολύ δραστικά και ασταθή ενώ παράλληλα υπόκεινται σε πλευρικές αντιδράσεις (π.χ. αντιδράσεις μεταφοράς και τερματισμού). Η κυριότερη παράπλευρη και ενδογενής αντίδραση είναι η μεταφορά (δηλαδή η απόσπαση του υδρογόνου) στο μονομερές, και η οποία είναι δύσκολο να αποφευχθεί. Για να σταθεροποιηθεί το καρβοκατιοντικό ενδιάμεσο (με πυρηνόφιλη αλληλεπίδραση) προτάθηκε ¹⁴¹ να χρησιμοποιηθεί α) πυρηνόφιλο αντισταθμιστικό ιόν, β) βάση Lewis (πρόσθεσης προ της έναρξης της αντίδρασης). Με τις δύο αυτές συμπληρωματικές μεθόδους, μπορεί να επιτευχθεί η καταστολή της αντίδρασης μεταφοράς (λόγω της μείωσης του θετικού φορτίου στον α-C και της οξύτητας του β-H). Ο κατιοντικός πολυμερισμός έχει τα εξής τρία στάδια :

- Έναρξη αντίδρασης

Για την έναρξη του πολυμερισμού χρησιμοποιούνται απαρχητές που δίνουν θετικά φορτισμένα ιόντα τα οποία αντιδρούν με το μονομερές και σχηματίζονται πρωτογενή κατιόντα. Τέτοιοι απαρχητές μπορεί να είναι διεγέρτες οξέων/ ισχυρά ανόργανα

πρωτονικά οξέα (π.χ. HCl, H₂SO₄, HClO₄, H₃PO₄), αλογόνα (π.χ. I₂) και σε βιομηχανική κλίμακα, σύμπλοκα οξέων κατά Lewis (π.χ. BF₃, AlCl₃, TiCl₄, SnCl₄). Στην περίπτωση των συμπλόκων, απαιτείται η παρουσία ίχνους ένωσης- πρωτονιοδότη (π.χ. ύδωρ, αλκοόλη, οργανικά οξέα, αλκυλαλογονίδια). Δηλαδή, το ενεργό κέντρο (διεγέρτης) I είναι ένα κατιόν A⁺. Ο μηχανισμός έναρξης περιγράφεται από τις γενικές εξισώσεις:



Ένα ζεύγος ηλεκτρονίων από το διπλό δεσμό έλκεται από το κατιόν/ διεγέρτη και εγκαταλείπει το διπλό δεσμό για να σχηματίσει απλό χημικό δεσμό με το διεγέρτη. Ο μηχανισμός αυτός αφήνει ένα από τα άτομα άνθρακα του διπλού δεσμού με έλλειμμα ηλεκτρονίων, δηλαδή δημιουργείται ένα νέο κατιόν, το οποίο θα αντιδράσει με ένα δεύτερο μόριο μονομερούς με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που έκανε ο διεγέρτης με το πρώτο μόριο μονομερούς. Και ο μηχανισμός αυτός επαναλαμβάνεται μέχρις ότου σχηματιστεί το επιθυμητό πολυμερές. Στο τέλος της φάσης της έναρξης του πολυμερισμού παράγεται ένα καρβοκατιόν.

- Πρόοδος αντίδρασης

Τα παραγόμενα καρβοκατιόντα είναι πολύ ασταθή, διότι το άτομο άνθρακα που περιέχει διαθέτει μόνο 6 ηλεκτρόνια στην εξώτατη στιβάδα του. Συνεπώς, απαιτεί τη συμπλήρωση της εξώτατης στιβάδας με δύο ακόμη ηλεκτρόνια, τα οποία ανευρίσκονται εύκολα στα ζεύγη ηλεκτρονίων του διπλού δεσμού του μορίου του μονομερούς. Έτσι, το καρβοκατιόν δεσμεύει το ένα ζεύγος ηλεκτρονίων σχηματίζοντας απλό δεσμό με το μόριο μονομερούς, ενώ συγχρόνως σχηματίζεται ένα νέο καρβοκατιόν, το οποίο μπορεί να αντιδράσει με άλλο μονομερές και ο κύκλος να επαναληφθεί πολλές φορές μέχρι ότου να παραχθεί μια μακρά πολυμερική αλυσίδα, σύμφωνα με τη γενική αντίδραση:



- Τερματισμός αντίδρασης

Μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους μεταφοράς φορτίου τόσο προς το μονομερές, όσο και προς το πολυμερές και προς άλλα μοριακά είδη (παρόντα υπό μορφή προσμίξεων).

(i) Μεταφορά προς το μονομερές

Η διαδικασία περιγράφεται από τη γενική εξίσωση:



Τα υδρογόνα των μεθυλίων που βρίσκονται ενωμένα με το καρβοκατιόν έχουν την τάση να αποσπώνται και να ενώνονται με άλλα μόρια μονομερούς. Μετά την αναδιάταξη όλων των ηλεκτρονίων, προκύπτει μια ουδέτερη πολυμερική αλυσίδα με ένα διπλό δεσμό στο ένα άκρο της και ένα νέο κατιόν που δρα ως νέος διεγέρτης (ενεργό κέντρο) για περαιτέρω πολυμερισμό.

(ii) Μεταφορά σε προσμίξεις

Στο δοχείο πολυμερισμού για κάθε κατιόν ελλοχεύει κάπου ένα ανιόν και αναμένεται η μεταξύ τους αντίδραση, η οποία μπορεί να μην είναι επιθυμητή (εμποδίζεται η αντίδραση του κατιόντος με μόριο μονομερούς).

(iii) Μεταφορά προς το πολυμερές

Στην περίπτωση παρουσίας μονήρων ζευγών ηλεκτρονίων, που αντιδρούν απευθείας με το καρβοκατιόν και όχι με άτομο H, προκύπτει ένα διαφορετικό ουδέτερο πολυμερές με διαφοροποιημένο άκρο διακλάδωσης.

1.6 Τεχνικές χαρακτηρισμού

1.6.1 Σκέδαση φωτός (Light Scattering, LS) ¹⁴²⁻¹⁴⁴

Οι τεχνικές σκέδασης φωτός είναι πολύ σημαντικές πειραματικές τεχνικές στον τομέα μελέτης των διαλυμάτων πολυμερών, κολλοειδών και βιολογικών μακρομορίων παρέχοντας εξέχουσας σημασίας πληροφορίες για τις ιδιότητές τους. Η αρχή λειτουργίας τους συνίσταται στη μέτρηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από το διάλυμα σε διάφορες κατευθύνσεις σε σχέση με την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός εξαρτάται από το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός, το μέγεθος και το σχήμα των κέντρων σκέδασης, τις οπτικές ιδιότητες των σκεδαστών και τη γωνία παρατήρησης. Όταν μία δέσμη φωτός προσπέσει σε ένα υλικό, τα ηλεκτρόνια του υλικού αλληλεπιδρούν με το φως, διεγείρονται και γίνονται δευτερογενείς πηγές ακτινοβολίας, επανεκπέμποντας την απορροφούμενη ενέργεια προς όλες τις κατευθύνσεις με το ίδιο ακριβώς μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Οι τεχνικές σκέδασης φωτός θεωρούνται γρήγορες, μη καταστρεπτικές για το δείγμα και απόλυτες μιας και δεν απαιτείται βαθμονόμηση του οργάνου. Όμως επιβάλλονται ιδιαίτεροι χειρισμοί όπως (α) το δείγμα δεν πρέπει να είναι πολύ πυκνό ώστε να αποφευχθεί η πολλαπλή σκέδαση και (β) δεν πρέπει να υπάρχει πουθενά στο σύστημα σκόνη, καθότι τα σωματίδιά της αποτελούν και αυτά κέντρα ισχυρής σκέδασης.

1.6.1.1 Στατική σκέδαση φωτός (Static Light Scattering, SLS) ¹⁴⁵

Στην τεχνική αυτή μετράται η μέση τιμή ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας υπό συγκεκριμένες γωνίες για ένα εύρος συγκεντρώσεων του πολυμερούς στο διάλυμα. Στην περίπτωση των πολυμερικών διαλυμάτων, ο διορθωμένος λόγος Rayleigh, ΔR_θ συνδέεται με τα μοριακά χαρακτηριστικά του πολυμερούς και τις θερμοδυναμικές ιδιότητες του διαλύματος:

$$\frac{K \cdot C}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{M_w} \cdot \left(1 + \frac{1}{3} \cdot R_g^2 \cdot q^2 \right) + 2 \cdot A_2 \cdot C \quad (\text{εξ. 1.5})$$

όπου M_w το μοριακό βάρος του πολυμερούς, R_g η γυροσκοπική ακτίνα του πολυμερούς, A_2 ο δεύτερος ωσμωτικός συντελεστής Virial, ο οποίος εκφράζει αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο μορίων, q το διάνυσμα σκέδασης, το οποίο ορίζεται ως:

$$q = \frac{4 \cdot \pi \cdot n_0}{\lambda} \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (\text{εξ. 1.6})$$

με λ το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, n_0 ο δείκτης διάθλασης του διαλύτη στο συγκεκριμένο μήκος κύματος και K η πειραματική σταθερά η οποία εκφράζεται με τη σχέση:

$$K = \frac{4 \cdot \pi^2 \cdot n_0^2}{\lambda^4 \cdot N_A} \cdot \left(\frac{dn}{dC}\right)^2 \quad (\text{εξ. 1.7})$$

όπου N_A ο αριθμός του Avogadro, C η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας (g/ml) και dn/dC ή $\partial n/\partial C$ ο διαφορικός δείκτης διάθλασης του πολυμερικού διαλύματος (μέτρο της μεταβολής του δείκτη διάθλασης του διαλύματος συναρτήσει της αύξησης της συγκέντρωσης του πολυμερούς). Στην περίπτωση συμπολυμερών με δύο ή περισσότερα μόρια τα οποία δεν παρουσιάζουν ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ τους, ο διαφορικός δείκτης διάθλασης του διαλύματος $(\partial n/\partial C)_{\text{ολικό}}$ μπορεί να υπολογιστεί ως σταθμισμένος μέσος όρος των διαφορικών δεικτών διάθλασης $(\partial n/\partial C)_1$, $(\partial n/\partial C)_2$ έως και $(\partial n/\partial C)_k$ των επιμέρους συστατικών :

$$\left(\frac{\partial n}{\partial C}\right)_{\text{ολικό}} = w_1 \cdot \left(\frac{\partial n}{\partial C}\right)_1 + w_2 \cdot \left(\frac{\partial n}{\partial C}\right)_2 + \dots + w_k \cdot \left(\frac{\partial n}{\partial C}\right)_k \quad (\text{εξ. 1.8})$$

όπου $w_1, w_2, \dots, w_k$ τα κλάσματα βάρους των 1,2, ..., k συστατικών.

Εφαρμόζοντας την εξίσωση (εξ. 1.5) σε πολλαπλές γωνίες θ και συγκεντρώσεις C , προκύπτει το διάγραμμα Zimm, μέσω του οποίου εξαγονται το μοριακό βάρος M_w (ως το αντίστροφο της κοινής τεταγμένης επί της αρχής), ο δεύτερος συντελεστής Virial A_2 και η γυροσκοπική ακτίνα R_g (μέσω των κλίσεων των ευθειών για $\theta = 0$ και $C = 0$, αντίστοιχα).

Για σφαιροειδή μακρομόρια και για μικρή διαφορά των δεικτών διάθλασης μεταξύ του διαλύματος και του διαλύτη, διαγράμματα Guíner τα οποία έχουν αρνητική κλίση ίση με $R_g^2/3$ διευκολύνουν τη γωνιακή προέκταση. Τα διαγράμματα αυτά προέρχονται από την εξίσωση:

$$\frac{\Delta R_{\theta}}{K \cdot C} = M_w \cdot \exp\left(-\frac{1}{3} \cdot R_g^2 \cdot q^2\right) \quad (\text{εξ. 1.9})$$

σε ημιλογαριθμική κλίμακα των αξόνων $\frac{\Delta R_{\theta}}{K \cdot C}$ συναρτήσει του q^2 . Ενώ για πολύ διακλαδισμένα μακρομόρια (όπως πολυσακχαρίτες) μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα διαγράμματα Berry.

Η γυροσκοπική ακτίνα R_g είναι μια μαθηματικά καθορισμένη παράμετρος (ορίζεται από την εξίσωση (εξ. 1.10)) που περιγράφει την κατανομή των κέντρων μαζών στο μόριο και είναι ανεξάρτητη της μορφολογίας:

$$R_g^2 = \frac{\sum m_i \cdot r_i^2}{\sum m_i} \quad (\text{εξ. 1.10})$$

όπου m_i η μάζα του i ατόμου του σωματιδίου και r_i η απόσταση του i σωματιδίου από το κέντρο μάζας.

1.6.1.2 Δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS) ^{145,146}

Η αρχή της τεχνική αυτής στηρίζεται στο γεγονός ότι η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας ενός συστήματος, παρουσιάζει διακυμάνσεις συναρτήσει του χρόνου λόγω της κίνησης Brown των μορίων του συστήματος. Η μετρούμενη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης της σκεδαζόμενης έντασης $g_2(q, \tau)$, (εξίσωση Siegert), συνδέεται με την συνάρτηση αυτοσυσχέτισης του σκεδαζόμενου ηλεκτρικού πεδίου $g_1(q, \tau)$:

$$g_2(q, \tau) = 1 + \beta \cdot g_1^2(q, \tau) \quad (\text{εξ. 1.11})$$

όπου q το διάνυσμα σκέδασης, τ ο χρόνος υστέρησης, β ένας συντελεστής διόρθωσης (εξαρτώμενος από την πειραματική διάταξη).

Όταν οι σκεδαστές εκτελούν θερμική διάχυση και είναι όλοι πανομοιότυποι μεταξύ τους η συνάρτηση $g_1(q, \tau)$ είναι απλή εκθετική συνάρτηση:

$$g_1^2(q, \tau) = \exp(-\Gamma \cdot \tau) \quad (\text{εξ. 1.12})$$

όπου το Γ που ονομάζεται σταθερά χαλάρωσης συνδέεται με το συντελεστή διάχυσης D και το διάνυσμα σκέδασης q , ως εξής:

$$\Gamma = D \cdot q^2 \quad (\text{εξ. 1.13})$$

Μέσω του συντελεστή διάχυσης D μπορεί να υπολογιστεί η υδροδυναμική ακτίνα R_h των σωματιδίων, με χρήση της σχέσης Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_h} \quad (\text{εξ. 1.14})$$

όπου k_B η σταθερά Boltzmann, T η απόλυτη θερμοκρασία και η το ιξώδες του διαλύτη.

Για μη σφαιρικά σωματίδια, στην εξίσωση 1.14, αντικαθίστανται τα D και R_h με τα αντίστοιχα φαινόμενα μεγέθη (D^{app} και R_h^{app}).

Η υδροδυναμική ακτίνα R_h είναι μια φαινομενολογική ιδιότητα του σωματιδίου και είναι η ακτίνα μιας σφαίρας με τον ίδιο μετρούμενο συντελεστή μεταφορικής διάχυσης (νόμος Stokes-Einstein). Η ακτίνα αυτή περιλαμβάνει την επίδραση του διαλύτη και του σχήματος. Τα περισσότερα μόρια μπορεί να θεωρηθεί ότι μοιάζουν με σφαίρες.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η $g_1(q, \tau)$ δεν είναι απλό εκθετικό λόγω επιδράσεων έστω και χαμηλής πολυδιασποράς στα μεγέθη των σωματιδίων. Η κατανομή των μεγεθών εκφράζεται ως κατανομή χαρακτηριστικών ρυθμών χαλάρωσης Γ σε άθροισμα των εκθετικών συναρτήσεων που αντιστοιχούν σε κάθε ένα είδος σωματιδίων του συστήματος:

$$g_1(q, \tau) = \int G(\Gamma) \cdot \exp(-\Gamma \cdot \tau) \cdot d\Gamma \quad (\text{εξ. 1.15})$$

Για την ανάλυση της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης $g_1(q, \tau)$ έχουν αναπτυχθεί διάφορες μαθηματικές διαδικασίες με τις πιο διαδεδομένες, να είναι η μέθοδος των αθροισμάτων (cumulants method) και οι τεχνικές κανονικοποίησης (regularization methods), οι οποίες εφαρμόζονται μέσω του πιο συχνά χρησιμοποιούμενου προγράμματος CONTIN. Στη μέθοδο των αθροισμάτων, προσαρμόζεται μια απλή εκθετική συνάρτηση στη συνάρτηση συσχέτισης. Με την προηγούμενη μέθοδο λαμβάνεται υπόψη το μέσο μέγεθος των σωματιδίων και μια εκτίμηση του πλάτους της κατανομής (δείκτης πολυδιασποράς). Πιο συγκεκριμένα, η $g_1(q, \tau)$ εκφράζεται ως ένα πολυώνυμο 2^{ης} ή 3^{ης} τάξης ως προς το χρόνο τ :

$$\ln g_1(q, \tau) = -\bar{\Gamma} \cdot \tau + \frac{\mu_2}{2!} \cdot \tau^2 - \frac{\mu_3}{3!} \cdot \tau^3 \quad (\text{εξ. 1.16})$$

όπου $\bar{\Gamma}$ η μέση τιμή της σταθεράς χαλάρωσης και μ_2, μ_3 οι 2^{ης} και 3^{ης} τάξης συντελεστές του πολυωνύμου. Μέσω του υπολογισμού του $\bar{\Gamma}$ μπορεί να εξαχθεί η z-μέση τιμή του συντελεστή D σε μία ή περισσότερες γωνίες, μέσω της σχέσης (εξ. 1.14) ενώ ο δείκτης πολυδιασποράς (polydispersity index) του συστήματος, PDI ορίζεται ως:

$$PDI = \frac{\mu_2}{\bar{\Gamma}^2} \quad (\text{εξ. 1.17})$$

Η χρήση του προγράμματος CONTIN αποτελεί την προσαρμογή μιας πολλαπλής εκθετικής συνάρτησης στη συνάρτηση συσχέτισης, για τη εύρεση της κατανομής μεγεθών των σωματιδίων και της υδροδυναμικής τους ακτίνα R_h . Υπολογίζονται οι πιθανές λύσεις της εξίσωσης (εξ. 1.15) για τη συνάρτηση $G(\Gamma)$, μέσω ενός αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace και έπειτα το πρόγραμμα επιλέγει τη βέλτιστη δυνατή λύση για την $G(\Gamma)$, απορρίπτοντας λύσεις που παρουσιάζουν πολυπλοκότητα (από φυσική

άποψη ή αφορούν πειραματικές απροσδιοριστίες). Με τον τρόπο αυτό εξάγεται η συνάρτηση κατανομής των χρόνων χαλάρωσης του συστήματος, η οποία μπορεί να μετασχηματιστεί σε συνάρτηση κατανομής της υδροδυναμικής ακτίνας των σωματιδίων του συστήματος (εξ. 1.13 - 1.14).

Ο χαρακτηριστικός λόγος ρ ορίζεται ως το πηλικό R_g/R_h , μετά από προέκταση σε $q=0$. Ο αριθμός αυτός υποδηλώνει το σχήμα/μορφολογία των νανοσωματιδίων που μελετώνται. Η τιμή του ρ , που είναι χαρακτηριστική για ένα σφαιρικό σωματίδιο του οποίου η μάζα είναι πιο συγκεντρωμένη προς το κέντρο της^{10, 82, 147} είναι 0.66. Όταν ο παράγοντας ρ ισούται με περίπου 0.87 αποκαλύπτεται ότι η αυτο-οργανούμενη δομή τους στο διαλύτη (π.χ. νερό) είναι στο εύρος των τιμών για σφαίρα^{10, 83, 148} ενώ για ομοιόμορφης κατανομής μάζας ή συμπαγή σφαίρα $\rho \sim 0.775$. Για πιο ανοιχτή μορφολογία τύπου μικρογέλης (microgel)¹⁴⁹, σφαιρικά κελύφη^{10, 84, 150} ή κοίλες σφαίρες^{10, 77, 151} με ένα απείρως λεπτό κέλυφος (κυστίδια)^{10, 84, 150} το ρ είναι 1.

1.6.1.3 Ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός (Electrophoretic Light Scattering, ELS)

152

Μια σημαντική συνέπεια από την ύπαρξη ηλεκτρικών φορτίων στην επιφάνεια των σωματιδίων, είναι ότι αυτά θα εμφανίσουν συγκεκριμένες ιδιότητες υπό την επίδραση ενός εφαρμοζόμενου εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου. Τα σωματίδια με ηλεκτρικό φορτίο, όταν βρεθούν σε ένα τέτοιο πεδίο, κινούνται προς τη μια ή την άλλη κατεύθυνση, ανάλογα με το αν το φορτίο τους είναι θετικό ή αρνητικό. Όταν το ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται διαμέσου ενός ηλεκτρολύτη, τα φορτισμένα σωματίδια που βρίσκονται διάσπαρτα στον ηλεκτρολύτη έλκονται προς το ηλεκτρόδιο αντίθετου φορτίου ενώ το ιξώδες του μέσου αντιστέκεται στην κίνηση αυτή του σωματιδίου. Όταν εδραιωθεί ισορροπία μεταξύ των δύο αυτών αντιτιθέμενων δυνάμεων, τα σωματίδια κινούνται με σταθερή ταχύτητα u , η οποία είναι ανάλογη της έντασης του πεδίου E . Τα φορτία στα σωματίδια κατανέμονται σε όλη την επιφάνεια και αντισταθμίζονται από το ολικό φορτίο στην ηλεκτρική διπλοστιβάδα στην οποία υπάρχει περίσσεια αντιθέτως φορτισμένων ιόντων. Το δυναμικό ζήτα, ζ_p ενός σωματιδίου είναι το δυναμικό της ηλεκτρικής διπλοστιβάδας κοντά στη επιφάνεια· στο εξώτατο όριο της διαχωριστικής στιβάδας σωματιδίου/ μέσου διασποράς (επίπεδο ολίσθησης). Μέσω της ηλεκτροφορητικής

κινητικότητας μ_e του σωματιδίου και με τη χρήση θεωρητικών μοντέλων, καθίσταται δυνατός ο υπολογισμός του ζ_p :

$$\zeta_p = \frac{3}{2} \cdot \frac{\eta \cdot \mu_e}{\varepsilon \cdot f} \quad (\text{εξ. 1.18})$$

όπου ε η διηλεκτρική σταθερά, η το ιξώδες του διαλύτη και f η συνάρτηση Henry (η οποία ισούται με 1.5 σύμφωνα με την παραδοχή Smoluchowski, που χρησιμοποιείται σε υδατικά διαλύματα). Η τεχνική της ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός συνδυάζει πειράματα ηλεκτροφόρησης και σκέδασης φωτός για τον υπολογισμό της ταχύτητας u των φορτισμένων σωματιδίων σε διάλυμα, τα οποία κινούνται υπό την επίδραση ενός εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου. Το μ_e συνδέεται με την ένταση του πεδίου από τον τύπο:

$$u = \mu_e \cdot E \quad (\text{εξ. 1.19})$$

1.6.2 Φασματοσκοπικές τεχνικές

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ του δείγματος και των διαφόρων τύπων ακτινοβολίας ή ενέργειας χρησιμοποιούνται οι φασματοσκοπικές ή φασματομετρικές μέθοδοι. Για την κατανόηση της αλληλεπίδρασης αυτής είναι απαραίτητη η εισαγωγή του σωματιδιακού μοντέλου στο οποίο η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία θεωρείται ως ένα ρεύμα διακριτών σωματιδίων ή κυματικών πακέτων ενέργειας (φωτόνια) με ενέργεια ανάλογη της ακτινοβολούμενης ενέργειας. Με τις μεθόδους αυτές καθίσταται δυνατή η ταυτοποίηση των μορίων, η εξαγωγή πληροφοριών σχετικά με τη δομή των μοριακών ειδών του δείγματος και ο ποσοτικός τους προσδιορισμός.

1.6.2.1 Φασματοσκοπία φθορισμού ή Φθορισμομετρία (Fluorescence Spectroscopy, FS) ¹⁵³

Η τεχνική του φθορισμού βασίζεται στην εκπομπή ακτινοβολίας από ένα διεγερμένο μόριο και προσδιορίζει μια σειρά οργανικών και ανόργανων ουσιών ακόμα και σε ιχνοποσότητες. Όταν ένα μόριο θεμελιώδους ενεργειακής κατάστασης αλληλεπιδρά με ακτινοβολία κατάλληλης συχνότητας, απορροφά την ακτινοβολούμενη ενέργεια και διεγείρεται (μεταπίπτει σε υψηλότερη ενεργειακή στάθμη) για μικρό χρονικό διάστημα. Έπειτα επιτυγχάνεται αποδιέγερση του μορίου, αποβάλλοντας ενέργεια είτε υπό μορφή θερμότητας, είτε μέσω εκπομπής ακτινοβολίας (φαινόμενο φωταύγειας) και επιστρέφει

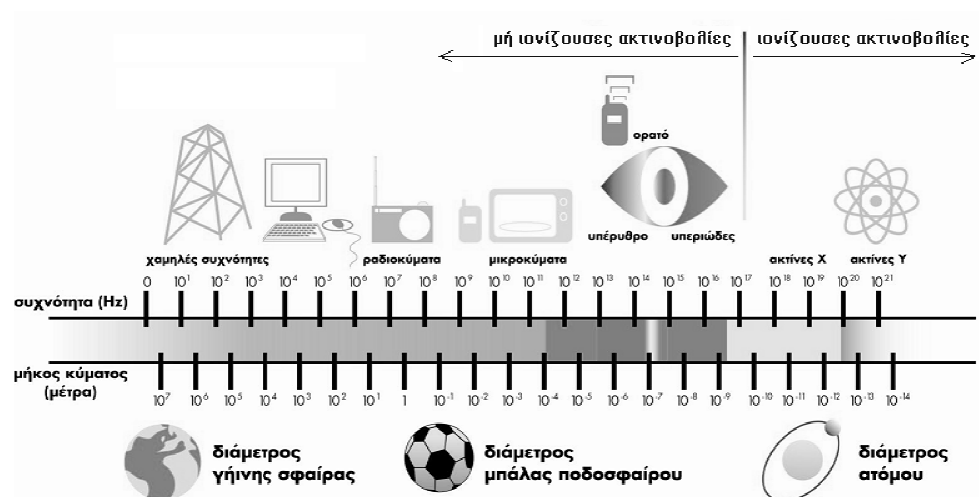
στη θεμελιώδη κατάσταση. Η δεύτερη περίπτωση αποδιέγερσης όταν συμβαίνει για σύντομο χρονικό διάστημα (1-10ns) χαρακτηρίζεται ως φθορισμός, ο οποίος μπορεί να περιγραφεί με τρία στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο, ένα φωτόνιο ενέργειας απορροφάται από το μόριο που βρίσκεται στη θεμελιώδη ηλεκτρονιακή κατάσταση S_0 και μεταβαίνει στην πρώτη απλή διεγερμένη κατάσταση S_1 . Στο δεύτερο στάδιο, κατά τη διάρκεια ζωής της διεγερμένης κατάστασης, το μόριο εφόσον χάνει ενέργεια, μεταβαίνει το ηλεκτρόνιο από το υψηλότερο στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης κατάστασης S_1 (δονητική επαναφορά). Κατά το τρίτο στάδιο του φθορισμού αποδιεγείρεται το μόριο με ταυτόχρονη εκπομπή ακτινοβολίας ενέργειας. Αποτέλεσμα αυτής της αποδιέγερσης είναι οι ζώνες φθορισμού μιας συγκεκριμένης ηλεκτρονιακής μετάπτωσης να εμφανίζονται μετατοπισμένες προς χαμηλότερες συχνότητες ή ισοδύναμα προς μεγαλύτερα μήκη κύματος ως προς την αντίστοιχη ζώνη απορρόφησης. Συνεπώς, ο φθορισμός συνήθως είναι αποτέλεσμα μετάπτωσης από το κατώτατο δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης κατάστασης σε ένα από τα δονητικά επίπεδα της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης με εκπομπή ακτινοβολίας.

1.6.2.2 Φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού-υπερύθρου (Ultra Violet-Visible-Near Infra Red ή UV-Vis-NIR spectroscopy) ¹⁵⁴

Οι απορροφήσεις ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή υπεριώδους και ορατού τμήματος του φάσματος είναι αποτέλεσμα των ενεργειακών μεταβολών στην ηλεκτρονική δομή των μορίων. Σε αυτό το είδος της φασματοσκοπίας τα εξωτερικά ηλεκτρόνια είναι εκείνα, που με την ανύψωση ή πτώση από τη μια τροχιά σε μια άλλη, προκαλούν απορρόφηση ενέργειας σε διακεκριμένες, κβαντωμένες ποσότητες. Οι αλλαγές της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας του μορίου μιας χημικής ένωσης προκαλούν μεταβολές της διπολικής ροπής του, που ευθύνονται για την αλληλεπίδραση του χημικού μορίου και της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (με ισχύ P_0) κατευθυνόμενη προς ένα δείγμα (ορισμένης συγκέντρωσης C) απορροφάται εν μέρει με τα διεγερμένα ηλεκτρόνια των μορίων του δείγματος να μεταβαίνουν σε ένα μοριακό τροχιακό υψηλότερης ενέργειας ενώ η υπόλοιπη ακτινοβολία εκπέμπεται με ισχύ P . Το φασματοφωτόμετρο αποτελεί το πιο διαδεδομένο όργανο των βιοχημικών εργαστηρίων καταγράφοντας την απορρόφηση σε σχέση με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας ορισμένου εύρους (nm) προσδιορίζοντας ποσοτικά ουσίες ή πληροφορίες για ορισμένες ομάδες ατόμων. Για την απορρόφηση σύμφωνα με τον νόμο του Beer-Lambert-Bouguer ισχύει ο κάτωθι τύπος:

$$A = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) = C \cdot l \cdot \varepsilon \quad (\text{εξ. 1.20})$$

όπου A η απορρόφηση της ακτινοβολίας, C η συγκέντρωση του δείγματος (g/ml), l το πάχος της κυψελίδας όπου τοποθετείται το δείγμα και ε η μοριακή απορροφητικότητα (mol/l) ή ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης-απόσβεσης (με εύρος τιμών $1\text{-}5 \cdot 10^5$). Οι διάφορες περιοχές του φάσματος φωτός εμφανίζονται στην Εικόνα 1.20.



Εικόνα 1.20: Φάσμα φωτός συναρτήσει του μήκους κύματος ή της συχνότητας της ακτινοβολίας.

1.6.2.3 Φασματοσκοπία υπερώθρου (Fourier Transform- InfraRed Spectroscopy, FT-IR) ^{155, 156}

Η φασματοσκοπία (απορρόφησης, εκπομπής και ανάκλασης) υπερώθρου είναι ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα φασματοσκοπικά εργαλεία για τη μελέτη και την ταυτοποίηση της δομής των πολυμερών. Αυτό οφείλεται στο ότι είναι μια γρήγορη, οικονομική και «ευαίσθητη» μέθοδος με τεχνικές δειγματοληψίας οι οποίες είναι εύκολες στη χρήση. Το φάσμα υπερώθρου μπορεί να ερμηνευθεί θεωρώντας ότι οφείλεται σε μια ποικιλία ενεργειακών μεταβολών. Οι μεταβολές αυτές είναι αποτέλεσμα των μεταπτώσεων μεταξύ των κβαντισμένων δονητικών ή περιστροφικών ενεργειακών καταστάσεων των μορίων παρέχοντας πληροφορίες όπως το χημικό περιβάλλον των δεσμών και ο πιθανός προσανατολισμός της διπολικής ροπής του μορίου. Η χρήση της κλίμακας κυματαριθμών (σε cm^{-1}) προτιμάται σε αυτή τη μέθοδο λόγω της γραμμικής

σχέσης αυτής της μονάδας με την ενέργεια και τη συχνότητα δόνησης της απορροφούμενης ακτινοβολίας μέσω της σχέσης:

$$\Delta E_{\text{vib}} = h \cdot C_s \cdot \nu \quad (\text{εξ. 1.21})$$

όπου ΔE_{vib} η απόσταση του δονητικού ενεργειακού επιπέδου, h η σταθερά του Planck και C_s η ταχύτητα του φωτός στο κενό.

Κατά τη μέτρηση του φάσματος η υπέρυθρη ακτινοβολία διέρχεται κάθετα από το συνολικό πάχος του δείγματος και κατευθύνεται σε κατάλληλο ανιχνευτή. Οπότε το φάσμα υπέρυθρου καταγράφεται ως η μεταβολή της διαπερατότητας συναρτήσει της συχνότητας ν εκφρασμένης σε κυματαριθμούς (cm^{-1}). Εάν η συχνότητα της ακτινοβολίας συμπίπτει με τη συχνότητα μιας κανονικής δόνησης του μορίου, θα ακολουθήσει μια καθαρή μεταφορά ενέργειας. Η μεταφορά αυτή θα προκαλέσει αλλαγή στο πλάτος της μοριακής δόνησης, οπότε θα πραγματοποιηθεί απορρόφηση ακτινοβολίας μέσω του νόμου Beer-Lambert-Bouguer (εξ. 1.20). Παρομοίως η περιστροφή ενός ασύμμετρου μορίου γύρω από το κέντρο βάρους του έχει ως αποτέλεσμα μια περιοδική διακύμανση της διπολικής ροπής, η οποία μπορεί να αλληλεπιδράσει με την ακτινοβολία.

1.6.2.4 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) ^{157- 161}

Η φασματοσκοπία αυτή είναι ένα από τα αποτελεσματικότερα εργαλεία για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της δομής των χημικών ουσιών μεταξύ των οποίων και των μακρομορίων αφού προσδιορίζεται η στερεοχημική απεικόνιση του πολυμερούς, η γεωμετρική ισομέρεια, η δομή και η σύσταση των συμπολυμερών. Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται στο NMR είναι οι εξής πέντε: (α) η χημική μετατόπιση δ , με την οποία λαμβάνονται πληροφορίες για το χημικό περιβάλλον (γειτονικά ηλεκτρόνια και πυρήνες) μιας ουσίας, (β) οι χρόνοι εφησυχασμού ή αποκατάστασης (T_1 , T_2) όπου μας δίνει πληροφορίες για τις φυσικές ιδιότητες της ουσίας μας, (γ) η σταθερά σύζευξης (J-coupling) για την εύρεση των ευνοϊκών διαμορφώσεων των μορίων, (δ) οι συζεύξεις των πυρήνων στο χώρο, οι οποίες δίνουν πληροφορίες για τη χωρική εγγύτητα των διαφόρων πυρήνων, (ε) το βαθμιδωτό επίπεδο με βάση το οποίο μπορούν να ληφθούν πληροφορίες για τη θέση ενός μορίου. Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός είναι μια μορφή φασματοσκοπίας απορρόφησης όπου το δείγμα ευρισκόμενο με τις

προσανατολισμένες ιδιοπεριστροφές του μέσα στο μαγνητικό πεδίο, απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία σε συχνότητες που το χαρακτηρίζουν (ως συνέπεια του μαγνητικώς επαγόμενου διαχωρισμού των ενεργειακών επιπέδων των πυρήνων). Ο μέγιστος αριθμός των συνιστωσών του spin για ένα συγκεκριμένο πυρήνα, είναι ο κβαντικός αριθμός του spin I . Ο πυρήνας λοιπόν θα έχει $2I+1$ διακριτές ενεργειακές καταστάσεις οι οποίες απουσία εξωτερικού πεδίου, θα έχουν την ίδια ενέργεια. Η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των καταστάσεων υψηλής και χαμηλής ενέργειας είναι ανάλογη της συχνότητα συντονισμού ν_0 , που ισούται με τον λόγο $B_0\gamma/2\pi$, όπου γ ο γυρομαγνητικός λόγος και B_0 η ένταση του εφαρμοζόμενου πεδίου. Όταν το άτομο βρεθεί εντός του μαγνητικού πεδίου τα ηλεκτρόνιά του εκτελούν εξαναγκασμένη κίνηση γύρω από τον πυρήνα η οποία δημιουργεί ένα επαγόμενο μαγνητικό πεδίο που αντιτίθεται στο εξωτερικό και προασπίζει (προστατεύει) τον πυρήνα (φαινόμενο χημικής μετατόπισης). Η σύζευξη των περιστροφών έχει ως αποτέλεσμα την πολλαπλότητα των απορροφήσεων. Τόσο η χημική μετατόπιση, όσο και η σχάση περιστροφής, αποτελούν σημαντικά στοιχεία για την ανάλυση δομής. Πειραματικά, οι δύο αυτές επιδράσεις διακρίνονται εύκολα, επειδή οι αποστάσεις τακ κορυφών οι οποίες προκύπτουν από χημική μετατόπιση, είναι ευθέως ανάλογες προς την ένταση του πεδίου ή τη συχνότητα του ταλαντωτή.

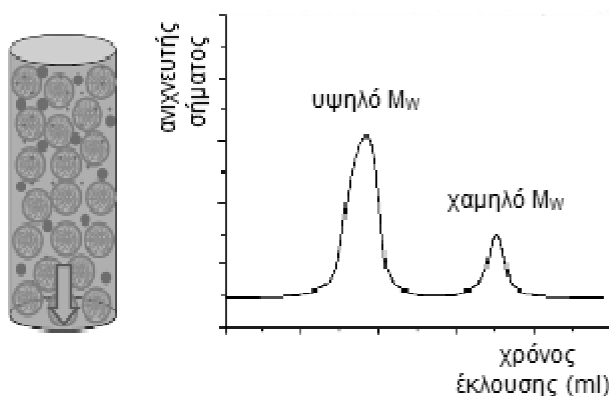
1.6.3 Χρωματογραφικές τεχνικές

1.6.3.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC) ¹⁶²

Η χρωματογραφία αυτή αποτελεί μία από τις πιο γρήγορες, διαδεδομένες και αξιόπιστες μεθόδους προσδιορισμού της καθαρότητας, των μοριακών βαρών των πολυμερών και της κατανομής τους. Ανήκοντας στο είδος της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High-performance ή high-pressure liquid chromatography, HPLC), το δείγμα μεταφέρεται από το φέροντα διαλύτη μέσα σε στήλες κατάλληλα πακεταρισμένες με ειδικό πορώδες υλικό (δίκτυωμένο πολυστυρένιο για να μην δημιουργούνται δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις) μεγάλου εύρους πόρων (500-106 Å). Μέσα στις στήλες, τα πολυμερή με το μικρότερο υδροδυναμικό όγκο διαχέονται μέσα σε περισσότερους πόρους καθυστερώντας περισσότερο από εκείνα που έχουν μεγαλύτερο μέγεθος, (αφού αδυνατούν να εισέλθουν μέσα σε όλους τους πόρους) να εξέλθουν της

στήλης και συνεπώς εκλούνται αργότερα (Εικόνα 1.21). Με αυτόν τον τρόπο (στερεοχημική παρεμπόδιση) επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των μοριακών ειδών με βάση το μέγεθός τους καθώς μόρια με διαφορετική υδροδυναμική ακτίνα θα έχουν διαφορετικούς χρόνους έκλουσης. Η ανίχνευση των εκλουόμενων μακρομορίων πραγματοποιείται με κατάλληλο ανιχνευτή που βρίσκεται στην έξοδο των στηλών. Οι πιο συνηθισμένοι ανιχνευτές βασίζονται σε μεταβολές συγκέντρωσης (δείκτη διάθλασης ή σε μεταβολές στην απορρόφηση του διαλύματος σε μήκη κύματος στην περιοχή του υπεριώδους-υπέρυθρου). Χρησιμοποιούνται και ανιχνευτές σκέδασης φωτός και ιζωδομετρικοί.

Η μέθοδος αυτή εφόσον είναι έμμεση (βασισμένη στον υδροδυναμικό όγκο και όχι στο μοριακό βάρος του πολυμερούς), απαιτείται βαθμονόμηση των στηλών, η οποία επιτυγχάνεται μετρώντας το χρόνο έκλουσης προτύπων δειγμάτων (δείγματα γνωστού μοριακού βάρους και χημικής σύστασης, στενής κατανομής μοριακών βαρών και ορισμένης αρχιτεκτονικής). Μια καμπύλη αναφοράς $\log M_w$ ως προς τον όγκο έκλουσης V_e καταγράφεται ώστε να βρεθεί το μοριακό βάρος του άγνωστου πολυμερούς από τον όγκο έκλουσης. Για να εφαρμοστεί αυτή η μέθοδος θα πρέπει το άγνωστο δείγμα να έχει την ίδια χημική σύσταση και αρχιτεκτονική με τα πρότυπα δείγματα με τα οποία έγινε η βαθμονόμηση. Στην περίπτωση των μιγμάτων ομοπολυμερών, συμπολυμερών και διακλαδισμένων ή αστεροειδών ομοπολυμερών ή συμπολυμερών απαιτείται να χρησιμοποιηθεί η παγκόσμια καμπύλη βαθμονόμησης η οποία χρησιμοποιεί το εσωτερικό ιξώδες του εκάστοτε προτύπου στο φέροντα διαλύτη και στη θερμοκρασία λειτουργίας του οργάνου της SEC ώστε να εξομοιωθούν οι διαφορετικές αρχιτεκτονικές και χημικές συστάσεις, επειδή το γινόμενο του εσωτερικού ιξώδους με το μοριακό βάρος, είναι ανάλογο του υδροδυναμικού όγκου του πολυμερούς.



1.6.4 Τεχνικές μικροσκοπίας

1.6.4.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) ^{164, 165}

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Εικόνα 1.22) είναι ένα όργανο που λειτουργεί όπως περίπου και ένα οπτικό μικροσκόπιο μόνο που χρησιμοποιεί δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας αντί για φως, για να εξετάσει αντικείμενα σε λεπτομερή κλίμακα. Τα πλεονεκτήματα της SEM σε σχέση με την οπτική μικροσκοπία έγκεινται στη μεγαλύτερη μεγέθυνση (έως 100.000x) και το μεγαλύτερο βάθος πεδίου δράσης (γι' αυτό κυρίως χρησιμοποιείται για συμπαγή δείγματα), ενώ επιτρέπεται η οπτική παρατήρηση των δειγμάτων σε κλίμακα mm έως μm .



Εικόνα 1.22: Παράδειγμα οργάνου ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης.

Στα πλεονεκτήματα επίσης, περιλαμβάνονται η πολύ απλή προετοιμασία του δείγματος και το γεγονός ότι δεν απαιτείται συλλογή πλήθους δεδομένων. Τόσο με τη μέθοδο ανακλώμενων όσο και με τη μέθοδο δευτερογενών ηλεκτρονίων προκύπτουν ευδιάκριτες εικόνες και παίρνουμε πληροφορίες οι οποίες αφορούν την τοπογραφία-μορφολογία της επιφάνειας του δείγματος, τη σύστασή του, την ηλεκτρική του αγωγιμότητα κ.λπ. Ωστόσο, στη δεύτερη μέθοδο η εικόνα χαρακτηρίζεται από τοπογραφική αντίθεση, σε αντιπαράθεση με την εικόνα της πρώτης μεθόδου όπου είναι

περισσότερο ευαίσθητη κατά την ανίχνευση ατομικής πυκνότητας και αποτελεί συνάρτηση του ατομικού αριθμού και της πυκνότητας των κόκκων του δείγματος. Η ένταση της δέσμης των ανακλώμενων ηλεκτρονίων είναι ανάλογη του ατομικού αριθμού των στοιχείων του δείγματος και της πυκνότητάς του. Αντίστοιχα με το σκοπό της παρατήρησης μπορεί να προκύψει μια μικροσκοπική εικόνα ή μια στοιχειακή κατανομή του δείγματος.

1.6.4.2 Ηλεκτρονική Μικροσκοπική Διέλευσης (Transmission Electron Microscope, TEM) ^{166, 167}

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης λειτουργεί με τις ίδιες βασικές αρχές όπως και το οπτικό μικροσκόπιο. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, όπως και στο αντίστοιχο μικροσκόπιο σάρωσης, χρησιμοποιείται δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας αντί για φως. Τα ηλεκτρόνια ως «φωτεινή πηγή» με πολύ χαμηλότερο μήκος κύματος δίνει στο TEM τη δυνατότητα ανάλυσης η οποία είναι χίλιες φορές καλύτερη από του οπτικού μικροσκοπίου. Πιο συγκεκριμένα, το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης χρησιμοποιεί δέσμη ηλεκτρονίων ομοιόμορφης πυκνότητας με την οποία ακτινοβολείται ένα λεπτό δείγμα. Η λεπτότητα αυτή απαιτείται επειδή τα ηλεκτρόνια υφίστανται ισχυρή ελαστική και μη ελαστική σκέδαση από τα άτομα του δείγματος. Οι διαστάσεις του δείγματος στο xy επίπεδο είναι συνήθως μερικά nm ενώ το πάχος φτάνει μέχρι κάτι εκατοντάδες nm ώστε να σκεδάζονται ελάχιστα τα ηλεκτρόνια. Τα τελευταία τα οποία διέρχονται από το δείγμα, υφίστανται περίθλαση σε διαφορετικές γωνίες, ανάλογα με τα κρυσταλλικά χαρακτηριστικά της κάθε περιοχής. Για παράδειγμα, μπορεί να μελετηθούν μικρές λεπτομέρειες διαφορετικών υλικών κοντά στο ατομικό επίπεδο. Η δυνατότητα της TEM για υψηλές μεγεθύνσεις την καθιστά ένα πολύτιμο εργαλείο στην επιστήμη υλικών, την ιατρική, τα βιολογικά υλικά και την έρευνα γενικότερα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Χημικά Αντιδραστήρια, παρασκευή ΗΜΡΟx και συμπλόκων τους με πρωτεΐνες και DNA

2.1.1 Χημικά Αντιδραστήρια για την υδρόλυση των βαθμωτών συμπολυμερών πολυ(2-μεθυλο-2-οξαζολίνη)s- grad- πολυ(2-φαινυλο-2-οξαζολίνη)s

Τα συμπολυμερή πολυ(2-μεθυλο-2-οξαζολίνη)s – grad -πολυ (2-φαινυλο-2-οξαζολίνη)s (ΜΡΟx) συντέθηκαν μέσω κατιονικού πολυμερισμού ανοίγματος δακτυλίου. Η αναλυτική διαδικασία περιγράφεται λεπτομερώς στην αντίστοιχη δημοσίευση ¹⁶⁸. Τα μοριακά χαρακτηριστικά των συμπολυμερών αυτών φαίνονται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1: Μοριακά χαρακτηριστικά των προδρόμων ΜΡΟx βαθμωτών συμπολυμερών.

Δείγμα	M_n^a	M_w^b	M_w/M_n^b	Σύσταση (wt%) ^a	
				MeOx	PhOx
ΜΡΟx1	4,900	5,200	1.14	72	28
ΜΡΟx2	5,100	3,200	1.15	90	10
ΜΡΟx3	4,600	3,300	1.26	61	39

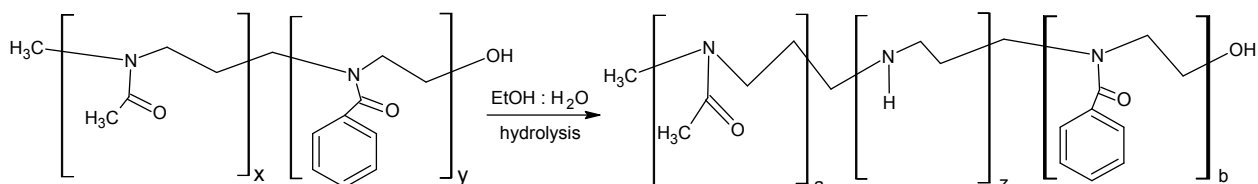
^a από ¹H NMR σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (chloroform-d, CDCl₃)

^b από SEC σε THF (με 5%v/v Et₃N)

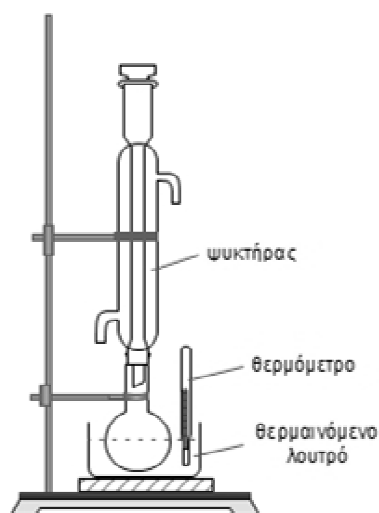
Η καθαρή αιθανόλη (ethanol, EtOH) και το υδροχλώριο (HCl 37%) ελήφθησαν από την Aldrich/ Fluka και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία.

2.1.2 Παρασκευή HMPOx βαθμωτών συμπολυμερών

Τα δείγματα HMPOx παρασκευάστηκαν με υδρόλυση των δύο βαθμωτών συμπολυμερών πολυ(2-μεθυλο-2-οξαζολίνη)- grad- πολυ(2-φαινυλο-2-οξαζολίνη) και συγκεκριμένα, τα MPOx1 και MPOx3 του Πίνακα 2.1. Αρχικώς 1g διαλύθηκε σε 16ml καθαρής EtOH με τη βοήθεια ελαφριάς ανάδευσης σε σφαιρική φιάλη των 100ml, στην οποία και παρέμεινε για 1 μέρα εκτός ψυγείου. Εν συνεχεία, στο θολό διάλυμα τοποθετήθηκαν 6.2 ml HCl 37% ώστε να υπάρχει ομογενές μίγμα διαλυτών αιθανόλης-νερού αναλογίας 80: 20 (v/ v). Η φιάλη με το διαφανές πλέον διάλυμα συνδέθηκε με ψυκτήρα και τοποθετήθηκε σε θερμαινόμενο ελαιόλουτρο. Η υδρόλυση καθώς και η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζονται στα Σχήματα 2.1 και 2.2. Η εξώθερμη αυτή αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 100°C, υπό ατμοσφαιρική πίεση με δύο διαφορετικούς χρόνους αντίδρασης (3 και 6 ώρες). Μετά το πέρας αυτού του χρόνου, το μίγμα ψύχθηκε σε λουτρό πάγου και εξουδετερώθηκε σε pH 8-9, με προσθήκη διαλύματος NaOH 10M. Τα προκύπτοντα συμπολυμερή απομονώθηκαν με έναν περιστροφικό εξατμιστήρα στους 55°C, υπό κενό και ξηράθηκαν για 2 μέρες σε φούρνο κενού. Τυχόν προσθήκη μικρής ποσότητας αιθανόλης απαιτήθηκε προκειμένου να «ξεπλυθεί» η φιάλη και να ανακτηθεί επιπλέον ποσότητα των HMPOx.



Σχήμα 2.1: Αντίδραση υδρόλυσης των βαθμωτών συμπολυμερών MPOx.



Σχήμα 2.2. Συσκευή υδρόλυσης των MPOx δειγμάτων

Τα συμπολυμερή HMPOx χαρακτηρίστηκαν τόσο από ATR-FTIR όσο και από ^1H NMR ώστε να βρεθούν οι λειτουργικές ομάδες τους και η σύστασή τους. Δευτεριωμένο νερό (D_2O), δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (chloroform-d, CDCl_3) και δευτεριωμένη μεθανόλη (methanol-d₄, MeOD ή CD_3OD) παραλήφθηκαν από την Merck, όπου και χρησιμοποιήθηκαν σε παρασκευή διαλυμάτων για ^1H NMR.

2.1.3 Παρασκευή HMPOx διαλυμάτων

Ως πρώτες ύλες για την παρασκευή των αλατούχων φωσφορικών ρυθμιστικών διαλυμάτων (phosphate buffered saline, PBS) διαλύθηκαν στερεές ταμπλέτες (που αγοράστηκαν από την Aldrich) σε κατάλληλη ποσότητα απεσταγμένου νερού (1 ταμπλέτα σε 200ml απεσταγμένου νερού). Ακετόνη ($\geq 99.9\%$) και εμβρυϊκός ορός βοοειδούς (fetal bovine serum, FBS) ελήφθησαν από την Fluka ενώ το δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (deoxyribonucleic acid, DNA), σε σκόνη με $M_w = 0.5\text{-}1 \cdot 10^5 \text{Da}$, αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich.

Παρασκευάστηκαν διαλύματα των HMPOx σε αποσταγμένο H_2O ($\text{pH} \sim 7$), σε PBS ($\text{pH} = 7,4$ και 0.154M NaCl), και σε PBS -FBS. Πιο συγκεκριμένα, η αρχική συγκέντρωση των συμπολυμερών σε νερό και PBS ήταν 10^{-2}g/ml με κανένα πρόβλημα απευθείας διαλύσεως. Κατόπιν, με βάση τα διαλύματα σε PBS, ακολούθησε η παρασκευή

διαλυμάτων PBS-FBS με αναλογίες 90/10 v/v και 10-95% v/v. Ετοιμάστηκαν συγκεντρώσεις των 10^{-3} g/ml των υδατικών HMPOx για πρόσθετες μετρήσεις.

Για τα πειράματα φθορισμού παρασκευάστηκε διάλυμα πυρενίου σε ακετόνη συγκέντρωσης 1mM. 2ml του διαλύματος αυτού προστέθηκαν σε όγκο 5ml διαλυμάτων των HMPOx σε νερό και PBS. Τα διαλύματα αυτά αφέθηκαν για 24 ώρες να ισορροπήσουν και εν συνεχεία να έρθουν σε επαφή με τον αέρα για 1 ώρα ώστε να εξατμισθεί η ακετόνη. Η συγκέντρωση των HMPOx στα διαλύματα αυτά ήταν $0.5 \cdot 10^{-2}$ g/ml. Το μήκος κύματος διέγερσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν $\lambda = 335$ nm και η εκπομπή των φασμάτων καταγράφηκε στην περιοχή 350-500 nm, με αύξηση του 1nm, χρησιμοποιώντας χρόνο ολοκλήρωσης 0.5 s.

Σύμπλοκα HMPOx/ DNA παρασκευάστηκαν με ανάμιξη διαλυμάτων HMPOx και DNA σε PBS με διαφορετικές αναλογίες μάζας των δύο συστατικών. Αρχικά κρατήθηκε σταθερή συγκέντρωση DNA 10^{-3} g/ml, ενώ η συγκέντρωση του HMPOx σε διαλύματα PBS κυμάνθηκε από $3.0 \cdot 10^{-5}$ g/ml έως $5.0 \cdot 10^{-6}$ g/ml. Ακολούθησε η παρασκευή μικτών διαλυμάτων με σταθερή συγκέντρωση του HMPOx1 ($C = 5 \cdot 10^{-4}$ g/ml) σε PBS, και μεταβαλλόμενη τη συγκέντρωση του DNA από $1.0 \cdot 10^{-5}$ g/ml έως $1.0 \cdot 10^{-4}$ g/ml.

Για τις μετρήσεις SEM, η συγκέντρωση των πολυμερών ήταν 10^{-4} g/ml και εκείνη του DNA $3.3 \cdot 10^{-4}$ g/ml.

2.2 Χημικά Αντιδραστήρια, Παρασκευή QIm και συμπλόκων τους με πρωτεΐνες και DNA

2.2.1 Χημικά Αντιδραστήρια για την παρασκευή τεταρτοταγών πολυμερών ιμιδαζολίου βασισμένων σε πολυ(χλωρομεθυλο στυρένιο) (poly(chloromethyl styrene), PCMS)

Ως πρόδρομες ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν ήδη υπάρχοντα πολυμερή: ομοπολυμερές PCMS, συμπολυμερές κατά συστάδες πολυ(χλωρομεθυλο στυρενίου) και πολυ(στυρενίου) (poly(chloromethyl styrene)-block-poly(styrene), PCMS-b-PS) καθώς και τυχαίο συμπολυμερές PCMS-co-PS. Η σύνθεσή τους είχε πραγματοποιηθεί μέσω ελεγχόμενου ριζικού πολυμερισμού μεσολάβησης νιτροξειδίου (nitroxide mediated controlled radical polymerization) και οι διαδικασίες παρασκευής τους περιγράφονται

λεπτομερώς στην αντίστοιχη δημοσίευση ¹⁶⁹. Περιληπτικώς τα μοριακά χαρακτηριστικά αναγράφονται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2: Μοριακά χαρακτηριστικά των τριών προδρόμων πολυμερών που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση.

Δείγμα	M_w^α (10⁴ g/mol)	I^α	X_{Cl}^β	%PS^β
PCMS	1.1	1.35	72	-
PCMS-b-PS	1.65	1.14	12	89
PS-co-PCMS	1.0	1.28	30	54

^α από SEC σε THF/5%v/v Et₃N

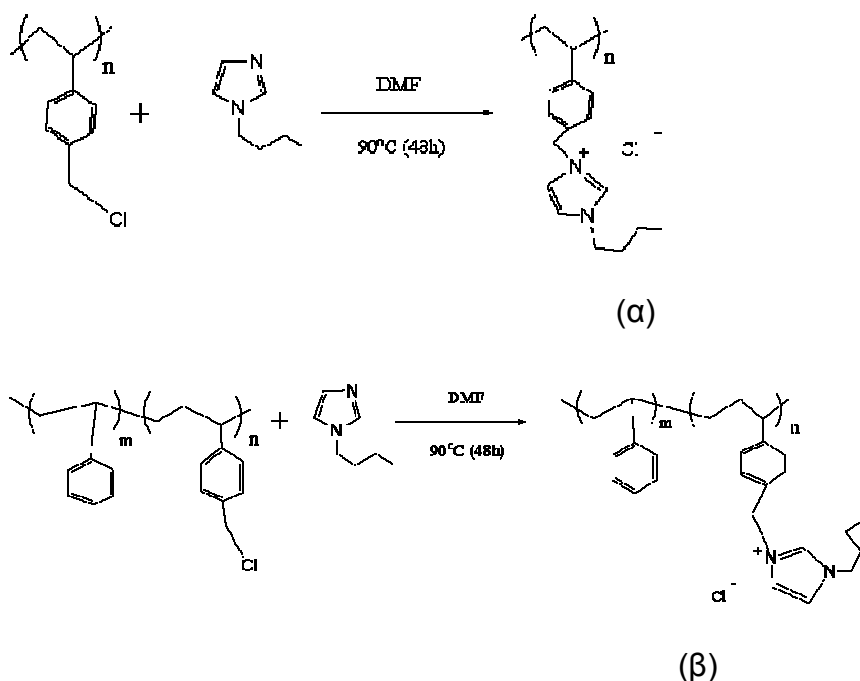
^β από ¹H NMR σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (chloroform-d, CDCl₃)

Διμέθυλο φορμαμίδιο (dimethyl formamide, DMF) αγοράστηκε από την Merck ενώ η 1-βουτυλιμιδαζόλη (1-butylimidazole, NBIZ) και ο διαιθυλαιθέρας (diethyl ether, DEE) αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich. Όλα τα χημικά χρησιμοποιήθηκαν όπως ελήφθησαν, εκτός από το DMF το οποίο ξηράνθηκε με τη χρήση μοριακών κοσκίνων (molecular sieves).

2.2.2 Σύνθεση τεταρτοταγών πολυμερών ιμιδαζολίου βασισμένων σε πολυ (χλωρομεθυλο στυρένιο)

Σε κάθε αντίδραση χημικής μετατροπής, 0.5 g ενός από τα τρία πολυμερή του Πίνακα 2.2, αντέδρασαν με ισοδύναμη ποσότητα (1.25 και 2.5 φορές ως προς τα -Cl) NBIZ σε 2.4ml DMF υπό ανάδευση. Οι αντιδράσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν υπό ατμόσφαιρα αζώτου, στους 90°C για 48 ώρες. Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε είναι αντίστοιχη με το Σχήμα 2.2, έχοντας bubbler στο άνω μέρος ώστε να ελέγχεται η ποσότητα του εισερχομένου αερίου αζώτου. Η εισαγωγή του στη στήλη θεωρήθηκε απαραίτητη ώστε να αποφευχθούν τυχόν οξειδώσεις. Τα πέντε προκύπτοντα τεταρτοταγή συμπολυμερή ιμιδαζολίου (QIm) απομονώθηκαν με καταβύθιση σε ψυχρό διαιθυλαιθέρα. Οι

αντιδράσεις παρασκευής τεταρτοταγών πολυμερών ιμιδαζολίου αναπαρίστανται σχηματικά στο Σχήμα 2.3(α) και 2.3(β).



Σχήμα 2.3: Αντίδραση παρασκευής τεταρτοταγών πολυμερών ιμιδαζολίου (α) των QIm-PCMS ομοπολυμερών, (β) των τυχαίων συμπολυμερών QIm-PS-co-PCMS ή/ και των συμπολυμερών κατά συστάδες QIm-PS-b-PCMS.

Τα QIm προϊόντα χαρακτηρίστηκαν τόσο από ATR-FTIR όσο και από ^1H NMR ώστε να βρεθούν οι λειτουργικές ομάδες τους και η σύστασή τους. Δευτεριωμένο νερό (D_2O), δευτεριωμένη μεθανόλη (methanol- d_4 , MeOD ή CD_3OD) και διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide- d_6 , DMSO- d_6) παραλήφθηκαν από την Merck, όπου και χρησιμοποιήθηκαν σε παρασκευή διαλυμάτων για ^1H NMR.

2.2.3 Παρασκευή QIm διαλυμάτων

Τετραϋδροφουράνιο (tetrahydrofuran, THF), χλωριούχο νάτριο (sodium chloride, $\geq 99.0\%$) και το δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ, σε σκόνη με $M_w = 0.5 \cdot 10^5 \text{ Da}$ αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich. Ως άλλες πρώτες ύλες για την παρασκευή των αλατούχων φωσφορικών ρυθμιστικών διαλυμάτων (PBS) διαλύθηκαν στερεές ταμπλέτες (που αγοράστηκαν από την ίδια εταιρεία) σε κατάλληλη ποσότητα απεσταγμένου νερού (1 ταμπλέτα σε 200ml απεσταγμένου νερού). Εμβρυϊκός ορός βοοειδούς (FBS) παραλήφθηκε από την Fluka.

Τα QIm δοκιμάστηκαν εάν μπορούν να διαλυθούν σε απεσταγμένο νερό απευθείας. Τελικώς επειδή τα συμπολυμερή QIm-PCMS-b-PS και QIm-PS-co-PCMS δεν μπορούσαν να διαλυθούν κατευθείαν σε νερό, διαλύθηκαν πρώτα σε THF. Το πρωτόκολλο για την παρασκευή των υδατικών διαλυμάτων των τεταρτοταγών προϊόντων, ήταν το εξής: πρώτα διαλύθηκαν (0.01g) σε 3ml THF και στη συνέχεια προστέθηκαν τα διαλύματα THF αυτά σε 10ml απεσταγμένου ύδατος γρήγορα υπό έντονη ανάδευση. Μετά την εξάτμιση του THF σε θερμοκρασία 60°C, η τελική συγκέντρωση του πολυμερούς στα υδατικά διαλύματα ήταν στα 10^{-3} g/ml.

Τα υδατικά πλέον διαλύματα αφέθηκαν για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να ισορροπήσουν πριν τον περαιτέρω χαρακτηρισμό τους. Βέβαια, τα ομοπολυμερή QIm-PCMS που διαλύθηκαν κατευθείαν σε νερό με αρχική συγκέντρωση 10^{-2} g/ml χρησιμοποιήθηκαν για πρόσθετα πειράματα και σύγκριση με τα υπόλοιπα αποτελέσματα.

Μια παράμετρος που μεταβλήθηκε στα παραπάνω υδατικά διαλύματα ήταν η ιοντική ισχύς και η μεταβολή της επιτεύχθηκε με την προσθήκη των επιθυμητών ποσοτήτων NaCl (από 0 έως 0.5M). Τα υδατικά διαλύματα των QIm αραιώθηκαν με απεσταγμένο νερό, για να παρασκευαστούν διαλύματα με συγκεντρώσεις από 10^{-4} g/ml έως 10^{-3} g/ml. Επιπλέον, η θερμοευαισθησία των διαλυμάτων εξετάστηκε αυξάνοντας τη θερμοκρασία σταδιακά από τη θερμοκρασία δωματίου (25°C) στους 55°C μέσα στην κυψελίδα του φωτομέτρου σκέδασης φωτός.

Διαλύματα των QIm σε PBS (pH=7.4 και 0.154M NaCl) παρασκευάστηκαν σύμφωνα με το προαναφερθέν πρωτόκολλο (προσθήκη σε THF πρώτα), χρησιμοποιώντας PBS αντί νερό, προκειμένου να επιτευχθεί μια τελική συγκέντρωση 10^{-3} g/ml.

Όσον αφορά τα φάσματα φθορισμού, το μήκος κύματος διέγερσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν $\lambda = 270$ nm και η εκπομπή των φασμάτων καταγράφηκε στην περιοχή 290-520 nm, με αύξηση του 1nm, χρησιμοποιώντας χρόνο ολοκλήρωσης 0.1s. Οι μετρήσεις των UV-Vis-NIR εκτελέστηκαν στην περιοχή 200-600nm σε θερμοκρασία δωματίου. Τα υδατικά διαλύματα των QIm πολυμερών που μελετήθηκαν τόσο με φθορισμομετρία όσο και με UV-Vis φασματομετρία είχαν συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-4}$ g/ml και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις αλλάζοντας την ιοντική ισχύ (στην περιοχή 0- 0.5M NaCl).

Για τα πειράματα συμπλοκοποίησης των QIm πολυμερών με τις πρωτεΐνες του FBS και με το DNA χρησιμοποιήθηκαν τα ανωτέρω PBS διαλύματα των πολυμερών. Για τα πειράματα με FBS, η τελική συγκέντρωση του QIm σε PBS-FBS (90/10 %v/v) διαλύματα ήταν $5 \cdot 10^{-5}$ g/ml. Για τα πειράματα με το DNA, η συγκέντρωση του QIm (με το

υψηλότερο επί τοις εκατό ποσοστό % NBIZ) σε PBS κρατήθηκε σταθερή και ίση με $5 \cdot 10^{-4}$ g/ml, ενώ η συγκέντρωση του DNA κυμάνθηκε από $1 \cdot 10^{-6}$ g/ml έως $1 \cdot 10^{-4}$ g/ml. Δηλαδή για την παρασκευή διαλυμάτων με σύμπλοκα QIm με DNA χρησιμοποιήθηκαν τα αρχικά διαλύματα QIm (10^{-3} g/ml) και DNA (10^{-3} g /ml) σε PBS.

2.3 Χημικά Αντιδραστήρια, Παρασκευή PEG-b-PPhOx και συμπλόκων τους με τις πρωτεΐνες του FBS

2.3.1 Αντιδραστήρια σύνθεσης σειράς PEG-b-PPhOx

Τοσυλικός μεθυλαιθέρας πολυ(αιθυλενογλυκόλης) (poly(ethylene glycol) methyl ether tosylate, mPEGtos), με μοριακό βάρος $M_n=5000$ g/mol, βουτυρονιτρίλιο (butyronitrile, BCN, $\geq 99.5\%$) και 2-φαινυλο-2-οξαζολίνη (2-phenyl-2-oxazoline, 99%) αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich Chemical Company, ενώ το εξάνιο (hexane, $\geq 99.0\%$) παραλήφθηκε από την Fluka. Επίσης, τολουόλιο (toluene, $\geq 99.5\%$) και υδρίδιο του ασβεστίου (95%) ελήφθησαν από την Fluka. Βέβαια, ο διαλύτης, ο μακροαπαρχητής και το μονομερές απαιτήθηκε να καθαριστούν (όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 2.3.2) πριν τη σύνθεση των PEG-b-PPhOx.

2.3.2 Καθαρισμός του διαλύτη, του μακροαπαρχητή και του μονομερούς

Ο διαλύτης BCN ξηράνθηκε με μοριακά κόσκινα 3Å. Πριν από κάθε αντίδραση, 0.5g του απαρχητή (mPEGtos) διαλύονταν με 4ml τολουόλιο σε σφαιρική φιάλη, χρησιμοποιώντας rotor evaporator και στη συνέχεια το διαφανές διάλυμα που προέκυπτε ξηράνθηκε στη γραμμή κενού. Από την άλλη μεριά, το μονομερές PhOx αναδεύτηκε σε μικρή ποσότητα υδριδίου του ασβεστίου CaH_2 και απαερώθηκε ώστε να επιτευχθεί αφυδάτωση του μονομερούς. Για περαιτέρω καθαρισμό, το PhOx αποστάχθηκε δύο φορές υπό κενό και αποθηκεύτηκε στους -10°C υπό ατμόσφαιρα αζώτου μέχρι τη χρήση του.

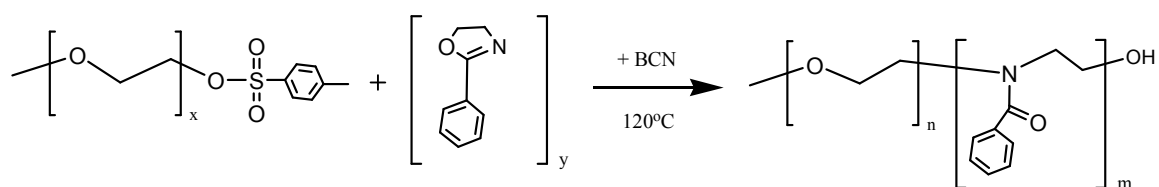
2.3.3 Σύνθεση συμπολυμερών PEG-b-PPhOx

Η διαδικασία πολυμερισμού ανοίγματος δακτυλίου χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των συμπολυμερών κατά συστάδες PEG-b-PPhOx. 0.5 g mPEGtos αναμίχθηκαν με

κατάλληλη ποσότητα (4 ή 2ml) βουτυρονιτριλίου (BCN) σε σφαιρική φιάλη υπό τη βοήθεια ανάδευσης. Ακολούθησε η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας του μονομερούς PhOx (1g, 0.25 g). Το μίγμα της αντίδρασης μεταφέρθηκε σε σωλήνα, όπου αφού σφραγίστηκε με ένα ελαστικό διάφραγμα, απαερώθηκε με αέριο άζωτο. Σε όλες τις αντιδράσεις για τη σύνθεση της PEG-b-PPhOx, το μίγμα αναδευόταν σε θερμοκρασία 120°C υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Η διάρκεια των πολυμερισμών αυτών ήταν 24 ώρες για 0.25g PhOx, ενώ για 1g PhOx ο χρόνος αντίδρασης ήταν 24 ώρες και 72 ώρες όταν ο διαλύτης ήταν 2 και 4 ml, αντιστοίχως. Μετά τη μείωση της θερμοκρασίας στους 25°C, ο τερματισμός του πολυμερισμού ανοίγματος δακτυλίου πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 100ml απαερωμένου απεσταγμένου νερού με σύριγγα στο σωλήνα. Αφού το μίγμα καταβυθίστηκε σε εξάνιο, τα συμπολυμερή PEG-b-PPhOx ξηράνθηκαν υπό κενό για 24 ώρες. Οι ποσότητες και οι συνθήκες της σύνθεσής τους συνοψίζονται στον Πίνακα 2.3 και η αντίδραση πολυμερισμού στο Σχήμα 2.4.

Πίνακας 2.3: Ποσότητες και συνθήκες για τη σύνθεση των συμπολυμερών κατά συστάδες PEG-b-PPhOx.

Δείγμα	Ποσότητες – Συνθήκες αντίδρασης			
	PEG (g)	PhOx (g)	BCN (ml)	t_{polymeriz.} (h)
PEG-b-PPhOx1	0.5	0.25	4	24
PEG-b-PPhOx2	0.5	1	2	24
PEG-b-PPhOx3	0.5	1	4	72



Σχήμα 2.4: Αντίδραση ανοίγματος δακτυλίου για την παραγωγή PEG-b-PPhOx.

Επιπλέον αντιδράσεις πολυμερισμού PEG-b-PPhOx υλοποιήθηκαν με μεταβολή των ποσοτήτων (συγκέντρωση του μονομερούς, μακροαπαρχητή και διαλύτη) και των

συνθηκών της αντίδρασης (διάρκεια και θερμοκρασία πολυμερισμού), όπως αυτές καταγράφονται στον Πίνακα 2.4.

Πίνακας 2.4: Ποσότητες και συνθήκες πολυμερισμού των PEG-b-PPhOx – Πρόσθετα πειράματα.

Δείγμα	Ποσότητες – Συνθήκες αντίδρασης				
	PEG (g)	PhOx (g)	BCN (ml)	T (°C)	Χρόνος αντίδρασης, t _r (h)
PEG-b-PPhOx4	0.5	1	4	140	24
PEG-b-PPhOx5	0.5	0.5	4	120	24
PEG-b-PPhOx6	0.5	0.5	4	120	3
PEG-b-PPhOx7	0.5	0.5	2	140	24

Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (chloroform-d, CDCl₃) και τριεθυλαμίνη (triethylamine, Et₃N) παραλήφθηκαν από την Merck, ενώ τετραϋδροφουράνιο (THF, ≥99.9%) ελήφθη από την Fluka. Τα μοριακά βάρη (M_n, M_w) των συμπολυμερών PEG-b-PPhOx προσδιορίστηκαν από ¹H NMR και SEC. Η σύσταση και απόδοση του πολυμερισμού βρέθηκαν με την τεχνική ¹H NMR ενώ οι λειτουργικές χημικές ομάδες πιστοποιήθηκαν και από φασματοσκοπία ATR-FTIR.

2.3.4 Παρασκευή διαλυμάτων PEG-b-PPhOx

Ακετόνη (≥99.9%) και πρωτεΐνες εμβρυϊκού ορού βοοειδούς (FBS) ελήφθησαν από την Fluka.

Τα συμπολυμερή PEG-b-PPhOx ήταν άμεσα διαλυτά στο νερό. Παρασκευάστηκαν λοιπόν, σε pH~ 7, τα υδατικά διαλύματά τους με αρχική συγκέντρωση C= 10⁻³g/ml. Τα υδατικά διαλύματα χαρακτηρίστηκαν με τεχνικές σκέδασης του φωτός και μελετήθηκαν ως συνάρτηση της θερμοκρασίας και του χρόνου ώστε να ελεγχθεί η σταθερότητα των

δομών. Επιπλέον πειράματα διεξήχθησαν για διαφορετική συγκέντρωση και μη φιλτραρισμένα υδατικά διαλύματα PEG-b-PPhOx.

Όπως στα πειράματα φθορισμού των HMPOx παρασκευάστηκε αρχικό διάλυμα πυρενίου σε ακετόνη συγκέντρωσης 1mM. Προϋπολογισμένοι όγκοι 2μl του διαλύματος αυτού προστέθηκαν σε όγκο διαλυμάτων των αρχικών υδατικών PEG-b-PPhOx. Τα διαλύματα αυτά αφέθηκαν για 24 ώρες να ισορροπήσουν και εν συνεχεία ήρθαν σε επαφή με τον αέρα για 1 ώρα ώστε να εξατμισθεί η ακετόνη. Η συγκέντρωση των PEG-b-PPhOx στα διαλύματα αυτά ήταν $7.5 \cdot 10^{-4}$ g/ml ενώ του πυρενίου (Py) είναι 0.4μM. Το μήκος κύματος διέγερσης που χρησιμοποιήθηκε στο φθορισμό ήταν $\lambda = 335$ nm και η εκπομπή των φασμάτων καταγράφηκε στην περιοχή 350- 500 nm, με αύξηση του 1nm, χρησιμοποιώντας χρόνο ολοκλήρωσης 0.1s. Τα διαλύματα αυτά δοκιμάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και σε 50°C.

Τα αρχικά υδατικά διαλύματα αραιώθηκαν σε άλλα βιολογικά μέσα, όπως PBS, με τελική συγκέντρωση $2 \cdot 10^{-4}$ g/ml. Τα διαλύματα αυτά των PBS αναμίχθηκαν με FBS, ώστε να υπάρξει αναλογία PBS-FBS (90/10% v/v) έχοντας συγκέντρωση των συμπολυμερών 10^{-5} g/ml. Ως πρόσθετα πειράματα παρασκευάστηκαν διαλύματα των PEG-b-PPhOx πολυμερών σε νερό χρησιμοποιώντας το ακόλουθο πρωτόκολλο παρασκευής: 0.01 g σκόνης PEG-b-PPhOx διαλύθηκε σε 1ml THF και το διάλυμα προστέθηκε σε 10 ml αποσταγμένου νερού (υπό έντονη ανάδευση). Με ήπια θέρμανση (σε 60°C), το THF απομακρύνθηκε και τα υδατικά αυτά διαλύματα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για μία μέρα ώστε να χρησιμοποιηθούν σε μετρήσεις LS.

2.4 Υβριδικά νανοσυστήματα με σύμπλοκα νικελίου και έπειτα αυτών με τις πρωτεΐνες του FBS

2.4.1 Πρώτες ύλες για την παρασκευή νανοϋβριδικών συστημάτων με σύμπλοκα νικελίου

Για την παρασκευή τέτοιων συστημάτων, από τη μεριά των πολυμερών χρησιμοποιήθηκαν τα συμπολυμερή κατά συστάδες PEG-b-PPhOx και PI-b-PEO. Το μεν πρώτο ήταν ένα από τα παραχθέντα συμπολυμερή με κατιοντικό πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου του υποκεφαλαίου 2.3.3 (το PEG-b-PPhOx3), το δε δεύτερο PI-b-PEO είχε συντεθεί με ανιοντικό πολυμερισμό με υψηλού κενού τεχνικές¹⁷⁰. Βέβαια, το PI-b-PEO είναι το γνωστό συμπολυμερές κατά συστάδες πολυ(ισοπρενίου) και

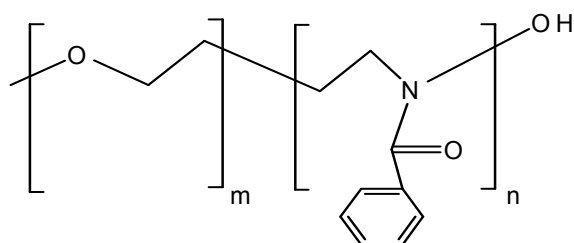
πολυ(αιθυλενοξειδίου) (poly(isoprene-*b*-ethylene oxide)). Στον Πίνακα 2.5 παρουσιάζονται τα μοριακά χαρακτηριστικά των δύο αυτών συμπολυμερών και στο Σχήμα 2.5 αποτυπώνονται οι χημικές τους δομές.

Πίνακας 2.5: Μοριακά χαρακτηριστικά των χρησιμοποιηθέντων στην υποενότητα αυτή συμπολυμερών κατά συστάδες.

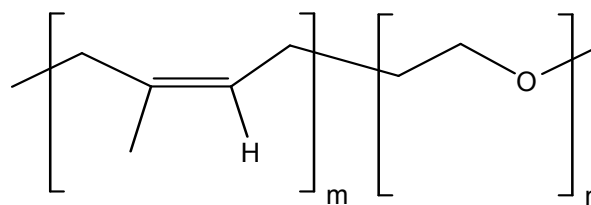
Δείγμα	Mn ^α (10 ³ g/mol)	Mw ^β (10 ³ g/mol)	PDI ^β	%wt (PEG ή PEO) ^α
PEG- <i>b</i> -PPhOx	6.2	7.4	1.03	80
PI- <i>b</i> -PEG	16.2	17.5	1.08	65

^α από ¹H NMR σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (chloroform-*d*, CDCl₃)

^β από SEC σε THF/5%v/v Et₃N



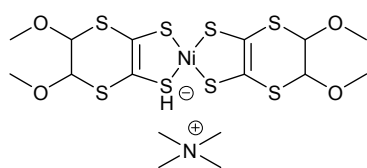
(α)



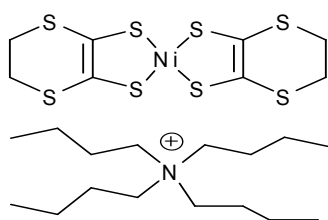
(β)

Σχήμα 2.5: Χημική δομή του συμπολυμερούς κατά συστάδες (α) PEG-*b*-PPhOx και (β) PI-*b*-PEO.

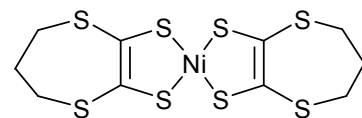
Από την άλλη μεριά, τα Ni 1,2-DT σύμπλοκα που είχαν συντεθεί από τον Δρ. Μούσδη και τους συνεργάτες του ¹⁰⁷ ¹⁰⁶. Πιο συγκεκριμένα, τα σύμπλοκα του νικελίου που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν τα εξής: (Me₄)N[Ni{dmeodddt}] ¹¹⁰, (Bu₄)N[Ni(dddtt)₂] ⁸⁹ και το ουδέτερο [Ni(pddt)₂] ¹¹⁰ όπου dmeodddt=5,6-dimethoxy-5,6-dihydro-1,4-dithiine-2,3-dithiolate, dddt=5,6-dihydro-1,4-dithiine-2,3-dithiolene and pddt=1,3-propanediylldithioethylene-1,2-dithiolene. Οι χημικοί τους τύποι παρουσιάζονται στο Σχήμα 2.6.



(α)



(β)



(γ)

Σχήμα 2.6: Χημική δομή του συμπλόκου νικελίου (α) τετραμεθυλαμμωνίου $(\text{Me}_4)\text{N}[\text{Ni}(\text{dmeoddtd})]=\text{Bis}[5,6\text{-dimethoxy-5,6-dihydro-1,4-dithiine-2,3-dithiolate}]$ Nickel tetramethylammonium, (β) τετραβουτυλαμμωνίου $(\text{Bu}_4)\text{N}[\text{Ni}(\text{dddt})_2]=\text{Tetrabutylammonium bis}(5,6\text{-dihydro-1,4-dithiine-2,3-dithiole})$ nickel και (γ) $[\text{Ni}(\text{pddt})_2]=\text{Bis}(6,7\text{-dihydro-5H-[1,4] dithiepine-2,3-dithiole})$ nickel.

2.4.2 Παρασκευή υβριδικών διαλυμάτων με σύμπλοκα νικελίου

Το τετραϋδροφουράνιο, οι ταμπλέτες PBS και ο εμβρυϊκός ορός βοοειδούς αγοράστηκαν και προετοιμάστηκαν, όπως σε προηγούμενες υποενότητες.

Τα δισυσταδικά συμπολυμερή του 2.4.1 υποκεφαλαίου καθώς και τα σύμπλοκα νικελίου 1, 2– διθειολενίου (του ίδιου υποκεφαλαίου) αρχικώς διαλύθηκαν σε έναν κοινό καλό διαλύτη (THF). Εκτενέστερα, 10mg των συμπολυμερών αυτών διαλύθηκαν σε 1 ml THF υπό ανάδευση και προστέθηκε προϋπολογισμένη ποσότητα Ni 1,2-DT συμπλόκων δίνοντας THF διαλύματα με διαφορετική αναλογία μάζας των συστατικών τους. Αυτά τα διαλύματα THF προστέθηκαν σε 10ml απεσταγμένου νερού (pH~ 7) υπό έντονη ανάδευση. Ακολούθησε η εξάτμιση του διαλύτη THF με τη θέρμανση των διαλυμάτων στους 60°C και τα πλέον υδατικά διαλύματα είχαν $C_{\text{polymer}} = 10^{-3}\text{g/ml}$ (αρχικά διαλύματα). Οι αναλογίες (mg συμπολυμερούς/ mg Νί συμπλοκών) των υδατικών διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν ήταν (10/1), (10/2) και (10/4).

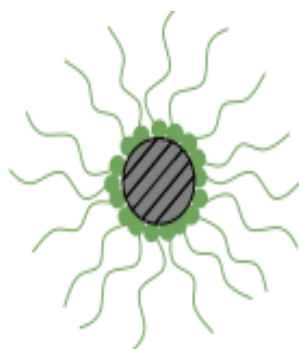
Τα διαλύματα χαρακτηρίστηκαν από (στατική και δυναμική) σκέδαση φωτός και φασματοσκοπία UV-vis-NIR. Τα σταθερά υβριδικά νανοσυστήματα σε νερό ελέγχθηκαν επίσης και σε άλλα βιολογικά υγρά. Ως εκ τούτου, τα υδατικά διαλύματα αραιώθηκαν σε PBS και PBS-FBS (90/10 v/v) διαλύματα. Η τελική συγκέντρωση των πολυμερών στο PBS και PBS-FBS διαλυμάτων ήταν 0.2 και 0.01 mg/ml αντίστοιχα.

2.5 Υβριδικά νανοσυστήματα με μαγνητικά σωματίδια καθώς και των συμπλόκων τους με τις πρωτεΐνες του FBS

2.5.1 Πρώτες ύλες για την παρασκευή νανουβριδικών συστημάτων με μαγνητικά σωματίδια

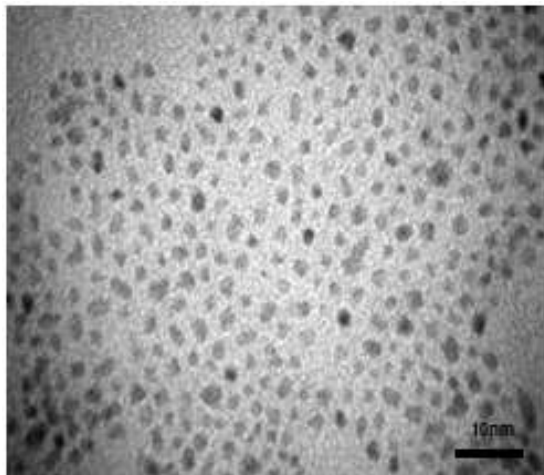
Για την παρασκευή τέτοιων συστημάτων, όσον αφορά τα πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν τα συμπολυμερή κατά συστάδες PEG-b-PPhOx και PI-b-PEO. Τα μοριακά χαρακτηριστικά των δύο αυτών συμπολυμερών αναγράφονται στην αντίστοιχη 2.4.1 υποενότητα.

Από τη μεριά των μαγνητικών νανოსωματιδίων, χρησιμοποιήθηκαν αυτά από γ -Fe₂O₃ (με ελαϊκό οξύ στο εξωτερικό τους περίβλημα, Σχήμα 2.7) που είχαν συντεθεί από τον κ. Α. Μπακανδρίτσο και την ομάδα του στο Τμήμα Επιστήμης Υλικών του Παν. Πατρών. Επίσης, τα σωματίδια αυτά χαρακτηρίστηκαν με θερμοσταθμική ανάλυση (thermogravimetric analysis, TGA) και ηλεκτρονική μικροσκοπία διαπερατότητας (transmission electron microscopy, TEM).



Σχήμα 2.7: Σχηματική απεικόνιση των μαγνητικών NPs με γ -Fe₂O₃ στον πυρήνα και ελαϊκό οξύ ως κορώνα.

Τα δείγματα MagnNPs που χρησιμοποιήθηκαν, αποτελούντο από: 73% wt διχλωρομεθάνιο (dichloromethane, DCM), 26% wt ελαϊκό οξύ (oleic acid) και 1%wt γ - Fe_2O_3 . Τα δεδομένα TEM έδειξαν ακτίνα σωματιδίων 2nm (Σχήμα 2.8).



Σχήμα 2.8: TEM εικόνα των δειγμάτων MagnNPs.

2.5.2 Παρασκευή υβριδικών διαλυμάτων με μαγνητικά σωματίδια

Τετραϋδροφουράνιο (THF, $\geq 99.9\%$) αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich ενώ για την παρασκευή των αλατούχων φωσφορικών ρυθμιστικών διαλυμάτων (PBS) διαλύθηκαν στερεές ταμπλέτες (που αγοράστηκαν από την ίδια εταιρεία) σε κατάλληλη ποσότητα απεσταγμένου νερού (1 ταμπλέτα σε 200ml απεσταγμένου νερού). Εμβρυϊκός ορός βοοειδούς (FBS) λήφθηκε από την Fluka.

Αρχικά, σε 10mg των συμπολυμερών κατά συστάδες του 2.4.1 υποκεφαλαίου προστέθηκε προϋπολογισμένη ποσότητα (0.1-0.5 mg) των μαγνητικών σωματιδίων του 2.5.1 υποκεφαλαίου διαλύθηκε σε 1 ml THF υπό ανάδευση. Αυτά τα διαλύματα THF προστέθηκαν σε 10ml απεσταγμένου νερού ($\text{pH} \sim 7$) υπό έντονη ανάδευση, όπου και ακολούθησε η εξάτμιση του διαλύτη THF με θέρμανση στους 60°C . Με αυτόν τον τρόπο δημιουργήθηκαν τα αρχικά υδατικά διαλύματα με $C_{\text{polymer}} = 10^{-3}\text{g/ml}$ και διαφορετική αναλογία μάζας των συστατικών τους. Οι αναλογίες (mg συμπολυμερούς/ mg MagnNPs) των υδατικών διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν ήταν (10/0.1), (10/0.2) και (10/0.5).

Ανά δύο μέρες, τα υδατικά διαλύματα χαρακτηρίστηκαν από (στατική και δυναμική) σκέδαση φωτός και φασματοσκοπία UV-vis. Τα σταθερά υβριδικά νανοσυστήματα σε

νερό ελέγχθηκαν επίσης και σε άλλα βιολογικά υγρά. Ως εκ τούτου, τα υδατικά διαλύματα αραιώθηκαν σε PBS και PBS-FBS (90/10 v/v) διαλύματα. Η τελική συγκέντρωση των πολυμερών στο PBS και PBS-FBS διαλυμάτων ήταν 0.2 και 0.01 mg/ml αντίστοιχα.

Τα σταθερά υδατικά διαλύματα, ξαναπαράχθηκαν με το ίδιο πρωτόκολλο όπως πριν με τη διαφορά ότι διαλύθηκε στα THF διαλύματα και (1 και 2 mg) κατάλληλης ποσότητας φαρμάκου ινδομεθακίνης. 1ml των διαλυμάτων αυτών αραιώθηκαν σε PBS και διαλύθηκαν σε FBS. Επιτεύχθηκε η τελική συγκέντρωση των πολυμερών στο PBS και PBS-FBS διαλυμάτων η οποία ήταν 0.2 και 0.01 mg/ml αντίστοιχα. Τεχνικές όπως το LS, UV-Vis και TEM χρησιμοποιήθηκαν και για το χαρακτηρισμό των διαλυμάτων με την ινδομεθακίνη.

2.6 Πειραματικές διατάξεις για χαρακτηρισμό πολυμερών και υβριδικών συστημάτων

Κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής συντέθηκε μια πλειάδα αμφίφιλων συμπολυμερών. Σε όλες τις αντιδράσεις πολυμερισμού, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική υψηλού κενού και πραγματοποιήθηκε καθαρισμός μονομερών, απαρχητών και διαλυτών.

Η γραμμή υψηλού κενού αποτελείται από γυάλινους σωλήνες (Pyrex), στρόφιγγες υψηλού κενού (Rotaflon HP 10mm, 10^{-8} mmHg), μία αντλία ελαίου, μία αντλία διαχύσεως υδραργύρου και δύο παγίδες υγρού αζώτου (που προστατεύουν τις αντλίες από πτητικά συστατικά). Με την τεχνική υψηλού κενού επιτυγχάνεται σχεδόν πλήρως η απομάκρυνση διαφόρων χημικών ουσιών από το σύστημα, όπως δραστικές προσμίξεις στα αντιδραστήρια, υγρασία, ατμοσφαιρικό οξυγόνο κ.λπ.

Ο καθαρισμός των χημικών ουσιών (π.χ. των μονομερών) πριν τη χρήση τους μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους όπως με πέρασμά τους από στήλη βασικής αλουμίνας, κράτηση υπό υψηλό κενό (απαερώσεις), με απόσταξη και με την παρουσία υδριδίου του ασβεστίου (CaH_2) ώστε να απομακρυνθεί και το τελευταίο ίχνος υγρασίας και όξινων προσμίξεων. Για παράδειγμα, οι αποστάξεις υψηλού κενού πραγματοποιούνται με ελαφριά θέρμανση του προς απόσταξη υγρού και παράλληλη ψύξη του υποδοχέα με υγρό άζωτο.

Στην εργασία αυτή, λόγω των διαφορετικών συστημάτων σύνθεσης, τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαφορετικά. Κάποιες χρησιμοποιηθέντες ενώσεις (π.χ. πολυμερή, μαγνητικά σωματίδια, σωματίδια νικελίου) δεν έχουν αγοραστεί από εταιρείες αλλά έχουν συντεθεί από συνεργάτες- ερευνητές. Στην υποενότητα αυτή, καταγράφονται όλα τα χημικά υλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά τη σύνθεση των νανοσυστημάτων μας.

2.6.1 Πειραματική διάταξη φασματοσκοπικών τεχνικών

2.6.1.1 Πειραματική διάταξη φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πραγματοποιήθηκε σε όργανο τύπου AC Varian 300 MHz στους 30°C. Οι κορυφές των φασμάτων από τον καταγραφέα αντιστοιχούν σε πρωτόνια (^1H). Από την ολοκλήρωση αυτών των κορυφών υπολογίζεται το ποσοστό του κάθε συμπολυμερούς. Για τις μετρήσεις το διαλυμένο συμπολυμερές συγκέντρωσης $2.5 \cdot 10^{-2}$ g/ml, αφού αφέθηκε κατά τη διάρκεια της νύχτας ώστε να επιτευχθεί πλήρης διάλυση και εξισορρόπηση, τοποθετήθηκε σε σωλήνες των 5mm. Ως διαλύτες στην φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίων (^1H NMR) χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο νερό (D_2O), δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (chloroform-d, CDCl_3), δευτεριωμένη μεθανόλη (methanol-d₄, MeOD ή CD_3OD) και διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide-d₆, DMSO-d₆) αναλόγως το συμπολυμερές. Οι υπολειμματικές κορυφές 171 των διαλυτών D_2O , CDCl_3 , MeOD και DMSO-d₆ είναι 4.79, 7.26, 3.31 και 2.50 ppm αντίστοιχα.

2.6.1.2 Πειραματική διάταξη φασματοσκοπίας υπερύθρου (Fourier Transform-InfraRed Spectroscopy, FT-IR)

Τα φάσματα FT-IR των παραχθέντων συμπολυμερών, σε στερεά κατάσταση, ελήφθησαν σε φωτόμετρο υπερύθρου Equinox 55 Bruker, μετασχηματισμού Fourier. Οι φασματοσκοπικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με διακριτική ικανότητα 2cm^{-1} και κάθε φάσμα αποτελεί το μέσο όρο τριών διαδοχικών φασμάτων περιοχής 5000 έως 525cm^{-1} , των 64 σαρώσεων. Αναλόγως το σύστημα, πραγματοποιήθηκε εναπόθεση είτε

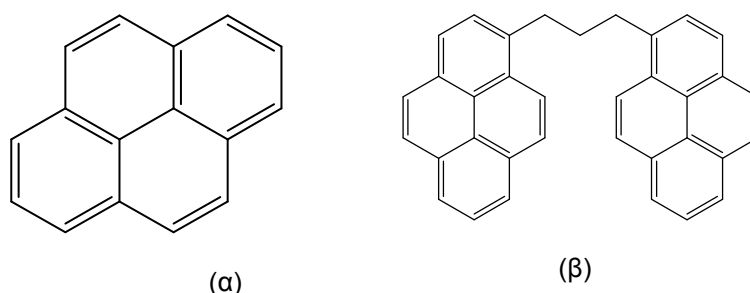
μικρής ποσότητας του εξεταζόμενου στερεού είτε του εξεταζόμενου διαλύματος στην επιφάνεια του κρυστάλλου διαμαντιού. Το διαμάντι είχε διάμετρο 1mm, δείκτη διάθλασης $n_c=2.41$ και κυματοδηγό ZnSe). Η συλλογή των φασμάτων αφορούσε λεπτά φιλμ, τα οποία προέκυπταν είτε από την εξάτμιση του διαλύτη με ροή αζώτου (στην περίπτωση των διαλυμάτων) είτε από την εφαρμογή πίεσης του εξεταζόμενου στερεού. Η ροή αζώτου στην οπτική διαδρομή των εξαρτημάτων του FT-IR απομάκρυνε τυχόν υδρατμούς και διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας.

2.6.1.3 Πειραματική διάταξη φασματοσκοπίας φθορισμού ή φθορισμομετρία

Το φάσμα φθορισμού ή εκπομπής λαμβάνεται με διέγερση σε καθορισμένο μήκος κύματος και καταγραφή της έντασης φθορισμού συναρτήσει του μήκους κύματος, σε αντίθεση με το φάσμα διέγερσης ή απορρόφησης το οποίο λαμβάνεται με καταγραφή της έντασης της ακτινοβολίας φθορισμού σε καθορισμένο μήκος κύματος (συνήθως στο σημείο που παρατηρείται μέγιστη ένταση φθορισμού) συναρτήσει του μήκους κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης. Τα φάσματα που λαμβάνονται πρέπει να διορθωθούν ως προς την ένταση της ακτινοβολίας διέγερσης και της απόκρισης του φωτοανιχνευτή σε διαφορετικά μήκη κύματος. Το φαινόμενο του φθορισμού επηρεάζεται από παράγοντες όπως η δομή του μορίου, η πολικότητα του διαλύτη-περιβάλλοντος των φθορίζοντων μορίων, η θερμοκρασία, το pH και η συγκέντρωση του διαλύματος.

Το μοντέλο Fluorolog-3 (FL3-21, Horiba Jobin Yvon-Spex), με λυχνία ξένου η οποία παρέχει ακτινοβολία στην περιοχή εκπομπής 250- 850nm, χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα φθορισμομετρίας. Η ανίχνευση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας πραγματοποιήθηκε σε γωνία 90°, για να αποφευχθεί η ανίχνευση της ακτινοβολίας διέγερσης. Στην περίπτωση ουσιών που δεν εμφανίζουν φθορισμό, είναι δυνατή η χρήση μοριακών φθορίζοντων ιχνηθετών όπως το πυρένιο (pyrene, Py) και το 1,3-bis(1-pyrenyl) propane (P3P). Το πυρένιο (Σχήμα 2.9 (α)) είναι ένα υδρόφοβο μόριο και έχει φάσμα φθορισμού το οποίο λαμβάνεται με διέγερση στα 335nm. Ο χαρακτηριστικός λόγος της έντασης της πρώτης κορυφής στα 372nm προς την ένταση της τρίτης κορυφής στα 383nm, I_1/I_3 , που εξάγεται από το φάσμα εκπομπής του πυρενίου, χρησιμοποιείται ως ένδειξη της πολικότητας του περιβάλλοντός του. Επιπλέον, το P3P (Σχήμα 2.9 (β)) είναι και αυτό ένας υδρόφοβος φθορίζον ανιχνευτής ο οποίος αποτελείται από δύο τμήματα πυρενίου που συνδέονται μεταξύ τους με αλυσίδα τριών

CH₂ και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο σε περιορισμούς που επιβάλλονται από το περιβάλλον του και επομένως, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αισθητήρας ιξώδους σε εσωτερικές περιοχές λιποπρωτεϊνών, μικυλλίων κ.λπ. Ένα αποδεικτικό στοιχείο του μικροπεριβαλλοντικού ιξώδους είναι ο λόγος I_M/I_E όπου I_M είναι η ένταση του μονομερούς (~375nm) και I_E η ένταση φθορισμού (~497nm) του excimer. Το πυρένιο και τα παράγωγά του έχουν μεγάλο χρόνο ζωής φθορισμού ο οποίος επιτρέπει την επίτευξη της κατάλληλης διαμόρφωσης για το σχηματισμό excimer.



Σχήμα 2.9: Χημική δομή του (α) Py και (β) P3P.

Όπως προαναφέρθηκε, η προσθήκη του ιχνηθέτη στα πολυμερικά διαλύματα (HMPOx και PEG-b-PPhOx) πραγματοποιήθηκε μέσω της προσθήκης κατάλληλης ποσότητας διαλύματός του σε ακετόνη και μετά την εξάτμισή της. Η τελική συγκέντρωση του πυρενίου και του P3P ήταν 0.4μM και 0.1μM αντίστοιχα. Η καταγραφή των φασμάτων αυτών και στις δύο περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε ανά 1nm, με χρόνο ολοκλήρωσης 0.5 s, ενώ το εύρος των σχισμών διέλευσης ορίστηκε στο 1nm.

2.6.1.4 Πειραματική διάταξη φασματοσκοπίας υπεριώδους – ορατού- υπερύθρου (Ultra Violet-Visible-Near Infrared Red ή UV-Vis-NIR spectroscopy)

Όλες οι μετρήσεις φασματοσκοπίας υπεριώδους- ορατού- υπερύθρου πραγματοποιήθηκαν με ένα Perkin Elmer UV-VIS-NIR φασματόμετρο (Lambda 19) σε περιοχή εύρους 250- 4000nm. Η τοποθέτηση των δειγμάτων (3ml) έγινε σε κυψελίδα χαλαζία 1-cm με ταχύτητα σάρωσης 240 nm/min.

2.6.2 Πειραματική διάταξη σκέδασης φωτός

2.6.2.1 Πειραματική διάταξη Δυναμικής & Στατικής σκέδασης φωτός

Η πειραματική διάταξη για τις μετρήσεις της σκέδασης φωτός, αποτελείται από ένα ALV/CGS-3 ολοκληρωμένο σύστημα γωνιομέτρου (ALVGmbH), το οποίο είναι εξοπλισμένο με μία κυλινδρική πηγή Uniphase laser JDS He-Ne μήκους κύματος $\lambda=632.8\text{nm}$ και ισχύος 22 mW, μία συσκευή συγκράτησης της κυψελίδας του δείγματος, η οποία έχει λουτρό ελεγχόμενης θερμοκρασίας με υγρό παρόμοιου δείκτη διάθλασης με αυτόν του γυαλιού της κυψελίδας (τολουόλιο), και έναν Avalanche ανιχνευτή φωτοδίοδο για γωνίες με εύρος 30-150°. Το σύστημα αυτό είναι συνδεδεμένο με μία ALV/ LSE-5003 ηλεκτρονική μονάδα ελέγχου του γωνιομέτρου και έναν ALV-5000/EPP συσχετιστή φωτονίων πολλαπλών χρόνων δειγματοληψίας, με 288 κανάλια, στον οποίο ανιχνεύεται το σήμα της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας και καθίσταται δυνατή η μέτρηση της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης. Τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν, τοποθετήθηκαν σε πρότυπα κυλινδρικά κελιά χαλαζία Helma πλάτους 1 cm, απαλλαγμένα από σκόνη. Βέβαια, το δείγμα δεν πρέπει να είναι πολύ πυκνό για να μην γίνεται πολλαπλή σκέδαση και δεν πρέπει να υπάρχει πουθενά στο σύστημα σκόνη, διότι τα σωματίδια σκόνης αποτελούν και αυτά κέντρα σκέδασης. Λόγω λοιπόν, της ευαισθησίας της συγκεκριμένης τεχνικής στην παρουσία μεγάλων σωματιδίων, τα προς μελέτη δείγματα φιλτράρονταν πριν τη μέτρηση, μέσω φίλτρων υδρόφιλης μεμβράνης PTFE διαμέτρου πόρων 0.45 μm (Millex– LCR της Millipore).

2.6.2.2 Πειραματική διάταξη ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός

Μια μέθοδος, που δίνει πληροφορίες σχετικά με το συνολικό φορτίο (θετικό ή αρνητικό) που φέρει το πολυμερές είναι οι μετρήσεις του ζ-δυναμικού (σε γωνία σκέδασης 173°). Το μοντέλο ZetaPlus της Brookhaven, με πηγή laser στερεής κατάστασης μήκους κύματος $\lambda=660\text{nm}$ και ισχύος 35 mW, χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός. Μια σειρά από διαλύματα (3ml) πολυμερών και των συμπλόκων τους, τοποθετήθηκαν σε κυψελίδα διασταυρούμενης δέσμης 1-cm, σε θερμοκρασία 25°C.

2.6.1 Πειραματική διάταξη χρωματογραφικών τεχνικών

2.6.1 Πειραματική διάταξη χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC)

Για τη χρωματογραφία SEC χρησιμοποιήθηκε ένα όργανο της Waters αποτελούμενο από ανιχνευτή διαφορικού δείκτη διάθλασης Waters 2414, μια ισοκρατική αντλία HPLC Waters 1515 και σύστημα τριών στηλών styragel από δικτυωμένο πολυστυρένιο, σε σειρά, διαστάσεων 78x300 mm και εύρους του πορώδους 10^3 - 10^6 Å. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν THF με 5% τριαιθυλαμίνη (Et_3N). Η ροή στη στήλη ήταν 1 ml/min και η θερμοκρασία σταθερή στους 40°C. Το όργανο βαθμονομήθηκε με πρότυπα δείγματα γραμμικού πολυστυρενίου μοριακών βαρών εύρους από 1,800 έως 900,000 g/mol με μικρή κατανομή. Τα δείγματα των συμπολυμερών διαλύθηκαν σε διαλύτη THF, προκειμένου να μετρηθούν τα μέσα μοριακά βάρη τους και η πολυδιασπορά τους.

2.6.4 Πειραματική διάταξη Τεχνικών μικροσκοπίας

2.6.4.1 Πειραματική διάταξη ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM)

Για τη μελέτη των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης Carl Zeiss EVO MA10 SEM, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό κανονική πίεση. Το μικροσκόπιο αυτό είχε τα εξής χαρακτηριστικά: (α) υψηλή τάση επιτάχυνσης 15.01kV, (β) απόσταση εργασίας (WD) 9.5mm, (γ) μεγέθυνση 1-50k x. Μια σταγόνα (30-60 μl) από κάθε δείγμα εναποτέθηκε πάνω σε υπόστρωμα οξειδίου του πυριτίου (SiO_2) και η περίσσεια διαλύτη απομακρύνθηκε με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού. Έπειτα τα ξηραμένα αυτά υμένια (film) επιμεταλλώθηκαν με χρυσό πάχους 18 nm σε εξαχνωτή. Για όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκε αυτή η τεχνική, η συγκέντρωση ήταν 1×10^{-4} g/ml.

2.6.4.2 Πειραματική διάταξη ηλεκτρονικής Μικροσκοπικής Διαπερατότητας (TEM)

Η εξέταση των δειγμάτων με το TEM πραγματοποιήθηκε σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο JEOL, JEM- 2100 που λειτουργούσε σε τάση επιτάχυνσης 200 kV (κάτω από συνθήκες φωτεινού πεδίου και κενού) και που ήταν εξοπλισμένο με μία CCD κάμερα (Gatan USC4000, Gatan). Μία σταγόνα διαλύματος τοποθετήθηκε σε ειδικά TEM υποστρώματα χαλκού που είναι καλυμμένα με ένα λεπτό υμένιο Formvar από άνθρακα.

Η τυχόν περίσσεια του δείγματος απομακρύνθηκε (όπως στο SEM) με τη χρήση χαρτιού διήθησης. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν χωρίς επιπλέον ιχνηθέτηση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 Αποτελέσματα και Συζήτηση για τα υβριδικά HMPOx νανοσυστήματα

3.1.1 Παρασκευή και χαρακτηρισμός των υδρολυμένων βαθμωτών HMPOx

Γραμμική πολυ(αιθυλενιμίνη) (LPEI) μπορεί να παραχθεί π.χ. με πολυμερισμό των υποκατεστημένων αζιριδινών (και των παραγώγων τους) καθώς και με υδρόλυση των πολυ(οξαζολινών) (POx). Όμως η πιο συνήθης μέθοδος και ο πιο ελπιδοφόρος δρόμος σύνθεσης καλώς καθορισμένων LPEI με στενές κατανομές μοριακών βαρών¹⁷²⁻¹⁷⁴ αποτέλεσε η βασική ή όξινη υδρόλυση των POx. Έχει αποκαλυφθεί¹⁷³ ότι η όξινη υδρόλυση πολυ(2-οξαζολινών) προχωρά αργά με χρόνους αντίδρασης που κυμαίνονται από λίγες ώρες έως αρκετές ημέρες, ενώ η αντίστοιχη βασική είναι ακόμη πιο αργή. Πρόσφατα, έχουν επιταχυνθεί τέτοιες αντιδράσεις μέσω της ακτινοβολήσης υπό μικροκύματα. Εκτός από τις κινητικές μελέτες της όξινης υδρόλυσης^{172, 173} ομοπολυμερών POx που διεξήχθησαν, όπως πολυ(2-αιθυλο-2-οξαζολίνη) (poly(2-ethyl-2-oxazoline), PEtOx), πολυ(2-μεθυλο-2-οξαζολίνη) (poly(2-methyl-2-oxazoline), PMeOx) και πολυ(2-φαινυλο-2-οξαζολίνη) (poly(2-phenyl-2-oxazoline), PPhOx), έχουν συντεθεί και γραμμικές PEI με υδρόλυση συμπολυμερών (2-οξαζολινών)¹⁷⁴. Στην τελευταία μελέτη, επιτεύχθηκε επιλεκτική υδρόλυση υπό ακτινοβολήση με μικροκύματα των P([MeOx]₆₀-b-[PhOx]₁₅) και P([MeOx]₅₀-b-[EtOx]₅₀) τόσο σε νερό όσο και σε δυαδικό μίγμα αιθανόλης -νερού. Τα μίγματα διαλύτη αιθανόλης-ύδατος βρέθηκαν ότι μειώνουν επιλεκτικά τον ρυθμό της όξινης υδρόλυσης των αλκυλο-υποκατεστημένων αμιδίων. Η μείωση αυτή γίνεται πιο έντονη καθώς αυξάνεται το μήκος της αλυσίδας του αλκυλίου από μεθύλιο σε αιθύλιο και προπύλιο (όπου μειώνονται οι αντίστοιχες σταθερές υδρόλυσης). Ως εκ τούτου, αυτός ο τρόπος αποτέλεσε μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την αύξηση της εκλεκτικότητας, ανοίγοντας το δρόμο προς την εκλεκτική υδρόλυση διπλά υδρόφιλων συμπολυμερών πολυ(2-οξαζολινών) κατά συστάδες. Από τους Kuringen και τους συνεργάτες του, δοκιμάστηκαν δύο αναλογίες ομογενών μιγμάτων διαλυτών 80:20 και 40:60 (v/v) αιθανόλης: νερού. Σε όξινη υδρόλυση, η πρώτη αναλογία μίγματος διαλυτών αιθανόλης: νερού παρουσίασε μέγιστη μετατροπή σε αιθυλαινιμίνη (EI). Οι σταθερές ρυθμού υδρόλυσης σε αιθανόλη: νερό (80:20 v/v) των ομοπολυμερών PMeOx και PPhOx (υπό ακτινοβολήση μικροκυμάτων) υπολογίστηκαν 72 και 4 l/(mol·s) αντίστοιχα, αποκαλύπτοντας την επιλεκτική μετατροπή (εκλεκτικότητα) της PMeOx προς PEI. Η EI μετατροπή των HMPOx για 6 ώρες με συμβατική θέρμανση (Πίνακας 3.1) είναι όμοια με των συμπολυμερών αυτών για 2 ώρες αντίστοιχη υδρόλυση υπό ακτινοβολήση.

Σε αντίστοιχη έρευνα ¹⁷⁵ με το δικό μας σύστημα ΗΜΡΟx (Πίνακας 3.1), υδρολύθηκαν συμπολυμερή ΡΜεΟx-b-PPhΟx με Μ_n =20kg/mol σε όξινο περιβάλλον για 2 ώρες μέσω συμβατικής θέρμανσης και αποκαλύφθηκε αναλογία ΜεΟx: PhΟx: ΕΙ πλησίον των δικών μας πειραμάτων (6 ωρών) που φαίνονται στον Πίνακα 3.1. Ο βαθμός υδρόλυσης (ποσοστό μετατροπής σε ΕΙ) βρέθηκε να είναι χαμηλότερος στα παραχθέντα ΗΜΡΟx, σε σύγκριση του αντίστοιχου των ΡΜεΟx-b-PPhΟx και ΡΜεΟx-stat-PPhΟx (με Μ_n =16 και 20kg/mol) σε όξινο περιβάλλον ¹⁷⁵ ενώ πλησιάζει το ΕΙ των ΡΜεΟx-stat-PPhΟx και ΡΜεΟx-b-PPhΟx (με Μ_n =17kg/mol) σε βασικό περιβάλλον (10 ώρες). Αυτό θα πρέπει να αποδοθεί στο γεγονός ότι στην περίπτωση μας η υδρόλυση δεν συνέβη υπό ακτινοβολή με μικροκύματα αλλά μέσω συμβατικής θέρμανσης.

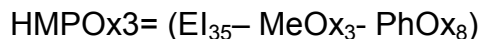
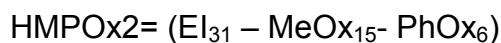
Όσον αφορά την αιθανόλη που χρησιμοποιήθηκε αναμεμιγμένη με το νερό, επειδή παραγγέλθηκε καθαρή, δεν απαιτήθηκε να αποσταχθεί ώστε να αποφευχθεί η ύπαρξη περαιτέρω ανεπιθύμητων προσμίξεων. Όπως προαναφέρθηκε και στο υποκεφάλαιο 2.1, τα μοριακά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την υδρόλυση (δηλαδή τη μετατροπή σε ΕΙ και τη σύσταση) των αρχικών συμπολυμερών ΜΡΟx ευρέθησαν με ¹H NMR ανάλυση. Τα χαρακτηριστικά αυτά των προδρόμων ΜΡΟx και των ΗΜΡΟx παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1: Μοριακά χαρακτηριστικά των βαθμωτών ΜΡΟx και ΗΜΡΟx συμπολυμερών.

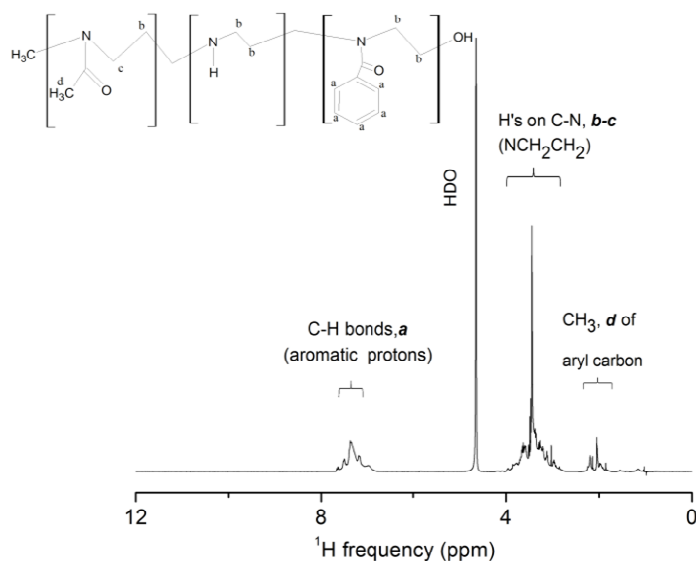
Δείγμα	M _n	M _w /M _n	t _{υδρόλυσης} (h)	Σύσταση (wt% από ¹ H-NMR)		
				ΕΙ	ΜεΟx	PhΟx
ΜΡΟx1	4,900	1.14	-	0	72	28
ΜΡΟx3	4,600	1.26	-	0	61	39
ΗΜΡΟx1	3,300	-	6	45	28	27
ΗΜΡΟx2	3,400	-	3	39	37	24
ΗΜΡΟx3	2,900	-	6	52	10	38

*Εναλλακτικά :

ΗΜΡΟx1= (ΕΙ₃₄ – ΜεΟx₁₀- PhΟx₆)



Από τον παραπάνω Πίνακα 3.1 φαίνεται, ότι όσο μικρότερος είναι ο χρόνος υδρόλυσης για την παρασκευή των HMPOx τόσο πιο μικρή είναι η μετατροπή ή περιεκτικότητα σε wt% EI. Είναι λογικό ότι μετά την υδρόλυση των MPOx, υπήρξε μείωση του μοριακού βάρους των πρόδρομων ενώσεων, αφού έγινε μετατροπή των επιμέρους μονομερών των βαθμωτών συμπολυμερών σε EI. Επιπλέον, τα υδρολυμένα βαθμωτά συμπολυμερή HMPOx ήταν αδιάλυτα ή με μεγάλη θολότητα σε δευτεριωμένους διαλύτες (π.χ. χλωροφόρμιο και μεθανόλη). Συνεπώς οι μετρήσεις ^1H NMR σε D_2O θεωρήθηκαν πιο κατάλληλες, όπως και σε άλλες δημοσιεύσεις ¹⁷⁶⁻¹⁷⁹. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα φάσματος ^1H NMR των HMPOx σε D_2O , φαίνεται στο Σχήμα 3.1 όπου απεικονίζονται τα πρωτόνια του HMPOx3 δείγματος.



Σχήμα 3.1: Το φάσμα ^1H NMR (300kHz, D_2O) του συμπολυμερούς HMPOx3.

Εκτενέστερα, οι κορυφές σε 2 και 7.4 ppm αποδίδονται στα πρωτόνια της περιοχής των ανθράκων του ακυλίου και του φαινυλίου αντίστοιχα. Τα πρωτόνια της κοινής αλυσίδας - $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-}$ των PEI, PPhOx και PMeOx, παρατηρήθηκαν στην ευρεία κορυφή με δ. 3.45ppm.

Εκτός της τεχνικής του ^1H NMR, η ύπαρξη των αναμενόμενων χημικών ομάδων στα δείγματα HMPOx πιστοποιήθηκε και με ATR-FTIR φασματοσκοπία αντίστοιχα με άλλες δημοσιεύσεις^{136, 155, 168, 180-182}. Στα φάσματα των πρόδρομων συμπολυμερών MPOx, οι κορυφές στην περιοχή $679\text{-}820\text{ cm}^{-1}$ σχετίστηκαν με τις δονήσεις κάμψης εκτός επιπέδου των αρωματικών C-H των ομάδων φαινυλίου των PhOx μονομερών μονάδων. Επίσης, οι κορυφές στην περιοχή $1011\text{-}1125\text{ cm}^{-1}$ αφορούσαν τις δονήσεις των C-C και C-N ομάδων. Οι ασύμμετρες δονήσεις έκτασης της -N-CH₂- ομάδας στην κύρια αλυσίδα καθώς και οι δονήσεις κάμψης εντός επιπέδου του CH₂ παρατηρήθηκαν σε 1476 cm^{-1} , ενώ η δόνηση της C=O ομάδας ήταν εμφανής στα 1633 cm^{-1} . Οι ευρείς κορυφές των $2900\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ σχετίστηκαν με τις ασύμμετρες και συμμετρικές δονήσεις της CH₂ ομάδας. Μετά την υδρόλυση, οι κορυφές που αποδόθηκαν στις C-C, C-H, C-N και N-CH₂ ομάδες εμφανίστηκαν στους σχετικούς άνωθεν κυματαριθμούς (όπως στο MPOx). Η δόνηση έκτασης του NH παρατηρήθηκε, όπως και αλλού¹⁸², στην περιοχή μεταξύ 3300 και 3600 cm^{-1} αποδεικνύοντας την παρουσία ομάδων αμίνης στα παραχθέντα συμπολυμερή.

3.1.2 Χαρακτηρισμός των υδατικών διαλυμάτων των βαθμωτών HMPOx συμπολυμερών

Οι μονομερικές μονάδες PhOx δίνουν αμφιφιλικό χαρακτήρα στα βαθμωτά HMPOx συμπολυμερή, αφού τα εναπομείνοντα μετά την υδρόλυση PhOx διατηρούν την υδρόφοβη φύση τους. Με περισσότερες αμίνες EI, η κατιοντική φύση του συμπολυμερούς αυξάνεται, αυξάνοντας τη διαλυτότητα του HMPOx συμπολυμερούς σε νερό λόγω του πολυηλεκτρολυτικού χαρακτήρα. Εστιάστηκε η προσοχή μας κυρίως στα δείγματα HMPOx 1 και 3, δεδομένου ότι έχουν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε wt% EI (λόγω του μεγαλύτερου χρόνου υδρόλυσης).

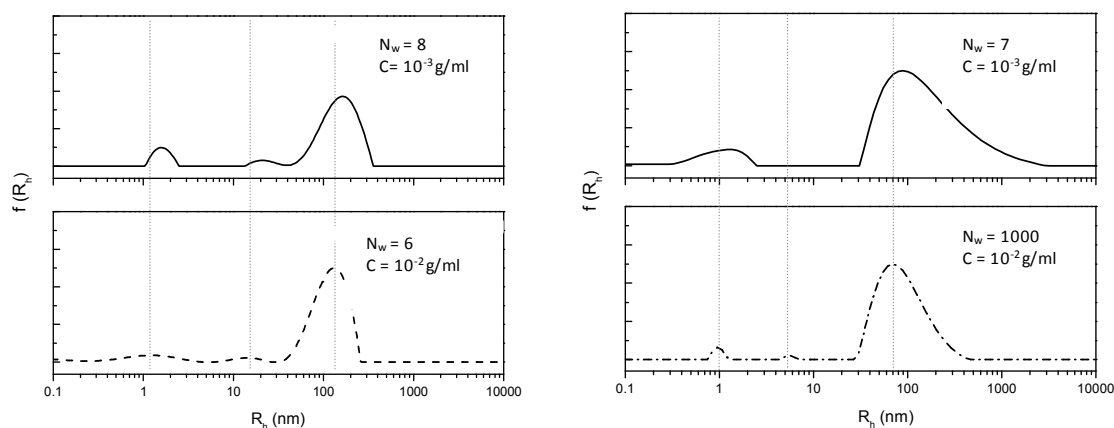
Προκειμένου να διερευνηθούν οι ιδιότητες των διαλυμάτων των συμπολυμερών HMPOx, χρησιμοποιήθηκε αρχικά η σκέδαση φωτός. Ο διαφορικός δείκτης διάθλασης του PMeOx ήταν $dn/dC=0.172\text{ ml/g}$ ^{183, 184}, ενώ ο αντίστοιχος του PEI ήταν $dn/dC=0.174\text{ ml/g}$ ¹⁸⁵. Ο dn/dC του PPhOx σε νερό υπολογίστηκε από την τιμή του σε THF (0.147 ml/g)¹⁸⁶ δίνοντας αποτέλεσμα $dn/dC=0.222\text{ ml/g}$. Βέβαια, χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες διάθλασης (n) του THF και του H₂O ίσοι με 1.41 και 1.33 αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα

από τις τεχνικές σκέδασης φωτός για τα υδατικά διαλύματα HMPOx φαίνονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός και φθορισμού των HMPOx συμπολυμερών σε υδατικά διαλύματα (με pH 7 και $C = 10^{-2}$ g/ml).

Δείγμα	R_h (nm)	R_g (nm)	ρ	ζ_P (mV)	I_1/I_3	PDI (90°)	M_w 10^4 (g/mol)	N_w
HMPOx1	164	82	0.50	+35 (± 1)	1.82	0.42	2.3	6
HMPOx2	130	89	0.69	+17	1.84	0.49	11	27
HMPOx3	95	71	0.75	+24 (± 1)	1.81	0.37	365	1000

Οι τιμές της γυροσκοπικής ακτίνας (R_g) και της υδροδυναμικής ακτίνας (R_h) που προήλθαν από στατικές και δυναμικές μετρήσεις σκέδασης φωτός, περιλήφθησαν στο χαρακτηριστικό λόγο $\rho = R_g/R_h$. Οι τιμές των R_h ήταν μεγαλύτερες από αυτές που αναμένονταν για τις μεμονωμένες αλυσίδες συμπολυμερούς, ένα αποτέλεσμα που υποδηλώνει το σχηματισμό συσσωματωμάτων. Οι υδροδυναμικές ακτίνες εμφάνισαν μικρή εξάρτηση από τη συγκέντρωση του συμπολυμερούς (ειδικά για το HMPOx3) και οι τιμές PDI υποδηλώνουν την παρουσία πολυδιάσπαρτων συσσωματωμάτων. Η ανάλυση CONTIN των συναρτήσεων αυτο-συσχέτισης έκανε αντιληπτή την παρουσία μεμονωμένων αλυσίδων του συμπολυμερούς (unimers) και των συσσωματωμάτων στα δείγματα HMPOx1 και 3, με διαφορετικά φαινόμενα μοριακά βάρη ($M_{w,app.}$), όπως προσδιορίστηκαν με στατική σκέδαση φωτός. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα διαγράμματα Zimm που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των μεγεθών R_g και $M_{w,app.}$ βρέθηκαν γραμμικά. Για παράδειγμα, στο Σχήμα 3.2, απεικονίζεται η συνάρτηση κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ για τα υδατικά διαλύματα των HMPOx1 και HMPOx3 βαθμωτών συμπολυμερών (με $C=10^{-3}$ και 10^{-2} g/ml).

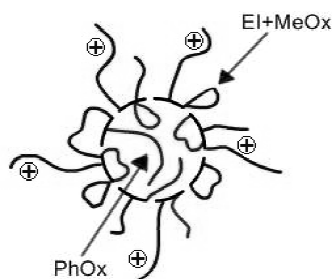


(α)

(β)

Σχήμα 3.2: Η συνάρτηση κατανομής μεγέθους συναρτήσει της R_h , για τα υδατικά διαλύματα των συμπολυμερών (α) HMPOx1 και (β) HMPOx3.

Οι τιμές R_g (δεδομένα από SLS) ήταν περίπου 80, 90 και 70nm για τα υδατικά διαλύματα HMPOx1, HMPOx2 και HMPOx3 με $M_{w,app}$ που ήταν $2.3 \cdot 10^4$, $11 \cdot 10^4$ και $365 \cdot 10^4$ g/mol. Οι υπολογισμένοι λόγοι R_g/R_h , έδειξαν ότι τα μικκύλια των HMPOx υδατικών διαλυμάτων είναι σχεδόν σφαιρικά. Το μέγεθος R_h των μικκυλίων των HMPOx σε υδατικά διαλύματα είναι μεγαλύτερο σε σύγκριση με το αντίστοιχο των πρόδρομων MPOx¹⁶⁸, γεγονός που αποδόθηκε στο υψηλότερο υδρόφιλο περιεχόμενο των υδρολυμένων συμπολυμερών. Η ευαισθησία της συσσωμάτωσης στο υδρόφοβο περιεχόμενο υπογραμμίζεται από την παρατήρηση (Σχήμα 3.2) ότι τα HMPOx3 συσσωματώματα έχουν πολύ υψηλότερο αριθμό συσσωμάτωσης (aggregation number) σε συγκέντρωση 10^{-2} συγκριτικά με αυτό σε συγκέντρωση 10^{-3} g/ml. Αυτό δείχνει ότι η συσσωμάτωση των HMPOx3 νανοσωματιδίων εξαρτάται έντονα από τη συγκέντρωση του πολυμερούς, σε αντίθεση με των HMPOx1 υδατικών διαλυμάτων, όπου έχει τον ίδιο αριθμό συσσωμάτωσης (N_w) ακόμη και στη χαμηλότερη συγκέντρωση που αυτά μελετήθηκαν. Η προτεινόμενη δομή των HMPOx υδρολυμένων συμπολυμερών σε νερό μπορεί να απεικονιστεί στην Εικόνα 3.1.



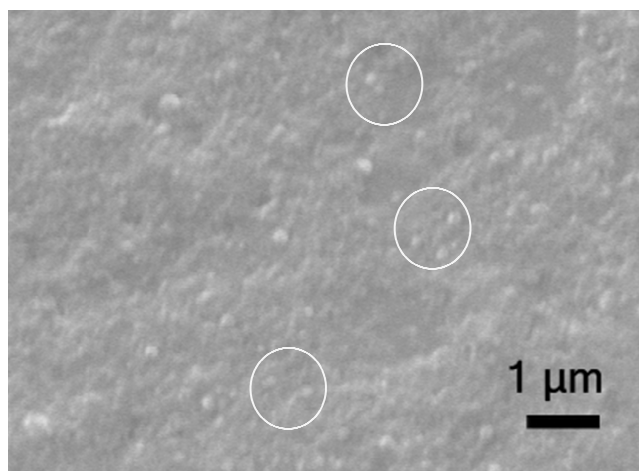
Εικόνα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση των υπερμοριακών συσσωματωμάτων που σχηματίστηκαν από τα κατιονικά συμπολυμερή HMPOx σε υδατικά μέσα.

Εξαιτίας της βαθμωτής διάταξης των υδρόφιλων/ υδρόφοβων ομάδων, η παρουσία βρόχων και αλληλουχιών ελεύθερων άκρων από αλυσίδες που αποτελούνται από MeOx και EI ομάδες, αναμένεται στο εξωτερικό των συσσωματωμάτων. Τα υδρόφοβα τμήματα PhOx αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του εσωτερικού του πυρήνα των συσσωματωμάτων. Είναι γνωστό ¹⁸¹ ότι το παρατηρούμενο σχετικά μεγάλο μέγεθος των σωματιδίων θα επηρεάζεται όχι μόνο από τις υδρόφιλες-υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που βιώνουν τα αντίστοιχα τμήματα των αλυσίδων, αλλά και από τις ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ PEI τμημάτων.

Τα συσσωματώματα των HMPOx3 ένεκα της υψηλότερης τιμής του λόγου R_g/R_h ($= 0.75$) σε σύγκριση με τους λόγους των άλλων δύο HMPOx, μπορούν να θεωρηθούν ότι έχουν μια πιο συμπαγή σφαιρική δομή ¹⁴⁷. Οι διαφορές στο μέγεθος και την πυκνότητα μπορούν να συσχετιστούν με τον λόγο υδρόφοβου/ υδρόφιλου περιεχομένου του κάθε δείγματος ⁶¹. Συνεπώς, οι αλυσίδες των HMPOx3 οι οποίες έχουν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε υδρόφοβα μέρη, σχημάτισαν μικρότερα και πιο καλά καθορισμένα συσσωματώματα με το χαμηλότερο PDI ⁶¹.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του ζήτα δυναμικού (ζ_p) και φθορισμομετρίας, υπό τις ίδιες συνθήκες ιοντικής ισχύος με της στατικής και δυναμικής σκέδασης φωτός, ώστε να δοθούν πληροφορίες σχετικά με το (εξωτερικό) φορτίο των συσσωματωμάτων HMPOx στα υδατικά διαλύματα και με την πολικότητα του μικροπεριβάλλοντος στον εσωτερικό τους (πυρήνα). Το ζ_p των συσσωματωμάτων HMPOx ήταν θετικό (Πίνακας 3.2), γεγονός που αναμενόταν από την παρουσία των EI ομάδων οι οποίες είναι ικανές για πρωτονίωση. Τα θετικά φορτισμένα αυτά συσσωματώματα θα έχουν τη δυνατότητα σύμπλεξης στην επιφάνειά τους με τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA (όπως εξετάστηκε και περαιτέρω) ^{180,187-189}.

Στα πειράματα της φασματοσκοπίας φθορισμού, η οποία είναι μία γνωστή τεχνική για τη μελέτη της συμπεριφοράς αυτο-οργάνωσης των συμπολυμερών, χρησιμοποιήθηκε πυρένιο ως ιχνηθέτης ^{190, 191}. Με άλλα λόγια, μέσω των πειραμάτων αυτών δίδονται σημαντικές πληροφορίες για την τοπική πολικότητα και ρευστότητα των νανοδομών. Όπως προαναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 2.6.1.3, ο λόγος των εντάσεων εκπομπής των ζωνών δόνησης (vibronic bands) 1 και 3 (I_1/I_3) ο οποίος είναι ευαίσθητος στην τοπική πολικότητα του περιβάλλοντος του πυρενίου, συμβάλλει στην εκτίμηση του αριθμού ή/και του μεγέθους των υδρόφοβων μικροπεριοχών που υπάρχουν στο διάλυμα ¹⁹². Στον Πίνακα 3.2 συνοψίζονται οι τιμές των λόγων I_1/I_3 των υδrolυμένων συσσωματωμάτων στο υδατικό περιβάλλον. Αυτές βρέθηκαν περίπου ίσες με 1.8 για τα συμπολυμερή HMPOx, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα συσσωματώματα δεν παρουσιάζουν επαρκή υδροφοβικότητα στο εσωτερικό τους ή ότι οι υδρόφοβες περιοχές τους δεν είναι αρκετά μεγάλες για να φιλοξενήσουν αποτελεσματικά πυρένιο. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν ληφθεί και σε άλλες έρευνες για συσσωματώματα που αφορούν αμφίφιλα συμπολυμερή τα οποία περιέχουν οξαζολίνη ^{168, 193}.



Εικόνα 3.2: Ενδεικτική τυπική SEM εικόνα από τα υδατικά διαλύματα του δείγματος HMPOx1 σε πλακίδιο πυριτίου ($C=10^{-4}$ g/ml).

Στην Εικόνα 3.2 παρουσιάζεται μια αντιπροσωπευτική εικόνα SEM των κατιοντικών συσσωματωμάτων των HMPOx1 σε νερό, με $C_{\text{πολυμ.}}=10^{-4}$ g/ml. Τα συσσωματώματα έδειξαν την ύπαρξη σφαιρικής μορφολογίας με μέση ακτίνα 100nm, τιμή που είναι σε σχετική συμφωνία με τα αποτελέσματα της σκέδασης φωτός. Η ύπαρξη ελαφρώς μεγαλύτερων μεγεθών των συσσωματωμάτων του συμπολυμερούς στις εικόνες SEM ¹⁹⁴ σε σύγκριση με την τεχνική DLS, προκλήθηκε πιθανότατα από την ξήρανση των

διαλυμάτων HMPOx στα πλακίδια του πυριτίου. Η ξήρανση μπορεί να προσδώσει ένα «άπλωμα» των δομών στην επιφάνεια, υποδεικνύοντας μια σχετικά χαλαρή και παραμορφούμενη δομή των HMPOx συσσωματωμάτων.

Τα κατιοντικά παραχθέντα συμπολυμερή διαλύθηκαν όχι μόνο σε νερό αλλά και σε αλατούχα ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του PBS μέσου είναι πιο κοντά στις φυσιολογικές συνθήκες που συναντώνται στο ανθρώπινο σώμα. Τα αποτελέσματα (R_g , R_h , ρ , I_1/I_3) τόσο από τη φασματοσκοπία φθορισμού όσο και από τη σκέδαση φωτός των δειγμάτων HMPOx σε PBS διαλύματα συνοψίζονται στον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός και φθορισμομετρίας για HMPOx συμπολυμερή σε PBS.

Δείγμα	R_h (nm)	R_g (nm)	ρ	ζ_p (mV)	I_1/I_3	PDI (90°)	M_w 10^5 (g/mol)	N_w
HMPOx1	84	66	0.79	+30 (± 2)	1.70	0.51	2.4	64
HMPOx2	127	66	0.52	+11	1.65	0.5	2.8	73
HMPOx3	88	71	0.81	+28 (± 1)	1.50	0.26	22	600

Το R_g και για τα δείγματα HMPOx σε PBS ήταν περίπου 70 nm, τιμές οι οποίες είναι κοντά στις αντίστοιχες σε υδατικά διαλύματα και παρέμειναν σχετικά σταθερές με τη συγκέντρωση των HMPOx. Οι τιμές των R_h των HMPOx νανοσωματιδίων σε PBS είναι χαμηλότερες από εκείνες των υδατικών διαλυμάτων υποδεικνύοντας την ύπαρξη μικρότερων συσσωματωμάτων. Η υψηλότερη ιοντική ισχύς του PBS προκαλεί μείωση των ηλεκτροστατικών απώσεων μεταξύ των PEI ομάδων, μειώνοντας το συνολικό μέγεθος των συσσωματωμάτων. Αυτό συμβαίνει διότι με τη θωράκιση ελαττώνονται οι απώσεις και οι αλυσίδες μεταπηδούν από εκταμένη κατάσταση προς αυτή μιας πιο συνεσταλμένης διαμόρφωσης. Περαιτέρω, οι αριθμοί συσσωμάτωσης είναι υψηλότεροι από εκείνων σε υδατικά διαλύματα, λόγω της μείωσης των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Όπως στα HMPOx υδατικά διαλύματα, οι υδροδυναμικές ακτίνες

των HMPOx σε διαλύματα PBS είναι υψηλότερες από εκείνες των MPOx σε PBS ¹⁶⁸, υποδηλώνοντας το σχηματισμό συσσωματωμάτων. Οι λόγοι R_g/R_h οι οποίοι ήταν γύρω στην τιμή 0.7 για τα HMPOx συσσωματώματα σε PBS, υποδήλωσαν την ύπαρξη των σφαιρικών σωματιδίων στα διαλύματα αυτά. Επιπλέον, στα πειράματα φθορισμού (Πίνακας 3.3), τα HMPOx σε PBS διαλύματα είχαν χαμηλότερες τιμές I_1/I_3 σε σύγκριση με τους αντίστοιχους λόγους των υδατικών διαλυμάτων, δείχνοντας ότι το πυρένιο βιώνει ένα περιβάλλον σχετικά αυξημένης υδροφοβικότητας. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη ιοντική ισχύ του PBS. Βέβαια, ο λόγος I_1/I_3 φαίνεται να εξαρτάται από τη σύσταση των HMPOx αλυσίδων, με χαμηλότερη τιμή εκείνη του λόγου για το δείγμα HMPOx3. Οι ανωτέρω τιμές των λόγων μπορούν να σχετιστούν με την αυξημένη ιοντική ισχύ του PBS, η οποία μειώνει ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και ενισχύει αποτελεσματικά την υδρόφοβη φύση των φορτισμένων ομάδων στις αλυσίδες των συμπολυμερών. Με αυτό τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα για ενδο- και δια- μοριακή συσσωμάτωση και για σχηματισμό σχετικά καλά καθορισμένων υδρόφοβων περιοχών κατάλληλου μεγέθους για τη διαμονή του πυρενίου ¹⁹⁵. Στον Πίνακα 3.3, οι μετρήσεις του ζ-δυναμικού των HMPOx συμπολυμερών σε διάλυμα PBS έδειξαν ότι τα συσσωματώματα HMPOx είναι θετικά φορτισμένα, λόγω του θετικού φορτίου των ομάδων της αιθυλενιμίνης. Τα ζ_p των PBS διαλυμάτων σε σύγκριση με τα αντίστοιχα του νερού είναι κοντά. Οι τιμές τους θα μπορούσαν ενδεχομένως να αποδοθούν στην επίδραση της ιοντικής ισχύος στα HMPOx συσσωματώματα.

3.1.3 Αποτελέσματα υβριδικών συστημάτων αποτελούμενων από HMPOx και πρωτεΐνες του FBS

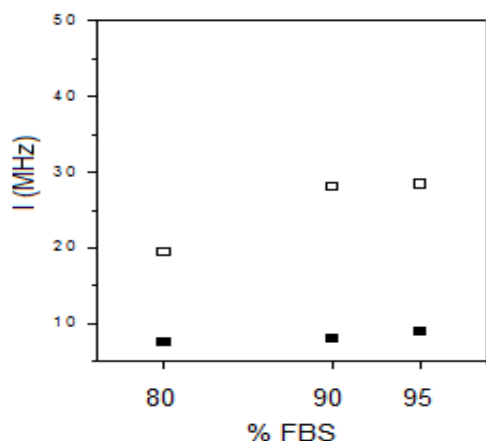
Ο εμβρυϊκός ορός βοοειδούς (FBS) είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος ορός για την *in vitro* κυτταρική καλλιέργεια (κυρίως των ευκαρυωτικών) κυττάρων ^{196 197}. Αυτό οφείλεται στο ότι το FBS το οποίο έχει πολύ χαμηλό επίπεδο αντισωμάτων, περιέχει ορμόνες και παράγοντες ανάπτυξης ¹⁹⁸. Η πλούσια ποικιλία των πρωτεϊνών σε εμβρυϊκό ορό βοδινού διατηρεί τα καλλιεργημένα κύτταρα σε μέσο στο οποίο μπορούν να επιβιώσουν, να αναπτυχθούν και να διαιρεθούν. Μια από τις πρωτεΐνες που αποτελεί σημαντικό συστατικό του FBS με σφαιρικό σχήμα, είναι η αλβουμίνη (bovine serum albumin, BSA) ¹⁹⁹ η οποία ομοιάζει χημικά με την αντίστοιχη του ανθρώπινου ορού. Η BSA είναι μία υδατοδιαλυτή, μη-γλυκοζυλιωμένη και αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη ορού με μοριακό βάρος περίπου 65kDa ^{200 201}.

Τα αποτελέσματα της σκέδασης φωτός για τα HMPOx συμπολυμερή σε διαλύματα PBS-FBS περιγράφονται στον Πίνακα 3.4 και τα Σχήματα 3.3 και 3.4.

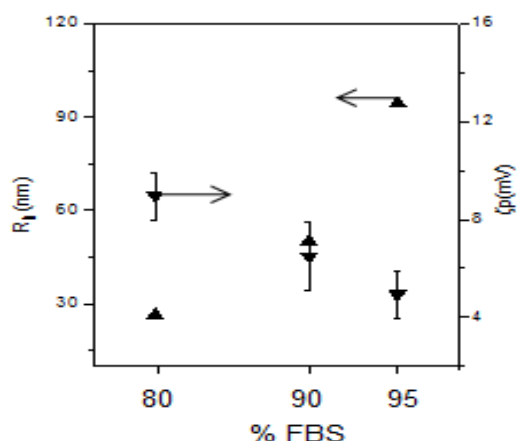
Πίνακας 3.4: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός και φθορισμομετρίας για HMPOx συμπολυμερή σε PBS-FBS (90/10% v/v).

Δείγμα	R_h (nm)	I_{cal} $10^4(\text{kHz})$	I_{exp} $10^4(\text{kHz})$	ζ_P (mV)
HMPOx1	51.6	6.4	19.1	+7.4 (± 0.9)
HMPOx2	59.9	7.3	15.4	-3
HMPOx3	49.9	8.0	28.1	+6.5 (± 1.4)

Οι πρωτεΐνες (π.χ. αλβουμίνες) που είναι παρούσες στα διαλύματα PBS-FBS αναμένοντο (λόγω της θεωρίας) και είναι σε θέση να αλληλεπιδράσουν με τα HMPOx συμπολυμερή. Το R_h (που προέρχεται από το DLS) ήταν περίπου 50nm για τα συστήματα των κατιοντικών συμπολυμερών σε PBS-FBS (90/10 v/v). Για αυτά τα HMPOx συστήματα οι τιμές των υδροδυναμικών ακτινών αυξήθηκαν, καθώς η συγκέντρωση του συμπολυμερούς αυξήθηκε, δείχνοντας αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες.



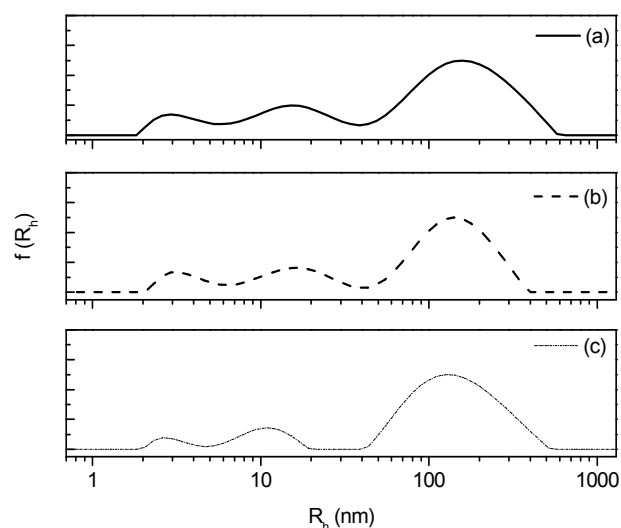
(α)



(β)

Σχήμα 3.3: (α) Η ένταση σκέδασης (με ■ και □ είναι τα $I_{\text{PBS-FBS}}$ (MHz) και I (MHz) αντίστοιχα), (β) η υδροδυναμική ακτίνα και το ζήτα δυναμικό (με ▲ και ▼ είναι R_h (nm) και ζ_p (mV) αντίστοιχα) του HMPOx3 σε διάλυμα PBS-FBS.

Επιπλέον, στο Σχήμα 3.3 απεικονίζεται ότι για την ίδια αύξηση της συγκέντρωσης του HMPOx3 στα διαλύματα PBS-FBS, η σκεδαζόμενη ένταση (I) σε γωνία σκέδασης $\theta=90^\circ$ αυξήθηκε. Οι τιμές των εντάσεων αυτών είναι μεγαλύτερες σε σχέση με τις αντίστοιχες που μετρήθηκαν σε μίγματα PBS-FBS χωρίς τα συμπολυμερή (όπου η σκεδαζόμενη ένταση από τα συσσωματώματα HMPOx είναι αρκετά μικρότερη). Αυτό αποδόθηκε στην παρουσία συσσωματωμάτων που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση των αρχικών συσσωματωμάτων των συμπολυμερών με τις πρωτεΐνες του FBS (Σχήμα 3.3 και 3.4). Βέβαια, οι τιμές των δεικτών PDI παρέμειναν σχετικά σταθερές (τα δεδομένα αυτά δεν εμφανίζονται στα Σχήματα 3.3 και 3.4).



Σχήμα 3.4: Συνάρτηση κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ για τα νανοσυστήματα των HMPOx3 σε PBS-FBS διαλύματα με αναλογίες PBS/FBS (v/v%): (a) 5-95, (b) 10-90 και (c) 20-80.

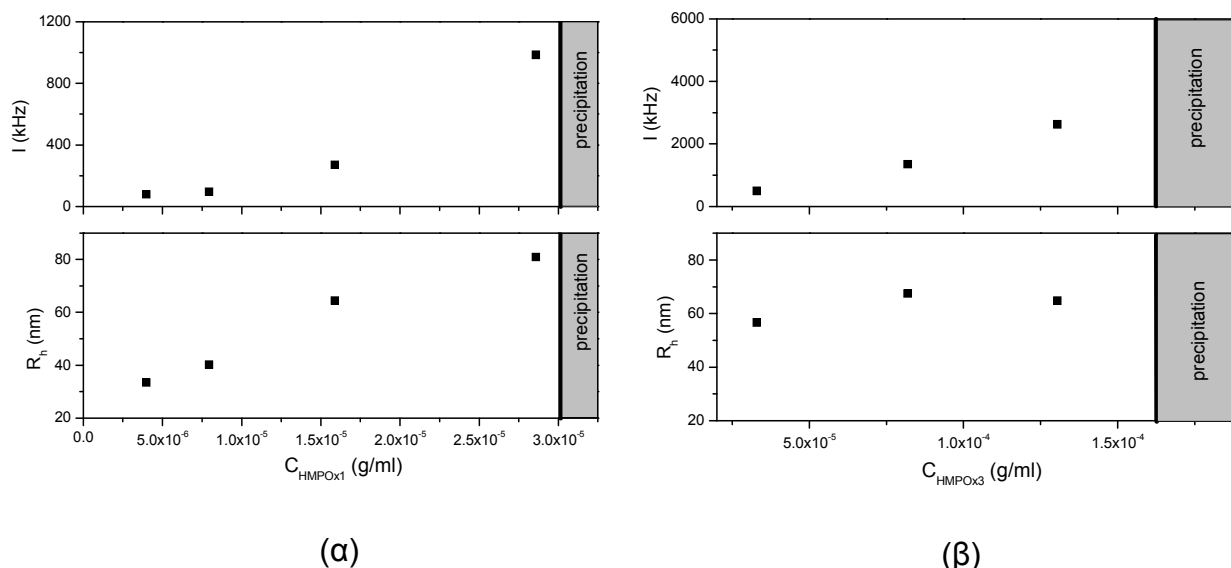
Οι τιμές του ζ- δυναμικού των HMPOx συμπολυμερών σε διαλύματα PBS-FBS (για $C=10^{-3}\text{g/ml}$) επιβεβαιώνουν το σχηματισμό συσσωματωμάτων πολυμερούς/ πρωτεΐνης. Αυτό οφείλεται στο ότι το θετικό φορτίο που έχουν τα HMPOx νανοσωματίδια μειώνεται λόγω συμπλοκοποίησης με τις πρωτεΐνες του FBS, οι οποίες είχαν $\zeta_P = -1.4 \pm 1.9 \text{ mV}$. Στον Πίνακα 3.4, οι τιμές ζ_P των συμπολυμερών δείχνουν μια εξάρτηση από τον λόγο φορτίου HMPOx/ πρωτεΐνης. Επίσης, παρατηρήθηκε μια μείωση του ζ- δυναμικού (Σχήμα 3.3) με αύξηση της συγκέντρωσης του FBS σε διαλύματα HMPOx/ PBS.

3.1.4 Αποτελέσματα υβριδικών συστημάτων αποτελούμενων από HMPOx και DNA

Όπως προαναφέρθηκε στο 1ο κεφάλαιο, ανά κάθε τρίτο άτομο του δομικού σκελετού της PEI ¹⁹¹ υπάρχει ένα άζωτο αμινο-ομάδας, εμφανίζοντας υψηλό κατιοντικό δυναμικό ⁵⁵ και σημαντική ρυθμιστική ικανότητα ^{202, 203}. Ως αποτέλεσμα, η PEI είναι ικανή για τη συμπύκνωση πλασμιδίων DNA και RNA σε σταθερά σύμπλοκα μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ²⁰⁴, αφού αυτά περιέχουν ομάδες COO^- και SO_3^- , οι οποίες υπάρχουν και σε χαμηλού μοριακού βάρους φάρμακα όπως ηπαρίνες (heparins, LMWHs) ¹⁸¹.

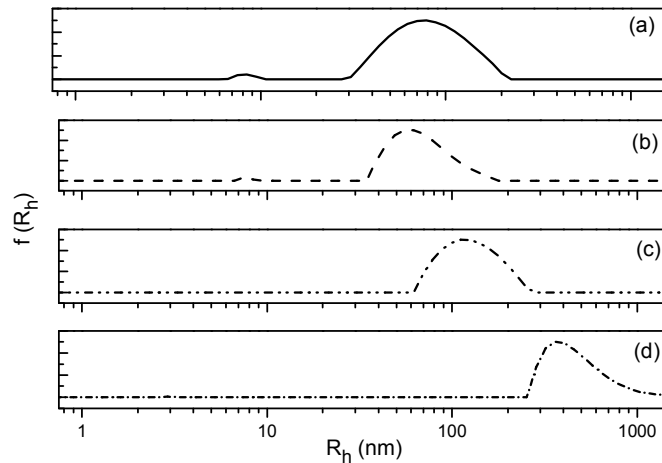
Σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις συμπολυμερούς, δημιουργούνται σταθερά σύμπλοκα HMPOx/DNA, ενώ παρατηρήθηκε καθίζηση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις

του συμπολυμερούς (σκιασμένο μέρος στο Σχήμα 3.5). Δεν πραγματοποιήθηκαν πειράματα σύμπλεξης του DNA με το HMPOx2, λόγω του μικρότερου θετικού φορτίου που είχε το συμπολυμερές αυτό σε PBS διάλυμα, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα HMPOx.



Σχήμα 3.5: Αποτελέσματα DLS των σύμπλοκων HMPOx/DNA σε διαλύματα PBS (με HMPOx1 και HMPOx3 να αφορούν τα (α) και (β) αντίστοιχα). Η συγκέντρωση του DNA ήταν σταθερή και ίση με 10^{-3} g/ml.

Στο Σχήμα 3.5 απεικονίζεται η συσχέτιση του R_h και της I με τη συγκέντρωση των συμπλόκων HMPOx/ DNA σε PBS διάλυμα. Σε γενικές γραμμές, μια αύξηση στη συγκέντρωση του HMPOx σε PBS διάλυμα, οδήγησε σε μεγαλύτερες τιμές των R_h . Ωστόσο, για το σύστημα HMPOx1/ DNA σε PBS διάλυμα, παρατηρήθηκε ελαφρά μείωση της υδροδυναμικής ακτίνας σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες της $C_{\text{HMPOx1/PBS}} = 0.3 \cdot 10^{-5}$ g/ml η οποία συνοδεύει την αύξηση της μάζας των συμπλόκων. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει μια πιθανή κατάρρευση των συμπλόκων που οδηγεί σε διαχωρισμό φάσης από το διάλυμα. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για το σύστημα HMPOx3/ DNA σε PBS με τη μείωση της R_h που εμφανίζεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες της $C_{\text{HMPOx3/PBS}} = 16 \cdot 10^{-5}$ g/ml. Οι διαφορετικές $C_{\text{HMPOx3/PBS}}$ και $C_{\text{HMPOx1/PBS}}$, όπου εμφανίστηκε αυτή η μείωση της υδροδυναμικής ακτίνας οφείλονται στην υψηλότερη περιεκτικότητα σε υδρόφοβο PhOx στο συμπολυμερές HMPOx3.



Σχήμα 3.6: Συνάρτηση κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ για το σύστημα HMPOx3/DNA σε PBS για συγκεντρώσεις πολυμερούς: (a) $C=8 \cdot 10^{-5}$ g/ml, (b) $C=1.3 \cdot 10^{-4}$ g/ml, (c) $C=1.7 \cdot 10^{-4}$ g/ml και (d) $C=2.5 \cdot 10^{-4}$ g/ml.

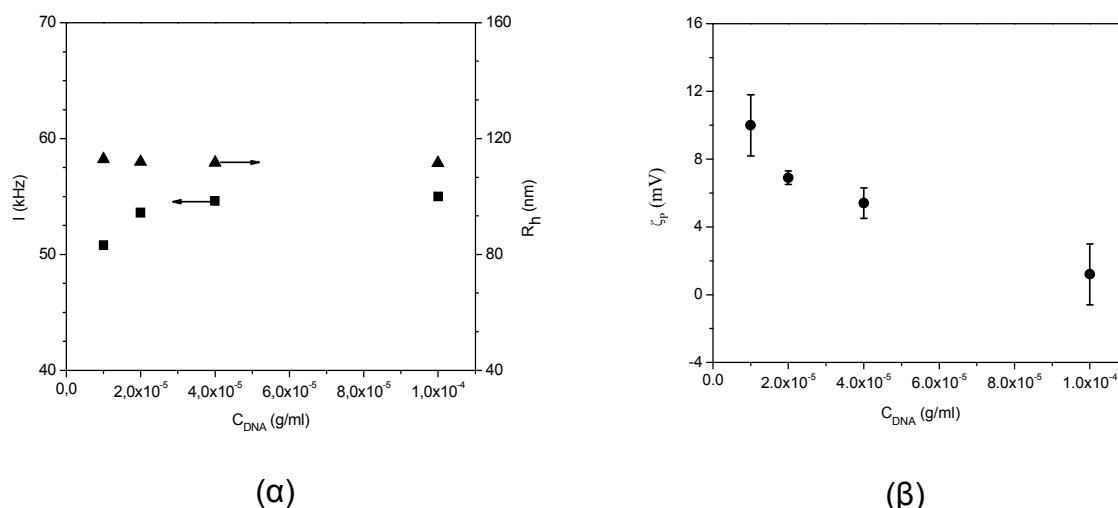
Για παραδείγμα στο σύστημα HMPOx3/ DNA σε PBS, (Σχήμα 3.6) απεικονίζεται η συνάρτηση κατανομής μεγέθους με την R_h , αυξανόμενη της συγκέντρωσης του πολυμερούς. Μπορεί να επιβεβαιωθεί ότι τα συσσωματώματα πάνω από μια συγκεκριμένη συγκέντρωση ξεκινούν να καθιζάνουν, αλλάζοντας παράλληλα την υδροδυναμική ακτίνα τους.

Η αύξηση της R_h με την αύξηση της συγκέντρωσης, στην περίπτωση της HMPOx1, είναι πιο έντονη σε σχέση με το συμπολυμερές HMPOx3. Με άλλα λόγια, σε διαλύματα σταθερής συγκέντρωσης DNA, η προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας συμπολυμερούς (ή αλλιώς συγκέντρωσής του) εμφάνισε τις εξής δύο διαφορετικές συμπεριφορές:

- 1) όταν το υδρόφοβο περιεχόμενο είναι χαμηλό (HMPOx1) οι επιπλέον αλυσίδες ή συσσωματώματα του συμπολυμερούς προσκολλώνται χαλαρά με τα σύμπλοκα αυξάνοντας το μέγεθός τους.
- 2) όταν το υδρόφοβο περιεχόμενο των νανοσυστημάτων είναι υψηλό (HMPOx3) τα σύμπλοκα είναι συμπαγή και οι επιπλέον αλυσίδες ή συσσωματώματα συμπολυμερούς εισέρχονται στα σύμπλοκα και προκαλούν επιπρόσθετη κατάρρευση των αλυσίδων συγκρατώντας τα σύμπλοκα και εμποδίζοντάς τα να αυξήσουν σημαντικά το μέγεθός τους.

Για σταθερή συγκέντρωση HMPOx1 σε PBS ($C=5 \cdot 10^{-4}$ g/ml), η αύξηση της συγκέντρωσης του DNA, προκάλεσε αύξηση της έντασης σκέδασης, αλλά η υδροδυναμική ακτίνα των νανοσωματιδίων μειώθηκε. Από το Σχήμα 3.7, όπου

παρουσιάζονται οι μετρήσεις της ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός, μπορούν να δοθούν πληροφορίες σχετικά με το επιφανειακό φορτίο αυτών των συμπλόκων DNA²⁰². Οι τιμές αυτές υποδεικνύουν ότι οι ομάδες EI βρίσκονται αρχικά κυρίως στην επιφάνεια των HMPOx/ DNA συμπλόκων και με αύξηση της συγκέντρωσης του DNA, το τελευταίο φαίνεται να προσκολλάται έξω από τα HMPOx/ PBS συσσωματώματα. Αυτή η υπόθεση δικαιολογεί²⁰⁵ τη μείωση του ζ- δυναμικού του νανοσυστήματος (Σχήμα 3.7).



Σχήμα 3.7: (α) Ένταση και υδροδυναμική ακτίνα από DLS και (β) ζ-δυναμικό των HMPOx1/DNA συμπλόκων σε PBS διαλύματα.

Οι ακτίνες από SEM (Εικόνα 3.3) των νανοσυσσωμάτων κυμάνθηκαν μεταξύ 150 και 200nm. Οι τιμές είναι ελαφρώς μεγαλύτερες από αυτές που λήφθηκαν από τα πειράματα σκέδασης φωτός. Αυτή η μικρή διαφορά οφείλεται στη διαφορετικότητα των χρησιμοποιούμενων μεθόδων. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η μεν SEM τεχνική αφορά ξηρά δείγματα, η δε σκέδαση φωτός σχετίζεται με τη συμπεριφορά των σωματιδίων σε διαλύματα (υγρή κατάσταση). Για παράδειγμα, τα HMPOx3/ DNA σύμπλοκα (Εικόνα 3.3) δείχνουν μια σφαιρική μορφολογία και είναι επιρρεπείς στην παραμόρφωση επί του στερεού υποστρώματος.



Εικόνα 3.3: SEM απεικόνιση των HMPOx3/DNA συμπλόκων σε PBS διάλυμα ($C = 3.3 \cdot 10^{-4} \text{ g/ml}$).

Μια παράμετρος που καθορίζει το σχηματισμό των πολυσυμπλόκων είναι ο λόγος N/ P²⁰⁶. Πιο συγκεκριμένα, ο N/ P ορίστηκε ως ο λόγος του αζώτου επί των PEI αλυσίδων προς το φώσφορο του νουκλεοτιδίου στο DNA. Είναι γνωστό ότι αυτή η παράμετρος συσχετίζεται με την αποτελεσματικότητα της επιμόλυνσης και κυτταροτοξικότητας²⁰⁷.

Στα πειράματά μας υπήρχαν δύο διαφορετικές κλίμακες του λόγου N/ P:

α) Όταν η συγκέντρωση του DNA ήταν σταθερή και μεταβάλλετο η αντίστοιχη C των συμπολυμερών HMPOx, τότε ο N/ P = 0.02- 0.1 για HMPOx1 και 0.02- 0.12 για HMPOx3 αντίστοιχα. Ο περιορισμός στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, προκαλείται από το ίδιο το σύστημα, λόγω της καθίζησης.

β) Στην περίπτωση που η συγκέντρωση HMPOx ήταν σταθερή και η C του DNA μεταβάλλετο, η περιοχή του λόγου N/ P ήταν 17- 170 για HMPOx1 και 20- 200 για HMPOx3 αντίστοιχα. Οι λόγοι N/ P μεταξύ 5 και 20²⁰⁷ καθώς και μεταξύ 20 και 80²⁰⁶ σε PEI/ DNA σύμπλοκα έχουν αναφερθεί σε μελέτες μετάδοσης και κυτταροτοξικότητας. Ως εκ τούτου, συμπεραίνεται ότι τα HMPOx/ DNA σύμπλοκα αποτελούν συστήματα σχετικά για τέτοιου είδους βιοϊατρικές εφαρμογές.

3.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση για τα υβριδικά QIm νανοσυστήματα

3.2.1 Παρασκευή και χαρακτηρισμός των τεταρτοταγών πολυμερών ιμιδαζολίου QIm

Συνήθως, απαιτείται μια μεγάλη μοριακή περίσσεια του τεταρτοταγοποιητικού παράγοντα σε σχέση με τα πρόδρομα πολυμερή ώστε να επιτευχθεί ποσοτική τροποποίηση μετά τον πολυμερισμό²⁰⁸⁻²¹⁰.

Στην περίπτωση της τεταρτοταγοποίησης των βασισμένων σε PCMS πολυμερών, η ποσοτική (ή αλλιώς 100%) τροποποίηση επιτεύχθηκε με μέτρια περίσσεια (ισοδύναμο 2.5) του NBIZ, σε σχέση με τις CH₂-Cl ομάδες των τριών προδρόμων πολυμερών (Πίνακας 2.2, κεφ. 2). Στις αντιδράσεις τεταρτοταγοποίησης με το ομοπολυμερές PCMS και το τυχαίο PCMS-co-PS συμπολυμερές χρησιμοποιήθηκε επίσης και ισοδύναμο 1.25 του NBIZ.

Στον Πίνακα 3.5, παρουσιάζονται συνοπτικά τα μοριακά χαρακτηριστικά των προδρόμων και των QIm πολυμερών, που βασίζονται σε PCMS.

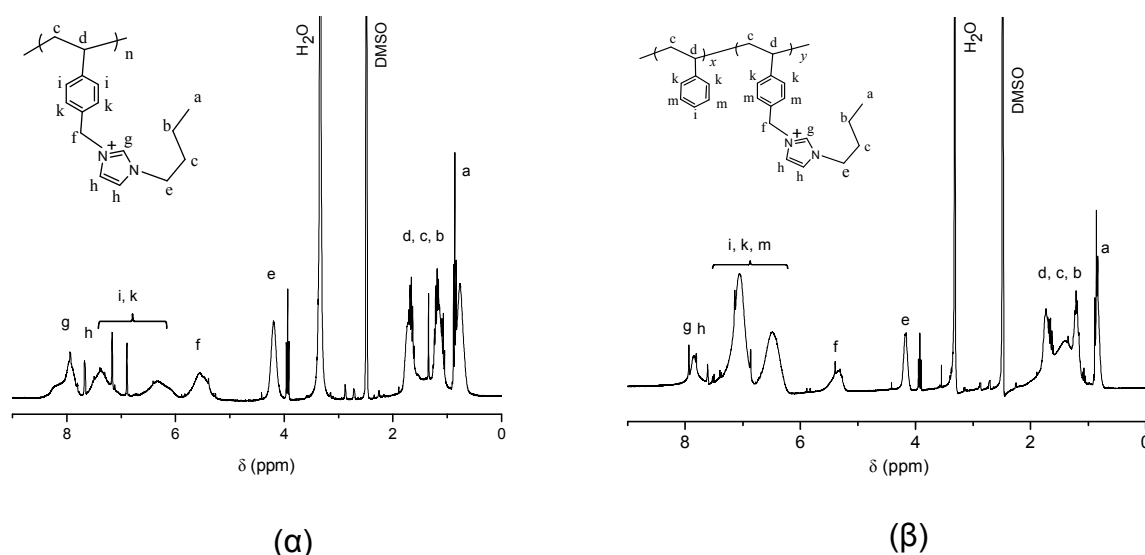
Πίνακας 3.5: Μοριακά χαρακτηριστικά των προδρόμων και των QIm πολυμερών, που βασίζονται σε PCMS.

Δείγμα	ισοδύν. NBIZ	M_w^a (10 ⁴ g/mol)	$I=M_w/M_n^b$	X_{Cl}^a	% wt PS ^a	% μετατροπή ^a
PCMS	-	1.1	1.35	72	-	-
PCMS-b-PS	-	1.65	1.14	12	89	-
PS-co-PCMS	-	1.0	1.28	30	54	-
QIm-PCMS1	1.25	1.47	1.35		-	73
QIm-PCMS2	2.5	1.99	1.35	-	-	100
QIm-PCMS-b-PS	2.5	1.8	1.14	-	82	100
QIm-PS-co-PCMS	είτε για 1.25, είτε για 2.5	1.37	1.28	-	39	100

^α από ¹H NMR ανάλυση (με διαλύτη DMSO-d₆)

^β το I θεωρήθηκε ίδιο προ και μετά την τεταρτοταγοποίηση

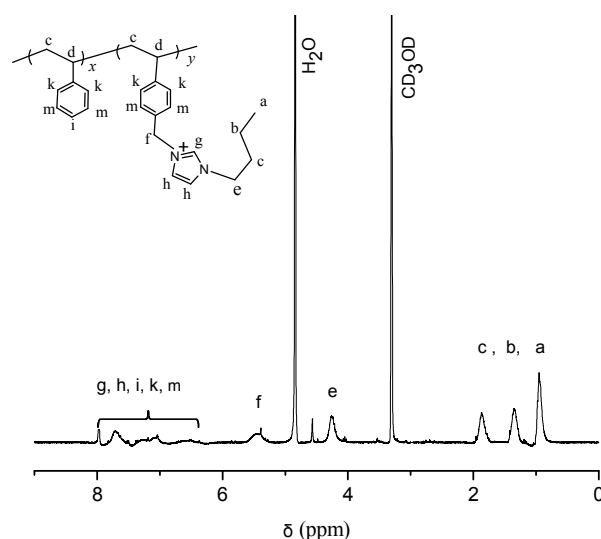
Για τις αντιδράσεις παρασκευής τεταρτοταγών πολυμερών ιμιδαζολίου του PCMS ομοπολυμερούς, επιτεύχθηκε 73% και 100% μετατροπή χρησιμοποιώντας 1.25 και 2.5 ισοδύναμα του NBIZ αντίστοιχα. Στην περίπτωση των PCMS ομοπολυμερών, οι ομάδες CH₂-Cl είναι κοντά η μία στην άλλη. Οι χωρικοί περιορισμοί που σχετίζονται με την πρόσβαση των NBIZ ομάδων μειώνουν την απόδοση της αντίδρασης παρασκευής τεταρτοταγών πολυμερών ιμιδαζολίου όταν χρησιμοποιείται μικρή μοριακή περίσσεια NBIZ. Στην περίπτωση του τυχαίου συμπολυμερούς (QIm-PCMS-co-PS), οι ομάδες CH₂-Cl είναι λιγότερο κοντά και πιο εύκολα προσβάσιμες από του ομοπολυμερούς. Η πλήρης τροποποίησή τους λαμβάνεται ακόμη και σε χαμηλή μοριακή περίσσεια NBIZ. Τα δύο αμφίφιλα τυχαία QIm-PCMS-co-PS1 και QIm-PCMS-co-PS1 συμπολυμερή που συντέθηκαν με 1.25 και 2.5 ισοδύναμα του NBIZ, έχουν την ίδια χημική δομή και περίπου 40% PS, με το PS υδρόφοβο τμήμα. Θα παρουσιαστούν λοιπόν, ως αποτελέσματα για το QIm-PCMS-co-PS αντί και για τα δύο τυχαία παραχθέντα συμπολυμερή. Όπως αναγράφεται κάτωθι του Πίνακα 3.5, τα Mw καθώς και τα %wt PS στα πρόδρομα και QIm συμπολυμερή εκτιμήθηκαν με ανάλυση ¹H NMR σε διαλύτη DMSO-d₆.



Σχήμα 3.8: Φάσματα του ¹H NMR των πολυμερών: (α) QIm-PCMS2 και (β) QIm-PS-co-PCMS σε διαλύτη DMSO-d₆.

Για παράδειγμα, στο Σχήμα 3.8(α) και 3.8(β) φαίνονται τα ^1H NMR φάσματα των QIm-PCMS2 και QIm-PS-co-PCMS συμπολυμερών αντίστοιχα. Το πολικό DMSO- d_6 μπορεί να απορρόφησε υγρασία, γι' αυτό το νερό εμφανίζεται στο 3.3 ppm στα φάσματα του ^1H NMR. Οι χημικές μετατοπίσεις για $\delta = 0.5\text{--}2.0$ ppm αντιστοιχίστηκαν στα υδρογόνα του απλού sp^3 C-H (CH_3 , CH_2 και CH) δεσμού των θέσεων a, b, c και d (Σχήμα 3.8). Βέβαια, οι αντίστοιχες ομάδες των πρωτονίων των απλών sp^3 C-H στο Σχήμα 3.8 (β) έδειξαν μια ευρύτερη κορυφή στα 1.1- 2.0ppm από τις αντίστοιχες του Σχήματος 3.8 (α). Οι τιμές των εμβαδών κάτω από τις κορυφές των 1.5-2.0 ppm είναι μικρότερες στο Σχήμα 3.8 (α) σε σύγκριση με αυτές στο Σχήμα 3.8 (β). Το γεγονός αυτό οφείλεται στα υδρογόνα του C-H τα οποία συνδέονται με το C_6H_5 του PS. Στο 3.9-4.3 ppm συντονίζονται τα δύο υδρογόνα του CH_2 που βρίσκονται κοντά στο άζωτο του ιμιδαζολίου ($-\text{CHNCH}_2$, θέση e στο Σχήμα 3.8). Τα υδρογόνα της ομάδας CH_2 που βρίσκεται μεταξύ των C_6H_4 και $\text{NC}_3\text{H}_3\text{N}$ αναγνωρίστηκαν να συντονίζονται σε $\delta = 5.2\text{--}5.7$ ppm (θέση f, στο Σχήμα 3.8). Επιπλέον, η ύπαρξη των δύο και τριών υδρογόνων του αρωματικού C-H δεσμού μπορούν να συσχετιστούν με τις ευρείες κορυφές στα 6-7.6 ppm του Σχήματος 3.8 (α) (C_6H_4) και του Σχήματος 3.8 (β) (C_6H_4 , C_6H_5) αντίστοιχα. Το πρωτόνιο στο $-\text{N}=\text{CH}-\text{N}-$ του ιμιδαζολίου παρατηρήθηκε ως ευρεία κορυφή να συντονίζεται σε $\delta = 8$ ppm (θέση g, Σχήμα 3.8), ενώ τα δύο πρωτόνια του $\text{CH}=\text{CH}$ (θέση h) της ομάδας NCHCHN προσδιορίστηκαν να συντονίζονται στα 7.7 ppm.

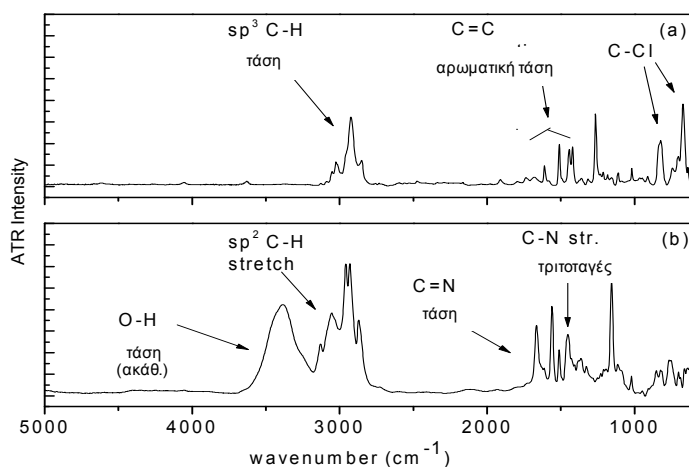
Συμπληρωματικά, τα QIm πολυμερή διαλύθηκαν σε CD_3OD για ^1H NMR ανάλυση. Για παράδειγμα το φάσμα ^1H NMR του QIm-PS-b-PCMS συμπολυμερούς κατά συστάδες, σε CD_3OD διαλύτη αναλύεται κατωτέρω στο Σχήμα 3.9.



Σχήμα 3.9: ^1H NMR (300MHz) φάσμα του QIm-PS-b-PCMS σε $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$.

Τα QIm πολυμερή εμφάνισαν ελαφρά μπλε απόχρωση όταν αυτά διαλύθηκαν σε $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$. Αυτή η χαρακτηριστική απόχρωση μπορεί να δείχνει σχηματισμό μικκυλίων, γεγονός που επηρεάζει τις χημικές μετατοπίσεις στην ^1H NMR τεχνική.

Εκτός από την ^1H NMR τεχνική, η ύπαρξη των αναμενόμενων χημικών ομάδων στις αλυσίδες των QIm αποδείχθηκε και με ATR-FTIR φασματοσκοπία. Τα φάσματα ATR-FTIR των προδρόμων συμπολυμερών σε στερεά κατάσταση συγκρίθηκαν με αυτά των τεταρτοταγών QIm συμπολυμερών. Στο Σχήμα 3.10 παρουσιάζονται τα φάσματα ATR-FTIR των (α) PCMS και (β) QIm-PCMS2 πολυμερών.



Σχήμα 3.10: Τα φάσματα ATR- FTIR των (α) PCMS and (β) QIm-PCMS2 πολυμερών.

Οι μετα- και παρα- υποκατεστημένες αρωματικές ενώσεις έχουν χαρακτηριστικές ζώνες που εμφανίζονται μεταξύ 680-900 cm^{-1} (π.χ. δονήσεις κάμψης των αρωματικών sp^2 C-H των ομάδων C_6H_4 , Σχήμα 3.10 (a)). Μόνο στο Σχήμα 3.10 (a), η έκταση του δεσμού sp^3 C-Cl παρατηρείται να συντονίζεται στους κυματάρθους 680 και 810 cm^{-1} . Τόσο στην (a) όσο και στην (b) απεικόνιση του Σχήματος 3.10, οι δονήσεις έκτασης της -C=C- ομάδας των αρωματικών C (δακτύλιος βενζολίου) παρατηρήθηκαν στους 1400- 1600 cm^{-1} κυματαριθμούς. Μετά την αντίδραση δημιουργίας τεταρτοταγών πολυμερών ιμιδαζολίου, η δόνηση έκτασης του C=N έγινε εμφανής στους 1683 cm^{-1} . Οι κορυφές σε 2800-3120 cm^{-1} σχετίζονται με την ασύμμετρη και συμμετρική έκταση των sp^3 (-CH_3 , $\text{-CH}_2\text{-}$) και sp^2 C-H (=CH-) αντίστοιχα. Μετά από αντίδραση 48 ωρών, αυτές οι δονήσεις είναι έντονες και εκτείνονται μέχρι τους 3170 cm^{-1} λόγω της αύξησης των =CH , $\text{-CH}_2\text{-}$ και -CH_3 ομάδων στα πολυμερή. Η έκταση OH παρατηρήθηκε σε μια ευρεία κορυφή των 3380 cm^{-1} λόγω του νερού.

3.2.2 Μελέτες αυτο-οργάνωσης των QIm πολυμερών σε υδατικά και PBS διαλύματα

A) Υδατικά διαλύματα: Το συμπολυμερή κατά συστάδες και τα τυχαία συμπολυμερή είχαν χαμηλότερη διαλυτότητα στο νερό σε σύγκριση με εκείνη των ομοπολυμερών. Το γεγονός αυτό αναμένεται αφού στα υπόλοιπα συμπολυμερή εκτός των QIm-PCMS, υπάρχουν οι ομάδες του πολυστυρενίου. Κατά συνέπεια, μόνο τα QIm-PCMS1 και QIm-PCMS2 ομοπολυμερή είχαν την ικανότητα να διαλυθούν κατευθείαν σε απεσταγμένο νερό. Από την άλλη τα QIm-PCMS-b-PS και QIm-PS-co-PCMS τεταρτοταγή προϊόντα δεν μπορούσαν να διαλυθούν απευθείας στο νερό, λόγω των επιπλέον υδρόφοβων περιοχών PS (Πίνακας 3.5). Στο πρωτόκολλο παρασκευής των υδατικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε ένας κοινός και καλός διαλύτης για τα PS, PCMS και NBIZ, το THF, εξασφαλίζοντας πλήρη διαλυτοποίηση των προϊόντων QIm και έγινε κατόπιν μεταφορά σε νερό όπως αναφέρεται στο πειραματικό μέρος. Τα αποτελέσματα σκέδασης φωτός για τα υδατικά διαλύματά τους συνοψίζονται στον Πίνακα 3.6.

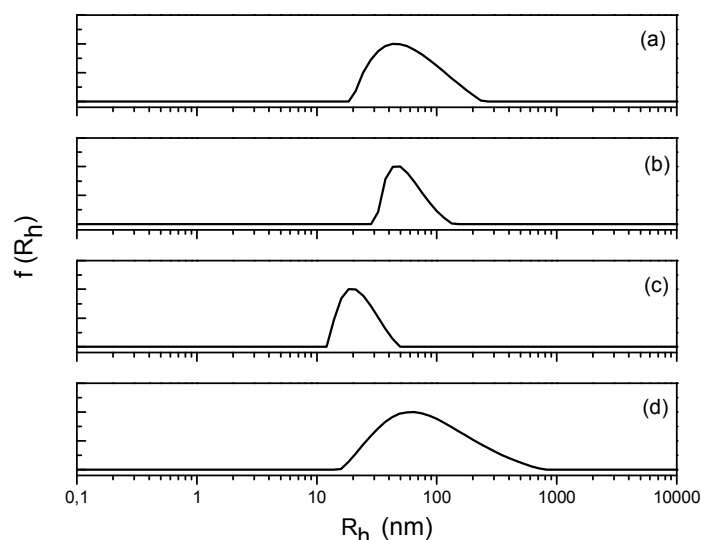
Πίνακας 3.6: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός για τα υδατικά διαλύματα των QIm πολυμερών σε pH~ 7.

Δείγμα	$M_{w, app}^{\alpha}$ (10^6 g/mol)	N_w^{α}	R_h^{β} (nm)	PDI^β	R_g^{α} (nm)	R_h^{α} (nm)	ρ =R_g/R_h^{α}	ζ_P (mV)
QIm-PCMS1	2.3	155	49	0.27	36	72	0.50	17.6(±1.9)
QIm-PCMS2	3.6	183	58	0.42	126	95	1.33	17.8 (±0.5)
QIm-PCMS-b-PS	0.6	33	24	0.40	42	50	0.84	36.6(±3.9)
QIm-PS-co-PCMS	2.7	197	67	0.46	31	57	0.55	24.7(±3.4)

^α μετά από προέκταση σε $q = 0$

^β από cumulants ανάλυση σε γωνία σκέδασης 90°

Σε όλα τα υδατικά QIm διαλύματα παρατηρήθηκε η ύπαρξη νανοσυσσωματωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τις μετρήσεις της δυναμικής σκέδασης φωτός, ένας κύριος πληθυσμός συσσωματωμάτων βρέθηκε στα διαλύματα αυτά. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ²¹¹ ότι σε ουδέτερο pH ο δακτύλιος του ιμιδαζολίου είναι υδρόφοβος. Τα συμπολυμερή QIm είναι αμφίφιλα αφού οι PS ομάδες έχουν υδρόφοβη φύση ²¹². Στο παρακάτω Σχήμα 3.11, παρουσιάζεται η συνάρτηση κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ έναντι της R_h για τα υδατικά διαλύματα των QIm πολυμερών (σε $C=10^{-3}$ g/ml, pH=7 και γωνία σκέδασης 90°).



Σχήμα 3.11: Διάγραμμα συνάρτησης κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ έναντι της υδροδυναμικής ακτίνας $R_h(\text{nm})$ για τα υδατικά διαλύματα των (a) QIm-PCMS1, (b) QIm-PCMS2, (c) QIm-PS-b-PCMS και (d) QIm-PC-co-PCMS πολυμερών, με $C=10^{-3}\text{g/ml}$ και σε γωνία σκέδασης 90° .

Από τον Πίνακα 3.6 φαίνεται ότι η R_h των QIm-PCMS2 συσσωματωμάτων είναι σχετικά κοντά με εκείνη των QIm-PCMS1, ενώ η γυροσκοπική ακτίνα, R_g , της δεύτερης είναι σχεδόν 4 φορές υψηλότερη από την αντίστοιχη της QIm-PCMS1. Ως εκ τούτου, υπάρχει μια σημαντική διαφορά ως προς το σχήμα των συσσωματωμάτων των ομοπολυμερών: του QIm-PCMS2 ($\rho = 1.33$) σε σύγκριση με του QIm-PCMS1 ($\rho = 0.50$). Το πολυμερές λοιπόν, με τον υψηλότερο βαθμό τεταρτοταγοποίησης δημιουργεί συσσωματώματα με μορφολογία ανοικτής δομής (λόγω διόγκωσης από το διαλύτη), ενώ το άλλο (QIm-PCMS1) με το χαμηλότερο βαθμό τεταρτοταγοποίησης σχηματίζει πιο συμπαγείς σφαιρικές νανοδομές, λόγω της υψηλότερης υδροφοβικότητας της κύριας αλυσίδας²¹³.

Για την εύρεση του φαινόμενου μοριακού βάρους υπολογίστηκαν οι τιμές των dn/dC . Είναι γνωστό ότι $n(\text{H}_2\text{O}) = 1.333$ ²¹⁴, $n(\text{PBS}) = 1.334$ ²¹⁵, $n(\text{NBIZ}) = 1.508$ (με $d = 0.94\text{ g/ml}$ ²¹⁶) και $n(\text{PCMS}) = 1.570$ (με $d = 1.074\text{ g/ml}$ ²¹⁷). Ο διαφορικός δείκτης διάθλασης του PCMS στο νερό είναι $dn/dC = 0.223\text{ ml/g}$, ενώ αυτός του NBIZ είναι $dn/dC = 0.186\text{ ml/g}$. Ο dn/dC του PS σε νερό υπολογίστηκε από την τιμή του σε THF (0.147 ml/g)¹⁸⁶ και την πυκνότητά του ($d = 1.05\text{ g/ml}$) με αποτέλεσμα να ισούται με 0.253 ml/g . Χρησιμοποιήθηκε ένας απλός κανόνας του γραμμικού συνδυασμού της κατά βάρους συνεισφοράς των επιμέρους dn/dC , για τον υπολογισμό του ολικού dn/dC των συμπολυμερών. Για παράδειγμα, ο ολικός dn/dC του QIm-PCMS-b-PS (82%wt PS), υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\left. \frac{dn}{dC} \right|_{\text{total}} = \% \{QIm - PCMS\} \times \left. \frac{dn}{dC} \right|_{QIm-PCMS} + \% \{PS\} \times \left. \frac{dn}{dC} \right|_{PS} \quad (\text{εξ. 3.1})$$

με $\% \{QIm-PCMS\}=18\%wt$, $\% \{PS\}=82\%wt$ και

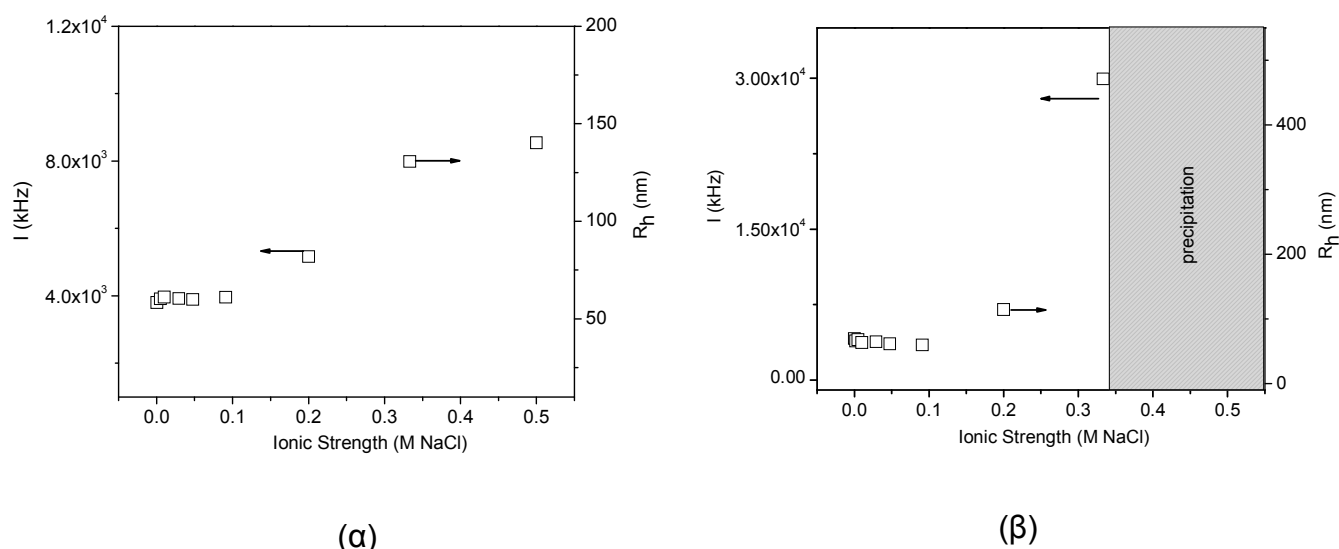
$$\left. \frac{dn}{dC} \right|_{QIm-PCMS} = \frac{MW_{QIm}}{MW_{QIm-PCMS}} \times \left. \frac{dn}{dC} \right|_{QIm} + \frac{MW_{PCMS (without Cl)}}{MW_{QIm-PCMS}} \times \left. \frac{dn}{dC} \right|_{PCMS} \quad (\text{εξ. 3.2})$$

Το φαινόμενο μοριακό βάρος ($M_{w,app.}$) των συσσωματωμάτων του QIm-PCMS2 ομοπολυμερούς είναι ελαφρώς υψηλότερο από εκείνο του QIm-PCMS1 (Πίνακας 3.6). Το ίδιο ισχύει και για τους αριθμούς συσσωμάτωσης, N_w . Ο δείκτης της πολυδιασποράς των συσσωματωμάτων του QIm-PCMS2 ομοπολυμερούς είναι μεγαλύτερος από αυτόν του QIm-PCMS1. Οι τιμές των ζ_p των QIm-PCMS ομοπολυμερών είναι περίπου 18 mV. Το γεγονός αυτό, δείχνει ότι και οι δύο τύποι συσσωματωμάτων εμφανίζουν περίπου τον ίδιο αριθμό επιφανειακών φορτίων. Επίσης, το $M_{w, app.}$ του QIm-PS-co-PCMS είναι ίσο με εκείνο του QIm-PCMS2, όπου και αυτό το πολυμερές είχε 100% μετατροπή. Ο λόγος ρ του QIm-PS-co-PCMS συμπολυμερούς ήταν 0.55. Η δομή αυτών των συσσωματωμάτων φαίνεται να είναι σφαιρική και να εξαρτάται λιγότερο ισχυρά από το βαθμό τεταρτοταγοποίησης, εξαιτίας της παρουσίας των υδρόφοβων μονάδων του στυρενίου. Η R_h των QIm-PS-co-PCMS συσσωματωμάτων είναι περίπου 70 nm με $N_w=197$ (τιμές υψηλότερες από τις τιμές των QIm –PCMS συμπολυμερών, Πίνακας 3.6) και $PDI=0.46$. Η τιμή του ζ -δυναμικού του QIm-PS-co-PCMS νανοσυστήματος ήταν περίπου +25 mV. Τα νανοσωματίδια των QIm-PS-b-PCMS συμπολυμερών εμφάνισαν μορφολογία κοντινή σε συμπαγή σφαίρα ($\rho= 0.84$). Αυτά τα σφαιρικά μικκύλια έχουν πυρήνα το PS και στέμμα το QIm-PCMS. Η R_h των συσσωματωμάτων αυτών ήταν η χαμηλότερη από την αντίστοιχη όλων των QIm δειγμάτων, πιθανώς λόγω της δομής του QIm-PS-b-PCMS. Όπως αναμενόταν οι τιμές του ζ_p των QIm-PS-b-PCMS μικκυλίων είναι θετικές (Πίνακας 3.6).

Εξάρτηση της δομής των συσσωματωμάτων των QIm πολυμερών από τη θερμοκρασία και την ιοντική ισχύ στα υδατικά τους διαλύματα. Η αύξηση της θερμοκρασίας των υδατικών διαλυμάτων των παραχθέντων πολυμερών από 25°C έως

55°C, δεν προκάλεσε αλλαγές στα χαρακτηριστικά των συσσωματωμάτων. Με την αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυμάτων των QIm πολυμερών, η μάζα των συσσωματωμάτων αυξάνεται, ενώ δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο μέγεθος (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Όταν το pH μεταβάλλεται από 7 έως 9, οι τιμές του $M_{w,app}$ και του N_w βρέθηκαν σταθερές, ενώ παρατηρήθηκε μια ελαφρά αύξηση της R_h των υδατικών διαλυμάτων (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Ως εκ τούτου, οι μεταβολές της θερμοκρασίας και του pH δεν αλλοιώνουν τη δομή των νανοσωματιδίων.

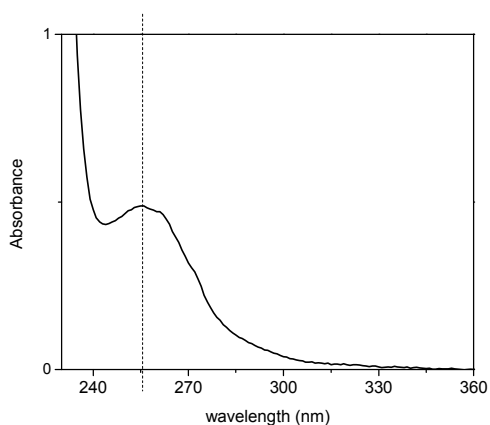
Επιπροσθέτως, ερευνήθηκε η επίδραση του άλατος στη δομή και το μέγεθος των συσσωματωμάτων. Η ιοντική ισχύς του μέσου μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη δομή και τη διαμόρφωση των QIm πολυμερών, δεδομένου ότι αυτά έχουν τη φύση πολυηλεκτρολυτών. Οι τιμές τόσο της μάζας όσο και του μεγέθους όλων των συσσωματωμάτων των QIm πολυμερών στα υδατικά διαλύματα παρέμειναν αμετάβλητες για χαμηλή ιοντική ισχύ (IS) μικρότερη ή ίση με 0.1M NaCl. Για υψηλότερη συγκέντρωση άλατος, τα ομοπολυμερή έδειξαν αύξηση των εντάσεων σκέδασής τους και των υδροδυναμικών ακτίνων τους (Σχήμα 3.12). Αυτή η δευτερεύουσα συσσωμάτωση πρέπει να ήταν αποτέλεσμα των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων θωράκισης οι οποίες προέρχονται από την παρουσία χαμηλής μοριακής μάζας ηλεκτρολύτη στα συστήματα. Αυτή υποβαθμίζει την ποιότητα του διαλύτη για τις αλυσίδες²¹⁸. Σε αυτά τα διαλύματα δεν παρατηρήθηκε καθίζηση. Από την άλλη μεριά, τα υδατικά διαλύματα των QIm-PS-b-PCMS συμπολυμερών εμφάνισαν θολότητα (το οποίο είναι σημάδι καθίζησης) για IS ανωτέρω των 0.2M NaCl, ενώ το υδατικό διάλυμα του QIm-PS-co-PCMS τυχαίου συμπολυμερούς απέκτησε θολότητα για ιοντική ισχύ μεγαλύτερη της 0.33M NaCl. Μέχρι τα 0.2 και 0.3M NaCl, αυτά τα νανοσωματίδια μεγάλωσαν σε μέγεθος και σε μάζα. Αυξάνοντας όμως περαιτέρω τη συγκέντρωση άλατος, παρατηρήθηκε μείωση της έντασης της σκέδασης φωτός. Επίσης, καθίζηση των νανοσυσσωματωμάτων άρχισε να γίνεται ορατή σχεδόν αμέσως σε αυτά τα διαλύματα. Στο Σχήμα 3.12 παρουσιάζονται ως παραδείγματα των παραπάνω LS αποτελεσμάτων, τα διαγράμματα εξάρτησης των I και R_h των διαλυμάτων των QIm-PCMS2 και QIm-PS-co-PCMS πολυμερών έναντι της IS. Σε όλες τις περιπτώσεις, υπάρχουν αλληλεπιδράσεις των πολυμερικών αλυσίδων των διαφορετικών συσσωματωμάτων καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση άλατος.



Σχήμα 3.12: Διαγράμματα σκεδαζόμενης έντασης και υδροδυναμικής ακτίνας των υδατικών διαλυμάτων των: (α) QIm-PCMS2 και (β) QIm-PS-co-PCMS πολυμερών (με $C_{QIm}=10^{-3}$ g/ml) συναρτήσει της C_{NaCl} .

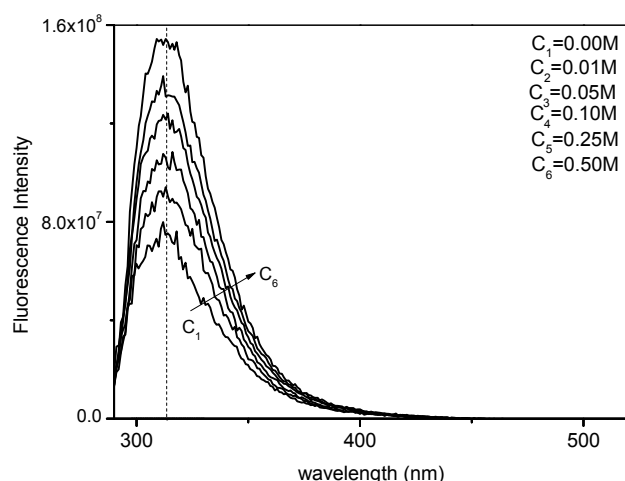
Ιοντική ισχύς των QIm πολυμερών, σε υδατικά διαλύματα – Πειράματα φασματοσκοπίας UV-ορατού και φθορισμομετρίας. Τα κατιοντικά πολυμερή που συντέθηκαν, έδειξαν εγγενείς φωτοφυσικές ιδιότητες, δηλαδή εμφάνισαν ισχυρή απορρόφηση στην UV-ορατή περιοχή καθώς και φθορισμό. Ως εκ τούτου, εξετάστηκε η ύπαρξη τυχόν μεταβολών στα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού συναρτήσει της IS του διαλύματος, δεδομένου ότι η μεταβολή της συγκέντρωσης άλατος αναμένεται να αλλάξει την κατάσταση συσσωμάτωσης και τη διαμόρφωση των πολυμερικών αλυσίδων στα συσσωματώματα. Αυτές οι μεταβολές με τη σειρά τους μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγές στις φωτοφυσικές ιδιότητες των πολυμερών. Τα παράγωγα του χλωρομεθυλο στυρενίου (chloromethyl styrene, CMS) με ιμιδαζόλη χρησιμοποιούνται σε πολλές φωτογραφικές εφαρμογές και δίνουν φωτοευαίσθητες ρητίνες²¹⁹. Δεν είναι εύκολο να εξηγηθεί πλήρως η επίδραση της ιοντικής ισχύος με την UV -ορατού και του φθορισμού απορρόφησης ένεκα των πολλών διαφορετικών παραγόντων που επηρεάζουν τα φάσματα, όπως διαμοριακοί δεσμοί, αριθμός συσσωμάτωσης, θολερότητα κ.ά.. Στα φάσματα UV-ορατού και φθορισμού, τα μέγιστα μήκη κύματος απορρόφησης (λ_{max}) των υδατικών QIm διαλυμάτων εμφανίστηκαν στο 258nm και 313nm, αντίστοιχα. Για παράδειγμα, στα φάσματα UV -ορατού του QIm-PCMS2 πολυμερούς σε νερό ως συνάρτηση της ιοντικής ισχύος, η λ_{max} και η απορρόφηση των κορυφών δεν άλλαξε με την ιοντική ισχύ του διαλύματος (Σχήμα 3.13, $C_{NaCl}=0.1$ M).

Συγκρίνοντας την απορρόφηση των UV-ορατού φασμάτων των QIm-PCMS1 και QIm-PCMS2 υδατικών διαλυμάτων, μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι η μία του QIm-PCMS1 (με χαμηλότερο περιεχόμενο ιμιδαζολίου) ήταν χαμηλότερη από την άλλη του 2ου ομοπολυμερούς (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

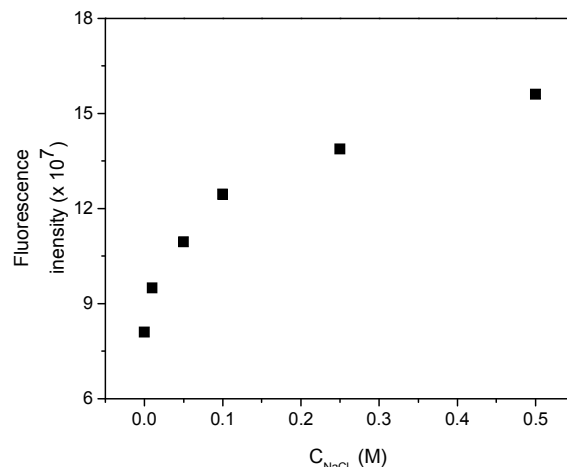


Σχήμα 3.13: Φάσμα UV-ορατού για υδατικά QIm-PCMS2 διαλύματα ($C_{NaCl}=0.1M$)

Στα φάσματα φθορισμού, το λ_{max} δεν μετατοπίστηκε μεταβάλλοντας την ιοντική ισχύ του μέσου (Σχήμα 3.14 (α)). Για το κατιοντικό QIm-PCMS2 ομοπολυμερές, στο Σχήμα 3.14 (β) φαίνεται ότι όσο υψηλότερη είναι η ιοντική ισχύς, τόσο μεγαλύτερη γίνεται η ένταση φθορισμού (παράλληλα με την αύξηση του αριθμού συσσωμάτωσης).



(α)



(β)

Σχήμα 3.14: (α) Φάσματα φθορισμού και (β) έντασης φθορισμού στα 313nm για QIm-PCMS2 υδατικά διαλύματα ως συνάρτηση της C_{NaCl} .

B) PBS διαλύματα. Οι ιδιότητες των QIm πολυμερών διερευνήθηκαν σε PBS, δεδομένου ότι οι φυσικοχημικές ιδιότητες του τελευταίου είναι πιο κοντά στις φυσιολογικές συνθήκες του ανθρώπινου σώματος. Αυτά τα διαλύματα ενδέχεται να επηρεάζουν την επέκταση της αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη αυτού και τον εντοπισμό των αντισταθμιστικών ιόντων. Όπως και στα υδατικά διαλύματα, για την παρασκευή των PBS διαλυμάτων των παραχθέντων κατιοντικών πολυμερών απαιτήθηκε η χρήση κοινού διαλύτη (THF). Τα αποτελέσματα σκέδασης φωτός των δειγμάτων QIm σε PBS συνοψίζονται στον Πίνακα 3.7.

Πίνακας 3.7: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός για τα QIm πολυμερή ($C=10^{-3}$ g/ml) σε PBS (pH=7.4, $I=0.15M$).

Δείγμα	$M_{w, app.}$ (10^6 g/mol)	N_w	R_h (nm)	PDI	ζ_p (mV)
QIm-PCMS1	2.9	198	62	0.35	11.4(± 0.4)
QIm-PCMS2	5.4	270	81	0.41	11.9 (± 0.2)
QIm-PS-b-PCMS	1.4	76	106	0.39	14.2(± 2.5)
QIm-PS-co-PCMS	3.9	282	85	0.43	9.7(± 0.7)

Σε γωνία σκέδασης 90° , οι τιμές των υδροδυναμικών ακτίνων των QIm πολυμερών σε PBS ήταν υψηλότερες από εκείνες των υδατικών διαλυμάτων, δείχνοντας την παρουσία μεγαλύτερων συσσωματωμάτων. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη μείωση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων- απώσεων μεταξύ των θετικών πολυμερικών αλυσίδων (ομάδες ιμιδαζολίου), αυξάνοντας το συνολικό μέγεθος των συσσωματωμάτων. Επιπλέον, το $M_{w,app.}$ και ο N_w , που καθορίζονται από πολλαπλές γωνίες μέτρησης, έχουν υψηλότερες τιμές από ότι οι αντίστοιχες στα υδατικά διαλύματα. Οι μετρήσεις του επιφανειακού φορτίου (ζ -δυναμικό) των QIm πολυμερών σε PBS διάλυμα επιβεβαίωσαν ότι τα νανοσυσσωματώματά τους ήταν θετικά φορτισμένα. Αυτό αναμενόταν εξαιτίας του θετικού φορτίου του αζώτου στα τμήματα του ιμιδαζολίου. Οι εν λόγω ζ_p τιμές είναι χαμηλότερες από αυτές σε νερό, ένεκα της αύξησης της ιοντικής ισχύος (θωράκιση των νανοσωματιδίων). Για παράδειγμα, το ζ_p των QIm-PCMS2 και QIm-PS-co-PCMS πολυμερών σε PBS διαλύματα ήταν 11.9 (± 0.2) και 9.7 (± 0.7) mV αντίστοιχα.

3.2.3 Συμπλοκοποίηση QIm με τις πρωτεΐνες του FBS και DNA

Τα δεδομένα από σκέδαση φωτός (δυναμική και ηλεκτροφορητική) των QIm πολυμερών σε PBS-FBS (90-10 v/v%) διαλύματα καταγράφονται στον Πίνακα 3.8.

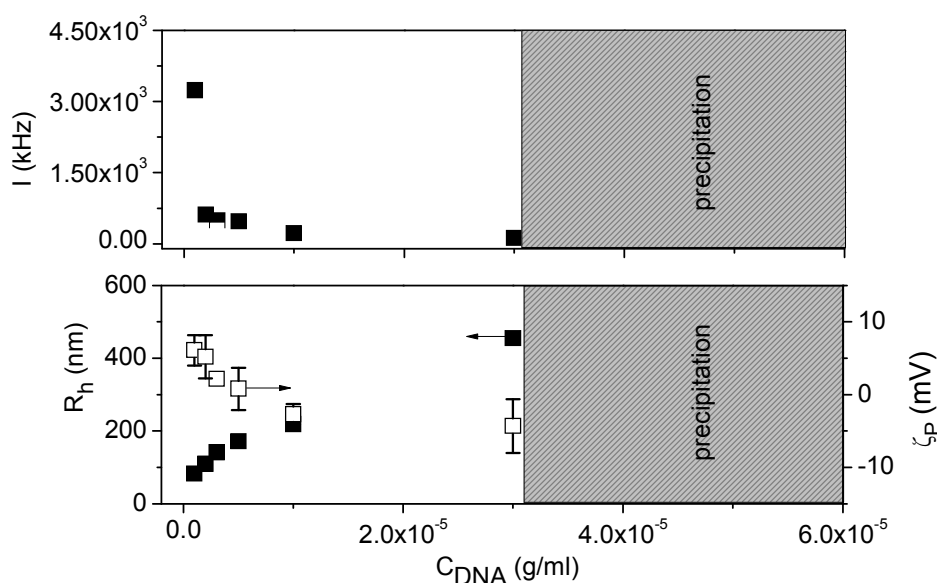
Πίνακα 3.8: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός για τα QIm/FBS πολυμερή σε PBS διάλυμα.

Δείγμα	I_{exp} (10^3 kHz)	$M_{w, \text{app.}}$ (10^6 g/mol)	R_h (nm)	PDI	ζ_P (mV)
QIm-PCMS1	30.1	26.9	182	0.34	-9.3(± 0.1)
QIm-PCMS2	31.3	29.4	198	0.32	1.9 (± 1.3)
QIm-PS-b-PCMS	46.9	30.8	263	0.47	1.11(± 7.9)
QIm-PS-co-PCMS	46.3	36.4	288	0.33	-7.2(± 2.6)

Η R_h των νανοσυσσωματωμάτων στα PBS-FBS διαλύματα βρέθηκε στα περίπου 200 nm. Εν τω μεταξύ, η έντασή τους είναι υψηλότερη σε σχέση με το άθροισμα της έντασης που μετράται σε PBS-FBS διάλυμα χωρίς πολυμερές και της σκεδαζόμενης έντασης του QIm πολυμερούς σε PBS. Αυτή η διαφορά μπορεί να αποδοθεί στο ότι, τα μεγαλύτερα συσσωματώματα (που έχουν μεγαλύτερες R_h) με το μεγαλύτερο αριθμό των αλυσίδων σχηματίστηκαν από την αλληλεπίδραση των αρχικών συσσωματωμάτων πολυμερούς σε PBS διάλυμα με τις πρωτεΐνες του FBS. Οι τιμές του ζ-δυναμικού των QIm πολυμερών σε διάλυμα PBS-FBS (Πίνακας 3.8) επιβεβαίωσαν το σχηματισμό συμπλόκων πολυμερούς/πρωτεΐνης, επειδή το θετικό φορτίο των QIm συσσωματωμάτων μειώνεται με τη συμπλοκοποίηση με τις πρωτεΐνες του FBS ($\zeta_P = -1.4 \pm 19$ mV). Τα αρνητικά φορτισμένα μέρη των πρωτεϊνών του FBS (ως επί το πλείστον αλβουμίνες) φαίνεται να είναι σε θέση να αλληλεπιδράσουν με τα κατιοντικά πολυμερή. Στις περιπτώσεις του QIm-PCMS ομοπολυμερούς και των QIm-PS-co-PCMS συμπολυμερών παρουσίασαν αντίστροφα φορτία (δηλαδή αρνητικά φορτία).

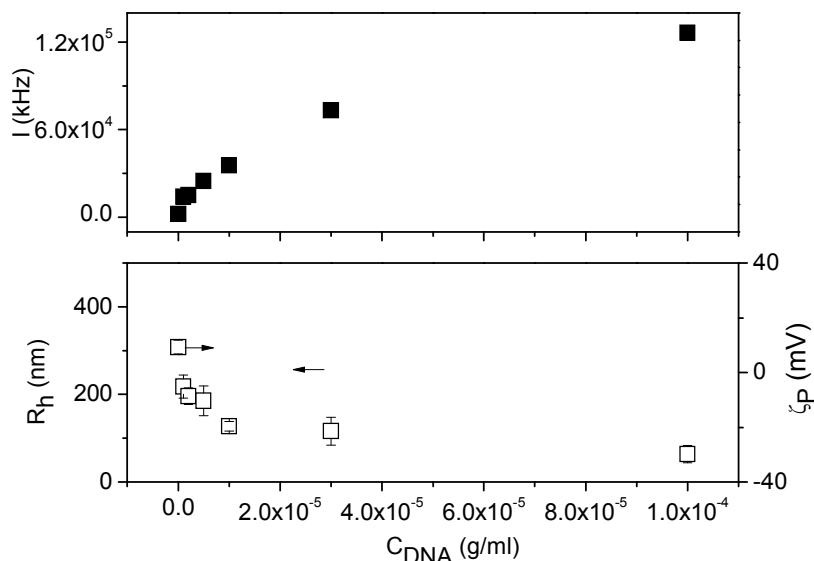
Όπως προαναφέρθηκε, τα κατιοντικά πολυμερή αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων και συμπυκνώνουν το DNA σε συγκροτήματα σωματιδίων όταν υπάρχει κατάλληλος λόγος αζώτου/φωσφορικών (N/ P). Δεδομένου ότι το άζωτο της ιμιδαζόλης στα τροποποιημένα πολυμερή παρουσίασαν υψηλό κατιοντικό φορτίο, είναι δυνατόν να παράγουν σταθερά σύμπλοκα με DNA ^{220 221 222}. Στην υποενοότητα αυτή, η προσοχή εστιάστηκε στα QIm-PCMS2 και QIm-PS-co-PCMS δείγματα, μιας και έχουν μεγαλύτερο θετικό φορτίο σε διαλύματα PBS σε σύγκριση με τα υπόλοιπα

κατιοντικά πολυμερή. Στα πειράματα με το DNA, η συγκέντρωση των πολυμερών στα μικτά PBS διαλύματα διατηρήθηκε σταθερή, ενώ η C_{DNA} αυξήθηκε έως 10^{-4} g/ml.



Σχήμα 3.15: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός των QIm-PCMS2/ DNA συμπλόκων σε PBS διαλύματα (με $C_{\text{QIm}}=5 \times 10^{-4}$ g/ml και C_{DNA} να ποικίλει).

Στο Σχήμα 3.15, για το ομοπολυμερές QIm-PCMS2, αύξηση της συγκέντρωσης του DNA, προκάλεσε μείωση της έντασης σκέδασης ενώ η υδροδυναμική ακτίνα αυξήθηκε. Το γεγονός αυτό, είναι ένα σημάδι συσσωμάτωσης με ταυτόχρονη ήπια καθίζηση. Η καταβύθιση έγινε ορατή πάνω από μια συγκεκριμένη συγκέντρωση (σκιασμένο μέρος του Σχήματος 3.15).



Σχήμα 3.16: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός των QIm-PS-co-PCMS/ DNA συμπλόκων σε PBS διαλύματα (με $C_{QIm}=5 \times 10^{-4}$ g/ml και διαφορετικές C_{DNA}).

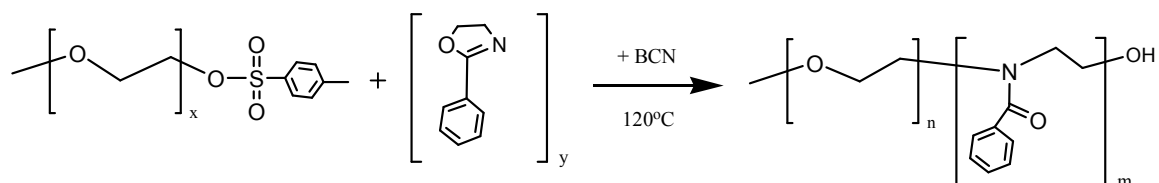
Από την άλλη μεριά, δεν παρατηρήθηκε καθίζηση στα QIm-PS-co-PCMS/ DNA πολυσύμπλοκα (Σχήμα 3.16). Τόσο η μάζα όσο και το μέγεθος (R_h) αυξήθηκαν για το σύστημα αυτό καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση του DNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τα συσσωματώματά τους να φαίνονται ότι είναι μεγαλύτερα.

Το φαινόμενο φορτίο των QIm/DNA συμπλόκων δείχνει ότι υπάρχει ισχυρή αλληλεπίδραση με το DNA. Έχει προαναφερθεί η σημαντικότητα των λόγων N/ P για την πρόβλεψη της τοξικότητας των κυττάρων. Στην περίπτωση των QIm/DNA συμπλόκων, ο N/ P ορίστηκε ως ο λόγος του αζώτου στο δακτύλιο της ιμιδαζόλης προς το φώσφορο των νουκλεοτιδίων στο DNA. Λόγω των διαφορετικών C_{DNA} (ενώ η C_{QIm} στα διαλύματα διατηρείται σταθερή) παράχθηκαν διαφορετικές σειρές αναλογιών N/P. Το εύρος του λόγου N/ P για τα QIm-PCMS2/ DNA σύμπλοκα ήταν 13-130 ενώ το αντίστοιχο για τα QIm-PS-co-PCMS/ DNA πολυσύμπλοκα ήταν 8-80. Στην περιοχή $13 \leq N/P \leq 42$, παρατηρήθηκε καθίζηση των QIm-PCMS2/ DNA συμπλόκων.

3.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση για τα PEG- b- PPhOx νανοσυστήματα

3.3.1 Σύνθεση και μοριακός χαρακτηρισμός των αμφίφιλων συμπολυμερών PEG- b-PPhOx

Οι συνθέσεις των αμφίφιλων συμπολυμερών κατά συστάδες διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου της PhOx από το ένα άκρο του mPEGtos μακροαπαρχητή, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 3.4.



Εικόνα 3.4: Αντίδραση για τη σύνθεση των συμπολυμερών κατά συστάδες πολυ(αιθυλενοξειδίου)- b-πολυ(2-φαινυλο-2- οξαζολίνης).

Οι συνθήκες της αντίδρασης, τα μοριακά χαρακτηριστικά και η σύσταση των συμπολυμερών PEG-b-PPhOx παρατίθενται στον Πίνακα 3.9. Οι τιμές M_n και M_w (από τη SEC) είναι παρόμοιες για τα τρία συμπολυμερή με δύο συστάδες. Τα αποτελέσματα του M_n από την ^1H NMR τεχνική είναι κοντά σε αυτά που λήφθηκαν από τη SEC.

Πίνακας 3.9: Συνθήκες σύνθεσης και μοριακά χαρακτηριστικά των PEG-b-PPhOx συμπολυμερών.

Δείγμα	Συνθήκες αντίδρασης					απόδ. ^γ	M_n^{α} (10^3g/mol)	M_w^{β} (10^3g/mol)	PDI ^β	%wt PEG ^α
	PEG (g)	PhOx (g)	BCN (ml)	T (°C)	$t_{\text{πολυμ.}}$ (h)					
PEG-b-PPhOx1	0.5	0.25	4	120	24	0.06	5.6	7.4	1.03	89
PEG-b-PPhOx2	0.5	1	2	120	24	0.14	6.4	8.5	1.03	78
PEG-b-PPhOx3	0.5	1	4	120	72	0.13	6.2	7.4	1.03	80

PEG-b-PPhOx4	0.5	1	4	140	24	0.38	8.9	4.2	1.3	57
PEG-b-PPhOx5	0.5	0.5	4	120	24	0.09	5.9	7.4	1.03	85
PEG-b-PPhOx6	0.5	0.5	4	120	3	0.02	5.2	7.6	1.02	96
PEG-b-PPhOx7	0.5	0.5	2	140	24	0.34	8.5	4.1	1.3	59

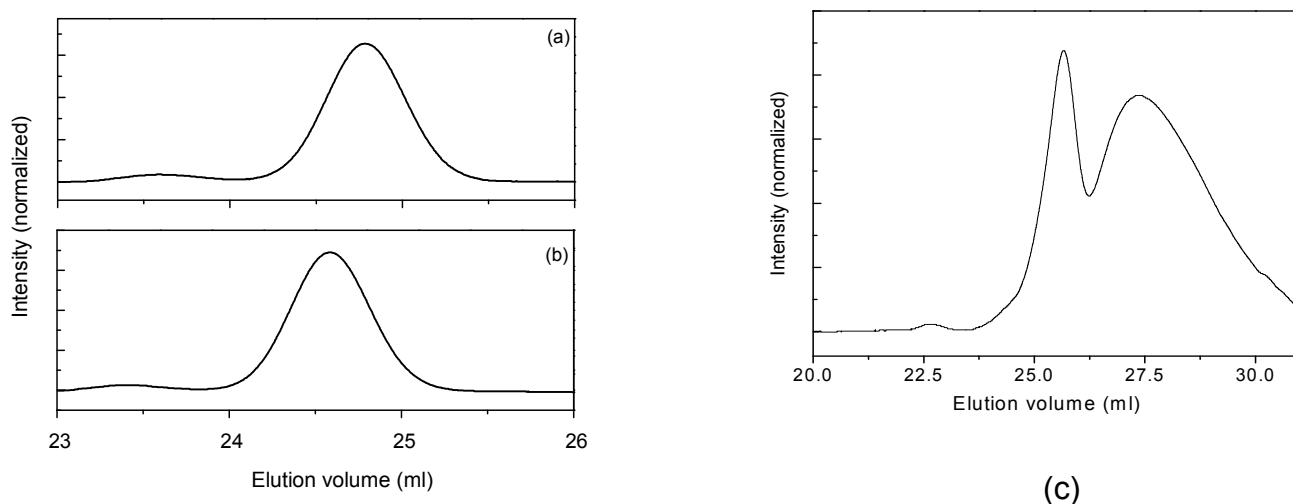
^α ¹H NMR σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο, CDCl₃

^β SEC σε THF/5%v/v Et₃N (βαθμονομημένο με γραμμικά PS πρότυπα)

^γ αποδ ή απόδοση (g PPhOx που αντέδρ.)= {μάζα σε PEG} · {wt PPhOx^α}/ {wt PEG^α}

Στο PEG-b-PPhOx1 συμπολυμερές όπου η μάζα του PPhOx ήταν η χαμηλότερη στην αντίδραση από τα τρία πρώτα συμπολυμερή, το αντίστοιχο επί τοις εκατό κατά βάρος (wt% PPhOx) ήταν και αυτό το χαμηλότερο μεταξύ των τριών αυτών συμπολυμερών. Πρόσθετα πειράματα πραγματοποιήθηκαν κάτω από διαφορετικές συνθήκες πολυμερισμού (PEG-b-PPhOx4 - PEG-b-PPhOx7) για να διερευνηθούν πώς οι τελευταίες επιδρούν στην παρασκευή νέων πολυμερών.

Κρίσιμο ρόλο στην αντίδραση παίζει η συγκέντρωση της PhOx, αποτέλεσμα που φαίνεται και από τη σύνθεση του PEG-b-PPhOx5 όπου χρησιμοποιήθηκαν 0.5 g PPhOx και το % wt. PEG βρέθηκε να είναι 85. Κατά συνέπεια (όπως αναμενόταν), το PEG-b-PPhOx1 συμπολυμερές είχε το υψηλότερο επί τοις % κλάσμα βάρους σε PEG όχι μόνο μεταξύ των τριών πρώτων συμπολυμερών PEG-b-PPhOx αλλά και μεταξύ όλων των παραχθέντων πολυμερών (τα οποία συντέθηκαν στους 120°C με χρόνο αντίδρασης 24 ώρες). Από τον Πίνακα 3.9 παρατηρείται ότι, όταν η συγκέντρωση του μονομερούς μειώνεται ή όταν ο όγκος του BCN αυξάνεται, η απόδοση του πολυμερισμού του PhOx είναι χαμηλή, ακόμη και όταν ο χρόνος της αντίδρασης φθάνει τις 72h (PEG-b-PPhOx3, Πίνακας 3.9).



Σχήμα 3.17: SEC φάσμα του (a) PEG-b-PPhOx1, (b) PEG-b-PPhOx2 και (c) PEG-b-PPhOx4 διδυσταδικού πολυμερούς.

Στο Σχήμα 3.17 (a) και (b), τα ενδεικτικά χρωματογραφήματα SEC π.χ. των PEG-b-PPhOx1 και PEG-b-PPhOx2 δείχνουν μονή κορυφή κατανομής μοριακού βάρους, με χαμηλή τιμή πολυδιασποράς PDI (~ 1.03) για τα περισσότερα παραχθέντα πολυμερή. Όμως τα SEC χρωματογραφήματα των δειγμάτων 4 και 7 έδειξαν την ύπαρξη δίκροφης μοριακής κατανομής με ευρεία κορυφή σε υψηλούς όγκους έκλουσης. Για παράδειγμα, το χρωματογράφημα SEC του PEG-b-PPhOx4 φαίνεται στο Σχήμα 3.17 (c). Παρόμοια συμπεριφορά με των δειγμάτων 4 κι 7 έχει παρατηρηθεί και από άλλες ομάδες²²³ όταν συντέθηκε το πολυ(στυρένιο)-b-πολυ(μεθυλο μεθακρυλικό). Η ερμηνεία του γεγονότος είναι ότι το mPEGtos ενδέχεται να αποτύχει να ξεκινήσει τον πολυμερισμό της PhOx (ατελής εκκίνηση). Βέβαια, τα δείγματα 4 και 7 μπορεί να είναι στην πραγματικότητα ένα μίγμα με PEGtos και PPhOx αλυσίδες. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι με αντίδραση διάρκειας έως 3 ώρες, δεν επιτεύχθηκε κάποιος σημαντικός πολυμερισμός. Για τα PEG-b-PPhOx4 έως και PEG-b-PPhOx7 αποδείχτηκε μέσω της SEC ότι παρασκευάστηκαν μίγματα PEGtos και PPhOx αλυσίδων με ευρείες κατανομές μοριακού βάρους, τα οποία είχαν περιεκτικότητα σε PPhOx χαμηλότερη από 22 %wt περίπου. Όταν η θερμοκρασία πολυμερισμού αυξήθηκε πάνω από 120°C, πραγματοποιήθηκε μη ελεγχόμενος πολυμερισμός. Πιθανότατα οι διαπιστώσεις αυτές συνδέονται με πρόωρο τερματισμό της αντίδρασης, ο οποίος οφείλεται σε ανεπιθύμητες αντιδράσεις καθώς προχωρά ο πολυμερισμός του PhOx.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δειγμάτων 5 και 6 (Πίνακας 3.9), φαίνεται ότι καθώς ο χρόνος πολυμερισμού αυξάνεται από 3 σε 24 ώρες, το επί τοις % κ.β. PEG μειώνεται

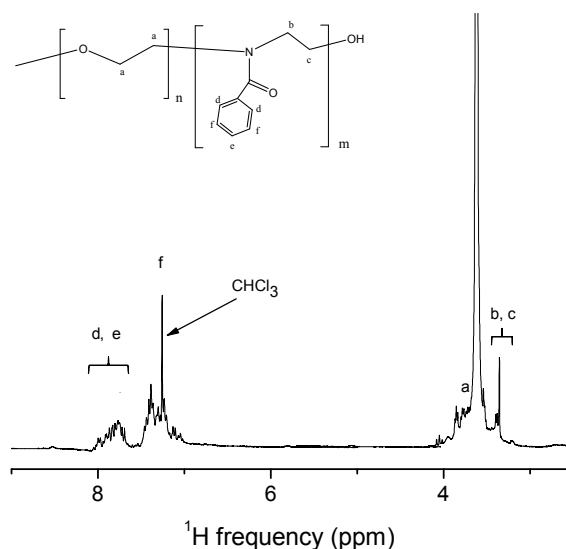
από 96 σε 85. Η κορυφή πολυμερισμού του δείγματος 5 στη SEC βρέθηκε σε ελαφρώς υψηλότερο χρόνο έκλουσης και ως εκ τούτου σε χαμηλότερο μοριακό βάρος και εμφανίζεται διευρυμένη κορυφή, σε αντίθεση με το δείγμα 6. Ένα σενάριο είναι ότι η αντίδραση χρειάζεται περισσότερο από 3 ώρες (h) για να συμβεί και ότι για χρόνο πολυμερισμού ($t_{\text{πολυμ}}$) των 24 ωρών, υπάρχει μια μετατοπισμένη κορυφή του μακροαπαρχητή σε υψηλότερη μετατροπή της PPhOx. Συγκρίνοντας τα δείγματα 1 και 5, παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση του κλάσματος βάρους% της PEG, αλλάζοντας από 89 σε 84 αντίστοιχα. Οι τιμές M_n για αυτά τα δύο δείγματα ακολούθησαν την ίδια τάση.

Στον Πίνακα 3.9 φαίνεται ότι αλλαγές στις συνθήκες της αντίδρασης, όπως στη θερμοκρασία αντίδρασης (140°C), στον όγκο BCN ή στον χρόνο της αντίδρασης (72 ώρες) δεν έδειξαν υψηλότερο κλάσμα βάρους % της PPhOx. Χαμηλές αποδόσεις στις διαδικασίες σύνθεσης 2-υποκατεστημένων οξαζολινών έχουν παρατηρηθεί και αλλού εξαιτίας π.χ. των στερικών επιπλοκών ²²⁴. Η επίδραση της πυρηνοφιλίας στους συμπολυμερισμούς, όπως έχει αναφερθεί σε άλλη δημοσίευση ⁶¹ είναι ισχυρότερη από ότι τα στερικά αποτελέσματα. Βέβαια, όπως αναφέρθηκε και στο 1ο κεφάλαιο, η σχετικά αργή σύνθεση των πολυ(2-οξαζολινών) μπορεί να επιταχυνθεί σημαντικά με τη χρήση αντιδραστών μικροκυμάτων ⁶¹. Όλα τα παραπάνω συνάγουν στο ότι η αργή κινητική της αντίδρασης μπορεί να οδηγήσει σε σχετικά στενό εύρος των μοριακών χαρακτηριστικών των παραχθέντων συμπολυμερών παρά τις διαφορετικές συνθήκες αντίδρασης. Στον πολυμερισμό των οξαζολινών ²²⁵, υπάρχει μια πιθανή πλευρική αντίδραση η οποία μπορεί να επηρεάσει τον χαρακτήρα του πολυμερισμού. Αυτή η πλευρική αντίδραση είναι η μεταφορά αλυσίδας στο μονομερές και θα μπορούσε να εξηγήσει τα αποτελέσματα για τα PEG-b-PPhOx4 και PEG-b-PPhOx7 πολυμερή. Λόγω της χαμηλής πυρηνοφιλικότητας της PhOx, οι συμπολυμερισμοί μπορούν να οδηγήσουν σε συμπολυμερή εν δυνάμει κατά συστάδες ²²⁶. Οι συμπολυμερισμοί των MeOx/PhOx and EtOx/PhOx έδειξαν γρήγορη κατανάλωση της MeOx ή της EtOx σε αντίθεση με την αργή ενσωμάτωση της PhOx, με αποτέλεσμα το σχηματισμό εν δυνάμει συμπολυμερών δύο συστάδων. Σε άλλη δημοσίευση ^{10,63,72} για τον κατιοντικό πολυμερισμό πολυοξαζολινών, αναφέρθηκε ειδικά το πρόβλημα της αντιστρεπτής απενεργοποίησης και επανενεργοποίησης των ενεργών κέντρων, η αυτο-οργάνωση και η ανταπόκριση στις αλλαγές της θερμοκρασίας των πολυοξαζολινών.

Οι κινητικές συμπολυμερισμού της PhOx και της PEG θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην αποκάλυψη των κατάλληλων-βέλτιστων αναλογιών δραστηριότητας και των κατανομών του μονομερούς στα συμπολυμερή. Ως εναλλακτική λύση είναι η

αντικατάσταση του mPEGτος μακροαπαρχητή με πιο εύκολα διαχειρίσιμες δομές PEO ενάρξεως πολυμερισμού (όπως τροποποιημένη PEO βενζυλο-ιωδιδίου, benzyl iodide PEO). Αυτές μπορεί να καταφέρουν μια ταχύτερη έναρξη για πολυμερισμούς οξαζολίνης (π.χ. των αλκυλο οξαζολινών) από ότι ο τοσυλικός τροποποιημένος PEO μακροαπαρχητής.

Δεδομένου ότι δεν μπόρεσε να πραγματοποιηθεί σύνθεση καλά καθορισμένων PEG-b-PPhOx συμπολυμερών με υψηλότερο ποσοστό σε PPhOx και υψηλότερο μοριακό βάρος σε σχέση με τα τρία πρώτα, το κύριο ενδιαφέρον εστιάστηκε στον πλήρη μοριακό χαρακτηρισμό των συμπολυμερών από PEG-b-PPhOx1 με PEG-b-PPhOx3. Όπως σε παρόμοιες μελέτες^{227 159} η ^1H NMR φασματοσκοπία χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της δομής και τη σύσταση των συμπολυμερών δύο συστάδων.



Σχήμα 3.18: Το φάσμα ^1H NMR του PEG-b-PPhOx3 δισυσταδικού συμπολυμερούς σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο CDCl_3 .

Τα χαρακτηριστικά σήματα (ή κορυφές) τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια των δακτυλίων των 2-οξαζολίνη (PhOx) επιβεβαιώνουν την απεικονιζόμενη δομή του συμπολυμερούς (Εικόνα 3.4). Ένα παράδειγμα του ^1H NMR φάσματος φαίνεται στο Σχήμα 3.18, το οποίο αφορά το δείγμα PEG-b-PPhOx3 σε CDCl_3 . Η ύπαρξη των πρωτονίων της $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ αλυσίδας παρατηρήθηκε μέσω της ευρείας κορυφής στα 3.6 ppm. Η κορυφή στα 3.3 ppm αποδίδεται στα πρωτόνια του δομικού σκελετού της PhOx ($-\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), ενώ οι κορυφές στα 7.4 και 7.7 ppm αποδίδονται στα αρωματικά πρωτόνια του δακτυλίου του φαινυλίου των PhOx τμημάτων. Η υπολειμματική κορυφή

του διαλύτη (CHCl_3) βρέθηκε στα 7.26 ppm (Σχήμα 3.18). Συνοψίζοντας λοιπόν, ισχύει: ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz): δ / ppm = 8.1-6.9 (comp, 5H), 4.0-3.5 (br, 4H, O- CH_2 - CH_2 -), 3.4-3.2 (br, 4H, N- CH_2CH_2).

Εκτός από τις τεχνικές NMR και SEC, τα PEG-b-PPhOx συμπολυμερή χαρακτηρίστηκαν και με μετρήσεις ATR-FTIR. Στα φάσματα αυτά, η ευρεία κορυφή στην περιοχή των κυματαριθμών $2600\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ είναι συναφής με τις δονήσεις της CH_2 ομάδας (sp^3 C-H τάση) ενώ οι κορυφές των $1610\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$ αφορούν τη δόνηση των C=O ομάδων. Επιπλέον, οι κορυφές στις περιοχές $1410\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ και $645\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ κυματαριθμών συσχετίζονται με τις δονήσεις έκτασης του C=C και της sp^2 C-H κάμψης των φαινυλομάδων (αρωματικών δακτυλίων) των PhOx μονομερικών μονάδων αντίστοιχα. Οι δονήσεις των N-C και C-O ομάδων της κύριας αλυσίδας παρατηρήθηκε στην περιοχή των κυματαριθμών $1010\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$.

3.3.2 Αυτο-οργάνωση των PEG-b-PPhOx συμπολυμερών σε υδατικά και βιολογικά μέσα

A) Υδατικά (φιλτραρισμένα) διαλύματα. Μετά τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό των πολυμερών, μελετήθηκαν οι ιδιότητες αυτο-οργάνωσης αυτών των αμφίφιλων συμπολυμερών κατά συστάδες σε υδατικά διαλύματα. Όπως προαναφέρθηκε, επικεντρώθηκε το ενδιαφέρον στην περαιτέρω ανάλυση των PEG-b-PPhOx1 έως και PEG-b-PPhOx3 συμπολυμερών. Διαπιστώθηκε μάλιστα, ότι τα δισυσταδικά συμπολυμερή ήταν άμεσα διαλυτά στο νερό και ένεκα των PPhOx υδρόφοβων τμημάτων τους αναμένεται, ότι έχουν αμφίφιλο χαρακτήρα. Τα αποτελέσματα σκέδασης φωτός των (φιλτραρισμένων) διαλυμάτων των τριών πρώτων PEG-b-PPhOx συμπολυμερών σε νερό παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.10.

Πίνακας 3.10: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός για υδατικά διαλύματα PEG-b-PPhOxσυμπολυμερών.

Δείγμα	$M_{w, app.}^{\alpha}$ (10^4g/mol)	N_w^{α}	R_h^{β} (nm)	R_h^{α} (nm)	R_g^{α} (nm)	ρ^{α} = R_g/R_h	PDI^β
PEG-b-PPhOx1	12.5	17	100.8	101.4	81.7	0.81	0.5
PEG-b-PPhOx2	22.9	27	106.4	130.6	86.2	0.66	0.5
PEG-b-PPhOx3	42.1	57	98.2	85.7	74.7	0.87	0.3

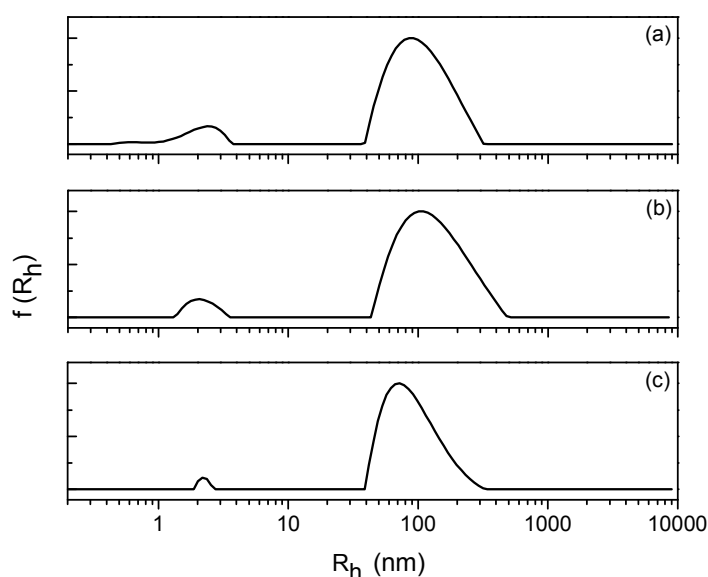
^α από προέκταση σε $q = 0$.

^β από cumulants ανάλυση σε γωνία σκέδασης 90°

Για τα PEG-b-PPhOx συμπολυμερή, τα φαινόμενα μοριακά βάρη των υδατικών διαλυμάτων τους είναι υψηλότερα από αυτά που βρέθηκαν με ανάλυση SEC αποδεικνύοντας τη συσχέτιση των PEG-b-PPhOx αλυσίδων σε νερό. Τα $M_{w,app.}$ τα οποία προσδιορίστηκαν με στατική σκέδαση φωτός για τα υδατικά διαλύματα των PEG-b-PPhOx1, PEG-b-PPhOx2 και PEG-b-PPhOx3 ήταν 12.5, 22.9 και $42.1 \cdot 10^4$ g/mol αντίστοιχα. Τα συσσωματώματα με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε PPhOx είχαν το μικρότερο μέγεθος και ως εκ τούτου, βιώνουν την υψηλότερη συμπίεση στις αλυσίδες του πυρήνα τους (όπως π.χ. δείγμα PEG-b-PPhOx3). Οι τιμές των R_g και R_h οι οποίες συνοψίζονται στον Πίνακα 3.10, χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του χαρακτηριστικού λόγου ρ , δίνοντας πληροφορίες για το σχήμα των νανοσωματιδίων. Μια PEG αλυσίδα μοριακού βάρους της τάξης 10^4 g/mol (όπως αυτής της μελέτης) θα έχει Flory ακτίνα περίπου 3nm^{228 1079} ενώ το μήκος του περιγράμματός της δεν θα υπερβαίνει τα 30nm. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.10, οι τιμές R_g και R_h παρατηρήθηκαν πολύ υψηλότερες από ό,τι μια πιθανή διαμόρφωση του πυρήνα-κέλυφος μικκυλίου. Το μικκύλιο αυτό θα είχε το τμήμα PPhOx να σχηματίζει ένα συμπαγή και υδρόφοβο πυρήνα ενώ το PEG τμήμα θα ήταν μία πολύ ενυδατωμένη επεκταμένη κορώνα. Ως εκ τούτου, τα σχηματισθέντα συσσωματώματα περιέχουν πιθανότατα περιοχές των συσσωματωματωμένων PPhOx τμημάτων μέσα στους πυρήνες αλλά και δημιουργούν επαφές μεταξύ των PEG και PPhOx τμημάτων. Ακόμη και η συσσωμάτωση μεταξύ των PEG τμημάτων μπορεί να αποτελέσει αιτία των επαφών μεταξύ των δισυσταδικών αλυσίδων^{229 1080}. Όλα τα παραπάνω δεν αποκλείουν

τη δυνατότητα ύπαρξης συσσωματωμάτων αποτελούμενων από διασυνδεδεμένα PEG-b-PPhOx μικκύλια με πυρήνα-κέλυφος. Η υπόθεση αυτή παρατηρήθηκε σε τρισυσταδικούς αμφιφιλικούς χαρακτήρα πολυηλεκτρολύτες που περιείχαν PEG ²³⁰.

Για τα υδατικά διαλύματα του PEG-b-PPhOx2 συμπολυμερούς, ο λόγος ρ ήταν ίσος με 0.66, χαρακτηριστική τιμή για σφαίρα με συμπυκνωμένη μάζα στο κέντρο της ¹⁴⁷. Ενώ ο λόγος R_g/R_h ήταν 0.88 και 0.87 για το PEG-b-PPhOx1 και PEG-b-PPhOx3 συμπολυμερές αντίστοιχα, αποκαλύπτοντας ότι η αυτο-οργανούμενη δομή τους στο νερό είναι στην περιοχή εύρους των τιμών ρ για σφαίρα ομοιόμορφης κατανομής μάζας ($\rho \sim 0.775$) ¹⁴⁸ και τύπου μικρογέλης (microgel) πιο ανοιχτής μορφολογίας ¹⁴⁹, σφαιρικών κελύφων ¹⁵⁰ ή κοίλων σφαιρών ¹⁵¹ με ένα απείρως λεπτό κέλυφος ¹⁵⁰ ($\rho \sim 1$). Στα PEG-b-PPhOx συστήματα, οι συσχετίσεις μεταξύ των αλληλεπιδράσεων ήταν περίπλοκες ακόμη και για μικρές αλλαγές στα μήκη των τμημάτων και των λόγων μεταξύ τους εντός των δισυσταδικών συμπολυμερών στο διάλυμα. Αυτό μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό την τελική γεωμετρία των αυτο-οργανούμενων νανοδομών.

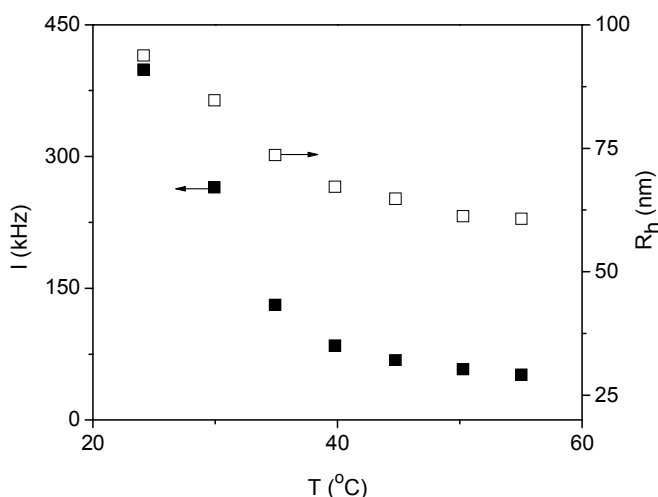


Σχήμα 3.19: Συναρτήσεις κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ έναντι $R_h(\text{nm})$ για τα (a) PEG-b-PPhOx1, (b) PEG-b-PPhOx2 και (c) PEG-b-PPhOx3 συμπολυμερή σε υδατικά διαλύματα ($C=10^{-3}$ g/ml) σε γωνία σκέδασης 90° .

Με cumulants ανάλυση σε γωνία σκέδασης 90° , οι καμπύλες κατανομής της R_h των υδατικών διαλυμάτων των συμπολυμερών εμφανίζονται στο Σχήμα 3.19. Οι τιμές της υδροδυναμικής ακτίνας ήταν υψηλότερες από αυτές που αναμένονταν για μεμονωμένες αλυσίδες συμπολυμερούς. Το αποτέλεσμα αυτό υποστηρίζει τον σχηματισμό

συσσωματωμάτων. Επιπλέον, τα υδατικά διαλύματα των δισυσταδικών αυτών συμπολυμερών είχαν μια ευρεία κατανομή μεγέθους αφού η PDI ήταν μεγαλύτερη από 0.2 (Πίνακας 3.10).

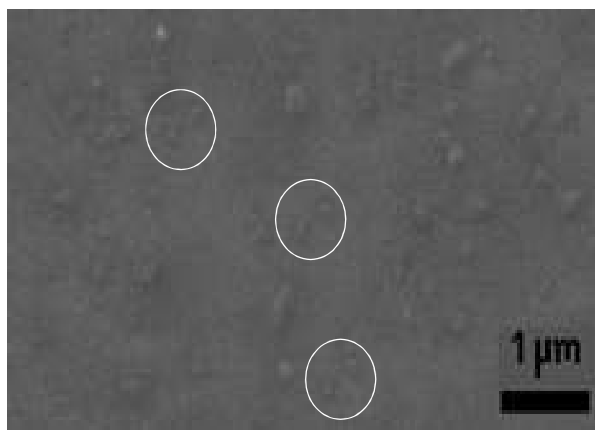
Όταν αυξήθηκε η θερμοκρασία, παρατηρήθηκε μια μείωση τόσο της μάζας (I) όσο και της υδροδυναμικής ακτίνας (R_h) αυτών των υδατικών φιλτραρισμένων διαλυμάτων.



Σχήμα 3.20: Διάγραμμα εξάρτησης της έντασης σκέδασης I (kHz) και της υδροδυναμικής ακτίνας R_h (nm) από τη θερμοκρασία του φιλτραρισμένου υδατικού διαλύματος του PEO-b-PPhOx3 δισυσταδικού συμπολυμερούς.

Παράδειγμα της εξάρτησης της θερμοκρασίας στα DLS δεδομένα για το φιλτραρισμένο υδατικό διάλυμα PEO-b-PPhOx3 φαίνεται στο Σχήμα 3.20. Επιπροσθέτως, η εξάρτηση από τη θερμοκρασία σε υδατικά μη φιλτραρισμένα διαλύματα των τριών πρώτων PEG-b-PPhOx συμπολυμερών μετρήθηκε και βρέθηκε πιο έντονη (δεδομένα δε φαίνονται).

Ήδη έχουν διεξαχθεί SEM πειράματα επί των φιλτραρισμένων υδατικών PEG-b-PPhOx διαλυμάτων. Παραδείγματος χάριν, τα συσσωματώματα του PEG-b-PPhOx3 συμπολυμερούς στο νερό απεικονίζονται στην Εικόνα 3.4. Η διάμετρος των σφαιρικών συσσωματωμάτων που παρατηρήθηκε με SEM, ήταν γύρω στα 200nm ενώ βρέθηκαν και στα δεδομένα DLS (προέκταση σε $q = 0$) μεγάλες τιμές R_h (Πίνακας 3.3).

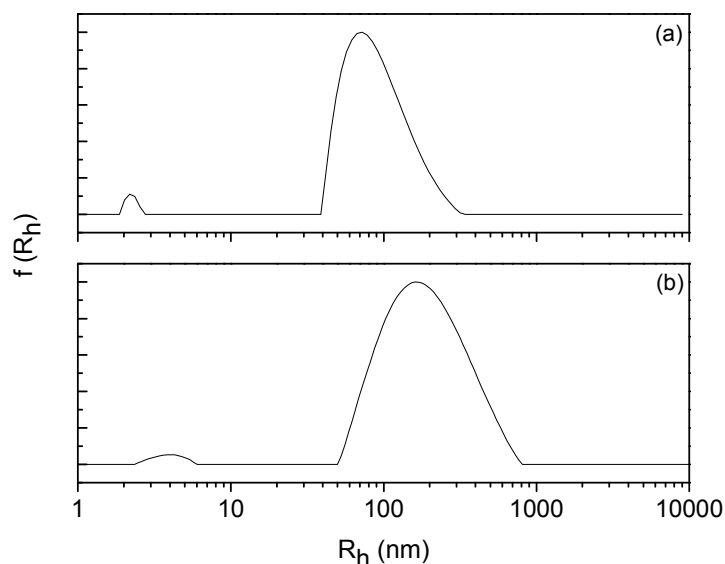


Εικόνα 3.4: SEM εικόνα του PEG-b-PPhOx3 συμπολυμερούς σε φιλτραρισμένο υδατικό διάλυμα ($C=10^{-3}$ g/ml).

Για τα πειράματα φασματοσκοπίας φθορισμού, το πυρένιο χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής ώστε να μελετηθεί η συμπεριφορά σύνδεσης των συμπολυμερών μεταξύ τους¹⁷⁹. Μπορούν λοιπόν, μέσω των πειραμάτων αυτών, να δοθούν πληροφορίες σχετικά με την τοπική πολικότητα και τη ρευστότητα των νανοσυσσωματωμάτων. Οι τιμές των λόγων I_1/I_3 για τα PEG-b-PPhOx συμπολυμερή σε υδατικό περιβάλλον ήταν περίπου 1.8. Ως εκ τούτου, στους 25°C, τα συσσωματώματα έχουν υδρόφοβες περιοχές οι οποίες δεν είναι αρκετά μεγάλες για να φιλοξενήσουν αποτελεσματικά το πυρένιο. Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν και σε 50°C. Τα πειράματα φθορισμού των υδατικών διαλυμάτων, (με τη χρήση ή μη χρήση φίλτρου), επαναλήφθηκαν μετά από μία εβδομάδα. Τα δεδομένα σκέδασης φωτός διαφόρων συγκεντρώσεων και θερμοκρασιών, δεν μεταβλήθηκαν μέσα σε μία εβδομάδα. Ο λόγος I_1/I_3 διατήρησε την ίδια τιμή, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα συσσωματώματα συνεχίζουν να μην παρουσιάζουν επαρκή υδροφοβικότητα στο εσωτερικό τους.

Συμπληρωματικά πειράματα που αφορούν τα πρωτόκολλα προετοιμασίας των PEG-b-PPhOx συμπολυμερών σε υδατικά διαλύματα. Εξετάστηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα προετοιμασίας στα υδατικά PEG-b-PPhOx διαλύματα με ίδια $C=10^{-3}$ g/ml. Το πρωτόκολλο I αφορά την άμεση διάλυση των δισυσταδικών συμπολυμερών σε αποσταγμένο νερό. Τα αποτελέσματα αυτών των διαλυμάτων αναφέρθηκαν στον Πίνακα 3.10 και συζητήθηκαν παραπάνω. Όπως αναφέρθηκε και στο 2ο κεφάλαιο το πρωτόκολλο II περιλάμβανε τη διάλυση των PEG-b-PPhOx πολυμερών σε καλό διαλύτη THF και τα παρεπόμενα αυτών σε απεσταγμένο νερό. Αφού εξατμίστηκε ο διαλύτης THF, τα υδατικά διαλύματα εξετάστηκαν με σκέδαση φωτός. Στο Σχήμα 3.21

παρουσιάζεται ένα παράδειγμα CONTIN ανάλυσης της συνάρτησης συσχέτισης των υδατικών διαλυμάτων των PEG-b-PPhOx3 συμπολυμερών, με βάση τα πρωτόκολλα I και II.



Σχήμα 3.21: Σύγκριση των CONTIN δεδομένων των PEG-b-PPhOx3 συμπολυμερών σε υδατικά διαλύματα που προέκυψαν από το πρωτόκολλο I και II (και αναφέρονται ως (a) και (b) αντίστοιχα).

Από το Σχήμα 3.21, είναι προφανές ότι το πρωτόκολλο II δίνει νανοσωματίδια με ευρύτερη κατανομή μεγέθους από αυτά που λαμβάνονται όταν τα συμπολυμερή διαλύονται άμεσα σε νερό (πρωτόκολλο I) και ίσως αποτελούν δομές μη ισορροπίας. Το γεγονός αυτό συνιστά μια ακόμη ένδειξη ότι μεμονωμένα μικκύλια με πυρήνα- κορώνα, δεν σχηματίζονται στα PEG-b-PPhOx διαλύματα (πρωτόκολλο I).

B) PBS (φιλτραρισμένα) διαλύματα. Έχοντας κατά νου, ότι τα ουδέτερα αυτά συμπολυμερή μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πιθανές βιοϊατρικές εφαρμογές, τα υδατικά διαλύματα των νανοσωματιδίων αυτών αραιώθηκαν σε PBS, προκειμένου να ελεγχθεί η συμπεριφορά των συμπολυμερών κάτω από τις σχετικές φυσιολογικές συνθήκες (pH=7.4, I=0.15M).

Πίνακας 3.11: LS αποτελέσματα των PEG-b-PPhOx συμπολυμερών σε διαλύματα PBS.

Δείγμα	$M_{w, app.}^{\alpha}$ ($10^4 g/mol$)	N_w^{α}	$R_h^{\beta}(nm)$ (%K.K.*)	PDI ^β
PEG-b-PPhOx1	1.5	2	107 (78.1%)	0.5
PEG-b-PPhOx2	2.5	3	125 (71.7%)	0.6
PEG-b-PPhOx3	1.6	2	104 (77.1%)	0.4

^α από προέκταση σε $q = 0$.

^β από cumulants ανάλυση σε γωνία σκέδασης 90°

*(%K.K.)= τα επί τοις εκατό % ποσοστά της κύριας κορυφής (K.K.), από CONTIN ανάλυση

Στον Πίνακα 3.11 συνοψίζονται τα αποτελέσματα σκέδασης φωτός αυτών των PBS διαλυμάτων. Οι τιμές της R_h για τα (φιλτραρισμένα) PBS διαλύματα είναι ελαφρώς υψηλότερες από εκείνες σε υδατικά διαλύματα. Όμως η μάζα των συσσωματωμάτων φαίνεται να είναι πολύ χαμηλότερη από ό,τι στα αντίστοιχα διαλύματα σε νερό. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την ύπαρξη πέραν του ενός πληθυσμού στο PBS διάλυμα (παράδειγμα φαίνεται στο Σχήμα 3.22b). Η συμβολή αυτού του πρόσθετου πληθυσμού δεν είναι αμελητέα (ως εκ τούτου στον Πίνακα 3.11 αναφέρεται το ποσοστό ύπαρξης της κύριας κορυφής μαζί με την υδροδυναμική ακτίνα R_h). Μετά από μία εβδομάδα, οι τιμές των I και R_h παρέμειναν σχεδόν οι ίδιες, γεγονός που δείχνει μια σταθερή συμπεριφορά γι' αυτό το διάστημα.

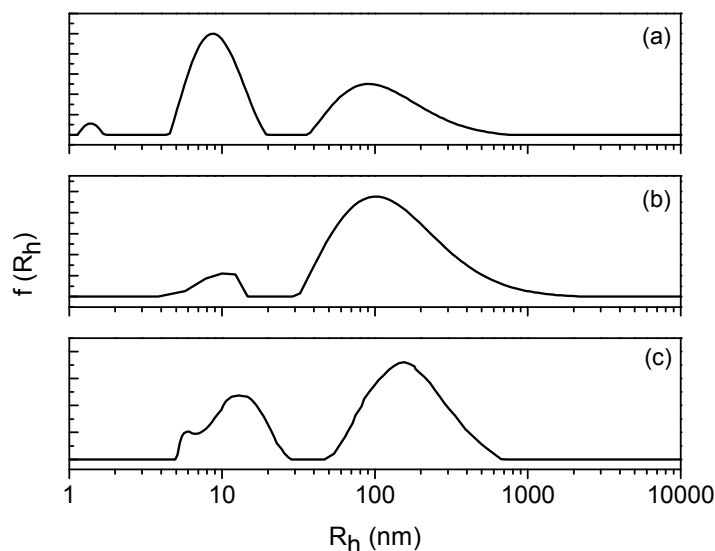
Οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε μόρια από αιθυλενογλυκόλη, νερό και ιόντα αλατιού σε διαλύματα τριών συστατικών έχουν αποδειχθεί πολύπλοκες. Πιο συγκεκριμένα, το φαινόμενο της εξαλάτωσης (salting-out effect) του PEO σε υδατικά διαλύματα καθορίζεται από τις αλλαγές της δομής του νερού και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του πολυμερούς και του νερού, λόγω του προστιθέμενου άλατος²³¹. Η διάσπαση του δεσμού υδρογόνου νερού-PEO και η σύμπλεξη της PEO με κατιόντα^{232,233} είναι οι πιθανές αιτίες των φαινομένων αυτών σε μοριακό επίπεδο. Στην περίπτωση των μικκυλίων με PEO ως κορώνα τους, υπάρχουν πολλά παραδείγματα όπου εμφανίζονται σε διάλυμα μικκύλια και μεγαλύτερα συσσωματώματα²³⁴²⁴. Για παράδειγμα στα μικκύλια από PS-b-PEO σε νερό, προκλήθηκε θραύση των δια-μικκυλιακών

συσσωματωμάτων (intermicellar clusters) με την προσθήκη αλάτων²³⁵. Τα ιόντα του άλατος ήταν υπεύθυνα για το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου και για τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των PEG ομάδων.

Τα αποτελέσματα των μη φιλτραρισμένων υδατικών και PBS διαλυμάτων των PEG-b-PPhOx παρουσιάζονται στο Παράρτημα Ι.

3.3.3 Αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών του FBS διαλύματος με τα PEG-b-PPhOx συμπολυμερή

Εκτός από τις μετρήσεις στα υδατικά και PBS διαλύματα, τα PEG-b-PPhOx συμπολυμερή σε PBS-FBS (90-10 v/v%) διαλύματα παρασκευάστηκαν με σκοπό να δοκιμαστεί η δομή και η σταθερότητά τους σε ένα άλλο βιολογικό υγρό. Όλα τα συμπολυμερή φαίνεται να αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες του FBS. Αυτό αποδεικνύεται από τη μεγαλύτερη τιμή της R_h σε σύγκριση με εκείνη της PEG-b-PPhOx στα διαλύματα PBS και εκείνη των διαλυμάτων PBS-FBS (90-10 v/v%) (χωρίς συμπολυμερές).



Σχήμα 3.22: Συνάρτηση κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ έναντι της υδροδυναμικής ακτίνας, για το PEG-b-PPhOx3 δισυσταδικό συμπολυμερές σε (b) PBS και (c) PBS (90%) - FBS (10%) διαλύματα. Το γράφημα (a) αναφέρεται σε PBS-FBS διαλύματα χωρίς συμπολυμερές απεικονίζοντας τους πληθυσμούς των πρωτεϊνών και των συσσωματωμάτων τους που υπάρχουν στο FBS.

Στο Σχήμα 3.22 αποδίδεται ένα παράδειγμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ των PEG-b-PPhOx συμπολυμερών και των πρωτεϊνών του FBS διαλύματος. Η συμπλοκοποίηση αυτή υποστηρίζεται επίσης από την αύξηση της έντασης του φωτός σκέδασης που μετρήθηκε για τα διαλύματα PBS-FBS τα οποία περιείχαν συμπολυμερές σε σύγκριση με το άθροισμα εκείνης του διαλύματος PBS-FBS χωρίς συμπολυμερές και του αντίστοιχου διαλύματος συμπολυμερούς.

Τα αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες, τα οποία βασίζονται σε PEO, θεωρήθηκαν ως κατάλληλοι υποψήφιοι για τη διαλυτοποίηση υδρόφοβων φαρμάκων. Όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 1ο, ένα μεγάλο ποσοστό των φαρμάκων έχουν δείξει χαμηλή διαλυτότητα σε βιολογικά υγρά, απαιτώντας σταθερά νανοσωματίδια με ιδιότητες ελεγχόμενης φόρτωσής τους και απελευθέρωσής τους. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα που έχουν τέτοιες ιδιότητες αποτέλεσαν τα PEO-PPO νανοσωματίδια²³⁶ και PEO-PLAA μικκύλια²³⁷. Επιπλέον, η σταθερότητα των μικκυλίων σε ορό παίζει σημαντικό ρόλο δεδομένου ότι μετά από μία ενδοφλέβια ένεση του νανοφορέα θα οδηγούσε σε πρόωρη εκφόρτωση του φαρμάκου²³⁸.

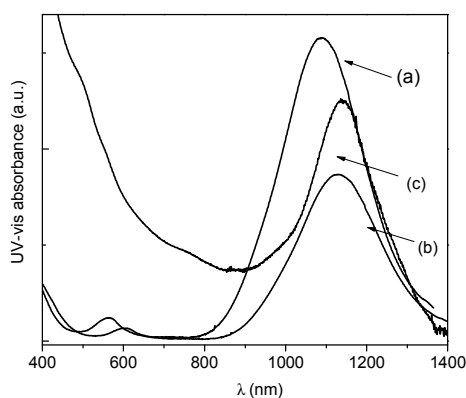
Τα αποτελέσματα σε PBS διάλυμα, λόγω της σταθερότητας των σχηματιζόμενων νανοδομών, υποδηλώνουν ότι τα PEG-b-PPhOx (και κυρίως αυτά με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε PEG) συμπολυμερή έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως νανοφορείς για την παράδοση υδρόφοβων φαρμάκων. Επί παραδείγματι η κατανομή της υδροδυναμικής ακτίνας για τα PEG-b-PPhOx3 συμπολυμερή σε PBS-FBS (10%) διαλύματα απεικονίζεται στο Σχήμα 3.22 (c). Σε όλες τις PEG-b-PPhOx νανοδομές στα PBS (90%)-FBS (10%) διαλύματα, τα παρατηρούμενα συσσωματώματα έχουν μέγεθος της τάξης των 200nm περίπου, χωρίς να εντοπίζεται καταβύθιση ή αστάθεια στα διαλύματα αυτά, για περίοδο μίας εβδομάδας.

3.4 Αποτελέσματα και Συζήτηση για τα υβριδικά νανοσυστήματα με σύμπλοκα νικελίου

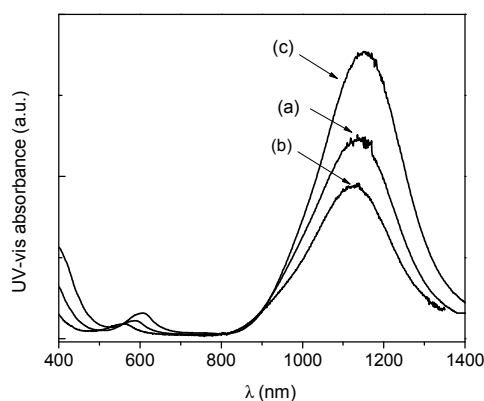
Όπως αναφέρθηκε στο 2ο Κεφάλαιο, χρησιμοποιήθηκαν τα αμφίφιλα δισυσταδικά PEG-b-PPhOx (του PEG-b-PPhOx3) και PI-b-PEO συμπολυμερή με τα PI και PPhOx να είναι τα υδρόφοβα τμήματα, ενώ η PEO (ή PEG) να είναι το υδρόφιλο τμήμα. Από την άλλη μεριά, τα τρία σύμπλοκα νικελίου έχουν μόνο υδρόφοβο χαρακτήρα.

3.4.1 Αποτελέσματα και Συζήτηση για τα διαλύματα που εμπεριέχουν δισυσταδικά συμπολυμερή και σύμπλοκα νικελίου

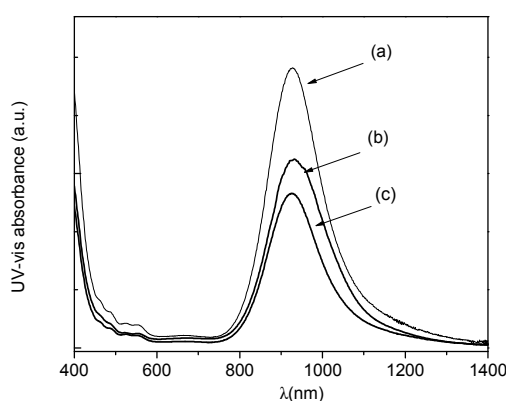
A) Διαλύματα THF. Τα PEO-b-PPhOx και PI-b-PEO συμπολυμερή κατά συστάδες είχαν τη δυνατότητα να διαλύονται άμεσα σε νερό σε αντίθεση με τα σύμπλοκα του νικελίου. Για να μπορέσουμε να εισάγουμε τα σύμπλοκα Ni σε υδατικό περιβάλλον (όπως στα βιολογικά συστήματα) απαιτήθηκε η διάλυσή τους σε έναν καλό κοινό διαλύτη όπως το THF. Στον κοινό διάλυμα σε THF αναπτύχθηκαν δυνάμεις μεταξύ των πολυμερών, τα οποία διαμορφώθηκαν στην μορφή διαμικκυλιακών συσσωματωμάτων ((swollen random coil)), και των συμπλόκων Ni σχηματίζοντας συσσωματώματα. Τα φάσματα UV-Vis-NIR για διαλύματα σε THF των συμπλόκων νικελίου, μόνα τους και παρουσία των δισυσταδικών συμπολυμερών φαίνονται στο Σχήμα 3.23.



(I)



(II)



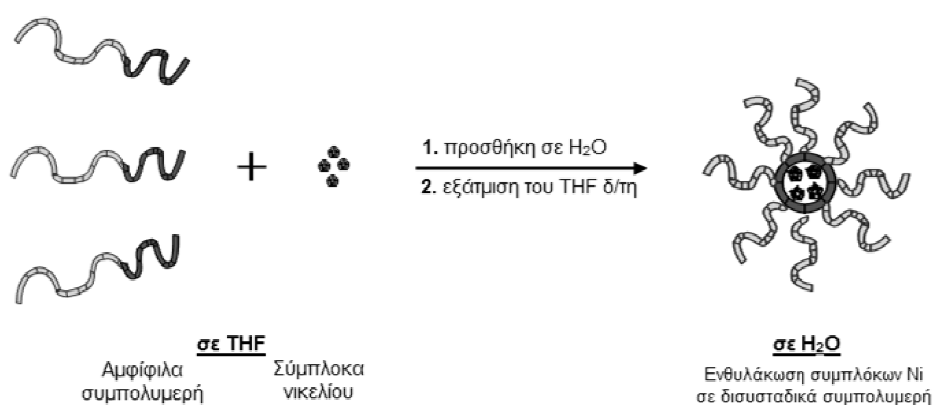
(III)

Σχήμα 3.23: Φάσματα UV-ορατού των (I) $(\text{Me}_4)\text{N}[\text{Ni}(\text{dmeodddt})]$, (II) $(\text{Bu}_4)\text{N}[\text{Ni}(\text{dddtd})_2]$ και (III) $[\text{Ni}(\text{pddtd})_2]$ συμπλόκων (a) όταν είναι μόνο τους σε THF, (b) παρουσία PEG-b-PPhOx και (c) παρουσία PI-b-PEO συμπολυμερών σε THF.

Όλες οι κορυφές των UV-vis φασμάτων ήταν στενές στην περιοχή του εγγύς υπέρυθρου (NIR). Η μέγιστη θέση του $(\text{Me}_4)\text{N}[\text{Ni}(\text{dmeodddt})]$ σε THF ήταν 1090 nm και μετακινήθηκε στα 1040 nm όταν προστέθηκαν τα PEG-b-PPhOx ή PI-b-PEO πολυμερή. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στην αλληλεπίδραση των μεθοξυομάδων με την PEO ομάδα (Σχήμα 3.23 (I)). Για το $(\text{Bu}_4)\text{N}[\text{Ni}(\text{dddtd})_2]$ σύμπλοκο, η θέση της κορυφής στο UV-Vis-NIR φάσμα για το THF διάλυμα ήταν στα 1140 nm και κινήθηκε ελαφρώς, προς τα 1160 και 1130 nm όταν προστέθηκαν τα PEG-b-PPhOx και PI-b-PEO διυσταδικά συμπολυμερή αντίστοιχα (Σχήμα 3.23 (II)). Η μικρή αυτή μετατόπιση οφείλεται πιθανώς στην αλληλεπίδραση των περιφερικών ομάδων των ομάδων θείου του συμπλόκου με τις ομάδες του πολυμερούς. Στην περίπτωση του $[\text{Ni}(\text{pddtd})_2]$ συμπλόκου, η θέση της κορυφής ήταν στα 930 nm ανεξάρτητα με την ύπαρξη ή μη των συμπολυμερών στο THF

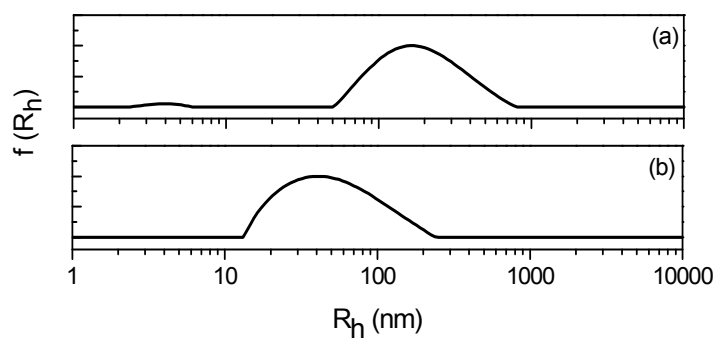
διάλυμα (Σχήμα 3.23 (III)). Δηλαδή το ουδέτερο αυτό σύμπλοκο του νικελίου φαίνεται να μην αλληλεπιδρά με τα πολυμερή όταν είναι σε περιβάλλον THF.

Β) Υδατικά διαλύματα. Αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο για την παρασκευή των υβριδικών μικκυλιακών νανοσωματιδίων σε υδατικό περιβάλλον, χρησιμοποιώντας το THF ως ένα υδατο-αναμίξιμο οργανικό και κοινό καλό διαλύτη (όπως προαναφέρθηκε). Με την εξάτμιση του THF, στα υδατικά πλέον διαλύματα, τα σύμπλοκα νικελίου ενθυλακώθηκαν στις δομές των μικκυλίων των συμπολυμερών (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5: Σχηματική αναπαράσταση που δείχνει την ενθυλάκωση των συμπλόκων νικελίου στα νανοσωματίδια του δισυσταδικού συμπολυμερούς.

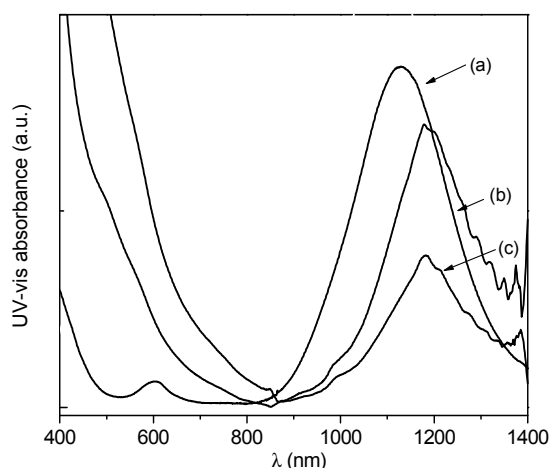
Προκειμένου να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα των υβριδικών νανοσωματιδίων, ετοιμάστηκαν τα υδατικά διαλύματα των δύο αυτών συμπολυμερών, χωρίς τα σύμπλοκα νικελίου, χρησιμοποιώντας το προαναφερόμενο πρωτόκολλο και έχοντας την ίδια συγκέντρωση πολυμερούς.



Σχήμα 3.24: Συνάρτηση κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ για τα υδατικά διαλύματα των (a) PEG-b-PPhOx και (b) PI-b-PEO συμπολυμερών (χωρίς σύμπλοκα νικελίου με $C_{\text{πολυμ.}}=1\text{mg/ml}$ και γωνία σκέδασης 90°) .

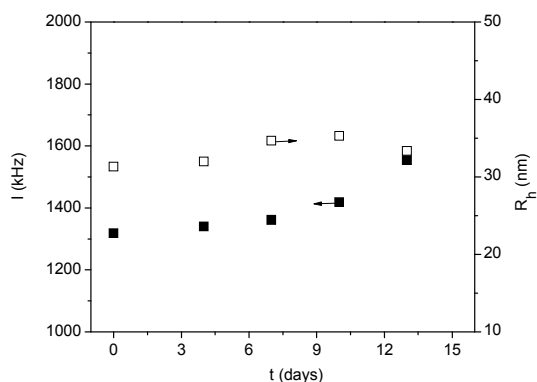
Οι μετρήσεις σκέδασης φωτός (Σχήμα 3.24) έδειξαν ότι οι υδροδυναμικές ακτίνες των PEG-b-PPhOx και PI-b-PEO συμπολυμερών είναι 160 και 43 nm αντίστοιχα. Εν συνεχεία παρασκευάστηκαν τα υδατικά διαλύματα των συμπολυμερών (10mg) προσθέτοντας συγκεκριμένη ποσότητα (1, 2 και 4mg) των Ni 1,2-DT συμπλόκων, τα οποία συμβολίζονται με τους λόγους (mg συμπολυμερούς/ mg Ni συμπλόκων) = (10/1), (10/2) και (10/4) αντίστοιχα. Τα πιο σταθερά υδατικά διαλύματα παρουσιάζονται κάτωθι:

Νανοσύστημα (A): PEG-b-PPhOx/ (Me₄N)[Ni(dmeodddt)] (10/1). Τα αποτελέσματα από τα UV-Vis-NIR φάσματα και τη σκέδαση φωτός του νανοσυστήματος (A) απεικονίζεται στο Σχήμα 3.25.

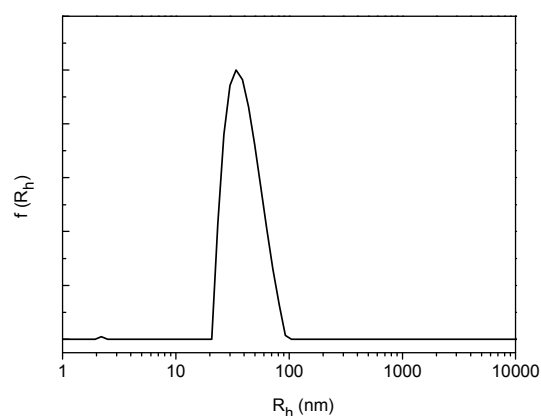


Σχήμα 3.25: Τα UV-Vis-NIR φάσματα των (a) PEG-b-PPhOx/ (Me₄)N[Ni(dmeoddtdt)] σε THF, (b) (Me₄)N[Ni(dmeoddtdt)] σύμπλοκα ενσωματωμένα στο PEG-b-PPhOx συμπολυμερές σε H₂O (1 μέρα) και (c) (Me₄)N[Ni(dmeoddtdt)] σύμπλοκα ενσωματωμένα στο PEG-b-PPhOx συμπολυμερές σε H₂O (13 μέρες). Η αναλογία μάζας (mg του συμπολυμερούς)/(mg των Ni αυτών συμπλόκων) ήταν 10/1.

Τα φασματοσκοπικά αποτελέσματα έδειξαν κορυφή στα 1140 και 1160 nm όταν το νανοσύστημα A ήταν διαλελυμένο σε THF και υδατικό διάλυμα αντίστοιχα. Η ελαφρά αυτή μετατόπιση, σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (και συνεπώς χαμηλότερη ενέργεια) είναι γνωστή και ως βαθμοχρωμική (bathochromic shift). Στην περίπτωση του νανοσυστήματος A, αυτή η μετατόπιση οφείλεται ενδεχομένως σε μεταβολή του περιβάλλοντος ¹¹⁰ από THF σε υδατικό. Η «αντίληψη» από τα (Me₄)N[Ni(dmeoddtdt)] σύμπλοκα ενός πιο πολικού περιβάλλοντος μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη μορίων νερού στον πυρήνα του συσσωματώματος του PEG-b-PPhOx/ (Me₄)N[Ni(dmeoddtdt)]. Η ύπαρξη του υποχρωμικού φαινομένου παρατηρήθηκε ήδη από την πρώτη μέρα με τη μείωση της μοριακής απορρόφησης κατά την αλλαγή του περιβάλλοντος. Στο Σχήμα 3.25 φαίνεται επίσης, ότι η απορρόφηση του UV-Vis-NIR του νανοσυστήματος A σε νερό μειώθηκε περαιτέρω κατά τη διάρκεια των 13 ημερών. Αυτή η συνεχόμενη πτώση της έντασης, κατά τη διάρκεια των 13 ημερών, πιθανότατα συνάγει την δημιουργία μεγαλύτερων σε μέγεθος συσσωματωμάτων (γεγονός που αποδεικνύεται και από τα DLS δεδομένα).



(α)

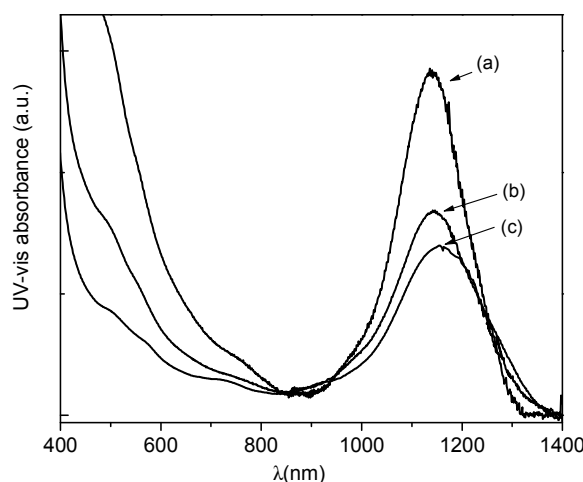


(β)

Σχήμα 3.26: (α) Η ένταση της σκέδασης και η υδροδυναμική ακτίνα συναρτήσει του χρόνου (t), (β) η συνάρτηση κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ για τα υδατικά διαλύματα PI-b-PEO/(Me₄N)[Ni(dmeodddt)] με αναλογία μάζας (mg συμπολυμερές)/ (mg Ni συμπλοκών) να είναι 10/ 1.

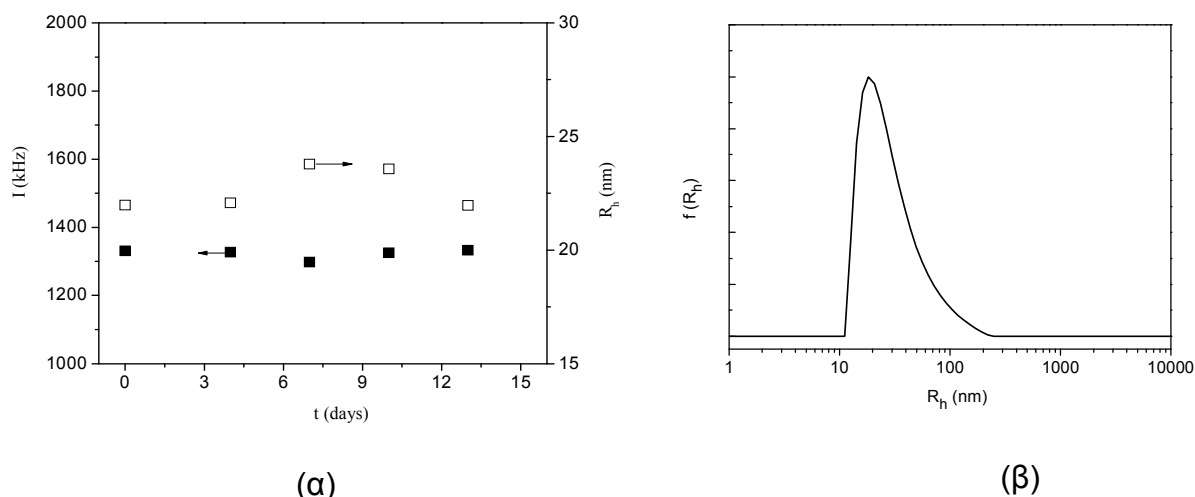
Παράλληλα, ο αλγόριθμος CONTIN έδειξε ότι η κατανομή του μεγέθους $f(R_h)$ στα υδατικά διαλύματα του νανοσυστήματος αυτού είναι σχετικά στενή (Σχήμα 3.26 (β)), και η υδροδυναμική ακτίνα βρέθηκε στα 35nm (1 μέρα). Στο Σχήμα 3.26 (α), η R_h φαίνεται να είναι σταθερή σε σχέση με το χρόνο, ενώ η ένταση αυξήθηκε ελαφρά (μετά την 7η μέρα). Αυτά τα σημάδια δείχνουν μια τάση για συσσωμάτωση και τη δυνατότητα καθίζησης έπειτα από παραμονή για μεγάλο σχετικά χρονικό διάστημα.

Νανοςύστημα (B): PI-b-PEO/ (Me₄N)[Ni(dmeodddt)] (10/1). Το δεύτερο σταθερό υδατικό σύστημα αποτελείται από το ίδιο θετικό σύμπλεγμα νικελίου ((Me₄N)[Ni(dmeodddt)]), και το δεύτερο συμπολυμερές κατά συστάδες (PI-b-PEO). Τα αποτελέσματα από UV-Vis-NIR και LS τεχνικές φαίνονται στο Σχήμα 3.27 και 28 αντίστοιχα.



Σχήμα 3.27: Τα UV-Vis-NIR φάσματα των (a) PI-b-PEO/ (Me₄)N[Ni(dmeodddt)] σε THF διάλυμα, (b) (Me₄)N[Ni(dmeodddt)] σύμπλοκα εθυλακωμένα στο PI-b-PEO συμπολυμερές σε H₂O (1 μέρα), (c) (Me₄)N[Ni(dmeodddt)] σύμπλοκα ενσωματωμένα στο PI-b-PEO σε H₂O (13 μέρα). Η αναλογία μαζών (mg συμπολυμερούς)/ (mg Ni συμπλόκων) είναι 10 προς 1.

Όπως αναφέρθηκε και για το νανοσύστημα A, οι κορυφές αυτών των Ni συμπλόκων και τα υβριδικά νανοσωματίδια παρατηρήθηκαν στα 1090 και στα 1140 nm (του φάσματος UV-Vis-NIR). Αυτό το σύστημα σε υδατικά διαλύματα δείχνει την ίδια θέση κορυφής στα 1140 nm αλλά καθώς ο χρόνος περνούσε, η ένταση της απορρόφησης μειώθηκε και μετακινήθηκε προς υψηλότερα μήκη κύματος δηλαδή περίπου στα 1160 nm μετά από 13 ημέρες. Σε σχέση με το A νανοσύστημα, η ελαφριά μεταβολή του μήκους κύματος των PI-b-PEO/ (Me₄)N[Ni(dmeodddt)] από THF περιβάλλον σε νερό μπορεί να οφείλεται στη μεταβολή του συμπολυμερούς. Συνεπώς, κατά το πέρας των δύο εβδομάδων, η ύπαρξη του PI υδρόφοβου τμήματος σε σχέση με το PPhOx του A νανοσυστήματος, αποδεικνύει ότι δίνει πιο σταθερά συσσωματώματα. Η αλλαγή δηλαδή του περιβάλλοντος δε παίζει τόσο σημαντικό ρόλο ή αλλιώς το φαινόμενο του θετικού σολαβατοχρωμισμού δεν είναι τόσο ισχυρό για το νανοσύστημα B γεγονός που μπορεί να υποστηριχθεί και από την ευρύτητα των UV-Vis-NIR κορυφών, η οποία δεν μεταβάλλεται τόσο όσο στο νανοσύστημα A.

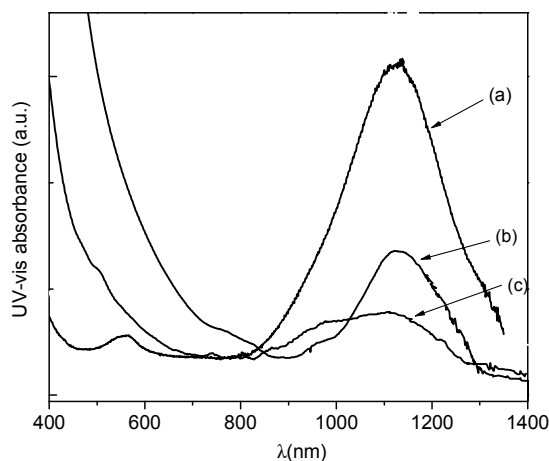


Σχήμα 3.28: DLS αποτελέσματα: (α) Η ένταση της σκέδασης και η υδροδυναμική ακτίνα σε σχέση με το χρόνο, (β) η συνάρτηση κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ για τα υδατικά διαλύματα του PI-b-PEO/(Me₄)N[Ni(dmeodddt)] νανοσυστήματος. Η αναλογία μάζας (mg συμπολυμερούς)/ (mg Ni συμπλόκων) είναι 10 προς 1.

Η υδροδυναμική ακτίνα είναι μικρότερη (περίπου 18 nm) και η κατανομή μεγέθους είναι ευρύτερη από εκείνη του συστήματος A (Σχήμα 3.28 (β)). Στο Σχήμα 3.28 (α), τόσο η I όσο και η R_h αυτών των νανοσωματιδίων φάνηκαν σταθερές για 13 ημέρες. Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν στην ύπαρξη ενός PI-b-PEO/(Me₄)N[Ni(dmeodddt)] νανοσυστήματος σε υδατικό περιβάλλον.

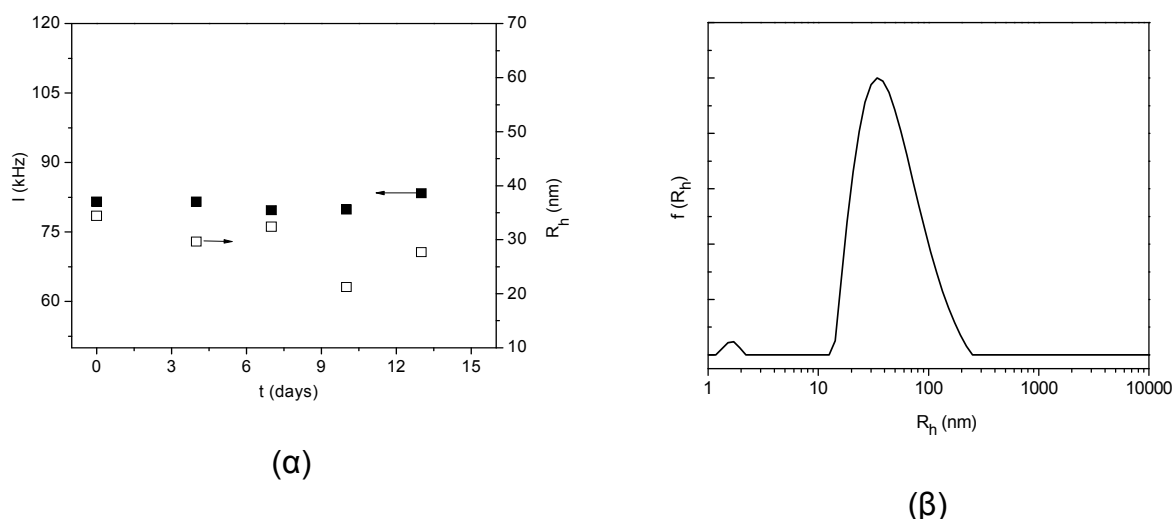
Νανοσύστημα (C): PEG-b-PPhOx/(Bu₄)N[Ni(dddtd)₂] (10/1). Η κορυφή στα 1130 nm αναφέρεται στο (Bu₄)N[Ni(dddtd)₂] σύμπλεγμα με το PEO-b-PPhOx συμπολυμερές σε THF διάλυμα, ενώ η θέση της κορυφής αυτής σε υδατικά διαλύματα του νανοσυστήματος C φαίνεται να είναι σχεδόν η ίδια (Σχήμα 3.29, 1 μέρα). Καθώς περνούσαν οι μέρες, η απορρόφηση του UV-Vis-NIR φάσματος έπεφτε και η κορυφή γινόταν ευρύτερη. Αυτό το αποτέλεσμα ενισχύει την άποψη, ότι μπορεί να λάβει χώρα ενδεχόμενη καταβύθιση των υβριδικών σωματιδίων. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλετε σε αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις στην περιοχή διαμόρφωσης των συμπλόκων. Η αναδιάταξη του (Bu₄)N[Ni(dddtd)₂] συμπλόκου στον πυρήνα που φαίνεται ήδη από την 1η μέρα με την πτώση του σήματος μπορεί να οφείλεται στη μερική οξείδωση του συμπλόκου του νικελίου, όπως παρόμοια συνέβει στο νανοσύστημα A. Στην παρούσα περίπτωση όμως το φαινόμενο αυτό είναι πιο έντονο στο νανοσύστημα αυτό και καθώς περνούν οι μέρες, και παρουσιάζεται αρνητικός σολβατοχρωμισμός, γεγονός που

αποδεικνύεται με την ύπαρξη εκτός από την κορυφή στα 1129 nm, του ώμου ¹¹⁰ γύρω στα 980 nm.



Σχήμα 3.29: Τα UV-Vis-NIR φάσματα των (a) PEG-b-PPhOx/ (Bu₄N)[Ni(dddtd)₂] σε THF, (b) (Bu₄N)[Ni(dddtd)₂] σύμπλοκο ενθυλακωμένο στο PEG-b-PPhOx πολυμερές σε H₂O (1 μέρα) και (c) (Bu₄N)[Ni(dddtd)₂] σύμπλοκο έγκλεισμένο στο PEG-b-PPhOx σε H₂O (13 μέρες).

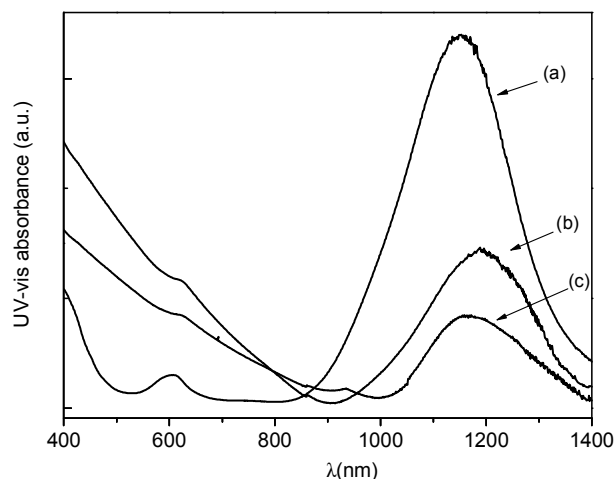
Η κατανομή μεγέθους $f(R_h)$ του συστήματος αυτού σε υδατικά διαλύματα, είναι στενή αλλά όχι τόσο όσο ήταν του συστήματος A (Σχήμα 3.30 (β)). Επιπλέον, η υδροδυναμική ακτίνα η οποία βρέθηκε να μειώνεται ελαφρά με το χρόνο. Στο Σχήμα 3.30 (α), η I δείχνει μια σχετική σταθερότητα με το χρόνο. Συμπερασματικά, τα υδατικά διαλύματα του νανοσυστήματος C, ήταν ένα σχετικά σταθερό νανοςύστημα αν και παρατηρήθηκε η έναρξη καθίζησής των νανοσωματιδίων των διαλυμάτων αυτών μετά από 13 μέρες.



Σχήμα 3.30: DLS αποτελέσματα: (α) Η ένταση της σκέδασης του φωτός και η υδροδυναμική ακτίνα των νανοσωματιδίων συναρτήσει του χρόνου, (β) η συνάρτηση κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ για τα υδατικά διαλύματα των PEG-b-PPhOx/ $(Bu_4N)[Ni(dddtd)_2]$ πολυσυμπλόκων με αναλογία μαζών (mg συμπολυμερούς)/(mg Ni συμπλόκων) να είναι 10: 1.

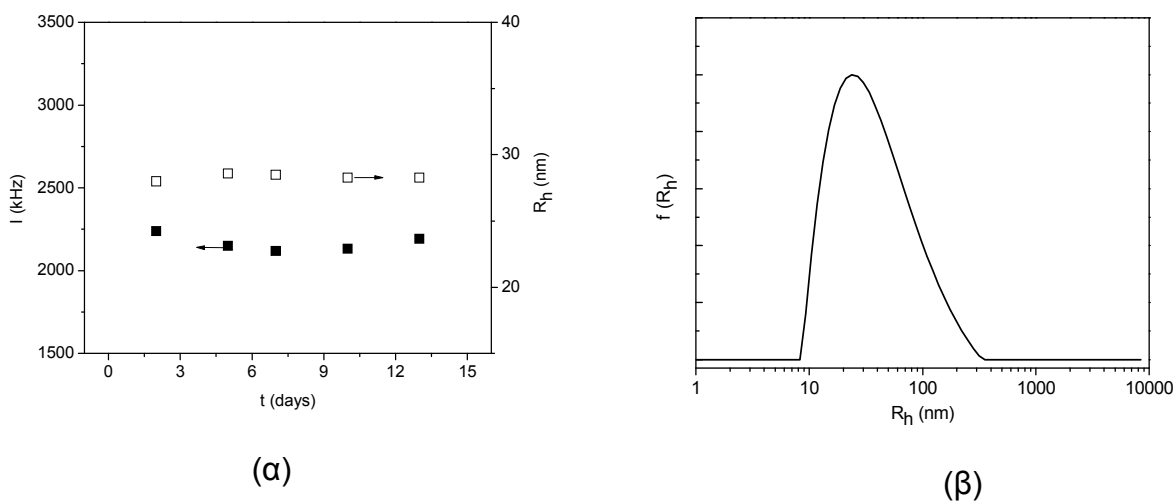
Νανοσύστημα (D): PI-b-PEO/ $(Bu_4N)[Ni(dddtd)_2]$ (10/1). Τα UV-Vis-NIR και LS αποτελέσματα των υβριδικών υδατικών διαλυμάτων των PI-b-PEO/ $(Bu_4N)[Ni(dddtd)_2]$ πολυσυμπλόκων, φαίνονται στα Σχήματα 31 και 32 αντίστοιχα. Στο Σχήμα 3.31, υπάρχει μια μικρή διαφορά μεταξύ των ζωνών απορρόφησης των THF και υδατικών διαλυμάτων του νανοσυστήματος D. Στα υδατικά διαλύματα αυτού του συστήματος, παρατηρήθηκε μία ελαφρά μείωση της απορρόφησης σε μεγαλύτερους χρόνους.

Μέσα από το φάσμα απορρόφησης φαίνεται ότι πιθανότατα δεν υπάρχει κάποια σημαντική αλλοίωση του πυρήνα του νανοσυσσωματώματος ή αλληλεπίδραση στο περιβάλλον διαμόρφωσης των συμπλόκων του νικελίου. Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται και από τα δεδομένα σκέδασης φωτός.



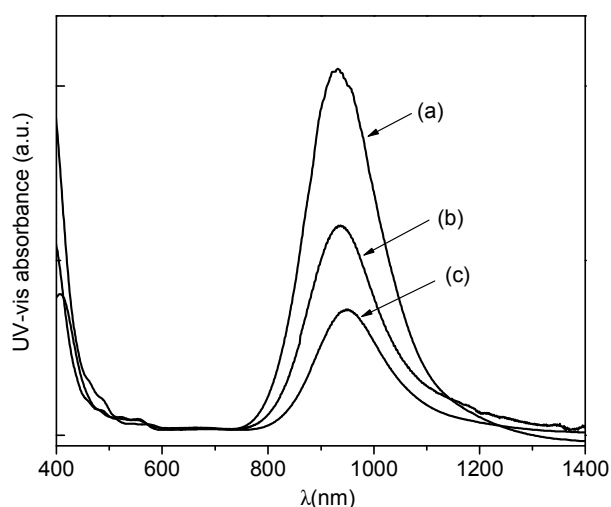
Σχήμα 3.31: Τα UV-Vis-NIR φάσματα των (a) PI-b-PEO/ $(\text{Bu}_4\text{N})[\text{Ni}(\text{dddtd})_2]$ πολυσυμπλόκων σε THF, (b) $(\text{Bu}_4\text{N})[\text{Ni}(\text{dddtd})_2]$ σύμπλοκο ενθυλακωμένο στο PI-b-PEO συμπολυμερές σε H_2O (1 μέρα) και (c) $(\text{Bu}_4\text{N})[\text{Ni}(\text{dddtd})_2]$ σύμπλοκο έγκλειστο στο PI-b-PEO δισυσταδικό σε H_2O (13 μέρες).

Η υδροδυναμική ακτίνα του νανοσυστήματος D βρέθηκε στα 23nm (Σχήμα 3.32(β)). Οι τιμές τόσο της I όσο και της R_h του υδατικού αυτού συστήματος ήταν σταθερές για 13 μέρες (Σχήμα 3.32(α)).



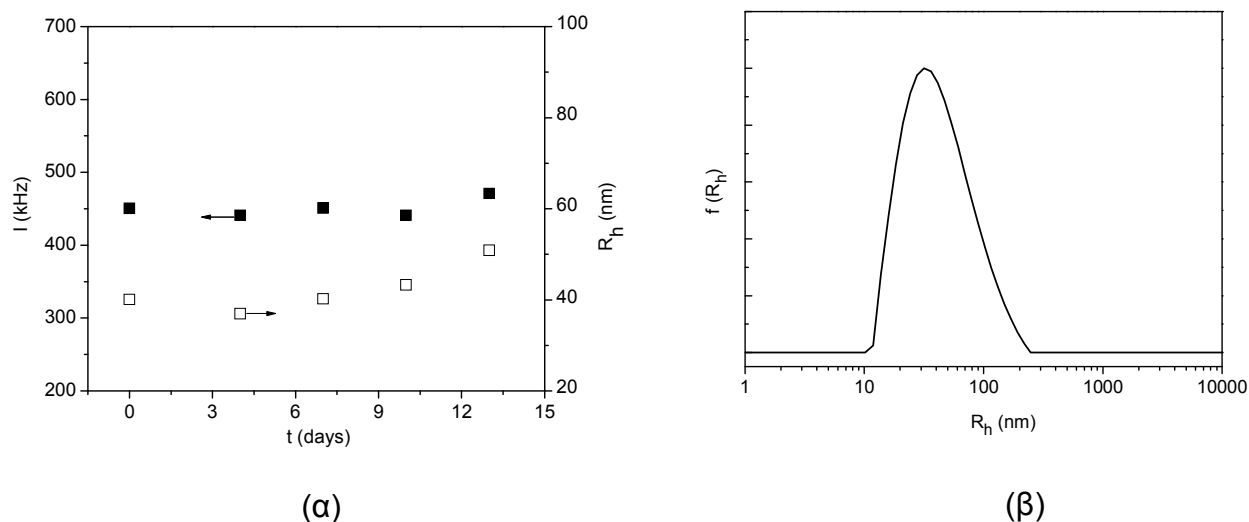
Σχήμα 3.32: Απεικόνιση DLS αποτελεσμάτων: (α) Η σκεδαζόμενη ένταση και η R_h με την πάροδο του χρόνου, (β) η συνάρτηση κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ για τα υδατικά διαλύματα του PI-b-PEO/ $(\text{Bu}_4\text{N})[\text{Ni}(\text{dddtd})_2]$ πολυσυμπλόκου. Η αναλογία μαζών (mg συμπολυμερούς)/ (mg Ni συμπλόκων) ήταν 10 προς 1.

Νανοσύστημα (E): PEO-b-PPhOx/[Ni(pddt)₂] (10/1). Η θέση της κορυφής για αυτό το σύστημα (Σχήμα 3.33), είτε αυτό έχει διαλυθεί σε THF είτε σε νερό, είναι σχεδόν η ίδια. Αν και δεν υπάρχει μεταβολή στη θέση της κορυφής μετά από 13 ημέρες, η απορρόφηση στα 930nm μειώθηκε κατά τη διάρκεια των 13 ημερών. Το ουδέτερο Ni[(pddt)₂] σύμπλοκο λοιπόν, ενδέχεται να εγκιβωτίζεται πιο κοντά στη διεπιφάνεια του PEO-PPhOx. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να αποφύγει την επαφή με τυχόν μόρια νερού που είναι εγκλωβισμένα στον πυρήνα του συμπλόκου. Όμως με αυτόν τον τρόπο μπορεί να συμβάλλει στην αύξηση του μεγέθους και της μάζας των συσσωματωμάτων του PEO-b-PPhOx/[Ni(pddt)₂] νανοσυστήματος.



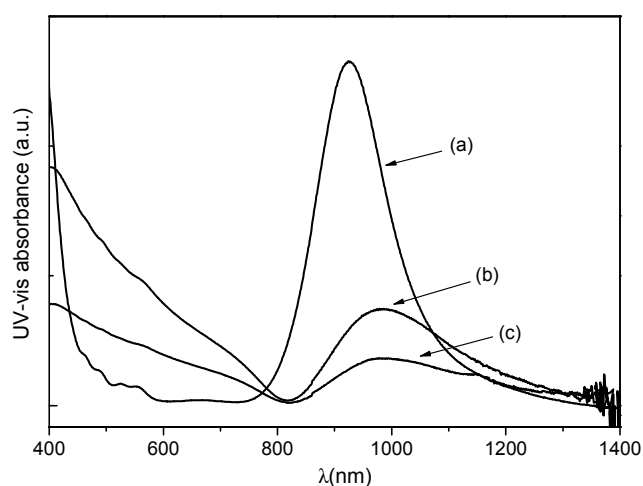
Σχήμα 3.33: Τα UV-Vis-NIR φάσματα των (a) PEO-b-PPhOx/ Ni[(pddt)₂] σε THF, (b) ενθυλακωμένα Ni[(pddt)₂] σύμπλοκα στα PEO-b-PPhOx συμπολυμερή σε H₂O (1 μέρα) και (c) εγκιβωτισμένα Ni[(pddt)₂] σύμπλοκα στα PEO-b-PPhOx σε H₂O (13 ημέρες). Η αναλογία μαζών (mg συμπολυμερούς)/ (mg Ni συμπλοκών) ήταν 10 προς 1.

Η $f(R_h)$ του νανοσυστήματος αυτού σε υδατικά διαλύματα, ήταν αρκετά ευρεία (Σχήμα 3.34 (β)). Στο Σχήμα 3.34 (α), όχι μόνο η ένταση του φωτός σκέδασης (η οποία είναι 400 kHz), αλλά και η R_h παρουσίασε επίσης αύξηση μετά την πάροδο 9 ημερών. Τα συμπεράσματα αυτά συνάγουν στο παραπάνω συμπέρασμα του αναδαιάταξης των συμπλόκων του νικελίου σε περιοχές ίδιας πολικότητας.



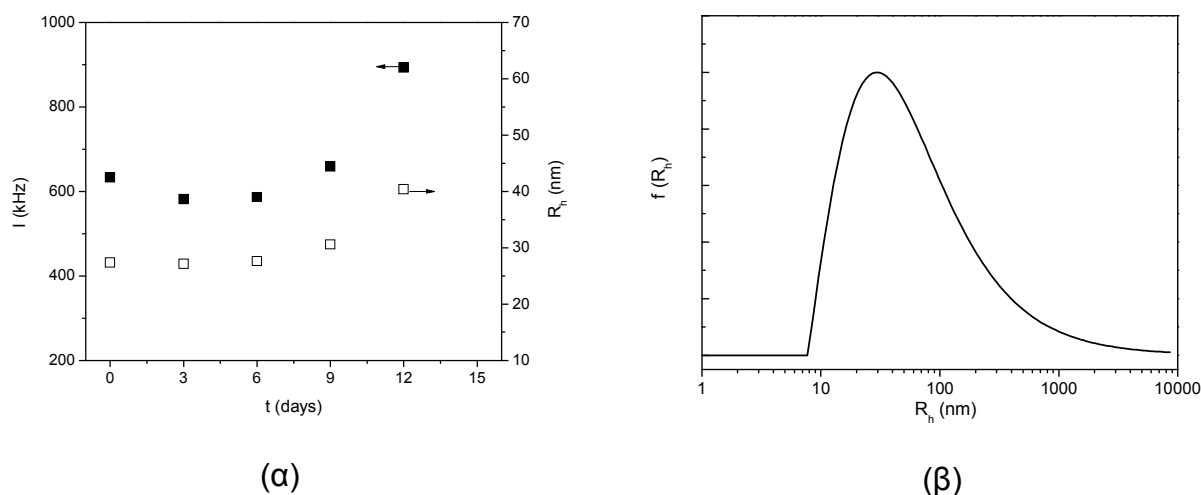
Σχήμα 3.34: (α) Η σκεδαζόμενη I και η R_h ακτίνα σε συνάρτηση με το χρόνο, (β) η συνάρτηση κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ για τα υδατικά διαλύματα PEO-b-PPhOx/ $\text{Ni}[(\text{pddt})_2]$ με αναλογία μαζών (mg συμπολυμερούς)/ (mg Ni συμπλοκών) που είναι 10 προς 1.

Νανοσύστημα (F): PI-b-PEO/ $[\text{Ni}(\text{pddt})_2]$ (10/1). Οι UV-Vis-NIR μετρήσεις (Σχήμα 3.35) δείχνουν ότι η κορυφή του συστήματος αυτού μεταβάλλεται από 930 σε 985 nm, όταν αυτό διαλύθηκε από THF σε νερό διαλύτη. Επιπρόσθετα, η ένταση της απορρόφησης μειώνεται μέσα στο χρόνο όταν χρησιμοποιείται νερό ως διαλύτης.



Σχήμα 3.35: Τα UV-Vis-NIR δεδομένα των (α) PI-b-PEO/ $\text{Ni}[(\text{pddt})_2]$ σε THF, (β) ενθυλακωμένα $\text{Ni}[(\text{pddt})_2]$ στο PI-b-PEO συμπολυμερές σε H_2O (1 ημέρα) και (γ) εγκλιβωτισμένα $\text{Ni}[(\text{pddt})_2]$ σύμπλοκα στο PI-b-PEO σε H_2O (13 ημέρες). Η αναλογία μαζών (mg συμπολυμερούς)/ (mg Ni συμπλοκών) είναι 10: 1.

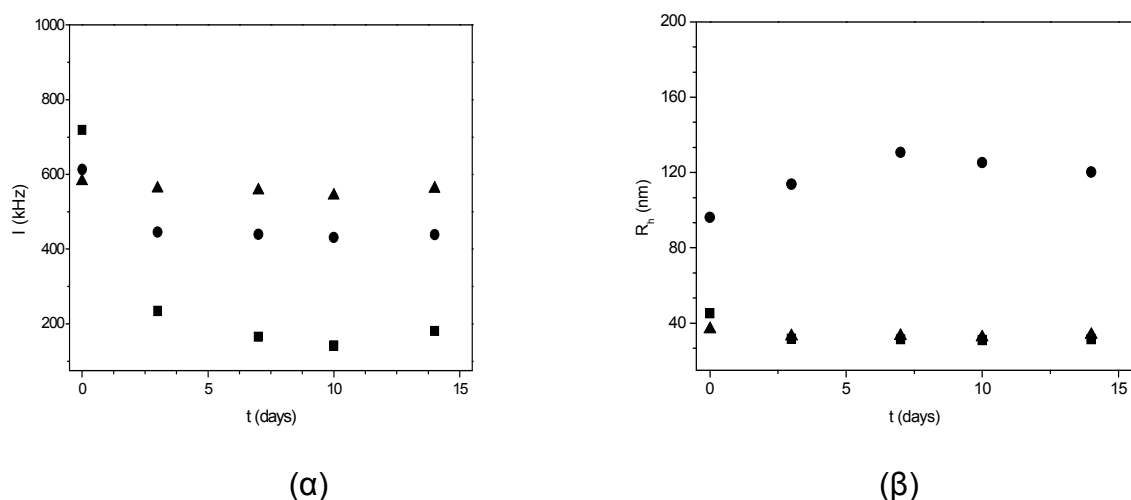
Η μετατόπιση των κορυφών από το (a) στο (b) του Σχήματος 3.35, δηλαδή σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (bathochromic shift), όπως και στην περίπτωση του νανοσυστήματος A, οφείλεται ενδεχομένως σε μεταβολή του περιβάλλοντος¹¹⁰ από THF σε υδατικό. Το ουδέτερο $\text{Ni}[(\text{pddt})_2]$ πιθανότατα βρίσκεται στη διεπιφάνεια μεταξύ του PI και PEO.



Σχήμα 3.36: (α) Η ένταση της σκέδασης και η υδροδυναμική ακτίνα σε συνάρτηση με το χρόνο, (β) η συνάρτηση κατανομής μεγέθους $f(R_h)$ για τα υδατικά διαλύματα του PI-b-PEO/ $\text{Ni}[(\text{pddt})_2]$ με αναλογία μαζών (mg συμπολυμερούς)/ (mg Ni συμπλόκων) να είναι 10 προς 1.

Σύμφωνα με τη DLS, η υδροδυναμική ακτίνα αρχικά ήταν 29 nm και έπειτα αυξήθηκε μετά από 9 μέρες. Επίσης, η σκεδαζόμενη ένταση παρουσίασε την ίδια τάση με την R_h , και αυξήθηκε μετά το πέρας των 9 ημερών από την παρασκευή των υδατικών διαλυμάτων του νανοσυστήματος F. Στο Σχήμα 3.36 αποδίδονται παραστατικά τα αποτελέσματα αυτά. Όμοια με το E νανοςύστημα στο νερό αυξάνεται η μάζα και το μέγεθος των συσσωματωμάτων.

Γ) PBS διαλύματα. Τα διαλύματα PBS, έχοντας ωσμωτικότητα και συγκεντρώσεις ιόντων κοντινές με εκείνες του ανθρώπινου σώματος^{239 240}, χρησιμοποιήθηκαν ως προπαρασκευαστικά πειράματα προ βιοτεχνολογικών εφαρμογών. Από τα παραπάνω υδατικά διαλύματα, αυτά τα οποία είναι τα πιο σταθερά, αυτά και επιλέχθηκαν για περαιτέρω έρευνα. Ως εκ τούτου, τα υδατικά διαλύματα των νανοσυστημάτων B, C και D αραιώθηκαν σε PBS.

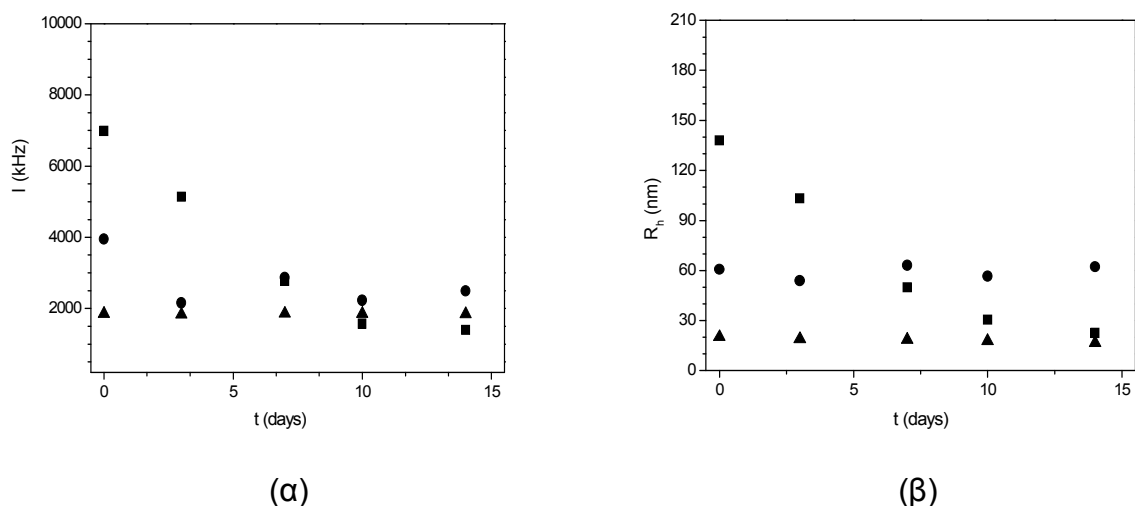


Σχήμα 3.37: DLS αποτελέσματα: (α) Η ένταση της σκέδασης του φωτός και (β) η υδροδυναμική ακτίνα των B (▲), C (■) και D (●) νανοσυστημάτων σε PBS.

Στο Σχήμα 3.37 φαίνονται τα αποτελέσματα της σκέδασης του φωτός συναρτήσει του χρόνου αυτών των τριών νανοσυστημάτων σε PBS διάλυμα. Όσον αφορά την ένταση των νανოსωματιδίων των συστημάτων C (PEO-b-PPhOx/ (Bu₄N)[Ni(dddtd)₂]) και D (PI-b-PEO/ (Bu₄N)[Ni(dddtd)₂] σε PBS διάλυμα αρχικά παρατηρήθηκε μείωση και εν τέλει, σταθεροποίησή της. Η R_h του νανοσυστήματος C σε PBS διάλυμα ήταν κάπως σταθερή στο διάστημα των 13 ημερών. Βέβαια αυτό φαίνεται μετά από μια μικρή μείωση της υδροδυναμικής ακτίνας της που παρατηρήθηκε μετά από 1 μέρα. Όσον αφορά την R_h του συστήματος D, αυτή αυξήθηκε έως την 7η ημέρα, μετά από την οποία καθίστατο περισσότερο ή λιγότερο σταθερή. Από την άλλη πλευρά, οι τιμές των I και R_h του συστήματος B σε PBS ήταν σταθερές με την πάροδο του χρόνου. Πρέπει να σημειωθεί εδώ, ότι η μείωση της έντασης σκέδασης του φωτός καθώς η R_h παραμένει σταθερή, είναι ένα σημάδι καθίζησης. Η περίπτωση που η I μειώνεται και αυξάνεται η R_h , μπορεί να είναι σημάδι της συσσωμάτωσης/καθίζησης των σωματιδίων.

3.4.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση για την αλληλεπίδραση των συμπλόκων συμπολυμερούς/ νικελίου με πρωτεΐνες του FBS διαλύματος

Τα αποτελέσματα της δυναμικής σκέδασης του φωτός (σε γωνία σκέδασης $\theta = 90^\circ$) για τα B, C και D νανοσυστήματα σε διαλύματα PBS-FBS φαίνονται στο Σχήμα 3.38.



Σχήμα 3.38: (α) Η ένταση της σκέδασης του φωτός και (β) η υδροδυναμική ακτίνα των B (▲), C (■) και D (●) νανοσυστημάτων σε PBS/ FBS (90/10v/v %) διαλύματα.

Στα τρία αυτά διαλύματα νανοσυστημάτων, οι εντάσεις σκέδασης του φωτός είναι υψηλότερες από αυτές σε PBS δείχνοντας μια πιθανή αλληλεπίδραση των νανοσυστημάτων με τις πρωτεΐνες των διαλυμάτων PBS-FBS. Η I του συστήματος C σε διάλυμα PBS-FBS μειώθηκε σημαντικά με το χρόνο, ενώ η αντίστοιχη ένταση του φωτός του συστήματος D μετά από μια μείωση, αρχίζει να αυξάνεται και πάλι. Η υδροδυναμική ακτίνα του νανοσυστήματος C σε διάλυμα PBS-FBS μειώθηκε με το πέρασμα του χρόνου, ενώ η R_h από το σύστημα D κυμάνθηκε γύρω από μια ορισμένη τιμή. Επίσης, η R_h του PI-b-PEO/ (Me₄)N[Ni(dmeodddt)] (σύστημα B) σε διάλυμα PBS-FBS είναι σταθερή για 13 μέρες, έχοντας τιμή ίση με 25 nm. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν μερική συσσωμάτωση των υβριδικών νανοσωματιδίων λόγω της ιοντικής προάσπισης και συμπλοκοποίησης με τις πρωτεΐνες του διαλύματος FBS. Ως εκ τούτου, μπορεί να υποστηριχθεί ότι το υβριδικό PI-b-PEO / (Me₄)N[Ni(dmeodddt)] νανοςύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για βιοτεχνολογικούς σκοπούς.

3.5 Αποτελέσματα και Συζήτηση για τα υβριδικά νανοσυστήματα με μαγνητικά σωματίδια

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή του 3.4 υποκεφαλαίου, χρησιμοποιήθηκαν τα αμφίφιλα PEO-b-PPhOx (του PEG-b-PPhOx3) και PI-b-PEO συμπολυμερή, με τα PI και

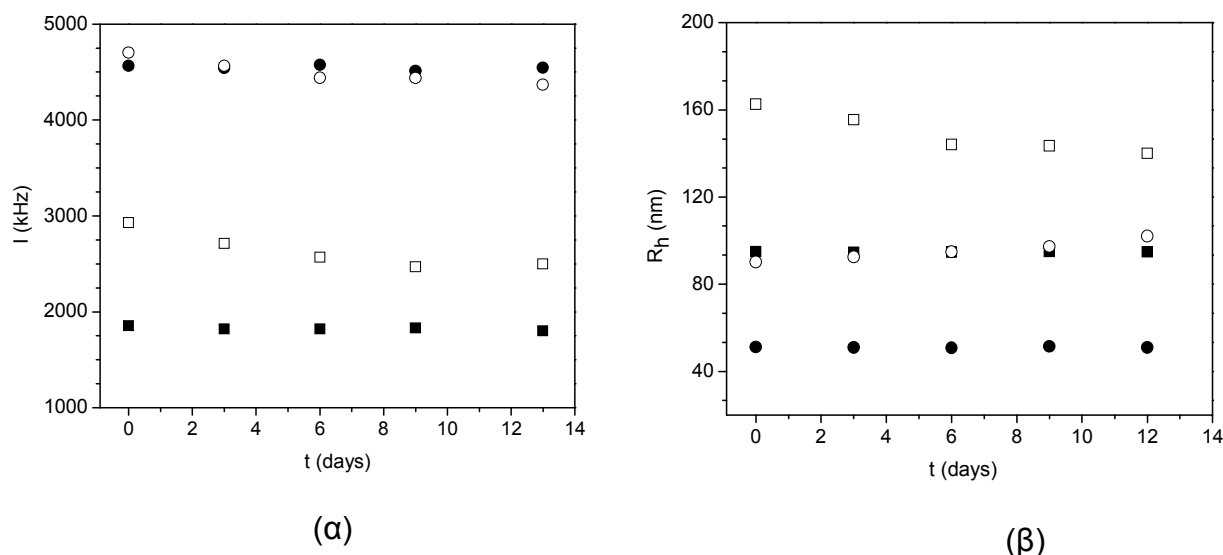
PPhOx τμήματα να έχουν υδρόφοβο χαρακτήρα. Από την άλλη μεριά, τα μαγνητικά σωματίδια έχουν μόνο υδρόφοβο χαρακτήρα.

3.5.1 Αποτελέσματα και Συζήτηση για τα διαλύματα που εμπεριέχουν δισυσταδικά συμπολυμερή και μαγνητικά σωματίδια $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

Συμπολυμερή συμπλεγμένα με δείγμα. Για τα δύο αυτά δισυσταδικά συμπολυμερή χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο II το οποίο περιλάμβανε τη διάλυσή τους σε THF διαλύτη και εν συνεχεία προσθήκη σε απεσταγμένο νερό. Αφού εξατμίστηκε ο διαλύτης THF, τα υδατικά διαλύματα των δισυσταδικών συμπολυμερών εξετάστηκαν με LS, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως αναφορά στα αποτελέσματα σύμπλεξής τους με μαγνητικά σωματίδια και πρωτεΐνες. Στο Σχήμα 3.24, παρουσιάζονται οι μετρήσεις σκέδασης φωτός των συμπολυμερών (χωρίς μαγνητικά σωματίδια), σε υδατικά πλέον διαλύματα (Πρωτόκολλο II, $C=10^{-3}\text{g/ml}$, για γωνία σκέδασης 90°). Οι R_h των PEG-b-PPhOx και PI-b-PEO (Πρωτόκολλο II) βρέθηκαν ίσες με 169 και 43nm αντίστοιχα. Από την ανάλυση του CONTIN αλγορίθμου, φάνηκαν ότι οι κατανομές μεγέθους των συμπολυμερών σ' αυτά τα διαλύματα ήταν ευρείς. Εν τέλει δέ, οι απόλυτες εντάσεις σκέδασης του φωτός των PEG-b-PPhOx και PI-b-PEO συμπολυμερών σε H_2O ήταν 1348 και 1578kHz αντίστοιχα.

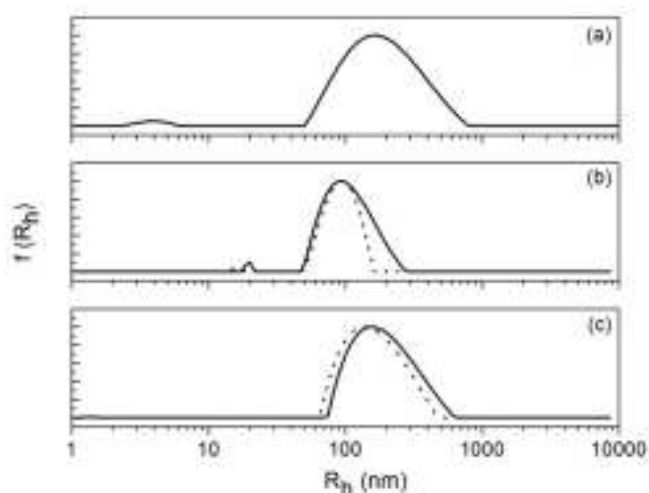
A) Υδατικά διαλύματα.

Παρασκευάστηκαν τα υδατικά διαλύματα των ανωτέρω συμπολυμερών προσθέτοντας συγκεκριμένη ποσότητα (0.1, 0.2 και 0.4 mg) των μαγνητικών σωματιδίων, τα οποία συμβολίζονται με το λόγο (mg συμπολυμερούς/ mg MagnNPs)= (10/0.1), (10/0.2) και (10/0.5) αντίστοιχα.



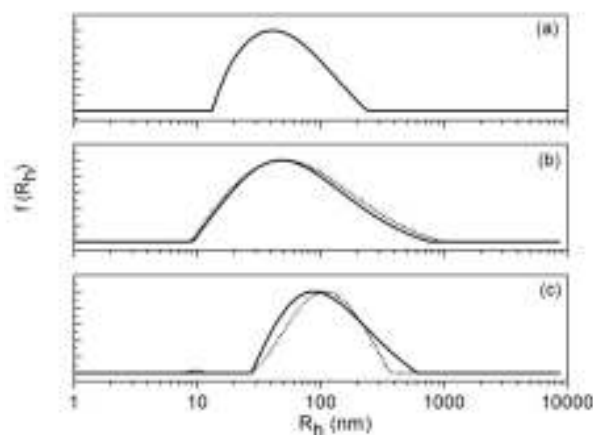
Σχήμα 3.39: (α) Η ένταση της σκέδασης του φωτός και (β) η υδροδυναμική ακτίνα των υδατικών διαλυμάτων των: (■) PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.1), (□) PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.2), (●) PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.2) και (○) PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.5) νανοσυστημάτων.

Από το Σχήμα 3.39, παρατηρήθηκε ότι σε διάρκεια 13 ημερών τόσο η I όσο και η R_h του PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.1) και του PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.2) νανοσυστήματος στο H_2O , παρέμειναν σταθερές. Στα υπόλοιπα νανοσυστήματα των υδατικών διαλυμάτων, εμφανίστηκε μια ελαφρά ελάττωση της έντασης σκέδασης του φωτός. Επιπροσθέτως, στα υδατικά διαλύματα του PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.2) νανοσυστήματος, παρουσιάστηκε μια μείωση της υδροδυναμικής ακτίνας από 160 σε 140 nm, ενώ στα υδατικά διαλύματα του PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.5) συστήματος έγινε αντιληπτή η αύξηση της R_h από 90 σε 120 nm. Ως εκ τούτου, με την πάροδο του χρόνου τα PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.2) νανοσωματίδια φαίνονται να διασπώνται σε μικρότερα ενώ τα PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.5) νανοσωματίδια δημιουργούν μεγαλύτερα συσσωματώματα. Και στις δύο περιπτώσεις υπήρξε μια ελαφρά καθίζηση ή θολότητα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από τη σύγκριση των CONTIN διαγραμμάτων (Σχήματα 3.40 και 3.41).



Σχήμα 3.40: CONTIN διαγράμματα για (a) PEG-b-PPhOx συμπολυμερή χωρίς μαγνητικά σωματίδια, καθώς για (b) PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.1) και (c) PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.2) νανοσυστήματα σε απεσταγμένο νερό. Στα (b) και (c) σχήματα, η μη διακεκομμένη και η διακεκομμένη γραμμή συμβολίζουν το σύστημα νανοσωματιδίων αυτό στη 1η μέρα και στη 13η μέρα αντίστοιχα.

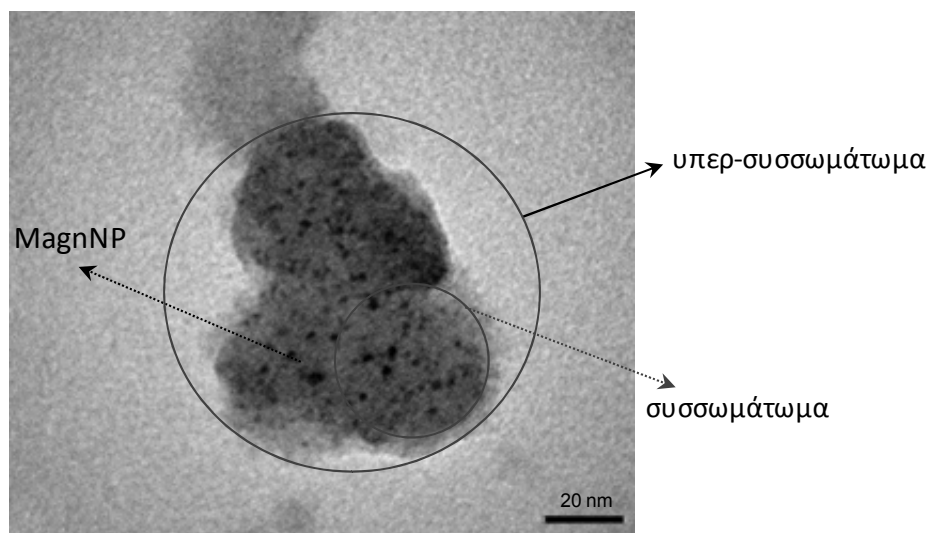
Υπάρχει μια μείωση από 160 nm σε 90nm καθώς τα PEG-b-PPhOx συμπολυμερή εγκλείουν MagnNPs (10/0.1), όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.40 (a) και (b). Δημιουργούνται λοιπόν, πιο μικρά και καλά καθορισμένα νανοσωματίδια αφού ελαττώνεται και το εύρος της κορυφής. Στα υδατικά διαλύματα των PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.2) νανοσυστημάτων παρατηρήθηκαν μεγαλύτερα νανοσωματίδια από την προηγούμενη συγκέντρωση μαγνητικών σωματιδίων.



Σχήμα 3.41: Η συνάρτηση κατανομής μεγέθους σε σχέση με την R_h , για (a) PI-b-PEO συμπολυμερή χωρίς μαγνητικά σωματίδια, (b) PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.2) και (c) PI-b-PEO /MagnNPs (10/0.5) νανοσυστήματα σε απεσταγμένο νερό. Στα (b) και (c) σχήματα, η μη διακεκομμένη και η διακεκομμένη γραμμή συμβολίζουν το αυτό σύστημα νανοσωματιδίων στη 1η μέρα και στη 13η μέρα αντίστοιχα.

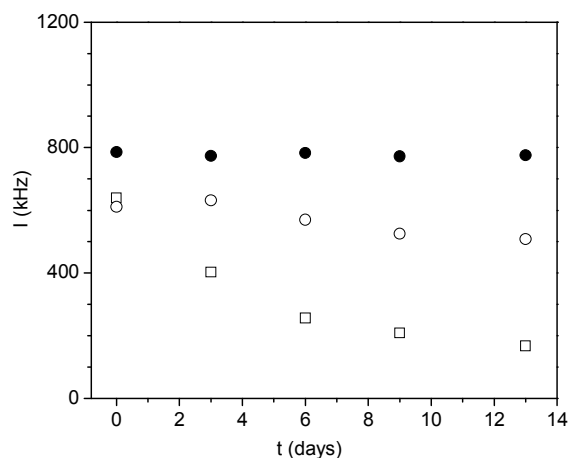
Το PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.2) νανοςύστημα σε υδατικό περιβάλλον εμφανίζει μέγιστο κατανομής σε R_h κοντά σε εκείνο του PI-b-PEO συμπολυμερούς, χωρίς τα μαγνητικά νανοσωματίδια. Η κορυφή του Σχήματος 3.41 (b) είναι διευρυμένη προς μεγαλύτερες ακτίνες. Τούτέστιν, τα διαλύματα αυτά περιέχουν παρομοίου μεγέθους συσσωματώματα με τα αρχικά καθώς και κάποιο πληθυσμό με μεγαλύτερα συσσωματώματα. Η κορυφή στα PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.4) νανοσυστήματα είναι μετατοπισμένη σε σύγκριση με τις αντίστοιχες του Σχήματος 3.41 (b) και (c), γεγονός που σημαίνει ότι σε μεγαλύτερη συγκέντρωση των μαγνητικών νανοσωματιδίων, τα μεγάλα δευτερογενή συσσωματώματα είναι κυρίαρχα.

Τα TEM πειράματα έδειξαν μικρότερο μέγεθος νανοσωματιδίων σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της υδροδυναμικής ακτίνας του DLS. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι τα υβριδικά νανοσυστήματα σε υδατικά διαλύματα σχηματίζουν συσσωματώματα. Για παράδειγμα όπως αποτυπώνεται και στην Εικόνα 3.6. η φαινόμενη ακτίνα του PEG-b-PPhOx/ γ -Fe₂O₃ (10/0.1) νανοσυστήματος σε νερό βρέθηκε γύρω στα 40nm. Βέβαια, με τον όρο φαινόμενη ακτίνα εννοείται η αντίστοιχη υδροδυναμική ακτίνα που θα είχαν τα νανοσωματίδια αυτά αν ήταν σφαιρικά. Τα μεγάλα νανοσωματίδια ήταν σύμπλεγμα μικροτέρων αποτελούμενων από μαγνητικά σωματίδια (σκούρα σωματίδια, Εικόνα 3.6) και ένα πέπλο συμπολυμερούς.

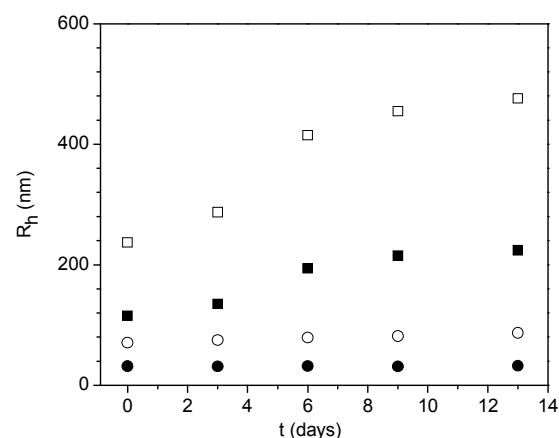


Εικόνα 3.6: TEM απεικόνιση των υδατικών διαλυμάτων των PEG-b-PPhOx/ MagnNPs (10/0.1) νανοσυστημάτων, όπου φαίνονται κυρίως οι πυρήνες των νανοσωματιδίων με μικρά σκούρα να είναι τα μαγνητικά.

B) PBS διαλύματα. Ακολούθησε η μελέτη των PBS διαλυμάτων των παραπάνω νανοσυστημάτων, ώστε να αποκαλυφθούν τυχόν διαφοροποιήσεις κατά την επαφή τους με το ανθρώπινο σώμα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα υδατικά διαλύματα. Στα όλα τα PBS διαλύματα παρατηρήθηκε ότι η I είναι χαμηλότερη από την αντίστοιχη των υδατικών διαλυμάτων. Διαπιστώθηκε ότι στο χρονικό διάστημα των 13 ημερών, η σκεδαζόμενη ένταση των PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.2) και PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.5) νανοσυστημάτων μειώθηκε περίπου από 600 kHz σε 200 και 500 kHz αντίστοιχα. Από την άλλη μεριά, υπήρξε μια μικρή αύξηση της μάζας των PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.1) νανοσωματιδίων σε PBS. Όπως απεικονίζεται στα Σχήματα 42 (β) και 43, οι υδροδυναμικές ακτίνες των PEG-b-PPhOx/MagnNPs νανοσυστημάτων σε PBS που ήταν μεγαλύτερες από εκείνες των ίδιων συστημάτων σε υδατικά διαλύματα και αυξήθηκαν με την πάροδο των 2 εβδομάδων.

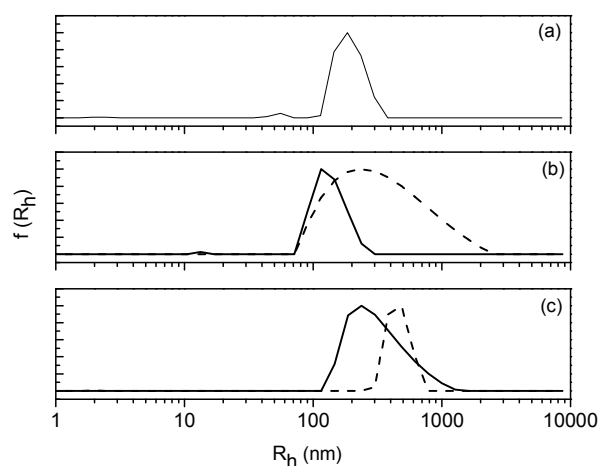


(α)

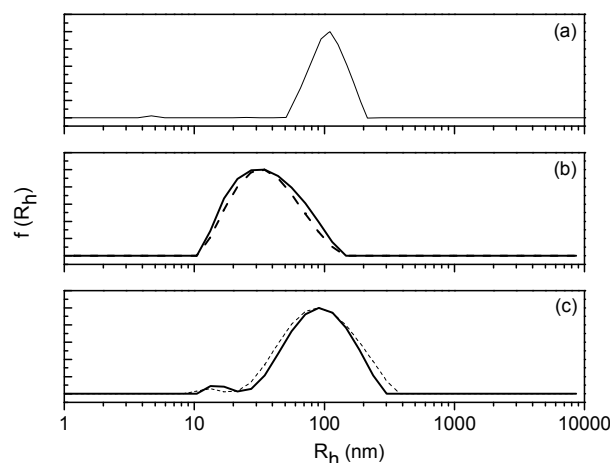


(β)

Σχήμα 3.42: (α) Η ένταση της σκέδασης του φωτός και (β) η υδροδυναμική ακτίνα των: (■) PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.1), (□) PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.2), (●) PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.2) και (○) PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.5) νανοσυστημάτων των PBS διαλυμάτων.



Σχήμα 3.43: Η συνάρτηση κατανομής μεγέθους εν σχέσει με την υδροδυναμική ακτίνα για τα PEG-b-PPhOx/MagnNPs νανοσυστήματα σε PBS διαλύματα, όταν αυτά (α) δεν έχουν μαγνητικά σωματίδια (Πρωτόκολλο II) και όταν έχουν εγκλεισμένα μαγνητικά νανοσωματίδια (b) σε αναλογία (10/0.1) και (c) σε αναλογία (10/0.2) σε PBS. Στα (b) και (c) σχήματα, η μη διακεκομμένη και η διακεκομμένη γραμμή συμβολίζουν το αντίστοιχο σύστημα νανοσωματιδίων στη 1η μέρα και στη 13η μέρα αντίστοιχα.



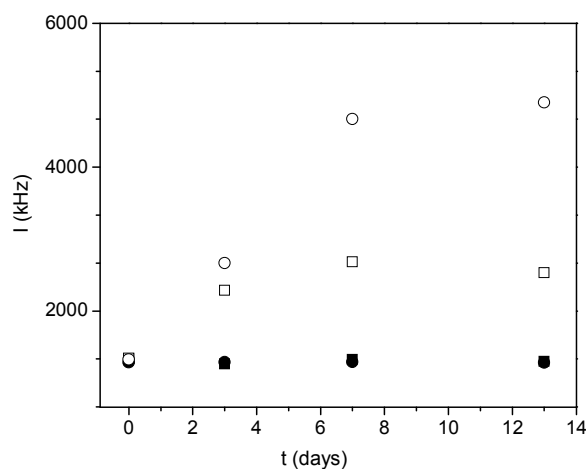
Σχήμα 3.44: Η συνάρτηση κατανομής μεγέθους συναρτήσει της υδροδυναμικής ακτίνας για τα PI-b-PEO/MagnNPs σε PBS διαλύματα, όταν αυτά (a) δεν έχουν μαγνητικά σωματίδια (Πρωτόκολλο II) και όταν έχουν εγκλεισμένα μαγνητικά νανοσωματίδια (b) σε αναλογία (10/0.2) και (c) σε αναλογία (10/0.5) σε PBS. Στα (b) και (c) σχήματα, η μη διακεκομμένη και η διακεκομμένη γραμμή συμβολίζουν το αντίστοιχο σύστημα νανοσωματιδίων στη 1η μέρα και στη 13η μέρα αντίστοιχα.

Στα Σχήματα 42 (β) και 44, φαίνεται να αυξάνεται η R_h του PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.5) από 80 σε 90nm εντός χρονικού διαστήματος 13 ημερών. Από τα παραπάνω δεδομένα συμπεραίνεται ότι το μεν PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.1) νανοσύστημα σε PBS διάλυμα εμφανίζει έντονα σημάδια συσσωμάτωσης, με αύξηση και της πολυδιασποράς του. Τα δε PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.2) και PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.5) νανοσυστήματα σε PBS παρουσίασαν σπάσιμο των συσσωματωμάτων σε μικρότερα. Από τα Σχήματα 42 και 44, διαφαίνεται ότι τα PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.2) νανοσωματίδια σε PBS (με PDI~0.2) ήταν σταθερά τόσο σε ένταση σκέδασης, όσο και σε υδροδυναμική ακτίνα κατά το πέρας των 13 ημερών.

3.5.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση για τα διαλύματα που εμπεριέχουν δισυσταδικά συμπολυμερή/ γ - Fe_2O_3 με πρωτεΐνες του FBS διαλύματος

Όπως αναφέρθηκε και στο 1ο κεφάλαιο, το 10% FBS διαλύματος χρησιμοποιείται για την έρευνα σε κύτταρα (π.χ. ανάπτυξη, κλωνοποίησή τους κλπ). Το επόμενο βήμα λοιπόν, ήταν να δοκιμαστούν τα νανοσυστήματα αυτά των PBS διαλυμάτων, αν αλληλεπιδρούν ή αν συμπλέκονται κατά την είσοδό τους σε περιβάλλον που ομοιάζει με

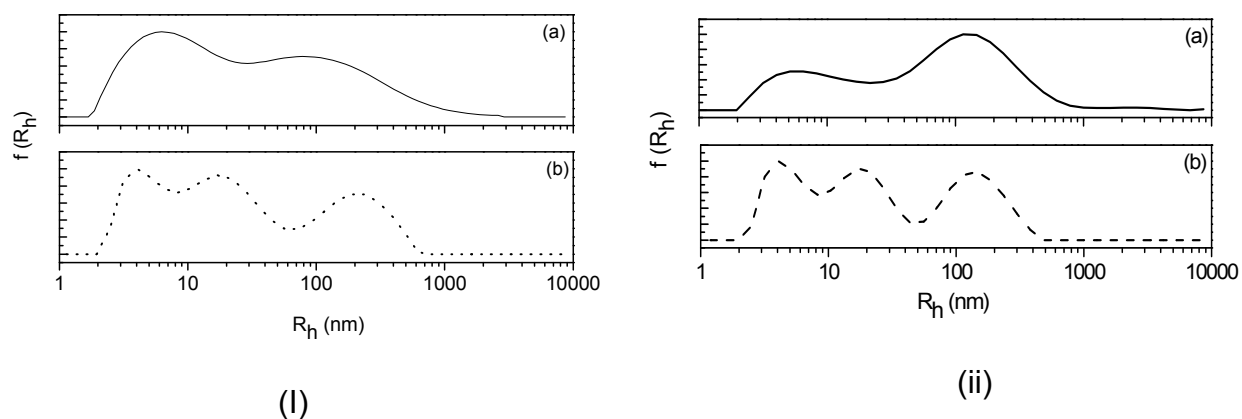
τον ανθρώπινο ορό του αίματος. Τα πειράματα με DLS παρουσιάζονται στα Σχήματα 3.45 έως 3.47.



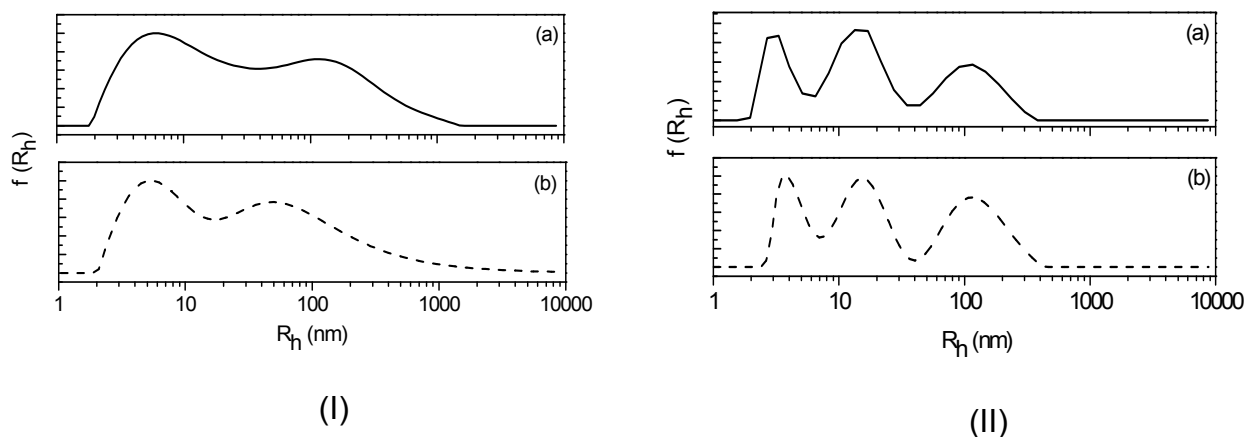
Σχήμα 3.45: Η ένταση σκέδασης του φωτός συναρτήσει του χρόνου των: (■) PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.1), (□) PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.2), (●) PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.2) και (○) PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.5) νανοσυστημάτων σε PBS- FBS διαλύματα.

Ήδη από το Σχήμα 3.45 διαφαίνεται η ύπαρξη έντονων αλληλεπιδράσεων των PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.2) και PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.5) νανοσυστημάτων σε PBS-FBS διαλύματα. Για όλα τα νανοσυστήματα η αρχική ένταση σκέδασης ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη I που προέκυπτε από τον συνδυασμό του PBS-FBS διαλύματος (χωρίς ύπαρξη συμπολυμερών ή μαγνητικών σωματιδίων) και των συστημάτων συμπολυμερών/ MagnNPs σε PBS.

Κατά την CONTIN ανάλυση, όλα τα νανοσυστήματα παρουσίασαν πολλαπλότητα κορυφών. Ιδίως τα PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.2) και PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.5) αποδείχτηκαν ως τα πιο ασταθή νανοσυστήματα σε βάθος χρόνου 2 εβδομάδων καθώς αλληλεπιδρούσαν με τις πρωτεΐνες του FBS διαλύματος (Σχήμα 3.46 I και II).



Σχήμα 3.46: Η $f(R_h)$ συναρτήσει της R_h (nm) για τα (I) PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.2) και (II) PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.5) σε PBS-FBS διάλυμα. Τα (a) και (b) συμβολίζουν το σύστημα νανοσωματιδίων στην 1η και στη 13η μέρα αντίστοιχα.

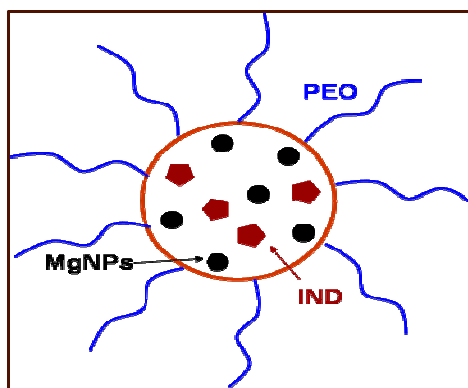


Σχήμα 3.47: Η $f(R_h)$ συναρτήσει της R_h (nm) για τα (I) PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.1) και (II) PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.2) νανοσυστήματα σε PBS-FBS διαλύματα. Τα (a) και (b) συμβολίζουν το σύστημα νανοσωματιδίων την 1η και τη 13η μέρα αντίστοιχα.

Από τα Σχήματα 45 και 47 συνάχθηκε το συμπέρασμα ότι τα PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.1) και PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.2) νανοσυστήματα σε PBS-FBS διαλύματα ήταν πιο σταθερά.

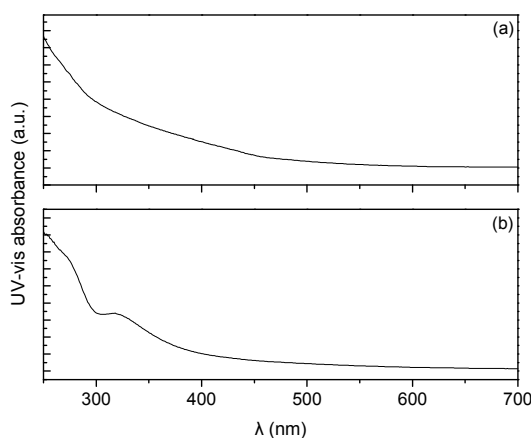
3.5.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση για τα διαλύματα που εμπεριέχουν δισυσταδικά συμπολυμερή/ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ με ινδομεθακίνη

Το επόμενο βήμα ήταν, τα πιο σταθερά παραπάνω υβριδικά νανοσυστήματα να χρησιμοποιηθούν και για την ενθυλάκωση κάποιου υδρόφοβου φαρμάκου.



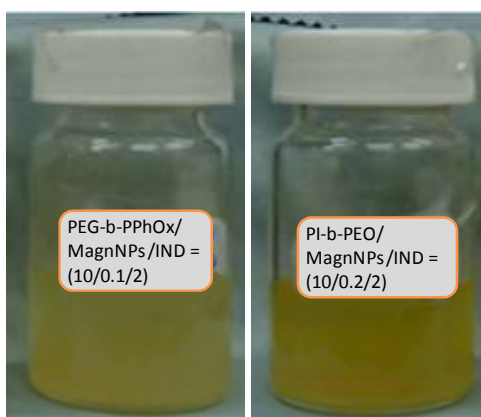
Εικόνα 3.7: Απεικόνιση PEG-b-PPhOx/MagnNPs/IND ή PI-b-PEO/MagnNPs/IND νανοσυστημάτων σε διαλύματα.

Στα συστήματα με τα εγκλεισμένα μαγνητικά σωματίδια και την ινδομεθακίνη (IND) θα αναμένεται πιθανή δομή όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 3.7. Η ύπαρξη της IND στα νανοσυστήματα αποδεικνύεται και από την ύπαρξη της αντίστοιχης κορυφής στο UV-vis φάσμα των αντίστοιχων διαλυμάτων. Και σε άλλη έρευνα²⁴¹ επιβεβαιώθηκε ότι η απορρόφηση της ινδομεθακίνης εμφανίζει μέγιστο γύρω στα 320 nm.



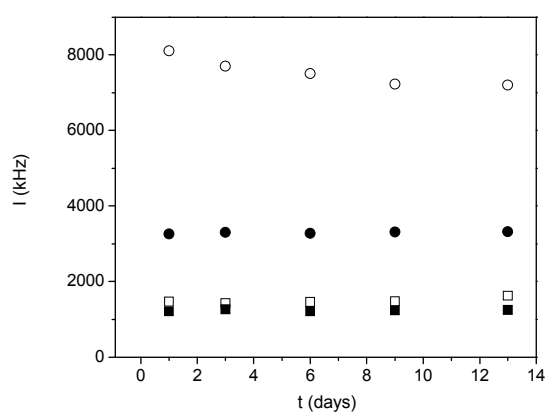
Σχήμα 3.48: UV-vis φάσματα απορρόφησης για το PI-b-PEO/MagnNPs νανοςύστημα σε νερό, (a) χωρίς ινδομεθακίνη και (b) με IND.

Ξαναπαρασκευάστηκαν τα PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.1) και PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.2) νανοσυστήματα, με τη διαφορά ότι προστέθηκε ποσότητα ινδομεθακίνης. Τα διαλύματα των συμπολυμερών κατά συστάδες με εγκιβωτισμένα μαγνητικά σωματίδια και ινδομεθακίνη συμβολίζονται ως (mg συμπολυμερούς/ mg MagnNPs/ mg ινδομεθακίνη). Για παράδειγμα, ένα διάλυμα των 10mg συμπολυμερών με εγκλεισμένα 0.1 mg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ σωματίδια και 1mg ινδομεθακίνης συμβολίζεται ως (mg συμπολυμερούς/ mg MagnNPs/ mg IND) = (10/0.1/1). Στα κιτρινωπά διαλύματα των PEG-b-PPhOx/MagnNPs (10/0.1) και PI-b-PEO/MagnNPs (10/0.2) νανοσυστημάτων παρουσιάστηκε κάποια θολότητα όταν χρησιμοποιήθηκαν 2mg ινδομεθακίνης (Εικόνα 3.7). Το γεγονός αυτό από την πρώτη κιόλας μέρα δημιούργησε υπόνοιες για καταβύθιση ή ύπαρξη μεγάλων συσσωματωμάτων. Τα συστήματα τα οποία είχαν εγκλεισμένη μεγαλύτερη ποσότητα (δηλαδή 2mg) ινδομεθακίνης εμφάνισαν μία ελαφρά καταβύθιση (Εικόνα 3.8) προτού αρχίσει η μέτρησή τους ($t=0$ μέρα) με σκέδαση φωτός.

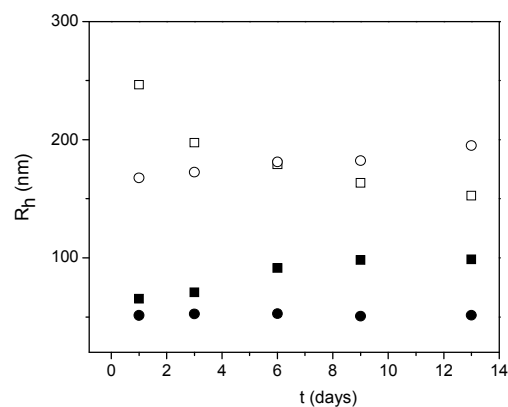


Εικόνα 3.8: Υδατικά διαλύματα των PEG-b-PPhOx/MagnNPs/IND (10/0.1/2) και PI-b-PEO/MagnNPs/IND (10/0.2/2) νανοσυστημάτων.

Στα πειράματα σκέδασης φωτός κατά την πάροδο 2 εβδομάδων, παρατηρήθηκε αύξηση και μείωση της έντασης σκεδάσεων για τα PEG-b-PPhOx/MagnNPs/IND (10/0.1/2) και PI-b-PEO/MagnNPs/IND (10/0.2/2) νανοσυστήματα σε νερό αντίστοιχα. Όσον αφορά το υδροδυναμικό μέγεθος, των μεν PEG-b-PPhOx/MagnNPs/IND (10/0.1/2) νανοσωματιδίων μειώθηκε ενώ η R_h αυξήθηκε για τα υδατικά διαλύματα των PEG-b-PPhOx/MagnNPs/IND (10/0.1/1) και PI-b-PEO/MagnNPs/IND (10/0.2/2) νανοσυστημάτων.

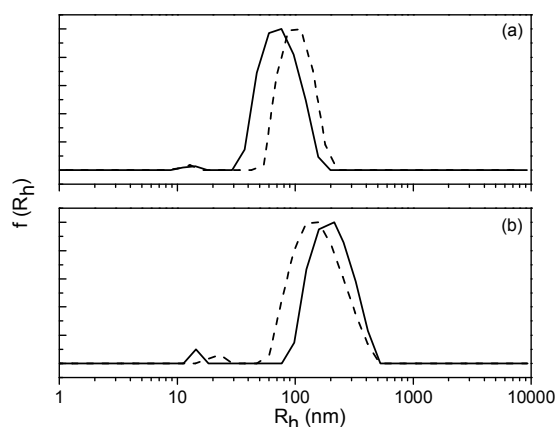


(α)

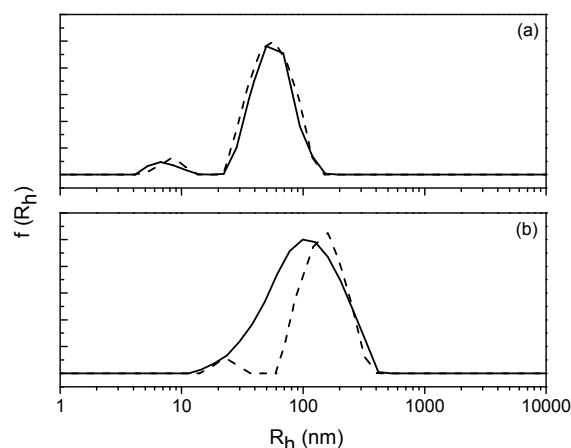


(β)

Σχήμα 3.49: Η ένταση της σκέδασης του φωτός των: (■) PEG-b-PPhOx/MagnNPs/IND (10/0.1/1), (□) PEG-b-PPhOx/MagnNPs/IND (10/0.1/1), (●) PI-b-PEO/MagnNPs/IND (10/0.2/1) και (○) PI-b-PEO/MagnNPs/IND (10/0.2/2) νανοσυστημάτων σε απεσταγμένο νερό.



(I)

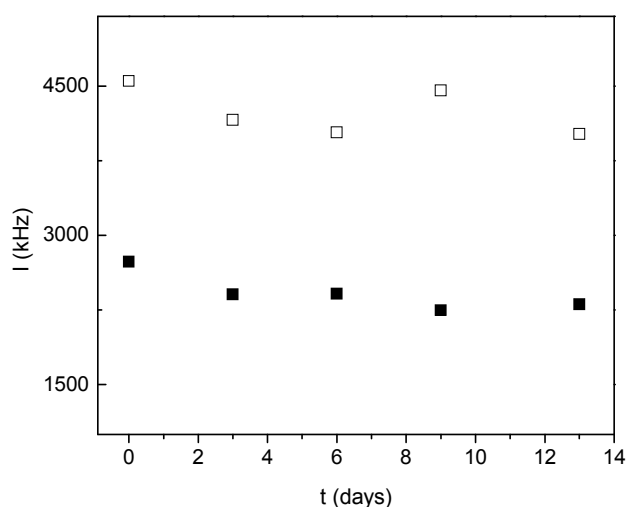


(II)

Σχήμα 3.50: Η συνάρτηση $f(R_h)$ συναρτήσει της R_h (nm) των: (I) PEG-b-PPhOx/MagnNPs/IND νανοσυστημάτων με αναλογίες μαζών (a) (10/0.1/2) και (b) (10/0.1/1) και των (II) PI-b-PEO/MagnNPs/IND νανοσυστημάτων με αναλογίες μαζών (a) (10/0.2/2) και (b) (10/0.2/1) σε υδατικά διαλύματα. Οι συνεχείς και οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν το σύστημα νανοσωματιδίων στην 1η και στη 13η μέρα αντίστοιχα.

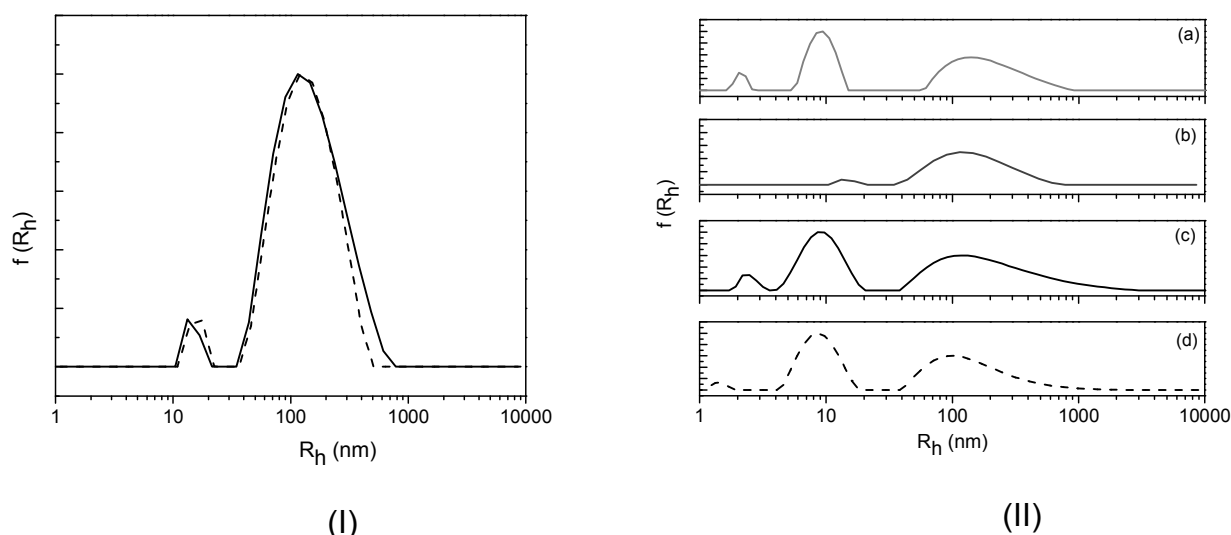
Οι cumulants και CONTIN αναλύσεις των PEG-b-PPhOx/MagnNPs/IND νανοσυστημάτων σε νερό έδειξαν, ότι αυτά με αναλογίες μαζών (10/0.1/1) και (10/0.1/2) παρουσίασαν με την πάροδο του χρόνου, συσσωματώματα και διάσπαση των νανοσυσσωματωμάτων αντίστοιχα. Τα νανοσυσσωματώματα των PI-b-

PEO/MagnNPs/IND (10/0.2/2) υδατικών διαλυμάτων παρουσίασαν σπάσιμο των συσσωματωμάτων κατά την πάροδο 13 ημερών. Εκτός από τα σωματίδια με τη μεγαλύτερη ποσότητα ινδομεθακίνης, οι υδροδυναμικές ακτίνες των υπολοίπων νανοσυστημάτων σε νερό ήταν πλησίον των R_h των υδατικών διαλυμάτων χωρίς την IND. Ως εκ τούτου, τα PI-b-PEO/MagnNPs/IND (10/0.2/1) υδατικά διαλύματα θεωρήθηκαν τα πιο ιδανικά για τη συνέχιση των πειραμάτων και σε άλλους βιολογικούς διαλύτες, όπως PBS και PBS-FBS.



Σχήμα 3.51: Η ένταση της σκέδασης του φωτός συναρτήσει του χρόνου των PI-b-PEO/MagnNPs/IND (10/0.2/1) νανοσυστημάτων σε : (■) PBS και (□) PBS-FBS (10%) διαλύματα.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.51, η σκεδαζόμενη ένταση στους δύο αυτούς βιολογικούς διαλύτες ήταν σχεδόν σταθερή και μεγαλύτερη από την I των PI-b-PEO/MagnNPs/IND (10/0.2/1) υδατικών διαλυμάτων.



Σχήμα 3.52: Η $f(R_h)$ συναρτήσεως της R_h (nm) για τα PI-b-PEO/MagnNPs/IND (10/0.2/1) νανοσυστήματα σε: (I) PBS (II) PBS-FBS(10%). Το (a) και (b) είναι το PBS-FBS(10%) διάλυμα (χωρίς κάποια προσθήκη, όπως πολυμερή, μαγνητικά σωματίδια, ινδομεθακίνη) και το νανοςύστημα που παρουσιάζεται στο (I) αντίστοιχα. Τα (c) και (d) αφορούν το PI-b-PEO/MagnNPs/IND (10/0.2/1) νανοςύστημα σε PBS-FBS(10%) διαλύματα για χρόνο $t=0$ ημέρες και 13 ημέρες αντίστοιχα.

Η CONTIN ανάλυση σε PBS έδειξε μέγεθος νανოსωματιδίων κοντά στα 100nm, διπλάσιο δηλαδή από την R_h των PI-b-PEO/MagnNPs/IND (10/0.2/1) νανοσυμπλόκων σε νερό. Σε PBS-FBS(10%) διάλυμα, η I ήταν μεγαλύτερη από το άθροισμα των διαλυμάτων PBS-FBS(10%) και PI-b-PEO/MagnNPs/IND (10/0.2/1) σε PBS. Επιπροσθέτως, όπως απεικονίζεται και στο Σχήμα 3.52, υπήρξαν δύο πληθυσμοί στα PI-b-PEO/MagnNPs/IND (10/0.2/1) PBS-FBS(10%) διαλύματα, οι οποίοι ήταν γύρω στα 10 και 150 nm. Αυτό συνέβη λόγω της επίδρασης και μικρής σύμπλεξης του νανοςυστήματος αυτού με τα συστατικά του FBS.

Όπως προκύπτει, τα αποτελέσματα λοιπόν, από τη σκέδαση φωτός υπέδειξαν ότι το PI-b-PEO συμπολυμερές μπορεί να εγκλείσει τόσο τα μαγνητικά σωματίδια όσο και την IND, χωρίς να δημιουργήσει έντονες διακυμάνσεις στα νανοςωματίδια αυτά με την πάροδο του χρόνου.

Συμπεράσματα

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν υβριδικά νανοσυστήματα από συμπολυμερή κατά συστάδες. Τρεις σειρές συμπολυμερών: HMPOx, QIm και PEG-b-PPhOx συνθέθηκαν με τεχνικές υδρόλυσης, τεταρτοταγοποίησης και κατιοντικού πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου αντίστοιχα. Ο μοριακός χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε με τεχνικές ^1H NMR, SEC και ATR-FTIR. Τα πολυμερή που συνθέθηκαν μελετήθηκαν ως προς την αυτοοργάνωσή τους σε υδατικά διαλύματα και βιολογικά υγρά με τεχνικές σκέδασης φωτός.

Στην περίπτωση των HMPOx βαθμωτών συμπολυμερών παρατηρήθηκαν συσσωματώματα αλυσίδων σε υδατικά διαλύματα τα οποία ήταν θετικά φορτισμένα με βαθμό συσσωμάτωσης πολύ ευαίσθητο στο υδρόφοβο περιεχόμενο του συμπολυμερούς. Σε PBS διαλύματα η αύξηση της ιοντικής ισχύος προκαλεί αύξηση του βαθμού συσσωμάτωσης και μείωση της υδροδυναμικής ακτίνας. Σε PBS-FBS διαλύματα παρατηρείται σύμπλεξη με τις πρωτεΐνες του FBS όπως φαίνεται από τη μεταβολή του ζ-δυναμικού και της σκεδαζόμενης έντασης. Η σύμπλεξη με DNA μελετήθηκε σε PBS διαλύματα υπό συνθήκες σταθερής ποσότητας πολυμερούς-μεταβαλλόμενης ποσότητας DNA και αντίστροφα. Ως αποτέλεσμα διερευνήθηκαν διαφορετικές επεριοχές τιμών του λόγου N/P. Στην περίπτωση του συμπολυμερούς με χαμηλό υδρόφοβο περιεχόμενο η σύμπλεξη με το DNA οδήγησε σε αύξηση του μεγέθους των συσσωματωμάτων ενώ στην περίπτωση συμπολυμερούς με υψηλό υδρόφοβο περιεχόμενο η σύμπλεξη προκαλεί συρρίκνωση.

Τα συσσωματώματα των QIm πολυμερών διαφόρων αρχιτεκτονικών και υδροφοβικότητων εμφάνισαν ενδιαφέρουσα εξάρτηση από την ιοντική ισχύ. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις άλατος παρατηρήθηκε δευτερεύουσα συσσωμάτωση ενώ η ένταση φθορισμού είχε συστηματική αύξηση με την ιοντική ισχύ. Τα πολυμερή αυτά μελετήθηκαν όπως και τα HMPOx, σε PBS και PBS/ FBS διαλύματα. Η δυνατότητα σύμπλεξης με DNA επιβεβαιώθηκε με μετρήσεις ζ-δυναμικού και σκέδασης φωτός, διερευνώντας τις περιοχές των N/P όπου παρατηρείται περαιτέρω συσσωμάτωση ή καθίζηση.

Τα δισυσταδικά συμπολυμερή PEG-b-PPhOx μελετήθηκαν σε υδατικά διαλύματα και βιολογικά υγρά, δείχνοντας εν κατακλείδι, μια ελαφρά αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες FBS.

Τα PEG-b-PPhOx3 και PI-b-PEO συμπολυμερή κατά συστάδες χρησιμοποιήθηκαν ως προς τη δημιουργία υβριδικών νανοσυστημάτων με σύμπλοκα νικελίου και μαγνητικά νανოსωματίδια σε υδατικά διαλύματα και επιλέχθησαν τα σταθερότερα συστήματα. Τέλος πραγματοποιήθηκε σύεγκλωβισμός ινδομεθακίνης στα νανοσυστήματα που περιείχαν μαγνητικά νανოსωματίδια. Τα σταθερά υβριδικά συστήματα που αναπτύχθηκαν και μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία ενδέχεται να έχουν τις κατάλληλες ιδιότητες για βιοτεχνολογικές εφαρμογές, όπως MRI και θεραπεία καρκίνου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας Α: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
aggregate	συσσωμάτωμα
amphiphilic copolymer	αμφίφιλο συμπολυμερές
anti cancer agent and drug	αντικαρκινικός παράγοντας και φάρμακο
backbone	ραχοκοκκαλιά, δομικός σκελετός
block copolymer	αδρομερές/ συσταδικό/ κατά συστάδες συμπολυμερές
complex	σύμπλοκο
copolymer	συμπολυμερές
core-shell micelle	μικκύλιο πυρήνα-κελύφους
cumulants method	μέθοδος των αθροισμάτων
encapsulation	εγκλωβισμός/ ενθυλάκωση
gradient copolymer	βαθμωτό συμπολυμερές
hydrogel	υδρογέλη
maghemite	μαγκεμίτης
monomer (or monomeric-repeating unit)	μονομερική δομική μονάδα
nano- drug delivery system	σύστημα παροχής νανο- φαρμάκου
natural polyelectrolyte	φυσικός πολυηλεκτρολύτης
polyampholyte	πολυαμφολύτη

polydispersity index	δείκτης πολυδιασποράς
polyelectrolyte	πολυηλεκτρολύτη
random copolymers	τυχαία συμπολυμερή
regularization method	τεχνική κανονικοποίησης
screening	προάσπιση/ θωράκιση
superparamagnetic nanoparticle	υπερπαραμαγνητικό νανοσωματίδιο
surfactant	επιφανειοδραστική ουσία
thermo-responsive polymer	θερμο-ανταποκρινόμενο πολυμερές
transition metal dithiolene complex	διθειολενικό σύμπλοκο μετάλλων μετάπτωσης
quaternization	τεταρτοταγοποίηση
unimer	μεμονωμένη αλυσίδα συμπολυμερούς

Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια

Πίνακας Β: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

I.Σ.	ισοηλεκτρικό σημείο
BCN	butyronitrile, βουτυρονιτρίλιο
BSA	bovine serum albumin, αλβουμίνη ορού βοοειδούς
CMC	critical micelle concentration, κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων
CRP	controlled radical polymerization, ελεγχόμενος ριζικός πολυμερισμός
CROP	living cationic ring-opening mechanism, ζωντανός κατιοντικός μηχανισμός ανοίγματος δακτυλίου
DCM	dichloromethane, διχλωρομεθάνιο
DEE	diethyl ether, διαιθυλαιθέρας
DLS	Dynamic Light Scattering, Δυναμική σκέδαση φωτός
DMF	dimethyl formamide, Διμέθυλο φορμαμίδιο
DNA	deoxyribonucleic acid, δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ
1, 2- DT	1, 2- dithiolene, 1, 2- διθειολενίου
ELS	Electrophoretic Light Scattering, Ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός
EtOH	ethanol, αιθανόλη
FBS	fetal bovine serum, εμβρυϊκός ορός βοοειδούς
FI	fluorescence imaging, απεικόνιση φθορισμού
FS	Fluorescence Spectroscopy, <i>Φασματοσκοπία φθορισμού ή Φθορισμομετρία</i>
FT-IR	Fourier Transform- InfraRed Spectroscopy, <i>Φασματοσκοπία</i>

	υπερύθρου
IND (ή INN)	indomethacin, ινδομεθακίνη
LCST	lower critical solution temperature, χαμηλή κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος
LS	Light Scattering, Σκέδαση φωτός
LMWHs	heparins, ηπαρίνες
MNP ή MagnNP	magnetic nanoparticle, μαγνητικό νανοσωματίδιο
MPOx	πολυ(2-μεθυλο-2-οξαζολίνη) – grad -πολυ (2-φαινυλο-2-οξαζολίνη)
MRI	Magnetic Resonance Imaging, απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού
NBIZ	1-butylimidazole, 1-βουτυλιμιδαζόλη
NH	nanohybrid, νανοϋβριδικό υλικό
NM	nanomaterial, νανοϋλικό
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού
NP	nanoparticle, νανοσωματίδιο
NSAID	nonsteroidal anti-inflammatory drug, μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο
PBS	phosphate buffered saline, αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα
PEC	polyelectrolyte complex, σύμπλοκο πολυηλεκτρολύτη
PEG	poly(ethylene glycol), πολυ(αιθυλενο γλυκόλη)
PEI	poly(ethylenimine) , πολυ(αιθυλινιμίνη)
PEO	poly(ethylene oxide), πολυ(αιθυλενοξείδιο)

POx	(poly(oxazoline), πολυ(οξαζολίνη)
Py	pyrene, πυρένιο
SEC	Size Exclusion Chromatography, Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
SEM	Scanning Electron Microscopy, Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης
SLP	specific loss power, ειδική απώλεια ισχύος
SLS	Static Light Scattering, Στατική σκέδαση φωτός
TEM	Transmission Electron Microscope, Ηλεκτρονική Μικροσκοπική Διέλευσης
TGA	thermogravimetric analysis, θερμοσταθμική ανάλυση
THF	tetrahydrofuran, τετραϋδροφουράνιο
UCST	upper critical solution temperature, υψηλή κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος
UV-Vis-NIR	Ultra Violet-Visible-Near Infra Red, Φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού-υπερύθρου

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Μετρήσεις σκέδασης φωτός από μη-διηθημένα διαλύματα συμπολυμερών PEG-b-PhOx.

Πίνακας Π1: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός για υδατικά μη φιλτραρισμένα διαλύματα των PEG-b-PPhOx συμπολυμερών.

Δείγμα	$M_w, \text{app.}^{\alpha}$ (10^4g/mol)	N_w^{α}	R_h^{β} (nm)	R_h^{α} (nm)	R_g^{α} (nm)	ρ^{α} = R_g/R_h	PDI^{β}
PEG-b-PPhOx1	74.7	101	134	319	174	0.55	0.4
PEG-b-PPhOx2	96.9	114	377	504	212	0.42	0.5
PEG-b-PPhOx3	77.0	104	128	489	223	0.46	0.4

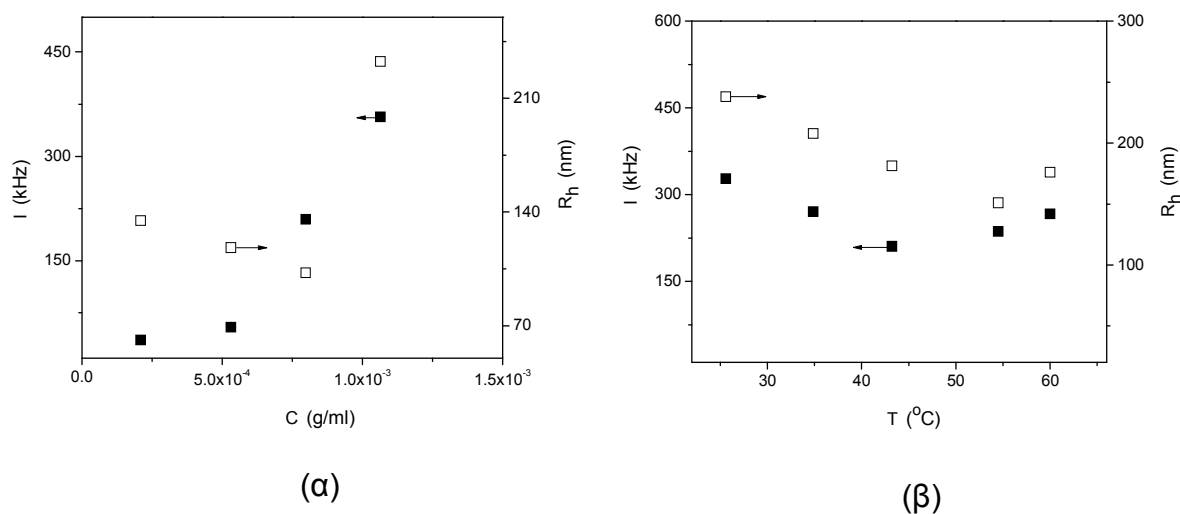
$^{\alpha}$ από προέκταση σε $q = 0$.

$^{\beta}$ από cumulants ανάλυση σε γωνία σκέδασης 90°

Πρόσθετα πειράματα σκέδασης φωτός πραγματοποιήθηκαν, με το να μην διέρχονται τα υδατικά διαλύματα των συμπολυμερών PEG-b-PPhOx μέσω φίλτρων. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να αποσαφηνιστούν πιθανές επιδράσεις από τη διαδικασία φιλτραρίσματος. Αυτά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα Π1 για $C = 10^{-3} \text{g/ml}$. Και οι τρεις M_w , N_w και R_h έχουν υψηλότερες τιμές για τα μη φιλτραρισμένα υδατικά διαλύματα των PEG-b-PPhOx συμπολυμερών από αυτές που παρατηρήθηκαν για τα αντίστοιχα φιλτραρισμένα υδατικά συστήματα (Πίνακας 3.10). Ο λόγος ρ προσεγγίζει την τιμή 0.5 για τα μη φιλτραρισμένα PEG-b-PPhOx υδατικά συστήματα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη μιας πυρήνα-κορώνα αρχιτεκτονικής των συσσωματωμάτων. Όμως πιθανότατα ο χαρακτηριστικός λόγος ρ δεν μπορεί να δώσει σαφή- ορθή εκτίμηση σε αυτήν την περίπτωση, επειδή παρατηρήθηκαν υψηλές τιμές πολυδιασποράς και λόγω της μεγάλης διαφοράς μεταξύ των τιμών R_h σε 0 και 90°).

Παράλληλα, διαπιστώθηκε ότι η σκεδαζόμενη ένταση και η R_h αυξάνεται όταν αυξάνεται η συγκέντρωση του διαλύματος. Αυτό μπορεί να υποδεικνύει ότι η συσσωμάτωση ενισχύεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Για παράδειγμα, οι μεταβολές της μάζας και

της υδροδυναμικής ακτίνας για τα μη φιλτραρισμένα υδατικά διαλύματα του PEG-b-PPhOx3 συμπολυμερούς φαίνονται στο Σχήμα Π1 (α).



Σχήμα Π1: Η σκεδαζόμενη ένταση και η υδροδυναμική ακτίνα του PEG-b-PPhOx3 συμπολυμερούς σε υδατικά μη φιλτραρισμένα διαλύματα συναρτήσει (α) της συγκέντρωσης και (β) της θερμοκρασίας.

Σε σύγκριση με την περίπτωση των φιλτραρισμένων υδατικών PEG-b-PPhOx συστημάτων, μία ελαφρά μείωση της I και της R_h των συσσωματωμάτων στα μη φιλτραρισμένα διαλύματα παρατηρήθηκε καθώς αυξήθηκε η θερμοκρασία (π.χ. Σχήμα Π1 (β)).

Πίνακας Π2: Αποτελέσματα σκέδασης φωτός για τα μη-φιλτραρισμένα διαλύματα PBS των PEG-b-PPhOx συμπολυμερών.

Δείγμα	$M_{w, app}^a$ (10^4 g/mol)	N_w^a	R_h^b (%K.K.) (nm)	PDI ^β
PEG-b-PPhOx1	31	42	216 (78.6%)	0.5
PEG-b-PPhOx2	24	28	133 (81.3%)	0.5
PEG-b-PPhOx3	31	42	193 (79.1%)	0.5

^a από προέκταση σε $q = 0$.

^β από cumulants ανάλυση σε γωνία σκέδασης 90°

*(%K.K.)= τα επί τοις εκατό % ποσοστά της κύριας κορυφής (K.K.), από CONTIN ανάλυση

Στον Πίνακα Π2, συνοψίζονται τα αποτελέσματα σκέδασης φωτός των PEG-b-PPhOx συμπολυμερών σε μη φιλτραρισμένα PBS διαλύματα. Οι τιμές της υδροδυναμικής ακτίνας για τα μη φιλτραρισμένα PBS διαλύματα είναι υψηλότερες από αυτών των μη φιλτραρισμένων υδατικών διαλυμάτων. Η διαφορά αυτή είναι πιο έντονη για τα μη φιλτραρισμένα υδατικά και PBS διαλύματα (εκτός από PEG-b-PPhOx3) σε σχέση με τα αντίστοιχα φιλτραρισμένα διαλύματα.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. C. Buzea, I. I. P. Blandino, K. Robbie, Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity, *Biointerphases*, 2, (4), 2007, pp. 1-103.
2. R. W. Siegel, E. Hu, D. M. Cox, H. Goronkin, L. Jelinski, C. C. Koch, J. Mendel, M. C. Roco, D. T. *Nanostructure Science and Technology : A Worldwide Study*; NSTC and IWGN: Maryland, 1999; pp 1-362.
3. M. C. Roco, W. S. Bainbridge, *Converting technologies for Improving Human Performance: Nanotechnology, Biotechnology, Information Technology and Cognitive Science*; US NSF: Arlington, Virginia, 2002.
4. C. C. Koch, Top-Down Synthesis of Nanostructured Materials: Mechanical and Thermal Processing Methods. *Rev. Adv. Mater. Sci.*, 5, 2003, pp. 91-99.
5. D. N. Karunaratne, Nanotechnology in medicine. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 35, (3), 2007, pp. 149-152.
6. R. A. Freitas, Nanotechnology, nanomedicine and nanosurgery. *International Journal of Surgery*, 3, (4), 2005, pp. 243-246.
7. Α. Δ. Ντόντος, *Συνθετικά Μακρομόρια- Βασική Θεώρηση*. 2002.
8. Ι. Δ. Παντελής, *Μη μεταλλικά τεχνικά υλικά: Δομή- Ιδιότητες- Τεχνολογία- Εφαρμογές*. Α.Παπασωτηρίου & ΣΙΑ Ο.Ε.: Αθήνα, 2009.
9. Ν. Χατζηχρηστίδης, Ε. Ιατρού, Σ. Πίσπας, Μ. Πιτσικάλης, Σ. Σιούλα, *Εισαγωγή στην Επιστήμη και Τεχνολογία Πολυμερών*. Αθήνα, 1998.
10. Ι. Χ. Σιμιτζής, *Πολυμερή*. ΕΜΠ: Αθήνα, 1994.
11. N. Hadjichristidis, G. Floudas, S. Pispas, *Block Copolymers: Synthetic Strategies, Physical Properties, and Applications*. 2003.
12. I. W. Hamley, *Developments in Block Copolymers Science and Technology*. John Wiley & Sons, Ltd UK, 2004.
13. T. Smart, H. Lomas, M. Massignani, M. Flores-Merino, L. R. Perez, G. Battaglia, Review: Block copolymer nanostructures. *Nanotoday*, 3, (3-4), 2008, pp. 38-46.
14. D. Greszta, K. Matyjaszewski, *Gradient copolymers - a new class of materials*, POLY 85, 1996, pp. 1567.

15. M. Kryszewski, Gradient polymers and copolymers. *Polymers for advanced technologies*, 9, (4), 1998, pp. 244-259.
16. U. Beginn, Gradient copolymers. *Colloid and polymer science*, 286, (13), 2008, pp. 1465-1474.
17. R. Jiang, Q. Jin, B. Li, D. Ding, R. A. Wickham, A.- C. Shi, Phase behavior of gradient copolymers. *Macromolecules*, 41, (14), 2008, pp. 5457-5465.
18. M. M. Mok, J. Kim, J. M. Torkelson, Gradient copolymers with broad glass transition temperature regions: Design of purely interphase compositions for damping applications. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 46, (1)|, 2008, pp. 48-58.
19. Buzin, A. I.; Pyda, M.; Costanzo, P.; Matyjaszewski, K.; Wunderlich, B., Calorimetric study of block-copolymers of poly (n-butyl acrylate) and gradient poly (n-butyl acrylate-co-methyl methacrylate). *Polymer* 2002, 43, (20), 5563-5569.
20. P. Alexandridis, B. Lindman, *Amphiphilic Block Copolymers: Self-Assembly and Applications*. Elsevier: New York, USA, 2000.
21. S. C. Owen, D. P. Y. Chan, M. S. Shoichet, Polymeric micelle stability (Review). *Nano Today*, 7, 2012, pp. 53-65.
22. G., Riess, Micellization of block copolymers. *Prog. Polymer Science*, 28, (7), 2003, pp. 1107-1170.
23. T.Fayed, M. Shaaban, M. El-Nahass, F. Hassan, *Hybrid organic-inorganic mesoporous silicates as optical nanosensor for toxic metals detection*, 1, 2014; pp. 74-94.
24. V. Abetz, J.-F. Gohy, Block Copolymer Micelles. In *Block Copolymers II*, Springer Berlin Heidelberg: 2005; Vol. 190, pp. 65-136.
25. Π. Γ. Κουτσούκος, *Χημεία κολλοειδών*. Παν/μιο Πατρών: Πάτρα, 1998.
26. L. N. Ira, *Physical Chemistry*. 5th ed. ed.; McGraw-Hill: Boston, 2001.
27. S. Slomkowski, Alemán V. J., G. R. Gilbert, M. Hess, K. Horie, G. R. Jones, P. Kubisa, I. Meisel, W. Mormann, S. Penczek, F. T. R. Stepto, Terminology of polymers and polymerization processes in dispersed systems. *Pure and Applied Chemistry*, 83, (12), 2011.

28. I. Genta, P. Perugini, T. Modena, F. Pavanetto, F. Castelli, R. A. A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, B. Conti, Miconazole-loaded 6-oxychitin-chitosan microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, 52, (1), 2003, pp. 11-18.
29. M. Hess, R. G. Jones, J. Kahovec, T. Kitayama, P. Kratochvil, P. Kubisa, W. Mormann, R. F. T. Stepto, D. Tabak, J. Vohlidal, Terminology of polymers containing ionizable or ionic groups and of polymers containing ions (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry*, 78, (11), 2006, pp. 2067-2074.
30. D. A. Mortimer, Synthetic polyelectrolytes - A review. *Polymer International*, 25, (1), 1991, pp. 29-41.
31. Lankalapalli, S.; Kolapalli, V. R. M., Polyelectrolyte complexes: A review of their applicability in drug delivery technology. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 71, (5), 2009, 481-487.
32. Lankalapalli, S.; Kolapalli, V. R. M., Polyelectrolyte Complexes: A Review of their Applicability in Drug Delivery Technology. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, 71, (5), 481-487.
33. E. Kizilay, A. Kayitmazer, D. Basak, L. Paul, Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167, (1-2), 2011, pp. 24-37.
34. E. Y. Chi, S. Krishnan, T. W. Randolph, J. F. Carpenter, Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation -Review article. *Pharm. Res.*, 20, (9), 2003, pp. 1325-1336.
35. S. Hocine, M.-H. Li, Thermoresponsive self-assembled polymer colloids in water. *Soft Matter.*, 9, (25), 2013, pp. 5839-5861.
36. M. A. Ward, T. K. Georgiou, Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications. *Polymers*, 3, 2011, pp. 1215-1242.
37. K. Letchford, H. Burt, A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65, (3), 2007, pp. 259-269.
38. Y.-P. Li, Y.-Y. Pei, X.-Y. Zhang, Z.-H. Gu, Z.-H. Zhou, W.-F. Yuan, J.-J. Zhou, J.-H. Zhu, X.-J. Gao, PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis,

preparation and biodistribution in rats. *Journal of Controlled Release*, 71, (2), 2001, pp. 203-211.

39. K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert, Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angewandte Chemie International Edition*, 49, (36), 2010, pp. 6288-6308.

40. G.-I. Yue, Q.-I. Cui, Y.-X. Zhang, E.-J. Wang, F.-P. Wu, Thermo-responsive block copolymers based on linear-type poly(ethylene glycol): Tunable LCST within the physiological range. *Chinese Journal of Polymer Science*, 30, (5), 2012, pp. 770-776.

41. V. K. Mourya, N. Inamdar, R. B. Nawale, S. S. Kulthe, Polymeric Micelles: General Considerations and their Applications. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 45, (2), 2011, pp. 128-138.

42. Y. Liu, H. Miyoshi, M. Nakamura, Nanomedicine for drug delivery and imaging: A promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. *International Journal of Cancer*, 120, (12), 2007, pp. 2527-2537.

43. Y. Q. Wang, J. Su, F. Wu, P. Lu, L. F. Yuan, W. E. Yuan, J. Sheng, T. Jin, Biscarbamate cross-linked polyethylenimine derivative with low molecular weight, low cytotoxicity, and high efficiency for gene delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 2012, pp. 693-704.

44. L. Jin, X. Zeng, M. Liu, Y. Deng, N. He, Current Progress in Gene Delivery Technology Based on Chemical Methods and Nano-carriers. *Theranostics*, 4, (3), 2014, pp. 240-255.

45. N. Nayerossadat, T. Maedeh, P. A. Ali, Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced Biomedical Research*, 1, 2012, pp. 27.

46. F. Liu, L. Huang, Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 78, (1-3), 2002, pp. 259-266.

47. S. Mansouri, P. Lavigne, K. Corsi, M. Benderdour, E. Beaumont, J. C. Fernandes, Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57, (1), 2004, pp. 1-8.

48. H. Yin, R. L. Kanasty, A. A. Eltoukhy, A. J. Vegas, J. R. Dorkin, D. G. Anderson, Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet*, 15, (8), 2014, pp. 541-555.

49. W. T. Godbey, K. K. Wu, G. J. Hirasaki, A. G. Mikos, Improved packing of poly (ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency. *Gene therapy*, 6, (8), 1999, pp. 1380-1388.
50. W. T. Godbey, K. K. Wu, A. G., Mikos, Tracking the intracellular path of poly (ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, (9), 1999, pp. 5177-5181.
51. W. T. Godbey, K. K. Wu, A. G. Mikos, Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly (ethyleneimine) as a gene delivery vehicle. *Journal of biomedical materials research*, 45, (3), 1999, pp. 268-275.
52. Y. H. Kim, J. H. Park, M. Lee, Y.-H. Kim, T. G. Park, S. W. Kim, Polyethylenimine with acid-labile linkages as a biodegradable gene carrier. *Journal of Controlled Release*, 103, (1), 2005, pp. 209-219.
53. J. W. Wiseman, C. A. Goddard, D. McLelland, W. H. Colledge, A comparison of linear and branched polyethylenimine (PEI) with DCChol/ DOPE liposomes for gene delivery to epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther.*, 10, (19), 2003, pp. 1654-1662.
54. C.-H. Ahn, S. Y. Chae, Y. H. Bae, S. W. Kim, Biodegradable poly(ethylenimine) for plasmid DNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 80, (1-3), 2002, pp. 273-282.
55. O. Boussif, F. Lezoualch, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J. P. Behr, A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, (16), 1995, pp. 7297-7301.
56. M. Thomas, A. M. Klibanov, Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, (23), 2002, pp. 14640-14645.
57. S. Li, L. Huang, Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Therapy*, 7, (1), 2000.
58. R. Hoogenboom, H. Schlaad, Bioinspired Poly(2-oxazoline)s (Review). *Polymers*, 3, 2011, pp. 467-488.
59. N. Adams, U. S. Schubert, Poly(2-oxazolines) in biological and biomedical application contexts. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, (15), 2007, pp. 1504-1520.

60. S. J. Huang, L.-H. Ho, E. Hong, O. Kitchen, Hydrophilic-hydrophobic biodegradable polymers: release characteristics of hydrogen-bonded, ring-containing polymer matrices. *Biomaterials*, 15, (15), 1994, pp. 1243-1247.
61. H. M. L. Lambermont-Thijs, M. J. H. C. Jochems, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, Synthesis and properties of gradient copolymers based on 2-phenyl-2-oxazoline and 2-nonyl-2-oxazoline. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 47, (23), 2009, pp. 6433-6440.
62. V. de la Rosa, Poly(2-oxazoline)s as materials for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25, (5), 2015, pp. 1211-1225.
63. A. Dworak, B. Trzebicka, A. Kowalczyk, C. Tsvetanov, S. Rangelov, Polyoxazolines- mechanism of synthesis and solution properties. *Polimery*, 59, (1), 2014, pp. 88-94.
64. N. Aich, J. Plazas-Tuttle, J. R. Lead, N. B. Saleh, A critical review of nanohybrids: synthesis, applications and environmental implications. *Environmental Chemistry*, 11, (6), 2014, pp. 609-623.
65. S. Rodrigues, C. Cordeiro, H. B. B. Seijo, C. Remunan-Lopez, A. Grenha, Hybrid nanosystems based on natural polymers as protein carriers for respiratory delivery: Stability and toxicological evaluation. *Carbohydrate Polymers*, 123, (0), 2015, pp. 369-380.
66. A. Ebrahiminezhad, Y. Ghasemi, S. Rasoul-Amini, J. Barar, S. Davaran, Preparation of novel magnetic fluorescent nanoparticles using amino acids. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, | 2013, pp. 534-539.
67. D. Manasmita, M. Debasish, T. K. Maiti, A. Basak, P. Pramanik, Bio-functionalization of magnetite nanoparticles using an aminophosphonic acid coupling agent: new, ultradispersed, iron-oxide folate nanoconjugates for cancer-specific targeting. *Nanotechnology*, 19, (41), 2008, pp. 415101.
68. H. Gu, R. Zheng, X. Zhang, B. Xu, Facile One-Pot Synthesis of Bifunctional Heterodimers of Nanoparticles: A Conjugate of Quantum Dot and Magnetic Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 126, (18), 2004, pp. 5664-5665.
69. K. Seo, D. Kim, pH-dependent hemolysis of biocompatible imidazole-grafted polyaspartamide derivatives. *Acta Biomaterialia*, 6, (6), 2010, pp. 2157-2164.

70. E. Pérez-Mayoral, V. Negri, J. Soler-Padrós, S. Cerdán, P. Ballesteros, Chemistry of paramagnetic and diamagnetic contrast agents for Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy. *European Journal of Radiology*, 67, (3), 2008, pp. 453-458.
71. M. Chu, X. Song, D. Cheng, S. Liu, J. Zhu, Preparation of quantum dot-coated magnetic polystyrene nanospheres for cancer cell labelling and separation. *Nanotechnology*, 17, (13), 2006, pp. 3268.
72. C. C. Berry, Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 42, (22), 2009, pp. 224003.
73. A. Z. Wang, F. Gu, L. Zhang, J. M. Chan, A. Radovic-Moreno, M. R. Shaikh, O. C. Farokhzad, Biofunctionalized targeted nanoparticles for therapeutic applications. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 8, (8), 2008, pp. 1063-1070.
74. E. du Trmolet de Lacheisserie, D. Gignoux, M. Schlenker, *Magnetism: Materials and Applications*. Springer: Boston, 2003.
75. S. Sun, C. B. Murray, D. Weller, L. Folks, A. Moser, Monodisperse FePt nanoparticles and ferromagnetic FePt nanocrystal superlattices. *Science*, 287, (5460), 2000, pp. 1989-1992.
76. A. K. Gupta, M. Gupta, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26, (18), 2005, pp. 3995-4021.
77. C. Sun, J. S. H. Lee, M. Zhang, Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, (11), 2008, pp. 1252-1265.
78. J. Chomoucka, J. Drbohlavova, D. Huska, V. Adam, R. Kizek, J. Hubalek, Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacological Research*, 62, (2), 2010, pp. 144-149.
79. J. Drbohlavova, R. Hrdy, V. Adam, R. Kizek, O. Schneeweiss, J. Hubalek, Preparation and Properties of Various Magnetic Nanoparticles. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 9, (4), 2009, pp. 2352-2362.
80. M. Ryvolova, J. Chomoucka, J. Drbohlavova, P. Kopel, P. Babula, D. Hynek, V. Adam, T. Eckschlager, J. Hubalek, M. Stiborova, J. Kaiser, R. Kizek, Modern Micro and Nanoparticle-Based Imaging Techniques. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 12, (11), 2012, pp. 14792-14820.

81. R. Zboril, M. Mashlan, D. Petridis, Iron(III) oxides from thermal processes-synthesis, structural and magnetic properties, mossbauer spectroscopy characterization, and applications. *Chem. Mat.*, 14, 2002, pp. 969-982.
82. T. Jiří, R. Zboril, D. Petridis, Maghemite nanoparticles by view of Mössbauer spectroscopy. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 6, (4), 2006, pp. 926-947.
83. J. Tuček, Z. Radek, D. Petridis, Maghemite Nanoparticles by View of Mössbauer Spectroscopy. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6, (4), 2006, pp. 926-947.
84. L. Machala, R. Zboril, A. Gedanken, Amorphous Iron (III) Oxide A Review. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111, (16), 2007, pp. 4003-4018.
85. Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, Topical Review: Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 36, (13), 2003, pp. 167-181.
86. M. Arruebo, R. Fernández-Pacheco, M. R. Ibarra, J. Santamaría, Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today*, 2, (3), 2007, pp. 22-32.
87. H. Amiri, R. Bustamante, A. Millán, N. J. O. Silva, R. Piñol, L. Gabilondo, F. Palacio, P. Arosio, M. Corti, A. Lascialfari, Magnetic and relaxation properties of multifunctional polymer-based nanostructured bioferrofluids as MRI contrast agents. *Magnetic Resonance in Medicine*, 66, (6), 2011, pp. 1715-1721.
88. J. Santoyo Salazar, L. Perez, O. de Abril, L. Truong Phuoc, D. Ihiawakrim, M. Vazquez, J.-M. Greneche, S. Begin-Colin, G. Pourroy, Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in 10-40 nm Range: Composition in Terms of Magnetite/Maghemite Ratio and Effect on the Magnetic Properties. *Chemistry of Materials*, 23, (6), 2011, pp. 1379-1386.
89. W. Schütt, C. Grüttner, U. Häfeli, M. Zborowski, J. Teller, H. Putzar, C. Schümichen, Applications of magnetic targeting in diagnosis and therapy- possibilities and limitations: a mini-review. *Hybridoma*, 16, (1), 1997, pp. 109-117.
90. G. G. Enriquez, S. A. A. Rizvi, M. J. D' Souza, D. P. Do, Formulation and evaluation of drug-loaded targeted magnetic microspheres for cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 2013, pp. 1393-1402.
91. U. O. Häfeli, Magnetically modulated therapeutic systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 277, (1-2), 2004, pp. 19-24.

92. S. A. Fauci, E. Braunwala, L. D. Kasper, L. D. Longo, L. S. Hauser, L. D. Longo, J. L. Jameson, J. Loscalzo, *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17 ed.; McGraw-Hill Professional: USA, 2008.
93. M. Baghban, M. B. Ayani, Source term prediction in a multilayer tissue during hyperthermia. *Journal of Thermal Biology*, 2015.
94. T. Refaat, S. Sachdev, V. Sathiaselvan, I. Helenowski, S. Abdelmoneim, M. C. Pierce, G. Woloschak, J. W. Small, B. Mittal, K. D. Kiel, Hyperthermia and radiation therapy for locally advanced or recurrent breast cancer. *The Breast*, 24, (4), 2015, pp. 418-425.
95. A. Jordan, P. Wust, R. Scholz, B. Tesche, H. Fahling, T. Mitrovics, T. Vogl, J. Cervos-Navarro, R. Felix, Cellular uptake of magnetic fluid particles and their effects on human adenocarcinoma cells exposed to AC magnetic fields in vitro. *Int. J. Hyperthermia*, 12, 1996, pp. 705.
96. A. Jordan, P. Wust, H. Fahling, W. John, A. Hinz, R. Felix, Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: physical evaluation of their potential for hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia*, 9, 1993, pp. 51.
97. M. Lévy, C. Wilhelm, J.-M. Siaugue, O. Horner, J.-C. Bacri, F. Gazeau, Magnetically induced hyperthermia: size-dependent heating power of γ -Fe₂O₃ nanoparticles. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 20, (20), 2008, pp. 204133.
98. J.-P. Fortin, C. Wilhelm, J. Servais, C. Ménager, J.-C. Bacri, F. Gazeau, Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. *Journal of the American Chemical Society*, 129, (9), 2007, pp. 2628-2635.
99. J. C. Jones, *d- and f- Block Chemistry*. Wiley- Interscience (Royal Society of Chemistry, RSC): Bristol, UK, 2001.
100. C. J. Jones, J. A. McCleverty, Complexes of transition metals with Schiff bases and the factors influencing their redox properties. Part I. Nickel and copper complexes of some diketone bithiosemicarbazones. *Journal of the Chemical Society A: Inorganic, Physical, Theoretical*, (0), 1970, pp. 2829-2836.
101. B. G. Bonneval, K. I. M.-C., Ching, F. Alary, T.-T. Bui, L. Valade, Neutral d⁸ metal bis- dithiolene complexes: synthesis, electronic properties and applications. *Coord. Chem. Rev.*, 254, 2010, pp. 1457-1467.

102. R. Eisenberg, H. B. Gray, Noninnocence in Metal Complexes: A Dithiolene Dawn. *Inorganic Chemistry*, 50, (20), 2011, pp. 9741-9751.
103. K. D. Johnson, Electrochemical studies of Metal 1,2-Dithiolene complexes. 1971.
104. N. Robertson, L. Cronin, Metal bis-1,2-dithiolene complexes in conducting or magnetic crystalline assemblies. *Coordination Chemistry Reviews*, 227, (1), 2002, pp. 93-127.
105. S. Rabaça, M. Almeida, Dithiolene complexes containing N coordinating groups and corresponding tetrathiafulvalene donors. *Coordination Chemistry Reviews*, 254, (13-14), 2010, pp. 1493-1508.
106. G. C. Papavassiliou, G. C. Anyfantis, G. A. Mousdis, Neutral metal 1,2-dithiolenes: Preparation, properties and possible applications of unsymmetrical in comparison to the symmetrical. *Crystals*, 2, (3), 2012, pp. 762-811.
107. G. C. Anyfantis, G. C. Papavassiliou, P. Aloukos, S. Couris, Y. F. Weng, H. Yoshino, K. Murata, Unsymmetrical Single-Component Nickel 1,2-Dithiolene Complexes with Extended Tetrachalcogenafulvalenedithiolato Ligands. *Z. Naturforsch*, 62b, 2007, pp. 200-204.
108. G. C. Anyfantis, G. C. Papavassiliou, N. Assimomytis, A. Terzis, V. Psycharis, C. P. Raptopoulou, P. Kyritsis, V. Thoma, I. B. Koutselas, Some unsymmetrical nickel 1,2-dithiolene complexes as candidate materials for optics and electronics. *Solid State Sciences*, 10, (12), 2008, pp. 1729-1733.
109. B. Cai, J.-L. Liu, X.-L. Sheng, X.- M. Ren, Observation of an unusual hysteretic magnetic transition in a heteroleptic nickel-bis-1,2-dithiolene compound. *Inorganic Chemistry Communications*, 14, (12), 2011, pp. 1971-1974.
110. G. Soras, N. Psaroudakis, M. J. Manos, A. J. Tasiopoulos, D. G. Liakos, G. A. Mousdis, Synthesis, experimental and theoretical investigation of a new type nickel dithiolene complex. *Polyhedron*, 62, 2013, pp. 208-217.
111. G. S. Macleod, H. J. Collett, J. T. Fell, The potential use of mixed films of pectin, chitosan and HPMC for bimodal drug release. *J Control Release*, 58, (3), 1999, pp. 303-310.
112. T. Traitel, R. Goldbart, J. Kost, Smart polymers for responsive drug-delivery systems. *Journal of Biomaterial Sciences- Polymer Edition*, 19, (6), 2008, pp. 755-767.

113. V, A. Kabanov, *From synthetic polyelectrolytes to polymer-subunit vaccines. Review.* Springer: Heidelberg, ALLEMAGNE, 2004; Vol. 46, pp. 20.
114. L. M. Bimbo, L. Peltonen, J. Hirvonen, H. A. Santos, Toxicological Profile of Therapeutic Nanodelivery Systems. *Current Drug Metabolism*, 13, (8), 2012, pp. 1068-1086.
115. X.-H. Peng, X. Qian, H. Mao, A. Y. Wang, Z. Chen, S. Nie, D. M. Shin, Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 3, (3), 2008, pp. 311-321.
116. B. D. Dhorajiya, B. Z. Dholakiya, N. Singh, Anticancer, Antibacterial, Antifungal Activities for Hybrid Probes of Aromatic Amine and Barbituric Acid. *GSTF Journal of Chemical Sciences (JChem) C7 - 41*, (2), pp. 1-8.
117. S. Nussbaumer, P. Bonnabry, J.-L. Veuthey, S. Fleury-Souverain, Analysis of anticancer drugs: A review. *Talanta*, 85, (5), 2011, pp. 2265-2289.
118. R. K. Verbeeck, Pharmacokinetic drug interactions with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clinical pharmacokinetics*, 19, (1), 1990, pp. 44-66.
119. X. Lu, W. Xie, D. Reed, W. S. Bradshaw, D. L. Simmons, Nonsteroidal antiinflammatory drugs cause apoptosis and induce cyclooxygenases in chicken embryo fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, (17), 1995, pp. 7961-7965.
120. P. Brooks, Use and benefits of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *The American journal of medicine*, 104, (3), 1998, pp. 9S-13S.
121. H. Vainio, G. Morgan, P. Kleihues, An international evaluation of the cancer-preventive potential of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 6, (9), 1997, pp. 749-753.
122. J. D. Pickard, L. A. MacDonell, E. T. Mackenzie, A. M. Harper, Prostaglandin-induced effects in the primate cerebral circulation. *European journal of pharmacology*, 43, (4), 1977, pp. 343-351.
123. N. Dahlgren, B. K. Siesjo, Effects of Indomethacin on Cerebral Blood Flow and Oxygen Consumption in Barbiturate-Anesthetized Normocapnic and Hypercapnic Rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1, (1), 1981, pp. 109-115.

124. T. Narisawa, M. Sato, M. Tani, T. Kudo, T. Takahashi, A. Goto, Inhibition of development of Methylnitrosourea-induced rat colon tumors by Indomethacin treatment. *Cancer research*, 41, (5), 1981, pp. 1954-1957.
125. C. A. Rubio, Antitumoral activity of indomethacin on experimental esophageal tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 72, (3), 1984, pp. 705-707.
126. M. Takahashi, F. Furukawa, K. Toyoda, H. Sato, R. Hasegawa, K. Imaida, Y. Hayashi, Effects of various prostaglandin synthesis inhibitors on pancreatic carcinogenesis in hamsters after initiation with N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine. *Carcinogenesis*, 11, (3), 1990, pp. 393-395.
127. S. Touhey, R. O'Connor, S. Plunkett, A. Maguire, M. Clynes, Structure- activity relationship of indomethacin analogues for MRP-1, COX-1 and COX-2 inhibition: identification of novel chemotherapeutic drug resistance modulators. *European Journal of Cancer*, 38, (12), 2002, pp. 1661-1670.
128. W., Carothers, Polymers and polyfunctionality. *Trans. Faraday Soc.*, 32, 1936, pp. 39-49.
129. P. J., Flory, *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell University Press: 1953; pp. 39.
130. Γ. Π. Καραγιαννίδης, Σ. Ε. Δ., *Χημεία Πολυμερών*. ΖΗΤΗ: 2006.
131. Α., Αυγερόπουλος, *Συνθετική Χημεία Πολυμερών και Μέθοδοι Τροποποίησης*. Επιστημονικές Παραδόσεις: Ιωάννινα, 2013.
132. J.-C. Soutif, J.-C. Brosse, Chemical modification of polymers I. Applications and synthetic strategies. *Reactive Polymers*, 12, (1), 1990, pp. 3-29.
133. K. A. Günay, P. Theato, H.-A. Klok, History of Post-Polymerization Modification. In *Functional Polymers by Post-Polymerization Modification*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2013; pp 1-44.
134. Contents: Macromol. React. Eng. 2/2014. *Macromolecular Reaction Engineering* 8, (2), pp. 63-66.
135. W. Tang, J. He, Y. Yang, A Facile Synthesis of Cleavable Block Copolymers via Tandem Polymerizations of NMRP and ATRP. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 43, (10), 2006, pp. 1553-1567.

136. C. Englert, L. Tauhardt, M. Hartlieb, K. Kempe, M. Gottschaldt, U. S. Schubert, Linear poly (ethylene imine)-based hydrogels for effective binding and release of DNA. *Biomacromolecules*, 15, (4), 2014, pp. 1124-1131.
137. K. Kuča, M. Kivala, V. Dohnal, A general method for the quaternization of N,N-dimethyl benzylamines with long chain n-alkylbromides. *Journal of Applied Biomedicine*, 2, 2004, pp. 195-198.
138. M. Schmidt, S. Förster, V. Abetz, A. H. E. Müller, Polyelectrolyte Block Copolymer Micelles. In *Polyelectrolytes with Defined Molecular Architecture II*, Springer Berlin Heidelberg: 2004; Vol. 166, pp. 173-210.
139. N.-G. Kang, B.-G. Kang, H.-D. Koh, M. Changez, J.-S. Lee, Block copolymers containing pyridine moieties: Precise synthesis and applications. *Reactive and Functional Polymers*, 69, (7), 2009, pp. 470-479.
140. J. Texter, *Reactions And Synthesis In Surfactant Systems*. CRC Press: 2001.
141. T. Higashimura, *Cationic Polymerization*. Kagaku Dojin: Kyoto, 1971, pp. 209.
142. P. Kratochvil, Classical Light Scattering from Polymer Solutions. *Elsevier: Amsterdam*, 1987.
143. B. Chu, *Laser Light Scattering*. 1991; Vol. 2.
144. M. B. Huglin, Light Scattering from Polymer Solutions. *Academic: New York* 1972.
145. S. Förster, M. Schmidt, M. Antonietti, Static and dynamic light scattering by aqueous polyelectrolyte solutions: effect of molecular weight, charge density and added salt. *Polymer*, 31, (5), 1990, pp. 781-792.
146. B. J. Berne, R. Pecora, Dynamic Light Scattering. *Plenum Press: New York* 1976.
147. B. Hirzinger, M. Helmstedt, J. Stejskal, Light scattering studies on core-shell systems: determination of size parameters of sterically stabilized poly(methylmethacrylate) dispersions. *Polymer*, 41, (8), 2000, pp. 2883-2891.
148. A. Müller, W. Burchard, Structure formation of surfactants in concentrated sulphuric acid: a light scattering study. *Colloid and Polymer Science*, 273, (9), 1995, pp. 866-875.

149. K. S. Schmitz, B. Wang, E. Kokufuta, Mechanism of Microgel Formation via Cross-Linking of Polymers in Their Dilute Solutions: Mathematical Explanation with Computer Simulations. *Macromolecules*, 34, (23), 2001, pp. 8370-8377.
150. J. Hotz, W. Meier, Vesicle-templated polymer hollow spheres. *Langmuir*, 14, (5), 1998, pp. 1031-1036.
151. O. Stauch, R. Schubert, G. Savin, W. Burchard, Structure of Artificial Cytoskeleton Containing Liposomes in Aqueous Solution Studied by Static and Dynamic Light Scattering. *Biomacromolecules*, 3, (3), 2002, pp. 565-578.
152. V. Tandon, S. K. Bhagavatula, W. C. Nelson, B. J. Kirby, Zeta potential and electroosmotic mobility in microfluidic devices fabricated from hydrophobic polymers: 1. The origins of charge. *Electrophoresis*, 29, (5), 2008, pp. 1092-1101.
153. V. Ntziachristos, Fluorescence molecular imaging. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 8, 2006, pp. 1-33.
154. H. Förster, UV/vis spectroscopy. *Mol. Sieves*, 4, 2004, pp. 337-426.
155. B. Stuart, *Infrared spectroscopy*. Wiley Online Library: 2005.
156. H. W. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata, H. M. Heise, *Near-infrared spectroscopy: principles, instruments, applications*. John Wiley & Sons: 2008.
157. E. D. Becker, *High Resolution NMR. Theory and Chemical Applications*. 2nd Ed. ed.; Elsevier- Academic Press: 1980.
158. W. J. Hennel, J. Klinowski, *Fundamentals of Nuclear Magnetic Resonance*. Wiley: New York, 1993.
159. M. Bruch, *NMR spectroscopy techniques*. CRC Press: 1996.
160. Furó, I., NMR spectroscopy of micelles and related systems. *Journal of Molecular Liquids* **2005**, 117, (1-3), 117-137.
161. Θ. Μαυρομούστακος, Ι. Ματσούκας, *NMR: Αρχές και εφαρμογές φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στην ιατρική, φαρμακευτική χημεία, βιοχημεία, χημεία τροφίμων και ποτών*. Ιατρικές Εκδόσεις Γιάννης Β. Παρισιάνος: Αθήνα, 2006.
162. C.-S. Wu, *Handbook Of Size Exclusion Chromatography And Related Techniques: Revised And Expanded*. CRC Press: 2003; Vol. 91.
163. B. A. Wolf, J. Eckelt, A. Eckelt, Size exclusion chromatography (Analysis).

164. P. E. J. Flewitt, R. K. Wild, *Physical Methods for Materials Characterisation*. IOP Publishing: Bristol, 1994.
165. I. M. Watt, *The Principles and Practice of Electron Microscopy*. Cambridge University Press: Cambridge, 1997.
166. R. F. Egerton, TEM specimens and images. In *Physical Principles of Electron Microscopy*, Springer: 2005; pp. 93-124.
167. R. Egerton, *Physical principles of electron microscopy: an introduction to TEM, SEM, and AEM*. Springer Science & Business Media: 2006.
168. Y. Milonaki, E. Kaditi, S. Pispas, C. Demetzos, Amphiphilic gradient copolymers of 2-methyl- and 2-phenyl-2-oxazoline: self-organization in aqueous media and drug encapsulation. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 50, (6), 2012, pp. 1226-1237.
169. T. Tsoukatos, S. Pispas, N. Hadjichristidis, Complex Macromolecular Architectures by Combining TEMPO Living Free Radical and Anionic Polymerization. *Macromolecules*, 33, (26), 2000, pp. 9504-9511.
170. S. Pispas, Double hydrophilic block copolymers of sodium(2-sulfamate-3-carboxylate)isoprene and ethylene oxide. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 44, (1), 2006, pp. 606-613.
171. H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *The Journal of organic chemistry*, 62, (21), 1997, pp. 7512-7515.
172. H. M. L. Lambermont-Thijs, F. S. van der Woerd, A. Baumgaertel, L. Bonami, F. E. Du Prez, U. S. Schubert, R. Hoogenboom, Linear Poly(ethylene imine)s by Acidic Hydrolysis of Poly(2-oxazoline)s: Kinetic Screening, Thermal Properties, and Temperature-Induced Solubility Transitions. *Macromolecules*, 43, (2), 2009, pp. 927-933.
173. L. Tauhardt, K. Kempe, K. Knop, E. Altuntaş, M. Jäger, S. Schubert, D. Fischer, U. S. Schubert, Linear Polyethyleneimine: Optimized Synthesis and Characterization – On the Way to “Pharmagrade” Batches. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 212, (17), 2011, pp. 1918-1924.
174. H. P. C. van Kuringen, V. R. de la Rosa, M. W. M. Fijten, J. P. A. Heuts, R. Hoogenboom, Enhanced Selectivity for the Hydrolysis of Block Copoly(2-oxazoline)s in

Ethanol–Water Resulting in Linear Poly(ethylene imine) Copolymers. *Macromolecular Rapid Communications*, 33, (9), 2012, pp. 827-832.

175. H. M. L. Lambermont-Thijs, J. P. A. Heuts, S. Hoeppener, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, Selective partial hydrolysis of amphiphilic copoly(2-oxazoline)s as basis for temperature and pH responsive micelles. *Polymer Chemistry*, 2, (2), 2011, pp. 313-322.

176. R. Tanaka, I. Ueoka, Y. Takaki, K. Kataoka, S. Saito, High molecular weight linear polyethylenimine and poly(N-methylethylenimine). *Macromolecules*, 16, (6), 1983, pp. 849-853.

177. X. Zeng, Y. Sun, X. Zhang, S. Cheng, R. Zhuo, A Potential Targeting Gene Vector Based on Biotinylated Polyethylenimine/Avidin Bioconjugates. *Pharmaceutical Research*, 26, (8), 2009.

178. X. Sun, S. Chen, J. Han, Z. Zhang, Mannosylated biodegradable polyethylenimine for targeted DNA delivery to dendritic cells. *International Journal of Nanomedicine*, Dovepress, 2012.

179. E. Vlassi, S. Pispas, Solution Behavior of Hydrolyzed Gradient Methyl/Phenyl Oxazoline Copolymers and Complexation with DNA. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 216, (8), 2015, pp. 873-883.

180. S. Choosakoonkriang, B. A. Lobo, G. S. Koe, J. G. Koe, C. R. Middaugh, Biophysical characterization of PEI/ DNA complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92, (8), 2003, pp. 1710-1722.

181. T. Yang, A. Hussain, S. Bai, I. Khalil, H. Harashima, A. Fakhrol, Positively charged polyethylenimines enhance nasal absorption of the negatively charged drug, low molecular weight heparin. *Journal of Controlled Release, Elsevier Science Ltd.*, 115, 2006, pp. 289-297.

182. S. Gunasekaran, D. Uthra, Fourier transform infrared and Fourier transform Raman spectra and normal coordinate analysis of ethyleneimine. *Indian Journal of Pure and Applied Physics*, 46, (2), 2008, pp. 100-105.

183. C. H. Chen, J. Wilson, W. Chen, R. M. Davis, J. S. Riffle, A light-scattering study of poly(2-alkyl-2-oxazoline)s: effect of temperature and solvent type. *Polymer*, 35, (17), 1994, pp. 3587-3591.

184. M. Hrubý, Č. Koňák, Ulbrich, K., Polymeric micellar pH-sensitive drug delivery system for doxorubicin. *Journal of Controlled Release*, 103, (1), 2005, pp. 137-148.

185. S. A. Ekhurutomwen, S. P. Sawan, B. F. Smith, T. W. Robison, K. V. Wilson, *Solution Behavior of Modified Polyethylenimine (PEI) Polymers by Light Scattering Investigations*. 2004.
186. B. Trzebicka, N. Koseva, V. Mitova, A. Dworak, Organization of poly(2-ethyl-2-oxazoline)-block-poly(2-phenyl-2-oxazoline) copolymers in water solution. *Polymer*, 51, (12), 2010, pp. 2486-2493.
187. Zou, S.-M.; Erbacher, P.; Remy, J.-S.; Behr, J.-P., Systemic linear polyethylenimine (L-PEI)-mediated gene delivery in the mouse. *The Journal of Gene Medicine* **2000**, 2, (2), 128-134.
188. R. Kircheis, L. Wightman, E. Wagner, Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53, (3), 2001, pp. 341-358.
189. J. Zhu, A. Tang, L. P. Law, M. Feng, K. M. Ho, D. K. Lee, F. W. Harris, P. Li, Amphiphilic core-shell nanoparticles with poly(ethylenimine) shells as potential gene delivery carriers. *Bioconjug Chem.*, 16, (1), 2005, pp. 139-146.
190. M. A. Winnik, S. M. Bystryak, J. Siddiqui, Interaction of Pyrene-Labeled Poly(ethylene imine) with Sodium Dodecyl Sulfate in Aqueous Solution. *Macromolecules*, 32, (3), 1999, pp. 624-632.
191. J.-P. Clamme, G. Krishnamoorthy, Y. Mely, Intracellular dynamics of the gene delivery vehicle polyethylenimine during transfection: investigation by two-photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1617, (1-2), 2003, pp. 52-61.
192. A. F. Thunemann, S. General, Poly(ethylene oxide)-b-poly(ethylene imine) Dodecanoate Complexes: Lamellar-within-lamellar Morphologies and Nanoparticles. *Macromolecules*, 34, (20), 2001, pp. 6978-6984.
193. B. Ochiatti, N. Guerin, S. V. Vinogradov, Y. S. Pierre, P. Lemieux, A. V. Kabanov, V. Y. Alakhov, Altered Organ Accumulation of Oligonucleotides Using Polyethyleneimine Grafted With Poly(ethylene Oxide) or Pluronic as Carriers. *Journal of Drug Targeting*, 10, (2), 2002, pp. 113-121.
194. X. Jiang, N. Petkov, S. K. Alexander, R. Azencott, B. G. Bodmann, A. Bouamrani, C. Chiappini, M. Ferrari, X. Liu, E. Tasciotti, SEM Image Analysis for Quality

Control of Nanoparticles. In *Computer Analysis of Images and Patterns*, Springer Berlin Heidelberg: 2009; Vol. 5702, pp. 590-597.

195. A. Siemiarczuk, W. R. Ware, Pyrene lifetime broadening in SDS micelles. *Chemical Physics Letters*, 167, (3), 1990, pp. 263-268.

196. R. Jaenicke, Stability and stabilization of globular proteins in solution - Review article. *Journal of Biotechnology (Elsevier)*, 79, 2000, pp. 193-203.

197. E. A. C. Jochems, B. F. J. van der Valk, R. F. Stafleu, V. Baumans, The use of fetal bovine serum: Ethical or scientific problem? *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*, 30, 2015, pp. 219-227.

198. D. Brunner, J. Frank, H. Appl, H. Schöffl, W. Pfaller, G. Gstraunthaler, Serum-free Cell Culture: The Serum-free Media Interactive Online Database. *ALTEX*, 27, (1/10), 2010, pp. 53-62.

199. J. Havlis, A. Shevchenko, Absolute Quantification of Proteins in Solutions and in Polyacrylamide Gels by Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 76, 2004, pp. 3029-3036.

200. K. Hirayama, S. Akashi, M. Furuya, K. Fukuhara, Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173, (2), 1990, pp.639-646.

201. A. P. Zunszain, J. Ghuman, T. Komatsu, E. Tsuchida, S. Curry, Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. *BMC Struct. Biol.* 2003, 3:6.

202. J. Suh, H. J. Paik, B. K. Hwang, Ionization of Poly(ethylenimine) and Poly(allylamine) at Various pH's. *Bioorganic Chemistry*, 22, (3), 1994, pp. 318-327.

203. A. von Harpe, H. Petersen, Y. Li, T. Kissel, Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 69, (2), 2000, pp. 309-322.

204. M.-G. Miguel, Association of surfactants and polymers studied by luminescence techniques. *Advances in Colloid and Interface Science*, 89-90, 2001, pp.1-23.

205. R. R. Sawant, S. K. Sriraman, G. Navarro, S. Biswas, R. A. Dalvi, V. P. Torchilin, Polyethyleneimine-lipid conjugate-based pH-sensitive micellar carrier for gene delivery. *Biomaterials*, 33, (15), 2012, pp. 3942-3951.

206. X. Huang, A.-V. Hartley, Y. Yin, J. H. Herskowitz, J. J. Lah, K. J. Ressler, AAV2 production with optimized N/P ratio and PEI-mediated transfection results in low toxicity and high titer for in vitro and in vivo applications. *Journal of Virological Methods*, 193, (2), 2013, pp. 270-277.
207. S. E. Reed, E. M. Staley, J. P.; Mayginnnes, D. J. Pintel, G. E. Tullis, Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors. *Journal of Virological Methods*, 138, (1-2), 2006, pp.85-98.
208. C. J. Galvin, J. Genzer, Applications of surface-grafted macromolecules derived from post-polymerization modification reactions. *Progress in Polymer Science*, 37, (7), 2012, pp. 871-906.
209. M. A. Gauthier, I. G. Matthew, H.- A. Klok, Synthesis of Functional Polymers by Post-Polymerization Modification. *Angewandte Chemie International Edition*, 48, (1), 2009, pp. 48-58.
210. M. A. C. Stuart, B. Hofs, I. K. Voets, A. de Keizer, Assembly of polyelectrolyte-containing block copolymers in aqueous media. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10, (1-2), 2005, pp. 30-36.
211. Y. Jiang, H. Xia, J. Yu, C. Guo, H. Liu, Hydrophobic ionic liquids-assisted polymer recovery during penicillin extraction in aqueous two-phase system. *Chemical Engineering Journal*, 147, (1), 2009, pp. 22-26.
212. J. S. Parent, M. J. A. Porter, R. M. Kleczek, A. R. Whitney, Imidazolium bromide derivatives of poly(isobutylene-co-isoprene): A new class of elastomeric ionomers. *Polymer*, 52, (24) 2011, pp. 5410-5418.
213. Y. C. Tang, J. H. Wu, J. X. Duan, The micellization and dissociation transitions of thermo-, pH- and sugar-sensitive block copolymer investigated by laser light scattering. *eXPRESS Polymer Letters*, 6, (8), 2012, pp. 647-656.
214. E. Hecht, A. Zajac, *Optics*. 4th ed.; Pearson Education (US): New Jersey, 1974.
215. R. L. Schoch, L. E. Kapinos, R. Y. Lim, Nuclear transport receptor binding avidity triggers a self-healing collapse transition in FG- nucleoporin molecular brushes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, (42), 2012, pp. 16911-16916.
216. chemnet.com, In.
217. www.dow.com, In.

218. T. Radeva, *Physical Chemistry of Polyelectrolytes*. 2001; Vol. 99.
219. M. Camps, M. Chatzopoulos, J.-P. Monthéard, Chloromethylstyrene: Synthesis, Polymerization, Transformations, Applications. *Journal of Macromolecular Science, Part C*, 22, (3), 1982, pp. 343-407.
220. J. A. O'Daly, M. B. Rodriguez, G. Garlin, Trypanosoma cruzi: Growth requirements at different temperatures in fetal bovine serum or peptide supplemented media. *Experimental Parasitology*, 64, (1), 1987, pp. 78-87.
221. M. P. Olivieri, K. H. Rittle, K. S. Tweden, R. E. Loomis, Comparative biophysical study of adsorbed calf serum, fetal bovine serum and mussel adhesive protein films. *Biomaterials*, 13, (4), 1992, pp. 201-208.
222. K. Manojkumar, K. T. Prabhu Charan, A. Sivaramakrishna, P. C. Jha, V. M. Khedkar, R. Siva, G. Jayaraman, K. Vijayakrishna, Biophysical Characterization and Molecular Docking Studies of Imidazolium based Polyelectrolytes/ DNA complexes: Role of Hydrophobicity. *Biomacromolecules* 2015.
223. T. J. Aitchison, M. Ginic-Markovic, S. Clarke, S. Valiyaveetil, Polystyrene-block-poly (methyl methacrylate): Initiation Issues with Block Copolymer Formation Using ARGET ATRP. *Macromolecular chemistry and physics*, 213, (1), 2012, pp. 79-86.
224. L. N. Pridgen, Oxazolines. 3. Regioselective synthesis of 2-(monosubstituted phenyl) and/or unsymmetrically 2-(disubstituted phenyl) 2-oxazolines by cross-coupling Grignard reagents to (haloaryl)-2-oxazolines. *The Journal of Organic Chemistry*, 47, (22), 1982, pp. 4319-4323.
225. S. Maas, Towards copolymer surfactants based on 2-oxazoline. 2015.
226. R. Hoogenboom, H. M. L. Thijs, M. W. M. Fijten, B. M. van Lankvelt, U. S. Schubert, One-pot synthesis of 2-phenyl-2-oxazoline-containing quasi-diblock copoly(2-oxazoline)s under microwave irradiation. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 45, (3), 2007, pp. 416-422.
227. M. Glassner, J. P. Blinco, C. Barner-Kowollik, Formation of nanoporous materials via mild retro-Diels-Alder chemistry. *Polymer Chemistry*, 2, (1), 2011, pp. 83-87.
228. K. Devanand, J. C. Selser, Asymptotic behavior and long-range interactions in aqueous solutions of poly (ethylene oxide). *Macromolecules*, 24, (22), 1991, pp. 5943-5947.

229. B. Hammouda, D. L. Ho, S. Kline, Insight into clustering in poly (ethylene oxide) solutions. *Macromolecules*, 37, (18), 2004, pp. 6932-6937.
230. A. Papagiannopoulos, M. Karayianni, G. Mountrichas, S. Pispas, A. Radulescu, Micellar and fractal aggregates formed by two triblock terpolymers with different arrangements of one charged, one neutral hydrophilic and one hydrophobic block. *Polymer*, 63, (0), 2015, pp. 134-143.
231. M. Ataman, Properties of aqueous salt solutions of poly(ethylene oxide). Cloud points, θ temperatures. *Colloid and Polymer Science*, 265, (1), 1987, pp. 19-25.
232. R. Heeb, S. Lee, N. V. Venkataraman, N. D. Spencer, Influence of Salt on the Aqueous Lubrication Properties of End-Grafted, Ethylene Glycol-Based Self-Assembled Monolayers. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 1, (5), 2009, pp. 1105-1112.
233. R. Sadeghi, F. Jahani, Salting-In and Salting-Out of Water-Soluble Polymers in Aqueous Salt Solutions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116, (17), 2012, pp. 5234-5241.
234. T. N. Khan, R. H. Mobbs, C. Price, J. R. Quintana, R. B. Stubbersfield, Synthesis and colloidal behaviour of a polystyrene-b-poly(ethylene oxide) block copolymer. *European Polymer Journal*, 23, (3), 1987, pp. 191-194.
235. L. M. Bronstein, D. M. Chernyshov, G. I. Timofeeva, L. V. Dubrovina, P. M. Valetsky, A. R. Khokhlov, Polystyrene-block-Poly(ethylene oxide) Micelles in Aqueous Solution. *Langmuir*, 15, (19), 1999, pp. 6195-6200.
236. D. A. Chiappetta, A. Sosnik, Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 66, (3), 2007, pp. 303-317.
237. A. Lavasanifar, J. Samuel, G. S. Kwon, Poly(ethylene oxide)-block-poly(l-amino acid) micelles for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, (2), 2002, pp. 169-190.
238. J. Lu, S. C. Owen, M. S. Shoichet, Stability of Self-Assembled Polymeric Micelles in Serum. *Macromolecules*, 44, (15), 2011, pp. 6002-6008.
239. J. P. Fortin-Ripoche, M. S. Martina, F. Gazeau, C. Menager, C. Wilhelm, J. C. Bacri, S. Lesieur, O. Clement, *Radiology*, 239, 415, 2006.

240. K. Kataoka, T. Matsumoto, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, S. Fukushima, K. Okamoto, G. S. Kwon, Doxorubicin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance. *Journal of Controlled Release*, 64, (1-3), 2000, pp. 143-153.
241. E. Vranić, A. Uzunović, Dissolution studies of physical mixtures of indomethacin with alpha- and gamma-cyclodextrins. *Bosn J Basic Med Sci.*, 10, (3), 2010, pp. 197-203.