



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Αυτοοργάνωση Πολυμερών:
Πολυηλεκτρολύτες και Σύμπλοκά τους με Πρωτεΐνες**

ΜΑΡΙΑ ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΗ

ΦΥΣΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2012

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αυτοοργάνωση Πολυμερών:
Πολυηλεκτρολύτες και Σύμπλοκά τους με Πρωτεΐνες

ΜΑΡΙΑ ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΗ

A.M.: 241003

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

N. Χατζηχρηστίδης, Ομότιμος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

N. Χατζηχρηστίδης, Ομότιμος Καθηγητής ΕΚΠΑ

K. Βύρας, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Γ. Δ. Χρυσικός, Ερευνητής Α΄ ΙΘΦΧ/ΕΙΕ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

N. Χατζηχρηστίδης, Ομότιμος Καθηγητής ΕΚΠΑ

K. Βύρας, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Γ. Δ. Χρυσικός, Ερευνητής Α΄ ΙΘΦΧ/ΕΙΕ

Γ. Κόκοτος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

M. Πιτσικάλης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

E. Ιατρού, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Γ. Σακελλαρίου, Λέκτορας ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 4/1/2012

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μελέτη αφορά τη διερεύνηση α) των ιδιοτήτων και της συμπεριφοράς σε υδατικό διάλυμα του συνθετικού πολυηλεκτρολύτη μετά νατρίου άλας του πολυ((σουλφαμινο-καρβοξυλο)ισοπρενίου) (SCPI) και β) της δομής, των ιδιοτήτων και της συμπεριφοράς των μικκυλίων που σχηματίζονται σε υδατικό μέσο, ως συνέπεια της αυτοοργάνωσης των νέων αμφιφιλικών συμπολυμερών κατά συστάδες του πολυηλεκτρολύτη SCPI με πολυστυρένιο (PS) και πολυαιθυλενοξείδιο (PEO) (συμπολυμερή των τύπων PS-SCPI, PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO), συναρτήσει τόσο των μοριακών χαρακτηριστικών και της μακρομοριακής αρχιτεκτονικής των συνθετικών πολυηλεκτρολυτών, όσο και των συνθηκών του διαλύματος (συγκέντρωση, pH και ιοντική ισχύς). Επίσης ασχολείται με τη διερεύνηση της διαδικασίας της σύμπλεξης, καθώς και της νανοσκοπικής δομής, των ιδιοτήτων και της συμπεριφοράς των σχηματιζόμενων συμπλόκων μεταξύ του πολυηλεκτρολύτη SCPI και των πολυηλεκτρολυτικών μικκυλίων των PS-SCPI, PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και των μορίων της πρωτεΐνης λυσοζύμης (HEWL), συναρτήσει της αναλογίας των δύο συστατικών, του pH και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος. Όπως διαπιστώθηκε, μέσω μετρήσεων δυναμικής, στατικής και ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός, τα ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά του πολυηλεκτρολύτη SCPI (δηλαδή η μεταβαλλόμενη συναρτήσει του pH πυκνότητα φορτίου και ο εν μέρει υδροφοβικός χαρακτήρας της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας), καθώς και η μακρομοριακή αρχιτεκτονική των πολυσυσταδικών πολυηλεκτρολυτών, επηρεάζουν σημαντικά τόσο τις ιδιότητες σε διάλυμα του ομοπολυμερικού πολυηλεκτρολύτη και των πολυηλεκτρολυτικών μικκυλίων, όσο και τη δομή, τις ιδιότητες και τη συμπεριφορά των συμπλόκων τους με τη λυσοζύμη. Σε όλες τις περιπτώσεις, φασματοσκοπικές μετρήσεις φθορισμού, υπερύθρου και κυκλικού διχρωισμού κατέδειξαν τη διατήρηση της δομής της συμπλεγμένης πρωτεΐνης.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Αυτοοργάνωση Πολυμερών

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: πολυηλεκτρολύτες, μικκύλια πολυηλεκτρολυτικών συμπολυμερών κατά συστάδες, σύμπλοκα πολυηλεκτρολυτών και πρωτεϊνών, ιδιότητες και συμπεριφορά σε διάλυμα, σκέδαση φωτός

ABSTRACT

The present study concerns the investigation of a) the aqueous solution properties and behavior of the synthetic polyelectrolyte sodium poly((sulfamate-carboxylate)isoprene) (SCPI) and b) the structure, properties and behavior of the micelles formed in aqueous medium, through the self-assembly of the novel amphiphilic block copolymers of the SCPI polyelectrolyte with polystyrene (PS) and poly(ethylene oxide) (PEO) (block copolymers of the types PS-SCPI, PS-SCPI-PEO and SCPI-PS-PEO), as a function of the molecular characteristics and the macromolecular architecture of the synthetic polyelectrolytes, along with the solution conditions (concentration, pH and ionic strength). Furthermore, it deals with the investigation of the complexation process, as well as the nanoscopic structure, properties and behavior of the formed complexes between the SCPI polyelectrolyte and the PS-SCPI, PS-SCPI-PEO and SCPI-PS-PEO polyelectrolyte micelles and lysozyme (HEWL) protein molecules, as a function of the ratio of the two components, the pH and ionic strength of the solution. Dynamic, static and electrophoretic light scattering measurements revealed the strong influence of the intriguing structural characteristics of the SCPI polyelectrolyte (i.e. the pH-dependent charge density and the partially hydrophobic nature of the polyelectrolyte chain), together with the macromolecular architecture of the polyelectrolyte block copolymers, on both the solution properties of the polyelectrolyte and the polyelectrolyte micelles, and the structure, solution properties and behavior of their complexes with lysozyme. In all cases, fluorescence, infrared and circular dichroism spectroscopic studies confirmed the preservation of the protein structure within the complexes.

SUBJECT AREA: Polymer Self-Assembly

KEYWORDS: polyelectrolytes, polyelectrolyte block copolymer micelles, polyelectrolyte-protein complexes, solution properties and behavior, light scattering

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί το αποτέλεσμα ερευνητικής μελέτης, η οποία πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας (ΙΘΦΧ) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ), στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Επιστήμη Πολυμερών και Εφαρμογές της» του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ). Πέραν της προσωπικής προσπάθειας, εξίσου καθοριστική αποδείχθηκε η συμβολή διαφόρων ανθρώπων, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω στο σημείο αυτό, ως ελάχιστη ένδειξη ευγνωμοσύνης.

Αρχικά, ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, κ.κ. Ν. Χατζηχρηστίδη Ομότιμο Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ, Κ. Βύρα Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ και Γ. Δ. Χρυσικό Ερευνητή Α΄ του ΙΘΦΧ/ΕΙΕ, για την πολύτιμη καθοδήγηση και τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής. Καθώς και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, κ.κ. Γ. Κόκοτο Καθηγητή, Μ. Πιτσικάλη Αναπληρωτή Καθηγητή, Ε. Ιατρού Αναπληρωτή Καθηγητή και Γ. Σακελλαρίου Λέκτορα, του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ, για τη συμβολή και τις χρήσιμες υποδείξεις τους. Εκτός αυτού, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ν. Χατζηχρηστίδη για τη συμμετοχή μου στο συγκεκριμένο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών, καθώς μου παρείχε τη δυνατότητα να ασχοληθώ με ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον και καινούργιο για μένα επιστημονικό πεδίο.

Επίσης, νιώθω βαθύτατη ευγνωμοσύνη προς τον κ. Γ. Δ. Χρυσικό και τον κ. Β. Γκιώνη, Ερευνητές Α΄ και Β΄, αντίστοιχα, του ΙΘΦΧ/ΕΙΕ, οι οποίοι συνέβαλαν καθοριστικά στην ερευνητική μου κατάρτιση και εκπαίδευση, καθώς και στην καθοδήγηση και την επίβλεψη της διδακτορικής διατριβής, ενώ παράλληλα μου προσέφεραν την αμέριστη υποστήριξη και συμπαράστασή τους, τις χρήσιμες συμβουλές τους, τις πλούσιες γνώσεις τους και την πολύτιμη βοήθειά τους, κάθε φορά που τη χρειάστηκα. Ακόμη, θα ήθελα να τους ευχαριστήσω θερμά για την οικονομική υποστήριξη που μου παρείχαν, μέσω των πόρων του Εργαστηρίου Φασματοσκοπικών Εφαρμογών του ΙΘΦΧ/ΕΙΕ. Την ίδια ευγνωμοσύνη νιώθω απέναντι στον κ. Σ. Πίσπα, Ερευνητή Β΄ του ΙΘΦΧ/ΕΙΕ, για την ουσιαστική

επιστημονική καθοδήγηση και επίβλεψη της παρούσας διατριβής, την ιδιαίτερα εποικοδομητική συνεργασία, το πλήθος των γνώσεων που μου μετέδωσε, τη διαμόρφωση της ερευνητικής μου σκέψης, την καθοριστικής σημασίας υποστήριξη, συμπαράσταση και βοήθεια, αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Θεωρώ τον εαυτό μου εξαιρετικά τυχερό και ευτυχή που είχα την ευκαιρία να γνωρίσω, να συνεργαστώ και να διδαχθώ από τους συγκεκριμένους ανθρώπους.

Η πραγματοποίηση της παρούσας ερευνητικής μελέτης δε θα ήταν δυνατή χωρίς την πολύτιμη βοήθεια διαφόρων συνεργατών. Κατ' αρχήν θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον Δρ. Γ. Μούντριχα για τη σύνθεση των πολυηλεκτρολυτών που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δ. Τσιούρβα, καθώς και την κ. Ω. Σιδεράτου, Ερευνητές Α' και Β', αντίστοιχα, του Ινστιτούτου Φυσικοχημείας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», για την παραχώρηση των εργαστηριακών εγκαταστάσεων και της πειραματικής διάταξης της Ηλεκτροφορητικής Σκέδασης Φωτός, καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθεια κατά τη διεξαγωγή των αντίστοιχων μετρήσεων. Ακόμη, τον κ. Γ. Νούνεση, Ερευνητή Α' του Ινστιτούτου Ραδιοϊσοτόπων και Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» και τον Δρ. Σ.-Χ. Γιατρέλλη, για την διεξαγωγή των μετρήσεων Θερμιδομετρίας Ισόθερμης Τιτλοδότησης και Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης, αλλά και την καθοριστική συμβολή τους στην επεξήγηση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων αυτών. Τέλος, την κ. Μ. Πελεκάνου, Ερευνήτρια Α' του Ινστιτούτου Βιολογίας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», καθώς και τις Δρ. Δ. Μπενάκη και Δρ. Α. Παναγιωτοπούλου, για τη διεξαγωγή των φασματοσκοπικών μετρήσεων Κυκλικού Διχρωισμού.

Ευχαριστώ θερμά όλο το προσωπικό του ΙΘΦΧ/ΕΙΕ και ιδιαίτερα τον Διευθυντή κ. Ε. Ι. Καμίτσο, τους Ερευνητές κ.κ. Γ. Παπαβασιλείου, Γ. Μούσδη, Χ. Βαρσάμη, Μ. Κομπίτσα, Ν. Ταγματάρχη, τον Ειδικό Λειτουργικό Επιστήμονα κ. Δ. Παλλέ, καθώς και τις Γραμματείς κ.κ. Ε. Παπαλεξάνδρου και Π. Σεριάτου, οι οποίοι ήταν πάντα πρόθυμοι να μου προσφέρουν οποιαδήποτε βοήθεια, ενώ με το ενδιαφέρον, την υποστήριξη και τη συμπαράστασή τους με έκαναν να νιώθω ως μέλος μίας ευρύτερης εργαστηριακής οικογένειας.

Στο κλίμα αυτό συνετέλεσαν καθοριστικά οι ιδιαίτερα φιλικές σχέσεις που ανέπτυξα με τους περισσότερους συναδέλφους μεταπτυχιακούς φοιτητές, υποψήφιους διδάκτορες και μεταδιδακτορικούς συνεργάτες του ΙΘΦΧ/ΕΙΕ. Θέλω να

ευχαριστήσω θερμά όλους όσους γνώρισα κατά την παραμονή μου στο Ινστιτούτο και κάθε έναν ξεχωριστά: τον Γιώργο Ανυφαντή, τον Λουκά Αθανασέκο, τον Μίλτο Βασιλειάδη, την Λεωνή Βέλλη, την Κατερίνα Γατσούλη, τον Κλεομένη Δημητρουλόπουλο, την Ελένη Καδίτη, τον Σωκράτη Καλογριανίτη, την Μαρία Καραμολέγκου, τον Νίκο Καρούση, τον Γιάννη Κονιδάκη, τον Νίκο Μακρή, τον Χρήστο Μαντζαρίδη, την Αναστασία Μεριστούδη, τον Γρηγόρη Μούντριχα, την Βανέσα Μπούκα, τον Σόλωνα Οικονομόπουλο, την Γεωργία Παγώνα, τον Άρη Παπαγιαννόπουλο, την Κωνσταντίνα Πουλλή, τον Γιώργο Ρώτα, την Αγγελική Σκόνδρα, την Ελίζαμπεθ Σταθοπούλου, την Μαρίνα Ταλέλλη, τον Κώστα Τσιαντό, την Ιωάννα Φασάκη, την Όλγα Χωριανοπούλου και τον Marc Dussauze, για τη συμπαράσταση, την υποστήριξη, τη βοήθεια, τη φιλία και την παρέα. Όλα αυτά τα χρόνια μοιραστήκαμε την καθημερινότητά μας, τα άγχη, τις αγωνίες, τις απογοητεύσεις, αλλά και τις χαρές, τις επιτυχίες, τα όνειρα και τα σχέδιά μας για το μέλλον. Γίναμε μία μεγάλη δεμένη παρέα και ελπίζω να παραμείνουμε έτσι και στο μέλλον. Ξεχωριστές ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στην Ειρήνη, γιατί η συμπαράστασή της, η ψυχολογική υποστήριξή της και η πολύτιμη για μένα φιλία μας, με βοήθησαν σημαντικά στην ολοκλήρωση της διατριβής αυτής, αλλά και στον Χρήστο, που μου συμπαραστάθηκε και με στήριξε σε όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας. Επίσης, ευχαριστώ τους συναδέλφους και φίλους Αγγελική Τσιγκρή, Μαριάννα Γιαννουράκου και Άρη Μπακανδρίτσο για τη συμπαράσταση.

Τέλος, η οικογένεια μου, οι γονείς μου Νίκος και Αντωνία και ο αδερφός μου Τάσος, ήταν πάντα δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια, με στήριζαν και με βοηθούσαν με όποιον τρόπο μπορούσαν, ενώ παράλληλα μου έδιναν κουράγιο και δύναμη να συνεχίσω και για το λόγο αυτό τους ευχαριστώ πολύ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	32
1.1. Πολυηλεκτρολύτες.....	32
1.1.1. Ιδιότητες σε διάλυμα ομοπολυμερικών πολυηλεκτρολυτών.....	35
1.1.2. Ιδιότητες σε διάλυμα πολυηλεκτρολυτών κατά συστάδες.....	43
1.2. Πρωτεΐνες.....	53
1.3. Σύμπλοκα πολυηλεκτρολυτών με πρωτεΐνες.....	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	67
2.1. Πειραματικές τεχνικές.....	67
2.1.1. Σκέδαση φωτός.....	67
2.1.1.1. Στατική σκέδαση φωτός.....	67
2.1.1.2. Δυναμική σκέδαση φωτός.....	69
2.1.1.3. Πειραματική διάταξη στατικής και δυναμικής σκέδασης φωτός.....	72
2.1.1.4. Ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός.....	73
2.1.1.5. Πειραματική διάταξη ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός.....	76
2.1.2. Φασματοσκοπικές μέθοδοι.....	77
2.1.2.1. Φασματοσκοπία φθορισμού.....	77
2.1.2.2. Πειραματική διάταξη φασματοσκοπίας φθορισμού.....	81
2.1.2.3. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού.....	82
2.1.2.4. Πειραματική διάταξη φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού.....	85
2.1.2.5. Φασματοσκοπία υπερύθρου.....	87
2.1.2.6. Πειραματική διάταξη φασματοσκοπίας υπερύθρου.....	91
2.1.3. Θερμιδομετρικές μέθοδοι.....	92
2.1.3.1. Θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης.....	93
2.1.3.2. Πειραματική διάταξη θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης.....	96
2.1.3.3. Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης.....	96

2.1.3.4. Πειραματική διάταξη διαφορικής θερμοδομετρίας σάρωσης	99
2.2. Υλικά	101
2.2.1. Πολυηλεκτρολύτες.....	101
2.2.2. Πρωτεΐνη.....	105
2.2.3. Παρασκευή διαλυμάτων πολυηλεκτρολυτών	105
2.2.4. Παρασκευή διαλυμάτων συμπλόκων.....	106
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΠΟΛΥΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΗΣ SCPI ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΤΟΥ ΜΕ ΛΥΣΟΖΥΜΗ.....	108
3.1. Ιδιότητες σε διάλυμα του πολυηλεκτρολύτη μετά νατρίου άλας του πολυ((σουλφαμινο-καρβοξυλο)ισοπρενίου) (SCPI).....	108
3.1.1. Ιδιότητες σε διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος.....	108
3.1.2. Επίδραση της θερμοκρασίας.....	118
3.1.3. Επίδραση της ιοντικής ισχύος.....	120
3.2. Σύμπλεξη του πολυηλεκτρολύτη SCPI με λυσοζύμη.....	126
3.2.1. Σύμπλεξη σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M	126
3.2.2. Σύμπλεξη σε pH 3 και ιοντική ισχύ 0.01 M	137
3.2.3. Δομή των συμπλόκων	143
3.2.4. Δομή της συμπλεγμένης πρωτεΐνης.....	147
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΔΙΣΥΣΤΑΔΙΚΟΣ ΠΟΛΥΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΗΣ PS-SCPI ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΤΟΥ ΜΕ ΛΥΣΟΖΥΜΗ	154
4.1. Ιδιότητες σε διάλυμα του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI.....	154
4.1.1. Ιδιότητες σε διάλυμα συναρτήσεως του pH	154
4.1.2. Ιδιότητες σε διάλυμα συναρτήσεως της ιοντικής ισχύος.....	161
4.1.3. Απόκριση των μικκυλίων συναρτήσεως των συνθηκών του διαλύματος	165
4.2. Σύμπλεξη του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI με λυσοζύμη	167
4.2.1. Σύμπλεξη σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M	167
4.2.2. Σύμπλεξη σε pH 3 και ιοντική ισχύ 0.01 M	177
4.2.3. Δομή των συμπλόκων	188
4.2.4. Δομή της συμπλεγμένης πρωτεΐνης.....	193

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΤΡΙΣΥΣΤΑΔΙΚΟΙ ΠΟΛΥΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΕΣ PS-SCPI-PEO ΚΑΙ SCPI-PS-PEO ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΤΟΥΣ ΜΕ ΛΥΣΟΖΥΜΗ.....	198
5.1. Ιδιότητες σε διάλυμα των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO	198
5.1.1. Ιδιότητες σε διάλυμα συναρτήσει του pH	199
5.1.2. Ιδιότητες σε διάλυμα συναρτήσει της ιοντικής ισχύος.....	207
5.1.3. Απόκριση των μικκυλίων συναρτήσει των συνθηκών του διαλύματος	213
5.2. Σύμπλεξη των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO με λυσοζύμη	215
5.2.1. Σύμπλεξη σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M	215
5.2.2. Σύμπλεξη σε pH 3 και ιοντική ισχύ 0.01 M	226
5.2.3. Δομή των συμπλόκων	235
5.2.4. Δομή της συμπλεγμένης πρωτεΐνης.....	240
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	245
6.1. Πολυηλεκτρολύτης SCPI και σύμπλοκά του με λυσοζύμη.....	247
6.2. Δισυσταδικός πολυηλεκτρολύτης PS-SCPI και σύμπλοκά του με λυσοζύμη....	251
6.3. Τρισυσταδικοί πολυηλεκτρολύτες PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και σύμπλοκά τους με λυσοζύμη	253
6.4. Σύγκριση της δομής των συμπλόκων των διαφορετικών συστημάτων.....	256
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	258
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	263
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	266
ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	267

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Σχήμα 1.1:** Σχηματική αναπαράσταση ενός διαλύματος πολυηλεκτρολύτη.32
- Σχήμα 1.2:** Μοριακή δομή α) του μετά νατρίου άλατος του πολυ(σουλφονομένου στυρενίου) και β) του πολυ(μεθακρυλικού οξέος), τα οποία αποτελούν τυπικά παραδείγματα ισχυρού και ασθενούς πολυηλεκτρολύτη, αντίστοιχα.33
- Σχήμα 1.3:** Εξάρτηση του συντελεστή διάχυσης της γρήγορης διαδικασίας χαλάρωσης D_f από α) το βαθμό εξουδετέρωσης των φορτίων, α , πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων PMAA με $M_w = 3 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ σε διάλυμα συγκέντρωσης $c = 36.6 \text{ g/l}$ χωρίς προσθήκη άλατος, β) τη συγκέντρωση του πρόσθετου άλατος NaCl, C_s , σε διάλυμα NaPSS με $M_w = 1.2 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ και $c = 5 \text{ g/l}$, γ) τη συγκέντρωση του πολυηλεκτρολύτη, c , για διαλύματα NaPSS με $M_w = 1 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ και δ) το μοριακό βάρος του πολυηλεκτρολύτη, M_w , για διαλύματα NaPSS με $c = 45.6 \text{ g/l}$ χωρίς προσθήκη άλατος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων δυναμικής σκέδασης φωτός του M. Sedláček.^{14, 15}39
- Σχήμα 1.4:** Σύγκριση των τιμών των συντελεστών της γρήγορης και της αργής διαδικασίας χαλάρωσης του συστήματος, D_f (ανοιχτά σύμβολα) και D_s (κλειστά σύμβολα), αντίστοιχα, συναρτήσει α) της συγκέντρωσης του πολυηλεκτρολύτη, c , για διαλύματα NaPSS με $M_w = 1.2 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ χωρίς προσθήκη άλατος και β) του μοριακού βάρους του πολυηλεκτρολύτη, M_w , για διαλύματα NaPSS με $c = 45.6 \text{ g/l}$ χωρίς προσθήκη άλατος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων δυναμικής σκέδασης φωτός του M. Sedláček.^{14, 15}40
- Σχήμα 1.5:** Γωνιακή εξάρτηση α) του συντελεστή διάχυσης D_s και β) της απόλυτης έντασης σκέδασης A_s , της αργής διαδικασίας χαλάρωσης του συστήματος, για διάλυμα NaPSS με $M_w = 7.1 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ και $c = 10 \text{ g/l}$ χωρίς προσθήκη άλατος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων σκέδασης φωτός του M. Sedláček.^{14, 15}41
- Σχήμα 1.6:** Εξάρτηση α) των συντελεστών διάχυσης D_f (ανοιχτά σύμβολα) και D_s (κλειστά σύμβολα), καθώς και β) των απόλυτων εντάσεων σκέδασης A_f (ανοιχτά σύμβολα) και A_s (κλειστά σύμβολα), της γρήγορης και της αργής διαδικασίας χαλάρωσης του συστήματος, αντίστοιχα, από τη συγκέντρωση του πρόσθετου άλατος NaCl, C_s , σε διάλυμα NaPSS με $M_w = 5 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ και $c = 5 \text{ g/l}$, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων σκέδασης φωτός του M. Sedláček.^{14, 15}42

- Σχήμα 1.7:** Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων παραμέτρων που καθορίζουν τη δομή των μικκυλίων ενός δισυσταδικού συμπολυμερούς AB, όπου A η αδιάλυτη και B η διαλυτή συστάδα που σχηματίζουν τον πυρήνα και την κορώνα του μικκυλίου, αντίστοιχα.....45
- Σχήμα 1.8:** Διαμόρφωση των μικκυλίων ενός δισυσταδικού συμπολυμερούς συναρτήσει της σύστασης του πολυμερούς: α) αστεροειδή μικκύλια και β) μικκύλια με μεγάλο πυρήνα και κοντή κορώνα.....45
- Σχήμα 1.9:** Διαμόρφωση των μικκυλίων ενός τρισυσταδικού συμπολυμερούς ABC, όπου α) οι συστάδες A και B είναι αδιάλυτες και η C διαλυτή (μικκύλια «πυρήνα-κελύφους-κορώνας»), η συστάδα A είναι αδιάλυτη και οι B και C διαλυτές, με την αδιάλυτη συστάδα β) στο άκρο της αλυσίδας (μικκύλια με ακτινικά διαχωρισμένη κορώνα), ή στο κέντρο της αλυσίδας, με αποτέλεσμα το σχηματισμό είτε γ) μικτής κορώνας, είτε δ) κορώνας αποτελούμενης από δύο ξεχωριστά ημισφαίρια («διπρόσωπα» μικκύλια).....47
- Σχήμα 1.10:** α) Χημική δομή του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ δύο γειτονικών αμινοξέων μίας πρωτεϊνικής αλυσίδας και β) τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ του αμινοξέος αλανίνη και ενός γειτονικού αμινοξέος....54
- Σχήμα 1.11:** Το πρωτεϊνικό μόριο της λυσοζύμης σε αναπαράσταση α) μοριακή (CPK), όπου τα άτομα άνθρακα, αζώτου, οξυγόνου και θείου είναι χρωματισμένα γκρι, μπλε, κόκκινα και κίτρινα, αντίστοιχα, και β) της δευτεροταγούς δομής, όπου φαίνονται οι περιοχές α-έλικας, β-πτυχωτής επιφάνειας, β-στροφής και τυχαίας διαμόρφωσης.....57
- Σχήμα 1.12:** Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού της σύμπλεξης πρωτεϊνών και πολυηλεκτρολυτών, σύμφωνα με τις πειραματικές μελέτες της ομάδας των Dubin και Kokufuta.¹³⁷60
- Σχήμα 1.13:** Σχηματική αναπαράσταση της πρόσδεσης των μορίων της ανεξίνης-A5 στην πολυηλεκτρολυτική κορώνα των μικκυλίων του δισυσταδικού αμφιφιλικού συμπολυμερούς PBuA-PECVPD, σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα της ομάδας των Giacomelli και Borsali.¹⁸⁵65
- Σχήμα 2.1:** Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης στατικής και δυναμικής σκέδασης φωτός.....73

Σχήμα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση της ηλεκτρικής διπλοστιβάδας (στιβάδα Debye), που σχηματίζεται γύρω από ένα αρνητικά φορτισμένο σωματίδιο σε περιβάλλον πολικού διαλύτη, των επιμέρους επιπέδων που την αποτελούν, του δυναμικού συναρτήσει της απόστασης από την επιφάνεια του σωματιδίου και των χαρακτηριστικών τιμών του.....	74
Σχήμα 2.3: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός.....	76
Σχήμα 2.4: Απλοποιημένο διάγραμμα Jablonski, το οποίο αναπαριστά σχηματικά τις τρεις επιμέρους διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά το φαινόμενο του φθορισμού.....	78
Σχήμα 2.5: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης φασματοσκοπίας φθορισμού...81	
Σχήμα 2.6: Σχηματική αναπαράσταση της στρέψης του επιπέδου πόλωσης του φωτός και της μετατροπής του από επίπεδα πολωμένο σε ελλειπτικά πολωμένο, κατά τη διέλευση μέσω οπτικά ενεργών ουσιών.....	83
Σχήμα 2.7: Χαρακτηριστικά φάσματα κυκλικού διχρωισμού, στην περιοχή του άπω υπεριώδους, των διαφόρων δευτεροταγών δομών διαμόρφωσης ενός πρωτεϊνικού μορίου.....	85
Σχήμα 2.8: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού.....	86
Σχήμα 2.9: Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου της ολικής ανάκλασης.....	90
Σχήμα 2.10: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης φασματοσκοπίας υπερύθρου.	92
Σχήμα 2.11: α) Σχηματική αναπαράσταση ενός θερμιδόμετρου ισόθερμης τιτλοδότησης και β) θερμιδομετρικά αποτελέσματα εκφρασμένα ως η μεταβολή της ισχύος συναρτήσει του χρόνου (επάνω), ή ως η μεταβολή της ενθαλπίας του συστήματος συναρτήσει του μοριακού λόγου των αλληλεπιδρώντων μορίων (κάτω).....	95
Σχήμα 2.12: Σχηματική αναπαράσταση ενός διαφορικού θερμιδόμετρου σάρωσης.	97
Σχήμα 2.13: Μορφή των αποτελεσμάτων ενός πειράματος διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης, καθώς και η επεξεργασία που πραγματοποιείται για τη διεξαγωγή των θερμοδυναμικών παραμέτρων της διαδικασίας θερμικής αποδιάταξης	

ενός πρωτεϊνικού διαλύματος.....	99
Σχήμα 2.14: Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης προσθήκης του χλωροσουλφονικού ισοκυανικού εστέρα (CSI) στο διπλό δεσμό των μονομερικών μονάδων του πολυισοπρενίου.....	103
Σχήμα 2.15: Μοριακή δομή α) του ομοπολυμερικού πολυηλεκτρολύτη SCPI, β) του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών γ) PS-SCPI-PEO και δ) SCPI-PS-PEO.....	104
Σχήμα 3.1: Κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις 90°, για διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/ml των πολυηλεκτρολυτών SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 και pH 3 με $I = 0.01M$	109
Σχήμα 3.2: α) Γωνιακή εξάρτηση του μέσου ρυθμού χαλάρωσης της γρήγορης και της αργής διαδικασίας, για το διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δείγματος SCPI-54K σε pH 7 με $I = 0.01 M$. β) Οι αντίστοιχες κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις 45, 90, και 135°.....	110
Σχήμα 3.3: Τυπικό διάγραμμα Zimm του δείγματος SCPI-54K σε pH 3 με $I = 0.01 M$. Η συγκέντρωση του διαλύματος κυμαίνεται από 0.5 έως 5 mg/ml.	114
Σχήμα 3.4: α) Θερμοκρασιακή εξάρτηση των συντελεστών διάχυσης της γρήγορης και της αργής διαδικασίας χαλάρωσης, D_f και D_s , για το διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δείγματος SCPI-54K σε pH 7 με $I = 0.01 M$. β) Οι αντίστοιχες κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις 90° και στη θερμοκρασία των 25, 40 και 60 °C.	119
Σχήμα 3.5: Θερμοκρασιακή εξάρτηση α) της συνολικής έντασης σκέδασης του διαλύματος I/I_{tot} , β) των απόλυτων εντάσεων σκέδασης της γρήγορης A_f (τετράγωνα) και της αργής A_s (κύκλοι) διαδικασίας χαλάρωσης, καθώς και του λόγου τους A_s/A_f , για το διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δείγματος SCPI-54K σε pH 7 με $I = 0.01 M$	120
Σχήμα 3.6: Εξάρτηση από την ιοντική ισχύ των ακτίνων R_g (τετράγωνα) και R_h (κύκλοι), καθώς και του χαρακτηριστικού τους λόγου ρ , για το διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δείγματος SCPI-54K, τόσο σε pH 7 όσο και σε pH 3..	121
Σχήμα 3.7: Κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις 90°, για το διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δείγματος SCPI-54K, τόσο σε pH 7 όσο και σε pH 3, για διαφορετικές τιμές της ιοντικής ισχύος, $I = 0.01, 0.2$ και $0.5 M$	123

- Σχήμα 3.8:** Εξάρτηση από την ιοντική ισχύ των απόλυτων εντάσεων σκέδασης της γρήγορης A_f (τετράγωνα) και της αργής A_s (κύκλοι) διαδικασίας χαλάρωσης, καθώς και του λόγου τους A_s/A_f , για το διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δείγματος SCPI-54K, τόσο σε pH 7 όσο και σε pH 3. 124
- Σχήμα 3.9:** Χρονική εξέλιξη των κατανομών των χρόνων χαλάρωσης στις 90°, για το διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δείγματος SCPI-54K, σε pH 7 και σε pH 3 με $I = 0.5$ M, μετά από 2 μέρες και μετά από 10 ή 11 μέρες. 125
- Σχήμα 3.10:** Ένταση σκέδασης στις 90°, I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$, για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και των δειγμάτων SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν κατά προσέγγιση τις αντίστοιχες τιμές των διαλυμάτων των πολυηλεκτρολυτικών. 127
- Σχήμα 3.11:** Κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90°, για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και των δειγμάτων SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, για $[-]/[+] = 5, 15$ και 25. Οι αντίστοιχες κατανομές των διαλυμάτων των πολυηλεκτρολυτών παρατίθενται επίσης, για λόγους σύγκρισης. 129
- Σχήμα 3.12:** Κανονικοποιημένες, ως προς τη συνολική ένταση του διαλύματος, κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90°, για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και των δειγμάτων SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, για $[-]/[+] = 20, 25$ και 30. Οι αντίστοιχες κανονικοποιημένες κατανομές των διαλυμάτων των πολυηλεκτρολυτών παρατίθενται επίσης, για λόγους σύγκρισης. . 131
- Σχήμα 3.13:** Ένταση σκέδασης στις 90°, I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της μοριακής αναλογίας $[HEWL]/[SCPI-54K]$ (κάτω άξονας x) ή $[HEWL]/[SCPI-21K]$ (επάνω άξονας x), για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και των δειγμάτων SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν κατά προσέγγιση τις αντίστοιχες τιμές των διαλυμάτων των πολυηλεκτρολυτών. 132
- Σχήμα 3.14:** Δυναμικό ζήτα, ζ_p , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$, για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και των δειγμάτων SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. 133
- Σχήμα 3.15:** Εξάρτηση από την ιοντική ισχύ της έντασης σκέδασης στις 90°, I_{90} , και της υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , για αντιπροσωπευτικά διαλύματα με $[-]/[+] = 5, 15$

και 30, των σειρών διαλυμάτων συμπλόκων της HEWL και των δειγμάτων SCPI-54K και SCPI-21K σε pH 7. 135

Σχήμα 3.16: Μεταβολή της ενθαλπίας ΔH , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$, για το σύστημα της HEWL και του δείγματος SCPI-54K σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Η συνεχόμενη γραμμή αντιπροσωπεύει το προσαρμοσμένο μοντέλο πρόσδεσης. 136

Σχήμα 3.17: Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$, για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 3 με $I = 0.01$ M. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν κατά προσέγγιση τις αντίστοιχες τιμές του διαλύματος του πολυηλεκτρολύτη. Οι αντίστοιχες τιμές της R_h του ίδιου συστήματος σε pH 7, συμπεριλαμβάνονται για λόγους σύγκρισης. 138

Σχήμα 3.18: Κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90° , για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 3 με $I = 0.01$ M, για $[-]/[+] = 10, 20$ και 30 . Η αντίστοιχη κατανομή του διαλύματος του πολυηλεκτρολύτη παρατίθεται επίσης, για λόγους σύγκρισης. 140

Σχήμα 3.19: Κανονικοποιημένες, ως προς τη συνολική ένταση του διαλύματος, κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90° , για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 3 με $I = 0.01$ M, για $[-]/[+] = 20, 25$ και 30 . Η αντίστοιχη κανονικοποιημένη κατανομή του διαλύματος του πολυηλεκτρολύτη παρατίθεται επίσης, για λόγους σύγκρισης. 141

Σχήμα 3.20: Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της μοριακής αναλογίας $[HEWL]/[SCPI-54K]$, για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 3 με $I = 0.01$ M. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν κατά προσέγγιση τις αντίστοιχες τιμές του διαλύματος του πολυηλεκτρολύτη. 142

Σχήμα 3.21: Δυναμικό ζήτα, ζ_p , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$, για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 3 με $I = 0.01$ M. 143

Σχήμα 3.22: Φαινόμενο μοριακό βάρος, M_w , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$, για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και των δειγμάτων SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, καθώς και της HEWL και του δείγματος SCPI-

54K, σε pH 3 με $I = 0.01$ M. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν τις αντίστοιχες τιμές των πολυηλεκτρολυτών.....	144
Σχήμα 3.23: Σχηματική αναπαράσταση της δομής των συμπλόκων, συναρτήσει της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$, για τα συστήματα της HEWL και των δειγμάτων SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, καθώς και της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 3 με $I = 0.01$ M.	145
Σχήμα 3.24: Φάσματα φθορισμού, των σταθερών διαλυμάτων συμπλόκων, του συστήματος της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Συμπεριλαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα της ελεύθερης HEWL.....	148
Σχήμα 3.25: Φάσματα κυκλικού διχρωισμού, στην περιοχή του άπω υπεριώδους, των σταθερών διαλυμάτων συμπλόκων, του συστήματος της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Συμπεριλαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα της ελεύθερης HEWL.	149
Σχήμα 3.26: Φάσματα μέσου υπερύθρου, στην περιοχή των κορυφών Amide I και II, για δύο αντιπροσωπευτικές τιμές της αναλογίας φορτίων $[-]/[+] = 5$ και 30 , του συστήματος της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Συμπεριλαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα της ελεύθερης HEWL.....	151
Σχήμα 3.27: Μεταβολή της θερμοχωρητικότητας ΔC_p , συναρτήσει της θερμοκρασίας, κατά τις πρώτες θερμικές σαρώσεις ρυθμού 1.5 K/min, διαλύματος ελεύθερης HEWL και διαλύματος συμπλόκων με $[-]/[+] = 4$, του συστήματος της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M.....	152
Σχήμα 4.1: Κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις 90° , για διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, σε pH 3, 7 και 9.....	155
Σχήμα 4.2: α) Γωνιακή εξάρτηση του μέσου ρυθμού χαλάρωσης των δύο κορυφών, για το διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, σε pH 7. β) Οι αντίστοιχες κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις 45 , 90 , και 135°	156
Σχήμα 4.3: Κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις 90° , για διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, σε pH 7, χωρίς προσθήκη άλατος και με ιοντική ισχύ $I = 0.1$ και 0.5 M.....	162

- Σχήμα 4.4:** Σχηματική αναπαράσταση της απόκρισης των μικκυλίων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, συναρτήσσει των αλλαγών του pH και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος..... 166
- Σχήμα 4.5:** Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M.. 168
- Σχήμα 4.6:** Κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90° , για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, για $C_{HEWL} = 0.04, 0.07$ και 0.3 mg/ml. Η αντίστοιχη κατανομή του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη παρατίθεται επίσης, για λόγους σύγκρισης..... 170
- Σχήμα 4.7:** Κανονικοποιημένες, ως προς τη συνολική ένταση του διαλύματος, κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90° , για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, για $C_{HEWL} = 0.03, 0.04$ και 0.05 mg/ml. Η αντίστοιχη κανονικοποιημένη κατανομή του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη παρατίθεται επίσης, για λόγους σύγκρισης..... 171
- Σχήμα 4.8:** Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσσει της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$, για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν τις αντίστοιχες τιμές του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη..... 172
- Σχήμα 4.9:** Γυροσκοπική ακτίνα, R_g , υδροδυναμική ακτίνα (μέσω μετρήσεων σε πολλαπλές γωνίες), R_h , και λόγος $\rho = R_g/R_h$, συναρτήσσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M..... 174
- Σχήμα 4.10:** Δυναμικό ζήτα, ζ_p , συναρτήσσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M..... 175
- Σχήμα 4.11:** Εξάρτηση από την ιοντική ισχύ της έντασης σκέδασης στις 90° , I_{90} , και της υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , για δύο αντιπροσωπευτικά διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL σε pH 7, με $C_{HEWL} =$

- 0.05 και 0.3 mg/ml..... 176
- Σχήμα 4.12:** Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M. 178
- Σχήμα 4.13:** Κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90° , για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M, για $C_{HEWL} = 0.016, 0.028$ και 0.08 mg/ml. Η αντίστοιχη κατανομή του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη παρατίθεται επίσης, για λόγους σύγκρισης..... 180
- Σχήμα 4.14:** Κανονικοποιημένες, ως προς τη συνολική ένταση του διαλύματος, κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90° , για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M, για $C_{HEWL} = 0.012, 0.016$ και 0.02 mg/ml. Η αντίστοιχη κανονικοποιημένη κατανομή του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη παρατίθεται επίσης, για λόγους σύγκρισης..... 181
- Σχήμα 4.15:** Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$, για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν τις αντίστοιχες τιμές του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη, ενώ οι τιμές του ίδιου συστήματος σε pH 7, συμπεριλαμβάνονται για λόγους σύγκρισης..... 182
- Σχήμα 4.16:** Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της μοριακής αναλογίας φορτίων $[HEWL]/[PS-SCPI]$, για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 3 και 7 με $I = 0.01$ M. 183
- Σχήμα 4.17:** Γυροσκοπική ακτίνα, R_g , υδροδυναμική ακτίνα (μέσω μετρήσεων σε πολλαπλές γωνίες), R_h , και λόγος $\rho = R_g/R_h$, συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M..... 185
- Σχήμα 4.18:** Δυναμικό ζήτα, ζ_p , συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI

και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M.....	186
Σχήμα 4.19: Εξάρτηση από την ιοντική ισχύ της έντασης σκέδασης στις 90° , I_{90} , και της υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , για αντιπροσωπευτικά διαλύματα με $C_{HEWL} = 0.02$ και 0.08 mg/ml, των διαλυμάτων συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL σε pH 3.....	187
Σχήμα 4.20: Φαινόμενο μοριακό βάρος, M_w , συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 και 3 με $I = 0.01$ M.....	189
Σχήμα 4.21: Σχηματική αναπαράσταση της δομής των συμπλόκων, συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα συστήματα του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL σε pH 7 και 3 με $I = 0.01$ M. Οι αντίστοιχες τιμές της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$, οι οποίες είναι κοινές για τα δύο συστήματα, συμπεριλαμβάνονται για λόγους σύγκρισης.....	190
Σχήμα 4.22: α) Φάσματα φθορισμού, των σταθερών διαλυμάτων συμπλόκων, του συστήματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Συμπεριλαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα διαλύματος ελεύθερης HEWL συγκέντρωσης 0.5 mg/ml, β) Σύγκριση των φασμάτων φθορισμού, των διαλυμάτων συμπλόκων με $C_{HEWL} = 0.05$ και 0.1 mg/ml, με τα αντίστοιχα φάσματα διαλυμάτων ελεύθερης HEWL συγκέντρωσης 0.05 και 0.1 mg/ml.....	194
Σχήμα 4.23: Φάσματα κυκλικού διχρωισμού, στην περιοχή του άπω υπεριώδους, των αντιπροσωπευτικών διαλυμάτων συμπλόκων με $C_{HEWL} = 0.1, 0.2$ και 0.3 mg/ml, του συστήματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Συμπεριλαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα διαλύματος ελεύθερης HEWL συγκέντρωσης 0.5 mg/ml.....	195
Σχήμα 4.24: Φάσματα μέσου υπερύθρου, στην περιοχή των κορυφών Amide I και II, για αντιπροσωπευτικές τιμές της $C_{HEWL} = 0.1$ και 0.3 mg/ml, του συστήματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Συμπεριλαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα της ελεύθερης HEWL.....	197
Σχήμα 5.1: Κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις 90° , για διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/ml των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, σε pH 3, 7 και 9.	200

- Σχήμα 5.2:** α) Γωνιακή εξάρτηση του μέσου ρυθμού χαλάρωσης των κορυφών, για τα διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/ml σε pH 7 των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, β) Οι αντίστοιχες κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις 45, 90, και 135°.201
- Σχήμα 5.3:** Κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις 90°, για διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/ml των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, σε pH 7, χωρίς προσθήκη άλατος και με ιοντική ισχύ $I = 0.1$ και 0.5 M.208
- Σχήμα 5.4:** Σχηματική αναπαράσταση της απόκρισης των μικκυλίων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, συναρτήσει των αλλαγών του pH και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος.214
- Σχήμα 5.5:** Ένταση σκέδασης στις 90°, I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M.216
- Σχήμα 5.6:** Κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90°, για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, για $C_{HEWL} = 0.05, 0.3$ και 0.8 mg/ml. Οι αντίστοιχες κατανομές των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών παρατίθενται επίσης, για λόγους σύγκρισης.220
- Σχήμα 5.7:** Κανονικοποιημένες, ως προς τη συνολική ένταση του διαλύματος, κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90°, για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, για $C_{HEWL} = 0.04, 0.05$ και 0.1 mg/ml. Οι αντίστοιχες κανονικοποιημένες κατανομές των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών παρατίθεται επίσης, για λόγους σύγκρισης.221
- Σχήμα 5.8:** Ένταση σκέδασης στις 90°, I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων [-]/[+], για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν τις αντίστοιχες τιμές των διαλυμάτων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών.222
- Σχήμα 5.9:** Γυροσκοπική ακτίνα, R_g , υδροδυναμική ακτίνα (μέσω μετρήσεων σε

πολλαπλές γωνίες), R_h , και λόγος $\rho = R_g/R_h$, συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M.223

Σχήμα 5.10: Δυναμικό ζήτα, ζ_p , συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M.224

Σχήμα 5.11: Εξάρτηση από την ιοντική ισχύ της έντασης σκέδασης στις 90° , I_{90} , και της υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , για αντιπροσωπευτικά διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL σε pH 7, με $C_{HEWL} = 0.05$ και 0.6 mg/ml.226

Σχήμα 5.12: Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M.227

Σχήμα 5.13: Κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90° , για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M, για $C_{HEWL} = 0.05, 0.3$ και 0.8 mg/ml. Οι αντίστοιχες κατανομές των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών παρατίθενται επίσης, για λόγους σύγκρισης.229

Σχήμα 5.14: Κανονικοποιημένες, ως προς τη συνολική ένταση του διαλύματος, κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90° , για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M, για $C_{HEWL} = 0.04, 0.05$ και 0.1 mg/ml. Οι αντίστοιχες κανονικοποιημένες κατανομές των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών παρατίθεται επίσης, για λόγους σύγκρισης.230

Σχήμα 5.15: Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$, για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν τις αντίστοιχες τιμές των διαλυμάτων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών.231

Σχήμα 5.16: Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h ,

συναρτήσει της μοριακής αναλογίας [HEWL]/[PS-SCPI-PEO] και [HEWL]/[SCPI-PS-PEO], για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 3 και 7 με $I = 0.01$ M.232

Σχήμα 5.17: Γυροσκοπική ακτίνα, R_g , υδροδυναμική ακτίνα (μέσω μετρήσεων σε πολλαπλές γωνίες), R_h , και λόγος $\rho = R_g/R_h$, συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M.233

Σχήμα 5.18: Δυναμικό ζήτα, ζ_p , συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M.234

Σχήμα 5.19: Εξάρτηση από την ιοντική ισχύ της έντασης σκέδασης στις 90° , I_{90} , και της υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , για αντιπροσωπευτικά διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL σε pH 3, με $C_{HEWL} = 0.05$ και 0.6 mg/ml.235

Σχήμα 5.20: Φαινόμενο μοριακό βάρος, M_w , συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 και 3 με $I = 0.01$ M.236

Σχήμα 5.21: Σχηματική αναπαράσταση της δομής των συμπλόκων, συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα συστήματα των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL σε pH 7 και 3 με $I = 0.01$ M. Οι αντίστοιχες τιμές της αναλογίας φορτίων [-]/[+], συμπεριλαμβάνονται για λόγους σύγκρισης.238

Σχήμα 5.22: α) Φάσματα φθορισμού των διαλυμάτων συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Συμπεριλαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα διαλύματος ελεύθερης HEWL συγκέντρωσης 1 mg/ml, β) Σύγκριση των φασμάτων φθορισμού, των διαλυμάτων συμπλόκων των δύο συστημάτων με $C_{HEWL} = 0.05$ και 0.1 mg/ml, με τα αντίστοιχα φάσματα διαλυμάτων ελεύθερης HEWL συγκέντρωσης 0.05 και 0.1 mg/ml.241

Σχήμα 5.23: Φάσματα κυκλικού διχρωισμού, στην περιοχή του άπω υπεριώδους, των

διαλυμάτων συμπλόκων με $C_{\text{HEWL}} = 0.1, 0.3$ και 0.6 mg/ml, των τρισταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Συμπεριλαμβάνεται το φάσμα διαλύματος ελεύθερης HEWL συγκέντρωσης 0.5 mg/ml.242

Σχήμα 5.24: Φάσματα μέσου υπερύθρου, στην περιοχή των κορυφών Amide I και II, για αντιπροσωπευτικές τιμές της $C_{\text{HEWL}} = 0.1, 0.3$ και 0.6 mg/ml, των συστημάτων των τρισταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Συμπεριλαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα της ελεύθερης HEWL.244

Σχήμα 6.1: Συνοπτική σχηματική αναπαράσταση της σύμπλεξης μεταξύ των πολυηλε-κτρολυτών SCPI, PS-SCPI, PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 και 3.257

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1: Μοριακά χαρακτηριστικά των πρόδρομων πολυμερών.	102
Πίνακας 2.2: Μοριακά χαρακτηριστικά των ομοπολυμερικών και πολυσυσταδικών πολυηλεκτρολυτών.	104
Πίνακας 3.1: Τιμές των συντελεστών διάχυσης D , των υδροδυναμικών ακτίνων R_h και των απόλυτων εντάσεων σκέδασης A , που αντιστοιχούν στη γρήγορη και στην αργή διαδικασία χαλάρωσης, των διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml των δειγμάτων SCPI, σε pH 7 και pH 3 με $I = 0.01$ M.	111
Πίνακας 3.2: Συνοπτικά αποτελέσματα των μετρήσεων στατικής και δυναμικής σκέδασης φωτός σε πολλαπλές γωνίες, των δειγμάτων SCPI σε pH 7 και σε pH 3 με $I = 0.01$ M.	114
Πίνακας 3.3: Τιμές του δυναμικού ζήτα και του χαρακτηριστικού λόγου I_1/I_3 , που εξάγονται από τις αντίστοιχες μετρήσεις ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός και φασματοσκοπίας φθορισμού, των διαλυμάτων συγκέντρωσης 5 mg/ml των δειγμάτων SCPI, σε pH 7 και pH 3 με $I = 0.01$ M.	116
Πίνακας 3.4: Συγκεντρωτικά ποσοστά των επιμέρους δευτεροταγών δομών της πρωτεΐνης, όπως εξάγονται από την ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού, των διαλυμάτων συμπλόκων του συστήματος της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, καθώς και της ελεύθερης HEWL.	150
Πίνακας 4.1: Τιμές των συντελεστών διάχυσης D και των υδροδυναμικών ακτίνων R_h που αντιστοιχούν στις δύο κορυφές χαλάρωσης, της έντασης σκέδασης στις 90° I_{90} , καθώς και της υδροδυναμικής ακτίνας R_{hc} που προκύπτει μέσω ανάλυσης cumulants στις 90° , των διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, σε pH 3, 7 και 9.	157
Πίνακας 4.2: Συνοπτικά αποτελέσματα των μετρήσεων στατικής και δυναμικής σκέδασης φωτός σε πολλαπλές γωνίες, των διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml, του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, σε pH 3, 7 και 9.	160
Πίνακας 4.3: Τιμές των συντελεστών διάχυσης D και των υδροδυναμικών ακτίνων R_h που αντιστοιχούν στις δύο κορυφές χαλάρωσης, της έντασης σκέδασης στις 90° I_{90} , καθώς και της υδροδυναμικής ακτίνας R_{hc} που προκύπτει μέσω ανάλυσης	

cumulants στις 90° , των διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, σε pH 7, χωρίς προσθήκη άλατος και με ιοντική ισχύ $I = 0.1$ και 0.5 M 162

Πίνακας 4.4: Συνοπτικά αποτελέσματα των μετρήσεων στατικής και δυναμικής σκέδασης φωτός σε πολλαπλές γωνίες, των διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml , του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, σε pH 7, χωρίς προσθήκη άλατος και με ιοντική ισχύ $I = 0.1$ και 0.5 M 164

Πίνακας 4.5: Συγκεντρωτικά ποσοστά των επιμέρους δευτεροταγών δομών της πρωτεΐνης, όπως εξάγονται από την ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού, των αντιπροσωπευτικών διαλυμάτων συμπλόκων, του συστήματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01 \text{ M}$, καθώς και της ελεύθερης HEWL. 196

Πίνακας 5.1: Τιμές των συντελεστών διάχυσης D και των υδροδυναμικών ακτίνων R_h που αντιστοιχούν στις κορυφές χαλάρωσης, της έντασης σκέδασης στις $90^\circ I_{90}$, καθώς και της υδροδυναμικής ακτίνας R_{hc} που προκύπτει μέσω ανάλυσης cumulants στις 90° , των διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, σε pH 3, 7 και 9..... 202

Πίνακας 5.2: Συνοπτικά αποτελέσματα των μετρήσεων στατικής και δυναμικής σκέδασης φωτός σε πολλαπλές γωνίες, των διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml , των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, σε pH 3, 7 και 9..... 205

Πίνακας 5.3: Τιμές των συντελεστών διάχυσης D και των υδροδυναμικών ακτίνων R_h που αντιστοιχούν στις κορυφές χαλάρωσης, της έντασης σκέδασης στις $90^\circ I_{90}$, καθώς και της υδροδυναμικής ακτίνας R_{hc} που προκύπτει μέσω ανάλυσης cumulants στις 90° , των διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, σε pH 7, χωρίς προσθήκη άλατος και με ιοντική ισχύ $I = 0.1$ και 0.5 M 209

Πίνακας 5.4: Συνοπτικά αποτελέσματα των μετρήσεων στατικής και δυναμικής σκέδασης φωτός σε πολλαπλές γωνίες, των διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml , των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, σε pH 7, χωρίς προσθήκη άλατος και με ιοντική ισχύ $I = 0.1$ και 0.5 M 212

Πίνακας 5.5: Συγκεντρωτικά ποσοστά των επιμέρους δευτεροταγών δομών της

πρωτεΐνης, όπως εξάγονται από την ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού, των αντιπροσωπευτικών διαλυμάτων συμπλόκων, των συστημάτων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, καθώς και της ελεύθερης HEWL.243

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται: i) η μελέτη των ιδιοτήτων και της συμπεριφοράς σε υδατικό διάλυμα του συνθετικού πολυηλεκτρολύτη μετά νατρίου άλας του πολυ((σουλφαμινο-καρβοξυλο)ισοπρενίου) (SCPI), ii) η διερεύνηση της δομής, των ιδιοτήτων και της συμπεριφοράς των μικκυλίων που σχηματίζονται σε υδατικό διάλυμα ως συνέπεια της αυτοοργάνωσης των αμφιφιλικών συμπολυμερών κατά συστάδες του πολυηλεκτρολύτη SCPI με πολυστυρένιο (PS) και πολυαιθυλενοξείδιο (PEO), συγκεκριμένα του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών διαφορετικής μακρομοριακής αρχιτεκτονικής PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, και iii) η μελέτη της διαδικασίας της σύμπλεξης, της δομής, των ιδιοτήτων και της συμπεριφοράς των σχηματιζόμενων συμπλόκων μεταξύ του ομοπολυμερικού πολυηλεκτρολύτη, καθώς και των μικκυλίων των πολυσυσταδικών πολυηλεκτρολυτών και των μορίων της πρωτεΐνης λυσοζύμης (HEWL), συναρτήσει τόσο των δομικών χαρακτηριστικών των μακρομορίων, όσο και των συνθηκών του διαλύματος.

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η εξακρίβωση της επίδρασης των ιδιαίτερων δομικών χαρακτηριστικών του πολυηλεκτρολύτη SCPI, δηλαδή η μεταβαλλόμενη συναρτήσει του pH πυκνότητα φορτίου και ο εν μέρει υδροφοβικός χαρακτήρας της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας, στις ιδιότητες και τη συμπεριφορά των διαφορετικών συστημάτων πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων και μικκυλίων, καθώς και των συμπλόκων τους με λυσοζύμη. Αντίστοιχο ενδιαφέρον προκάλεσε η διερεύνηση της επιρροής της μακρομοριακής αρχιτεκτονικής των συνθετικών πολυηλεκτρολυτών στη δομή, τις ιδιότητες και τη συμπεριφορά των συμπλόκων που σχηματίζουν με τη λυσοζύμη.

Το πρώτο κεφάλαιο αποτελεί την εισαγωγή της διατριβής, στην οποία παρουσιάζονται οι βασικές αρχές που χαρακτηρίζουν τους γραμμικούς ομοπολυμερικούς και αμφιφιλικούς πολυσυσταδικούς πολυηλεκτρολύτες και τις ιδιότητές τους σε διάλυμα, τη δομή και τις ιδιότητες των πρωτεϊνικών μορίων, τη διαδικασία της σύμπλεξης και τις ιδιότητες των συμπλόκων των ομοπολυμερικών και πολυσυσταδικών πολυηλεκτρολυτών με πρωτεΐνες, καθώς παράλληλα αναφέρονται οι κυριότερες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο εκάστοτε ερευνητικό πεδίο. Αντίστοιχα, στο πρώτο μέρος του δευτέρου κεφαλαίου γίνεται αναφορά των

θεωρητικών αρχών λειτουργίας και περιγραφή των διατάξεων των πειραματικών τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν για την επίτευξη της παρούσας μελέτης, ενώ στο δεύτερο μέρος περιγράφεται η σύνθεση και τα μοριακά χαρακτηριστικά των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και η διαδικασία παρασκευής των δειγμάτων.

Στα επόμενα τρία κεφάλαια παρατίθενται τα αποτελέσματα της πειραματικής μελέτης των διαφόρων συστημάτων. Συγκεκριμένα, στο πρώτο μέρος του τρίτου κεφαλαίου παρουσιάζεται η μελέτη των ιδιοτήτων και της συμπεριφοράς του ομοπολυμερικού πολυηλεκτρολύτη SCPI σε υδατικό διάλυμα, συναρτήσει του μοριακού βάρους και της συγκέντρωσης του πολυηλεκτρολύτη, καθώς και του pH, της ιοντικής ισχύος και της θερμοκρασίας του διαλύματος. Η διερεύνηση της διαδικασίας της σύμπλεξης και της δομής και των ιδιοτήτων των συμπλόκων του πολυηλεκτρολύτη SCPI και της λυσοζύμης, ως συνάρτηση της συγκέντρωσης και του μοριακού βάρους του πολυηλεκτρολύτη, καθώς και του pH και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος, παρουσιάζεται στο δεύτερο μέρος του τρίτου κεφαλαίου.

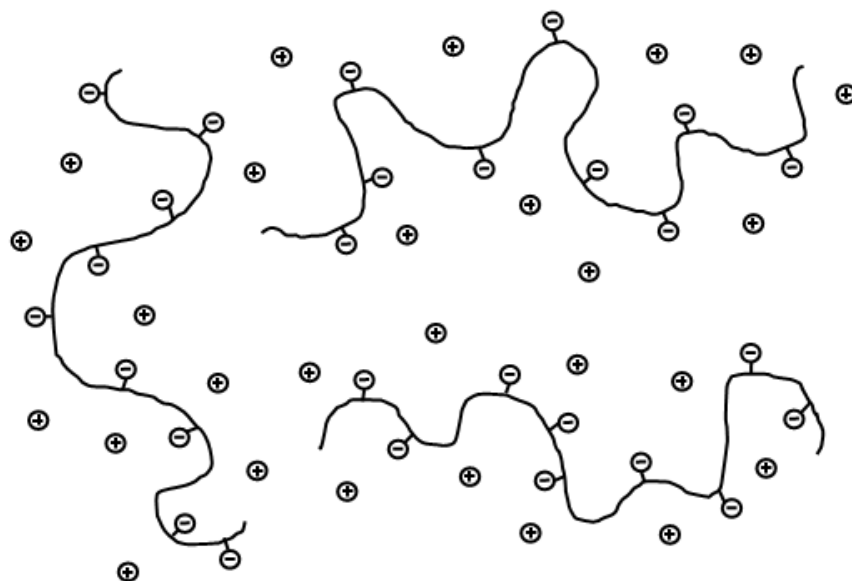
Παρομοίως, το τέταρτο κεφάλαιο παρουσιάζει αρχικά τη μελέτη της δομής των μικκυλίων που σχηματίζονται ως συνέπεια της αυτοοργάνωσης του αμφιφιλικού δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI σε υδατικό διάλυμα, καθώς και την επίδραση του pH και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος στις ιδιότητες των μικκυλίων. Εν συνεχεία, παρατίθενται τα αποτελέσματα της διερεύνησης της διαδικασίας της σύμπλεξης και της δομής και των ιδιοτήτων των συμπλόκων των μικκυλίων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της λυσοζύμης, συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, του pH και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος. Ακριβώς ανάλογη είναι η παρουσίαση των πειραματικών αποτελεσμάτων της μελέτης των μικκυλίων των τρισυσταδικών αμφιφιλικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και των συμπλόκων τους με τη λυσοζύμη, που πραγματοποιείται στο πέμπτο κεφάλαιο. Τέλος, στο έκτο κεφάλαιο γίνεται ανασκόπηση των κυριότερων συμπερασμάτων που εξήχθησαν κατά τη μελέτη των επιμέρους συστημάτων, καθώς και σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών συμπλόκων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Πολυηλεκτρολύτες

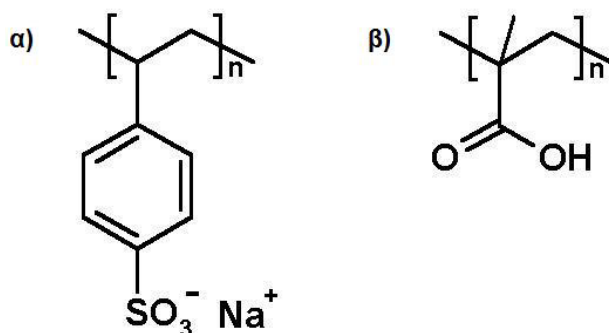
Ως πολυηλεκτρολύτες ορίζονται τα πολυμερικά μακρομόρια ή οι υπερμοριακές οντότητες που φέρουν μεγάλο αριθμό ιοντιζόμενων ομάδων. Οι ομάδες αυτές δίστανται σε διάλυμα υπό συγκεκριμένες συνθήκες, με αποτέλεσμα το μακρομόριο να καθίσταται άκρως φορτισμένο. Η διάσταση της κάθε ομάδας δημιουργεί ένα αντισταθμιστικό ιόν αντίθετου φορτίου στο διάλυμα. Επομένως, εάν το συνολικό φορτίο του πολυηλεκτρολύτη είναι $Q = Z e$ (όπου e το φορτίο του ηλεκτρονίου), κάθε πολυηλεκτρολύτης συνοδεύεται από Z αντισταθμιστικά ιόντα στο διάλυμα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.1.¹⁻⁴



Σχήμα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση ενός διαλύματος πολυηλεκτρολύτη.

Από τη σκοπιά της διάστασης σε υδατικό μέσο, οι πολυηλεκτρολύτες διαχωρίζονται σε ισχυρούς και ασθενείς. Οι ιοντιζόμενες ομάδες των ισχυρών πολυηλεκτρολυτών δίστανται πλήρως κατά τη διαλυτοποίηση σε νερό, ενώ στην περίπτωση των ασθενών πολυηλεκτρολυτών οι αντίστοιχες ομάδες δίστανται πλήρως κατά την εξουδετέρωση, δηλαδή την αλλαγή του pH του διαλύματος. Ως εκ τούτου, οι ασθενείς πολυηλεκτρολύτες δεν είναι πλήρως φορτισμένοι σε διάλυμα και το συνολικό τους φορτίο μπορεί να μεταβληθεί συναρτήσει του pH, της συγκέντρωσης των αντισταθμιστικών ιόντων ή/και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος. Τυπικό

παράδειγμα ισχυρού πολυηλεκτρολύτη αποτελεί το μετά νατρίου άλας του πολυ(σουλφονομένου στυρενίου) (sodium poly(styrene sulfonate), NaPSS), ενώ ασθενούς πολυηλεκτρολύτη το πολυ(μεθακρυλικό οξύ) (poly(methacrylic acid), PMAA), των οποίων η μοριακή δομή παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.2.



Σχήμα 1.2: Μοριακή δομή α) του μετά νατρίου άλατος του πολυ(σουλφονομένου στυρενίου) και β) του πολυ(μεθακρυλικού οξέος), τα οποία αποτελούν τυπικά παραδείγματα ισχυρού και ασθενούς πολυηλεκτρολύτη, αντίστοιχα.

Οι πολυηλεκτρολύτες είναι τόσο φυσικής/βιολογικής, όσο και συνθετικής προέλευσης, ενώ με βάση την αρχιτεκτονική του μακρομορίου κατηγοριοποιούνται ως εξής:

- i. γραμμικοί εύκαμπτοι πολυηλεκτρολύτες, όπως το μετά νατρίου άλας του πολυ(σουλφονομένου στυρενίου), το πολυ(μεθακρυλικό οξύ), το πολυ(ακρυλικό οξύ), η πολυ(βινυλοπυριδίνη), τα πολυπεπίδια πολυ(L-λυσίνη) και πολυ(L-ασπαρτικό οξύ), κ.τ.λ.,
- ii. σκωληκοειδείς ημιάκαμπτοι πολυηλεκτρολύτες, όπως η αλυσίδα του DNA,
- iii. ραβδοειδείς άκαμπτοι πολυηλεκτρολύτες, π.χ. ο ιός του μωσαϊκού του καπνού (tobacco mosaic virus, TMV),
- iv. σφαιρικά φορτισμένα μακρομόρια με τριτοταγή δομή, η οποία επηρεάζεται ελάχιστα από την παρουσία των φορτίων, όπως είναι οι πρωτεΐνες και
- v. σφαιρικοί πολυηλεκτρολύτες, όπως σωματίδια latex, δενδριμερή, μικκύλια, ορυκτά κolloειδή, κ.τ.λ.

Η διαμόρφωση κάθε πολυμερούς σε διάλυμα επηρεάζεται από πλήθος παραγόντων και ιδιαιτέρως από την αρχιτεκτονική του μακρομορίου και τη συνάφεια με το διαλύτη. Στην περίπτωση των πολυηλεκτρολυτών η παρουσία των φορτίων διαδραματίζει μείζονα ρόλο, καθώς οι ιδιότητες των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων

καθορίζονται κυρίως από τις μεγάλου βεληνεκούς ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις του συστήματος. Επομένως, οι φορτισμένες αλυσίδες των πολυηλεκτρολυτών υιοθετούν περισσότερο εκτεταμένες διαμορφώσεις, συγκριτικά με τις ουδέτερες πολυμερικές αλυσίδες, λόγω των ηλεκτροστατικών απώσεων μεταξύ των φορτισμένων τμημάτων της αλυσίδας. Βέβαια, εάν αυξηθεί η ιοντική ισχύς του διαλύματος μέσω της προσθήκης άλατος επέρχεται προάσπιση των φορτίων και εξασθένιση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων του συστήματος, με αποτέλεσμα οι πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες να μεταβαίνουν σε λιγότερο εκτεταμένες διαμορφώσεις, παρόμοιες με αυτές των ουδέτερων πολυμερών σε συνθήκες καλού διαλύτη.

Οι πολυηλεκτρολύτες χρησιμοποιούνται σε διάφορες εφαρμογές, οι οποίες σχετίζονται κυρίως με την τροποποίηση των ιδιοτήτων ροής και σταθερότητας υδατικών διαλυμάτων και πηκτωμάτων. Για παράδειγμα, μπορούν να σταθεροποιήσουν κολλοειδείς διασπορές ή να προκαλέσουν κροκιδώση. Επίσης, μπορούν να προσδώσουν φορτίο σε ουδέτερα σωματίδια, καθιστώντας δυνατή τη διασπορά τους σε υδατικό διάλυμα. Ως εκ τούτου, συχνά χρησιμοποιούνται ως πυκνωτικά, γαλακτωματοποιητές, μαλακτικά, κροκιδωτές, ή ως μειωτήρες αντίστασης ρευστών. Βρίσκουν εφαρμογή σε διαδικασίες επεξεργασίας νερού, καθώς και ανάκτησης ορυκτελαίων. Πλήθος σαπουνιών, σαμπουάν και καλλυντικών περιέχουν πολυηλεκτρολύτες, ενώ παράλληλα βρίσκουν εφαρμογή και στη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετα, ή ακόμα και σε μείγματα σκυροδέματος, όπου δρουν ως υπερρρευστοποιητές. Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εφαρμογή υδατοδιαλυτών πολυηλεκτρολυτών σε διάφορες βιοχημικές και ιατρικές διεργασίες. Η χρήση βιοσυμβατών πολυηλεκτρολυτών στην επικάλυψη εμφυτευμάτων, καθώς και στην ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμάκων, αποτελεί σύγχρονο πεδίο έντονης ερευνητικής μελέτης.

Η διερεύνηση των ιδιοτήτων και της συμπεριφοράς των πολυηλεκτρολυτών σε διάλυμα, έχει προσελκύσει εκτεταμένο ερευνητικό ενδιαφέρον τις τελευταίες δεκαετίες, τόσο από ακαδημαϊκή όσο και από τεχνολογική άποψη, λόγω των ιδιαιτεροτήτων της μακρομοριακής δομής καθώς και της πληθώρας πιθανών εφαρμογών. Παρακάτω παρουσιάζονται οι σημαντικότερες ιδιότητες, καθώς και η βασική συμπεριφορά σε διάλυμα γραμμικών εύκαμπτων αλυσίδων ομοπολυμερικών πολυηλεκτρολυτών και πολυηλεκτρολυτών κατά συστάδες.

1.1.1. Ιδιότητες σε διάλυμα ομοπολυμερικών πολυηλεκτρολυτών

Η πλούσια συμπεριφορά που εμφανίζουν τα πολυηλεκτρολυτικά διαλύματα οφείλεται κυρίως στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φορτίων τους. Ως εκ τούτου, εμφανίζει αρκετές ποιοτικές διαφορές συγκριτικά με την αντίστοιχη συμπεριφορά των ουδέτερων πολυμερών. Για παράδειγμα:

- i. Η μετάβαση από συνθήκες αραιού σε συνθήκες ημι-αραιού διαλύματος, λαμβάνει χώρα σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις πολυμερούς, από ότι στα διαλύματα μη φορτισμένων αλυσίδων.
- ii. Η συνάρτηση σκέδασης ομογενών πολυηλεκτρολυτικών διαλυμάτων εμφανίζει μία ιδιαίτερος έντονη κορυφή. Το μέγεθος του κυματανύσματος που αντιστοιχεί στην κορυφή αυτή είναι ανάλογο της τετραγωνικής ρίζας της συγκέντρωσης του πολυηλεκτρολύτη. Τα διαλύματα ουδέτερων πολυμερών δεν εμφανίζουν αντίστοιχη κορυφή.
- iii. Η οσμωτική πίεση των πολυηλεκτρολυτών σε διάλυμα χωρίς προσθήκη άλατος υπερβαίνει κατά αρκετές τάξεις μεγέθους την αντίστοιχη τιμή διαλυμάτων ουδέτερων πολυμερών παρόμοιας συγκέντρωσης. Επιπροσθέτως, αυξάνεται σχεδόν γραμμικά συναρτήσει της συγκέντρωσης του πολυηλεκτρολύτη και είναι ανεξάρτητη του μοριακού βάρους της αλυσίδας, για μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων. Η σχεδόν γραμμική εξάρτηση της οσμωτικής πίεσης από τη συγκέντρωση του πολυηλεκτρολύτη καθώς και η ισχυρή εξάρτησή της από την προσθήκη άλατος στο διάλυμα υποδηλώνουν ότι οφείλεται κυρίως στη συνεισφορά των αντισταθμιστικών ιόντων.
- iv. Το ιξώδες των πολυηλεκτρολυτικών διαλυμάτων είναι ανάλογο της τετραγωνικής ρίζας της συγκέντρωσης του πολυμερούς, ενώ στην αντίστοιχη περίπτωση διαλυμάτων ουδέτερων πολυμερών παρόμοιας συγκέντρωσης το ιξώδες είναι ανάλογο της συγκέντρωσης. Επίσης, σε συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων των πολυηλεκτρολυτικών διαλυμάτων παρατηρείται μείωση του ανηγμένου ιξώδους συναρτήσει της συγκέντρωσης, σε αντίθεση με τα διαλύματα ουδέτερων πολυμερών.
- v. Οι πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες σε συνθήκες ημι-αραιού διαλύματος ακολουθούν δυναμική μη-εμπλοκής (unentangled dynamics) για μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων συγκριτικά με τα διαλύματα ουδέτερων πολυμερών.

Αντίστοιχα, η μετάβαση σε συνθήκες εμπλοκής πραγματοποιείται για τιμές της συγκέντρωσης αρκετά μεγαλύτερες από τη συγκέντρωση αλληλοεπικάλυψης των αλυσίδων (chain overlap concentration).

Οι ιδιότητες των πολυηλεκτρολυτικών διαλυμάτων έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης θεωρητικής μελέτης κατά την πάροδο των χρόνων.⁵⁻¹³ Οι μελέτες αυτές περιγράφουν διάφορες παραμέτρους του συστήματος, όπως:

- i. τη φύση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και την επίδρασή τους στη δυναμική του διαλύματος και στη διαμόρφωση της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας,
- ii. τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων και μεταξύ των τμημάτων της ίδιας αλυσίδας,
- iii. την πιθανή διαμόρφωση της φορτισμένης αλυσίδας στο διάλυμα και τις παραμέτρους που σχετίζονται με αυτή, π.χ. το ηλεκτροστατικό μήκος ευκαμψίας,
- iv. τη συμπύκνωση των αντισταθμιστικών ιόντων στην επιφάνεια της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας και την επίδραση του συγκεκριμένου φαινομένου στην οσμωτική πίεση του διαλύματος,
- v. την επίδραση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται συνήθως μεταξύ του κύριου κορμού της αλυσίδας (chain backbone) και του διαλύτη στη διαμόρφωση της αλυσίδας,
- vi. τη διαφορετική δυναμική που ακολουθούν οι αλυσίδες σε συνθήκες αραιού και ημι-αραιού διαλύματος,
- vii. τη σημαντική επιρροή της ιοντικής ισχύος ή ισοδύναμα της προσθήκης άλατος στο διάλυμα στη διαμόρφωση της αλυσίδας και στη δυναμική του συστήματος και ούτω καθεξής.

Μία ιδιαίτερως ενδιαφέρουσα συνοπτική ανασκόπηση των κυριότερων θεωρητικών προβλέψεων αναφορικά με τις ιδιότητες των αραιών και ημι-αραιών διαλυμάτων γραμμικών εύκαμπτων πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων έχουν παρουσιάσει οι Dobrynin και Rubinstein.¹²

Μία από τις πλέον διαδεδομένες και ισχυρές πειραματικές τεχνικές μελέτης των πολυμερικών διαλυμάτων είναι αυτή της σκέδασης φωτός. Η καταλληλότητα της τεχνικής στηρίζεται στο γεγονός ότι οι απόλυτες τιμές των προσβάσιμων

διανυσμάτων σκέδασης είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με τις πολυμερικές αλυσίδες καθώς και τις αποστάσεις διαχωρισμού μεταξύ των αλυσίδων. Επιπροσθέτως, το εύρος των χρόνων χαλάρωσης που καλύπτει η τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS), ανταποκρίνεται στο μεγαλύτερο μέρος των δυναμικών διεργασιών των πολυμερικών συστημάτων. Παράλληλα, οι απόλυτες τιμές της έντασης σκέδασης του διαλύματος, οι οποίες εξάγονται μέσω μετρήσεων στατικής σκέδασης φωτός (Static Light Scattering, SLS), αποτελούν θερμοδυναμικές ποσότητες που υπό συγκεκριμένες συνθήκες επιτρέπουν τον υπολογισμό σημαντικών παραμέτρων του συστήματος, όπως το κατά βάρος μέσο μοριακό βάρος, M_w , το δεύτερο συντελεστή Virial του αναπτύγματος της οσμωτικής πίεσης, A_2 , (ο οποίος εκφράζει τις αλληλεπιδράσεις της πολυμερικής αλυσίδας με τα μόρια του διαλύτη), καθώς και τη γυροσκοπική ακτίνα, R_g , του μακρομορίου, μέσω της οποίας εξάγονται πληροφορίες για το μέγεθος και τη διαμόρφωση της αλυσίδας στο διάλυμα.

Στην περίπτωση των πολυηλεκτρολυτικών διαλυμάτων, το βεληνεκές των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων είναι επίσης συγκρίσιμο με τις απόλυτες τιμές των προσβάσιμων διανυσμάτων σκέδασης. Επομένως, η σκέδαση φωτός καθίσταται βασική τεχνική για τη μελέτη των πολυηλεκτρολυτικών διαλυμάτων,¹⁴⁻⁴³ καθώς η δομή και η δυναμική των διαλυμάτων αυτών καθορίζεται κυρίως από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις του συστήματος, οι οποίες είναι ισχυρότερες και χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο βεληνεκές από ότι οι αντίστοιχες αλληλεπιδράσεις μη φορτισμένων πολυμερικών συστημάτων. Σε αντίθεση με τα ουδέτερα πολυμερή, τα διαλύματα πολυηλεκτρολυτών είναι επί της ουσίας συστήματα πολλών συστατικών, τα οποία αποτελούνται από τις πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες, τα ιόντα των αλυσίδων, τα αντισταθμιστικά ιόντα και το διαλύτη. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα η σκέδαση ενός τέτοιου συστήματος να είναι ένα αρκετά σύνθετο φαινόμενο που εξαρτάται από πολλές παραμέτρους. Η συνολική ένταση σκέδασης του διαλύματος που ανιχνεύεται μέσω της στατικής σκέδασης φωτός περιλαμβάνει τις συνεισφορές των διαφορετικών σωματιδίων/συστατικών ή ισοδύναμα των διαφορετικών δυναμικών διαδικασιών χαλάρωσης του συστήματος. Οι συνεισφορές αυτές δύναται να διαχωριστούν με τη βοήθεια των μετρήσεων δυναμικής σκέδασης, εφόσον οι αντίστοιχες χρονικές συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης χαρακτηρίζονται από διαφορετική κλίμακα χρόνων χαλάρωσης.

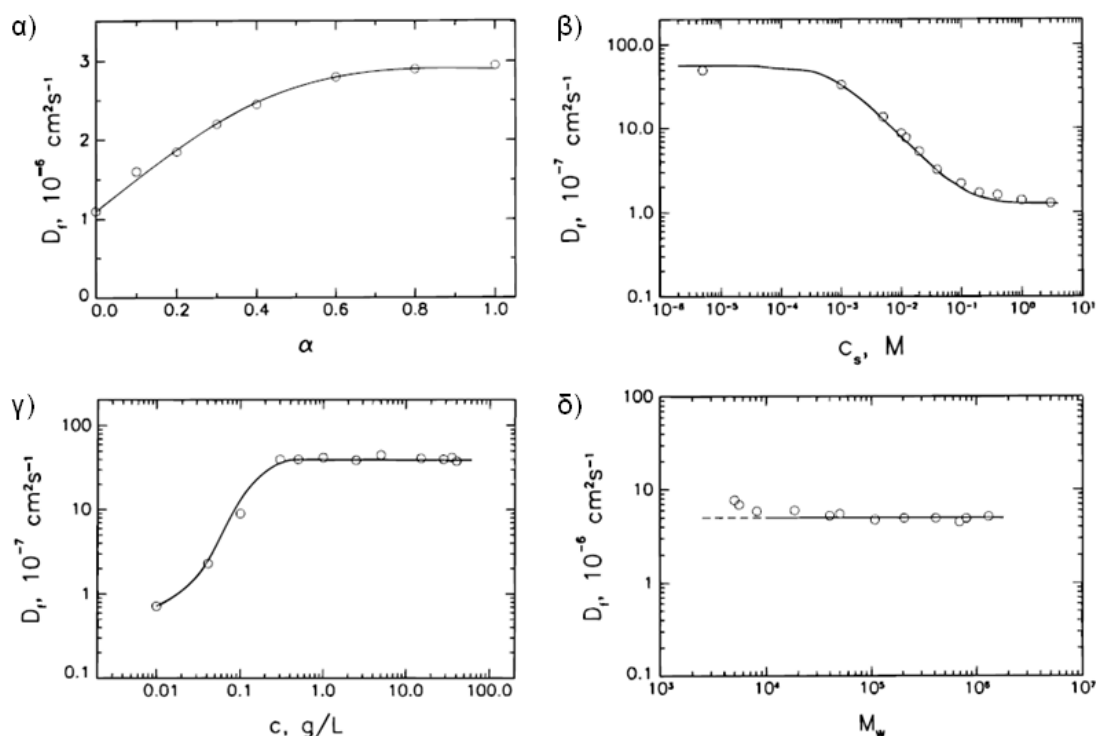
Είναι αξιοσημείωτο ότι η πλειονότητα των διαλυμάτων γραμμικών εύκαμπτων

πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων χωρίς προσθήκη άλατος ή με μικρή συγκέντρωση άλατος εμφανίζουν κατά τη μέτρηση δυναμικής σκέδασης μία διπλή εκθετική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης. Η συνάρτηση αυτή, αποτελείται από δύο διαφορετικές διαδικασίες χαλάρωσης, οι οποίες αποκαλούνται γρήγορη και αργή (fast and slow mode) με βάση τους αντίστοιχους χαρακτηριστικούς χρόνους. Τα χαρακτηριστικά των διαδικασιών αυτών επηρεάζονται σημαντικά από διάφορους παράγοντες όπως την πυκνότητα φορτίου και το μοριακό βάρος της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας, τη συγκέντρωση του πολυηλεκτρολύτη, καθώς και την ιοντική ισχύ του διαλύματος. Αναμφίβολα, μία από τις πλέον εκτενείς πειραματικές μελέτες των δύο αυτών διαδικασιών χαλάρωσης, αναφορικά με την προέλευσή τους και την εξάρτησή τους από τις διαφορετικές συνθήκες του συστήματος, οφείλεται στον M. Sedláček.^{14, 15, 35-40}

Η γρήγορη διαδικασία χαλάρωσης αντιστοιχεί συνήθως σε χρόνους στην περιοχή των 2×10^{-3} έως 2×10^{-1} ms¹⁴ και κατά γενική ομολογία αποδίδεται στη συζευγμένη διάχυση των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων και των αντισταθμιστικών ιόντων. Οι πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες διαχέονται αρκετά γρηγορότερα από ότι οι ουδέτερες αλυσίδες και οι υψηλοί ρυθμοί διάχυσης οφείλονται προφανώς στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφορετικών ιόντων του συστήματος. Ως εκ τούτου, ο αντίστοιχος συντελεστής διάχυσης της γρήγορης διαδικασίας D_f , ο οποίος είναι αντιστρόφως ανάλογος του χρόνου χαλάρωσης, εξαρτάται άμεσα από την πυκνότητα φορτίου της αλυσίδας και τη συγκέντρωση του άλατος στο διάλυμα. Η μείωση του φορτίου της αλυσίδας ή ισοδύναμα η αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος συνεπάγονται εξασθένηση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και προκαλούν μείωση του συντελεστή D_f , όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.3α και β, γεγονός που οφείλεται στην πιο αργή διάχυση των αλυσίδων των πολυηλεκτρολυτών.

Αντίστοιχα, ο συντελεστής D_f εμφανίζει αυξημένες τιμές για διαλύματα με υψηλή συγκέντρωση πολυηλεκτρολύτη, στα οποία οι αποστάσεις μεταξύ των αλυσίδων είναι σχετικά μικρές, ενώ οι τιμές του D_f μειώνονται και είναι συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες για διαλύματα ουδέτερων πολυμερών, στην περιοχή των χαμηλών συγκεντρώσεων του πολυηλεκτρολύτη, όπου οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είναι ασθενέστερες (Σχήμα 1.3γ). Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε συνθήκες ισχυρής ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης, δηλαδή υψηλής συγκέντρωσης πολυηλεκτρολύτη χωρίς προσθήκη άλατος, ο συντελεστής D_f φαίνεται να είναι ανεξάρτητος του μοριακού βάρους της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας, σε

μεγάλο εύρος τιμών του M_w (Σχήμα 1.3δ). Η διαπίστωση αυτή σε συνδυασμό με την αντίστοιχη σταθερότητα των τιμών του D_f στην περιοχή των υψηλών τιμών της συγκέντρωσης του πολυηλεκτρολύτη (Σχήμα 1.3γ), καταδεικνύουν ότι κατά τη μετάβαση από συνθήκες αραιού σε ημι-αραιού διαλύματος, ο συντελεστής διάχυσης της γρήγορης διαδικασίας χαλάρωσης του συστήματος δεν μεταβάλλεται. Επομένως, εξάγεται το συμπέρασμα ότι ο ρυθμός διάχυσης των τμημάτων της αλυσίδας ενός πολυηλεκτρολύτη σε συνθήκες ημι-αραιού διαλύματος, είναι σχεδόν ίδιος με αυτόν ολόκληρης της αλυσίδας.

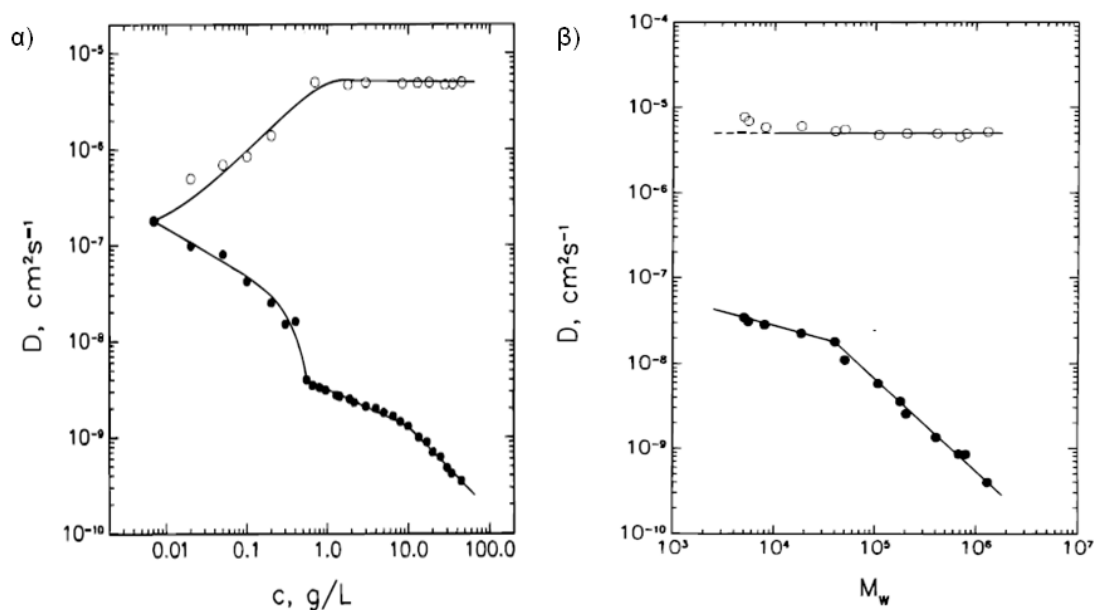


Σχήμα 1.3: Εξάρτηση του συντελεστή διάχυσης της γρήγορης διαδικασίας χαλάρωσης D_f από α) το βαθμό εξουδετέρωσης των φορτίων, α , πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων PMAA με $M_w = 3 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ σε διάλυμα συγκέντρωσης $c = 36.6 \text{ g/l}$ χωρίς προσθήκη άλατος, β) τη συγκέντρωση του πρόσθετου άλατος NaCl, C_s , σε διάλυμα NaPSS με $M_w = 1.2 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ και $c = 5 \text{ g/l}$, γ) τη συγκέντρωση του πολυηλεκτρολύτη, c , για διαλύματα NaPSS με $M_w = 1 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ και δ) το μοριακό βάρος του πολυηλεκτρολύτη, M_w , για διαλύματα NaPSS με $c = 45.6 \text{ g/l}$ χωρίς προσθήκη άλατος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων δυναμικής σκέδασης φωτός του M. Sedláček.^{14, 15}

Η προέλευση της αργής διαδικασίας χαλάρωσης, την οποία εμφανίζει η πλειοψηφία των διαλυμάτων πολυηλεκτρολυτών, δεν είναι πλήρως κατανοητή και μάλιστα θεωρείται αρκετά αμφιλεγόμενη.³³⁻⁴³ Στις περισσότερες περιπτώσεις

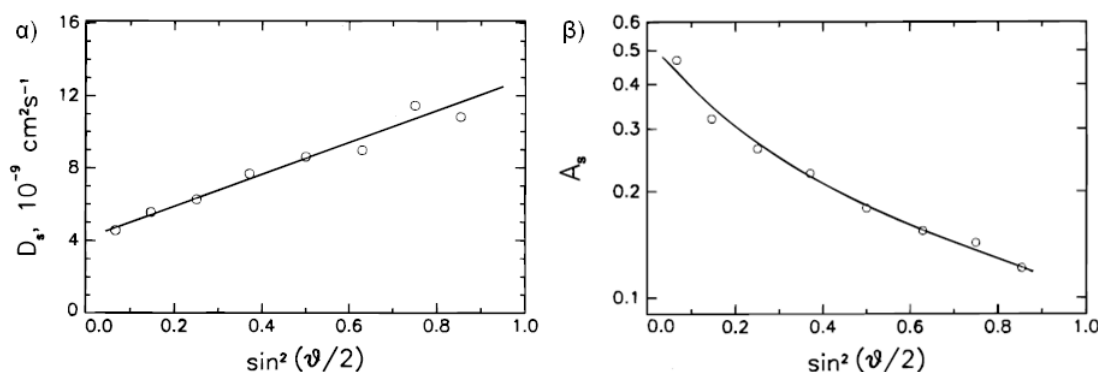
αποδίδεται στο σχηματισμό περιοχών πολλαπλών αλυσίδων (multichain domains),³³⁻⁴⁰ συσσωματωμάτων,⁴¹ ή συμπλεγμάτων (clusters),⁴² τα οποία οφείλονται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων. Επίσης, έχει προταθεί ότι ενδέχεται να προκύπτει από την ατελή διαλυτοποίηση του πολυηλεκτρολύτη⁴³ ή να υποδηλώνει το μηχανισμό έρπισης των αλυσίδων.¹⁶

Η διαδικασία αυτή είναι συνήθως πιο αργή συγκριτικά με τη γρήγορη διαδικασία κατά μία τάξη μεγέθους και αντιστοιχεί σε χρόνους χαλάρωσης στην περιοχή των 3×10^{-1} έως 2×10^2 ms.¹⁴ Ο διαχωρισμός των δύο διαδικασιών εξαρτάται από τις πειραματικές παραμέτρους, όπως τη συγκέντρωση του πολυηλεκτρολύτη στο διάλυμα ή/και το μοριακό βάρος της αλυσίδας, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.4, όπου γίνεται σύγκριση των τιμών των συντελεστών διάχυσης της γρήγορης και της αργής διαδικασίας χαλάρωσης του συστήματος, D_f και D_s , αντίστοιχα. Οι τιμές του συντελεστή D_s μειώνονται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση ή το μοριακό βάρος του πολυηλεκτρολύτη, υποδηλώνοντας ότι ο αντίστοιχος χρόνος χαλάρωσης αυξάνεται (ή ισοδύναμα η διαδικασία γίνεται πιο αργή) όσο μικραίνουν οι αποστάσεις μεταξύ των αλυσίδων και οι αλληλεπιδράσεις τους γίνονται εντονότερες.



Σχήμα 1.4: Σύγκριση των τιμών των συντελεστών της γρήγορης και της αργής διαδικασίας χαλάρωσης του συστήματος, D_f (ανοιχτά σύμβολα) και D_s (κλειστά σύμβολα), αντίστοιχα, συναρτήσει α) της συγκέντρωσης του πολυηλεκτρολύτη, c , για διαλύματα NaPSS με $M_w = 1.2 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ χωρίς προσθήκη άλατος και β) του μοριακού βάρους του πολυηλεκτρολύτη, M_w , για διαλύματα NaPSS με $c = 45.6 \text{ g/l}$ χωρίς προσθήκη άλατος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων δυναμικής σκέδασης φωτός του M. Sedláček.^{14, 15}

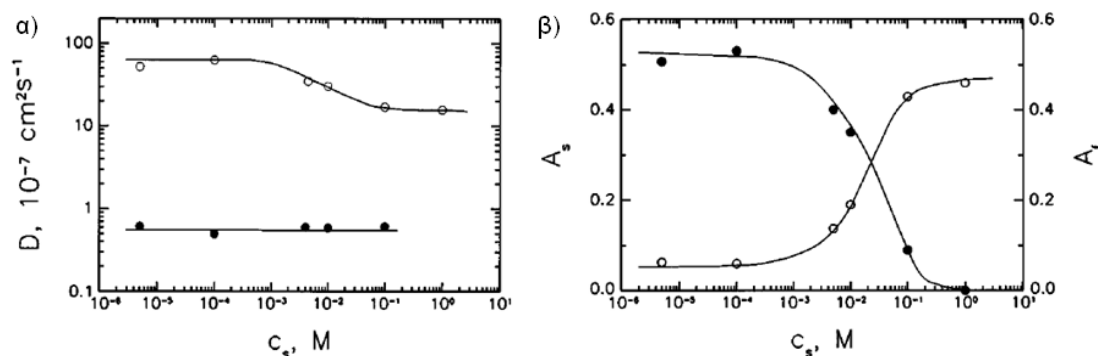
Τόσο ο συντελεστής D_s όσο και η απόλυτη ένταση σκέδασης A_s , η οποία αντιστοιχεί στην αργή διαδικασία χαλάρωσης (και ουσιαστικά αποτελεί ένδειξη της συνεισφοράς της αντίστοιχης διαδικασίας στη συνολική κατανομή των χρόνων χαλάρωσης του συστήματος), εμφανίζουν ισχυρή εξάρτηση από τη γωνία σκέδασης θ , όπως καταδεικνύουν τα αποτελέσματα του Σχήματος 1.5. Το γεγονός αυτό συνεπάγεται ότι η αργή διαδικασία χαλάρωσης οφείλεται στην παρουσία μεγάλων σε μέγεθος αντικειμένων στο διάλυμα, ειδικά συγκριτικά με το αντίστοιχο μέγεθος των αλυσίδων των πολυηλεκτρολυτών. Επομένως, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα αντικείμενα αυτά είναι περιοχές πολλαπλών αλυσίδων, οι οποίες προφανώς χαρακτηρίζονται από διαφορετικό δείκτη διάθλασης σε σχέση με το υπόλοιπο διάλυμα, γεγονός που επιτρέπει τη διάκριση τους μέσω των μετρήσεων σκέδασης φωτός.



Σχήμα 1.5: Γωνιακή εξάρτηση α) του συντελεστή διάχυσης D_s και β) της απόλυτης έντασης σκέδασης A_s , της αργής διαδικασίας χαλάρωσης του συστήματος, για διάλυμα NaPSS με $M_w = 7.1 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ και $c = 10 \text{ g/l}$ χωρίς προσθήκη άλατος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων σκέδασης φωτός του M. Sedláček.^{14, 15}

Παράλληλα, η προέλευση της αργής διαδικασίας χαλάρωσης αποδίδεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων των πολυηλεκτρολυτών διότι εμφανίζει ιδιαίτερη ευαισθησία στις αλλαγές των παραμέτρων που εκφράζουν τις αλληλεπιδράσεις αυτές, δηλαδή την πυκνότητα φορτίου της αλυσίδας ή/και την ιοντική ισχύ του διαλύματος. Στο Σχήμα 1.6 παρουσιάζεται η εξάρτηση του συντελεστή D_s και της απόλυτης έντασης σκέδασης A_s από τη συγκέντρωση του πρόσθετου άλατος NaCl στο διάλυμα, σε σχέση με τις αντίστοιχες μεταβολές των D_f και A_f . Παρόλο που οι τιμές του D_s δεν μεταβάλλονται κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος, η αντίστοιχη απόλυτη ένταση σκέδασης A_s μειώνεται σημαντικά (γεγονός που συνεπάγεται την παράλληλη αύξηση της συνεισφοράς της

γρήγορης διαδικασίας και εκφράζεται μέσω της παρατηρούμενης αύξησης του A_f), αποδεικνύοντας την ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της αργής διαδικασίας χαλάρωσης και των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων του συστήματος.



Σχήμα 1.6: Εξάρτηση α) των συντελεστών διάχυσης D_f (ανοιχτά σύμβολα) και D_s (κλειστά σύμβολα), καθώς και β) των απόλυτων εντάσεων σκέδασης A_f (ανοιχτά σύμβολα) και A_s (κλειστά σύμβολα), της γρήγορης και της αργής διαδικασίας χαλάρωσης του συστήματος, αντίστοιχα, από τη συγκέντρωση του πρόσθετου άλατος NaCl, C_s , σε διάλυμα NaPSS με $M_w = 5 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ και $c = 5 \text{ g/l}$, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων σκέδασης φωτός του M. Sedláč.^{14, 15}

Εκτός από τις τεχνικές δυναμικής και στατικής σκέδασης φωτός, ιδιαίτερα διαδεδομένες για τη μελέτη πολυηλεκτρολυτικών διαλυμάτων είναι και οι τεχνικές σκέδασης νετρονίων⁴⁴⁻⁴⁸ και ακτίνων X⁴⁸⁻⁵² σε μικρές γωνίες (Small Angle Neutron Scattering, SANS και Small Angle X-ray Scattering, SAXS), καθώς παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες αναφορικά με τη δομή και τη δυναμική του συστήματος. Επίσης σημαντικές έχουν αποδειχθεί οι μελέτες ιξωδομετρίας,^{18, 20, 48, 53} μέσω των οποίων διερευνάται η εξάρτηση του εσωτερικού ιξώδους του πολυηλεκτρολυτικού διαλύματος συναρτήσει των διαφόρων πειραματικών παραμέτρων του συστήματος. Τέλος, πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με το ενεργό φορτίο ή/και την ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων εξάγονται με χρήση τεχνικών ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός (Electrophoretic Light Scattering, ELS)^{18, 54} ή ηλεκτροφόρησης μέσω τριχοειδούς (Capillary Electrophoresis, CE)⁵⁵, ενώ φασματοσκοπικές μετρήσεις φθορισμού (fluorescence spectroscopy)^{56, 57} έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό τη μελέτη των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων, υπό ορισμένες συνθήκες, εξαιτίας της υδροφοβικότητας του κύριου κορμού της αλυσίδας.

1.1.2. Ιδιότητες σε διάλυμα πολυηλεκτρολυτών κατά συστάδες

Τα αμφιφιλικά συμπολυμερή κατά συστάδες αποτελούν μία εξαιρετικά ενδιαφέρουσα κατηγορία πολυμερικών μακρομορίων, κυρίως λόγω της μοναδικής τους ικανότητας να αυτοοργανώνονται σε διάλυμα.⁵⁸⁻⁶³ Η ασυμβατότητα μεταξύ των συστάδων έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μικκυλίων κατά τη διαλυτοποίηση των συγκεκριμένων συμπολυμερών σε εκλεκτικό διαλύτη, δηλαδή ένα μέσο που θεωρείται θερμοδυναμικά καλός διαλύτης για τη μία συστάδα, ενώ παράλληλα προκαλεί την καθίζηση της άλλης. Τα μικκύλια που προκύπτουν είναι ανάλογα αυτών που σχηματίζουν οι επιφανειοδραστικές ουσίες μικρού μοριακού βάρους. Επί της ουσίας, αποτελούνται από τον πυρήνα που σχηματίζουν οι αδιάλυτες συστάδες και την κορώνα που τον περιβάλλει, η οποία προκύπτει από τις διαλυτές συστάδες. Συνήθως χαρακτηρίζονται από σφαιρική δομή και σχετικά μικρή κατανομή μεγεθών, αν και τα χαρακτηριστικά αυτά ενδέχεται να μεταβάλλονται συναρτήσει των συνθηκών του διαλύματος και των χαρακτηριστικών της πολυμερικής αλυσίδας. Η διερεύνηση της αυτοοργάνωσης των αμφιφιλικών συμπολυμερών κατά συστάδες σε διάλυμα καθώς και της δομής και των ιδιοτήτων των σχηματιζόμενων μικκυλίων έχει προκαλέσει εκτεταμένο ερευνητικό ενδιαφέρον τις τελευταίες δεκαετίες. Ιδιαίτερα σημαντικές εργασίες ανασκόπησης έχουν παρουσιάσει οι Reiss⁶⁰ και Gohy.⁶¹ Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά οι σημαντικότερες παράμετροι που χαρακτηρίζουν τα μικκυλιακά συστήματα.

Η μικκυλίωση των αμφιφιλικών συμπολυμερών κατά συστάδες λαμβάνει χώρα σε αραιά διαλύματα εκλεκτικού διαλύτη για τη μία συστάδα, όταν η συγκέντρωση του διαλύματος υπερβαίνει την κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση (critical micelle concentration, cmc), η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα του εκάστοτε συστήματος συμπολυμερούς-διαλύτη. Σε συγκεντρώσεις μικρότερες της cmc στο διάλυμα υπάρχουν μόνο μοριακά διαλυμένες μεμονωμένες αλυσίδες (unimer chains) του συμπολυμερούς, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις συνυπάρχουν πολυμοριακά μικκύλια και μεμονωμένες αλυσίδες σε θερμοδυναμική ισορροπία μεταξύ τους.

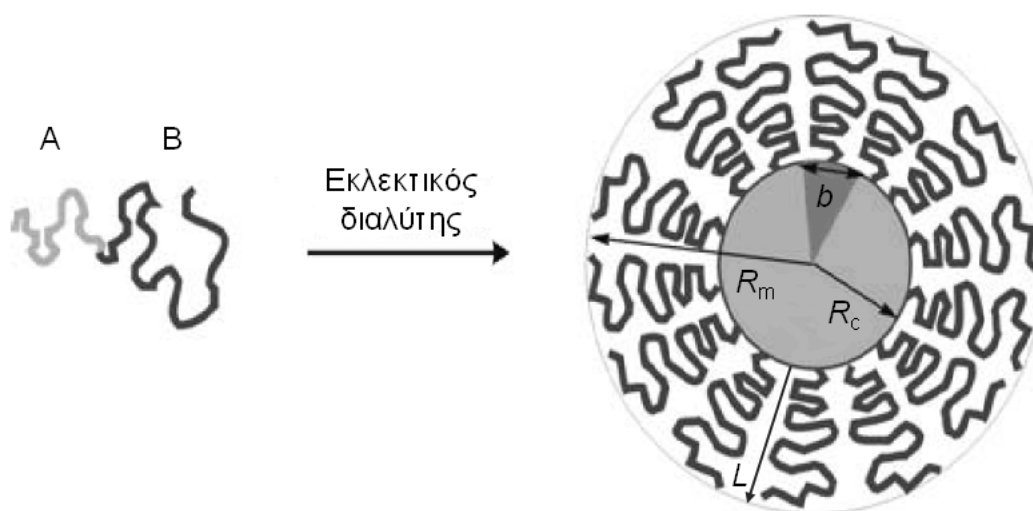
Για την παρασκευή των μικκυλιακών διαλυμάτων συνήθως χρησιμοποιείται μία εκ των δύο ακόλουθων διαδικασιών. Η πρώτη διαδικασία περιλαμβάνει την αρχική διάλυση του αμφιφιλικού συμπολυμερούς σε έναν κοινό διαλύτη, δηλαδή έναν καλό διαλύτη και για τις δύο συστάδες. Στη συνέχεια, η θερμοκρασία ή/και η σύσταση του

διαλύτη μεταβάλλονται, έτσι ώστε να προκληθεί ο σχηματισμός μικκυλίων. Η συγκεκριμένη μετάβαση επιτυγχάνεται συχνά με τη σταδιακή προσθήκη ενός διαλύτη που προκαλεί την καθίζηση της μίας συστάδας και τη διαδοχική αναδιάλυση (stripping) του κοινού διαλύτη, ενώ εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της διαπίδωσης μέσω ημιπερατής μεμβράνης (dialysis) για την απομάκρυνση του κοινού διαλύτη. Κατά τη δεύτερη διαδικασία το στερεό δείγμα του συμπολυμερούς διαλύεται απευθείας στον εκλεκτικό διαλύτη και το διάλυμα αφήνεται να αναδιαταχθεί. Σε ορισμένες περιπτώσεις η αναδιάταξη του διαλύματος υποβοηθείται μέσω θέρμανσης ή/και κατεργασίας με υπερήχους.

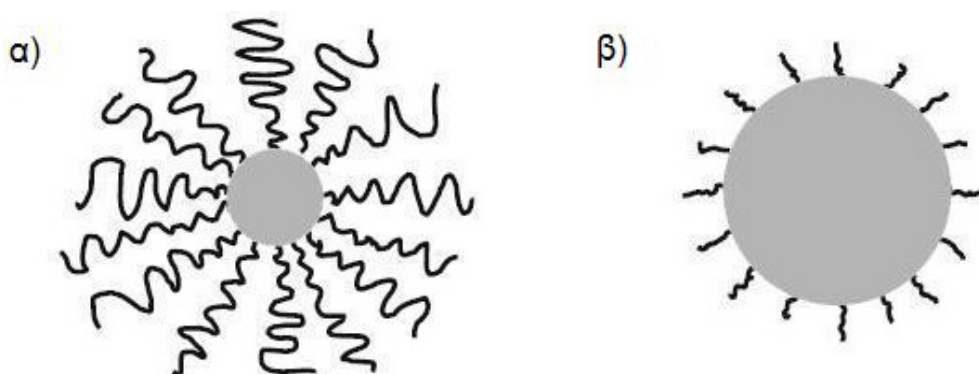
Έχει παρατηρηθεί ότι ανάλογα με τις ιδιότητες του συστήματος συμπολυμερούς-διαλύτη, ενδέχεται οι διαδικασίες αυτές να μην οδηγούν σε συνθήκες θερμοδυναμικής ισορροπίας στο διάλυμα. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελούν τα συμπολυμερή κατά συστάδες για τα οποία η συστάδα που σχηματίζει τον πυρήνα των μικκυλίων χαρακτηρίζεται από υψηλή θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g), π.χ. πολυστυρένιο. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, τα μικκύλια που σχηματίζονται ονομάζονται «παγωμένα» (“frozen” micelles), με την έννοια ότι η δομή τους παραμένει σταθερή σε συνήθεις θερμοκρασίες και δεν λαμβάνει χώρα ανταλλαγή αλυσίδων μεταξύ των μικκυλίων και των μεμονωμένων αλυσίδων στο διάλυμα.

Η μορφολογία των μικκυλίων ενός δισυσταδικού συμπολυμερούς του τύπου AB θεωρείται στην απλούστερη περίπτωση σφαιρική, ενώ η δομή τους χαρακτηρίζεται από πλήθος παραμέτρων όπως ο αριθμός συσσωμάτωσης του μικκυλίου, N_{agg} , ο οποίος εκφράζει τον αριθμό των μεμονωμένων αλυσίδων που αποτελούν το μικκύλιο, η ακτίνα του πυρήνα, R_c , η ακτίνα του μικκυλίου, R_m , το πάχος της κορώνας, L ($L = R_m - R_c$), καθώς και η απόσταση μεταξύ των γειτονικών συστάδων της κορώνας στη μεσεπιφάνεια πυρήνα/κορώνας, b , με b^2 το εμβαδό που καταλαμβάνει κάθε αλυσίδα της κορώνας στην επιφάνεια του πυρήνα. Οι παράμετροι αυτές (Σχήμα 1.7) καθορίζονται κυρίως από το βαθμό πολυμερισμού των επιμέρους συστάδων N_A και N_B και την παράμετρο αλληλεπίδρασης Flory-Huggins μεταξύ των δύο συστάδων, χ . Η ελεύθερη ενέργεια του μικκυλίου εξαρτάται από τη διεπιφανειακή ενέργεια πυρήνα/κορώνας, την ενέργεια έκτασης των δισυσταδικών αλυσίδων και την άπωση μεταξύ των αλυσίδων της κορώνας. Η ελαχιστοποίηση της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος ισοδυναμεί με κατάσταση θερμοδυναμικής ισορροπίας και οδηγεί στο σχηματισμό σταθερών μικκυλίων. Σε κάθε περίπτωση, η

διαμόρφωση των μικκυλίων είναι απόρροια της σύστασης του συμπολυμερούς. Δισυσταδικά πολυμερή με μεγάλο μήκος διαλυτών συστάδων και μικρό μήκος αδιάλυτων συστάδων σχηματίζουν αστεροειδή μικκύλια (“star-like” micelles) ενώ στην αντίθετη περίπτωση τα σχηματιζόμενα μικκύλια αποτελούνται από μεγάλο πυρήνα και κοντή κορώνα (“crew-cut” micelles), όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.8. Τέλος, εκτός από τη σφαιρική μορφολογία, η αυτοοργάνωση των αμφιφιλικών συμπολυμερών κατά συστάδες ενδέχεται να οδηγήσει στο σχηματισμό ραβδοειδών μικκυλίων (“rod-like” micelles) και κυστιδίων (vesicles).



Σχήμα 1.7: Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων παραμέτρων που καθορίζουν τη δομή των μικκυλίων ενός δισυσταδικού συμπολυμερούς AB, όπου A η αδιάλυτη και B η διαλυτή συστάδα που σχηματίζουν τον πυρήνα και την κορώνα του μικκυλίου, αντίστοιχα.

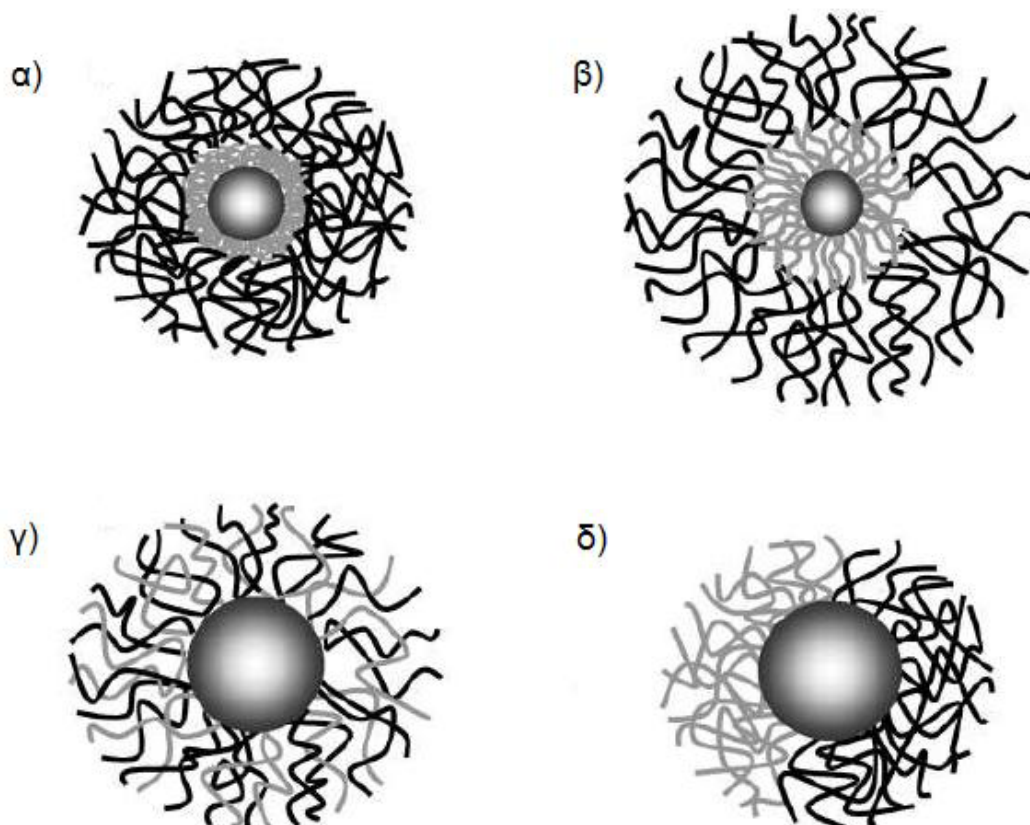


Σχήμα 1.8: Διαμόρφωση των μικκυλίων ενός δισυσταδικού συμπολυμερούς συναρτήσει της σύστασης του πολυμερούς: α) αστεροειδή μικκύλια και β) μικκύλια με μεγάλο πυρήνα και κοντή κορώνα.

Παρόλο που η πλειοψηφία των μικκυλιακών συστημάτων που μελετώνται αφορά μικκύλια δισυσταδικών αμφιφιλικών συμπολυμερών, ιδιαίτερο ενδιαφέρον

παρουσιάζει η περίπτωση των συστημάτων τρισυσταδικών γραμμικών συμπολυμερών του τύπου ABC, καθώς η παρουσία της τρίτης συστάδας προκαλεί το σχηματισμό μικκυλίων περίπλοκης μορφολογίας, ενώ παράλληλα δύναται να προσδώσει επιπλέον λειτουργικότητα στο σύστημα.⁵⁸⁻⁶⁵ Τα συμπολυμερή ABC χωρίζονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των διαλυτών ή μη συστάδων στον εκάστοτε διαλύτη. Συγκεκριμένα, τα τρισυσταδικά συμπολυμερή των οποίων οι δύο συστάδες είναι αδιάλυτες και η μία διαλυτή, σχηματίζουν μικκύλια με διαμερισματοποιημένο πυρήνα και ομογενή κορώνα. Η μορφολογία των μικκυλίων αυτών είναι του τύπου «κρεμμυδιού» (“onion-like” micelles), «τριών στρωμάτων» (“three-layer” micelles), ή «πυρήνα-κελύφους-κορώνας» (“core-shell-corona” micelles): η πρώτη αδιάλυτη συστάδα A σχηματίζει τον πυρήνα, η δεύτερη αδιάλυτη συστάδα B τυλίγεται γύρω από τον πυρήνα και η τρίτη διαλυτή συστάδα C εκτείνεται στο διάλυμα σχηματίζοντας την κορώνα του μικκυλίου (Σχήμα 1.9α).

Η δεύτερη κατηγορία αποτελείται από τα συμπολυμερή ABC των οποίων η μία συστάδα είναι αδιάλυτη και οι άλλες δύο διαλυτές. Αυτά σχηματίζουν μικκύλια ομογενούς πυρήνα και διαμερισματοποιημένης κορώνας. Ανάλογα με την αρχιτεκτονική του μακρομορίου, η μορφολογία των σχηματιζόμενων μικκυλίων ενδέχεται να είναι συμμετρική ως προς το κέντρο ή όχι. Όταν η αδιάλυτη συστάδα A βρίσκεται στο άκρο της τρισυσταδικής αλυσίδας η κορώνα των μικκυλίων παρουσιάζει ακτινικό διαχωρισμό, δηλαδή αποτελείται από δύο διαφορετικά στρώματα των συστάδων B και C (Σχήμα 1.9β). Αντίθετα, στην περίπτωση που η αδιάλυτη συστάδα A βρίσκεται στο κέντρο της αλυσίδας σχηματίζεται συνήθως μικτή κορώνα, αποτελούμενη από τις συστάδες B και C (Σχήμα 1.9γ). Επίσης, όταν η ασυμβατότητα μεταξύ των συστάδων είναι ιδιαίτερος αυξημένη είναι πιθανός ο διαχωρισμός της κορώνας σε δύο ξεχωριστά/διακριτά ημισφαίρια, αποτελούμενα από τις συστάδες B και C, αντίστοιχα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό των λεγόμενων «διπρόσωπων» μικκυλίων (“Janus” micelles) (Σχήμα 1.9δ). Επίσης πιθανό είναι το ενδεχόμενο σχηματισμού κυστιδίων, κατ’ αναλογία με τα συστήματα των δισυσταδικών συμπολυμερών. Αναλυτική παρουσίαση των διαφορετικών μορφολογιών των μικκυλίων που σχηματίζουν τα τρισυσταδικά αμφιφιλικά συμπολυμερή, σύμφωνα με τις διάφορες πειραματικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, μπορεί να αναζητηθεί στην ανασκόπηση των Fustin, Abetz και Gohy,⁶⁴ καθώς και την αντίστοιχη ανασκόπηση της ομάδας του N. Χατζηχρηστίδη.⁶⁵



Σχήμα 1.9: Διαμόρφωση των μικκυλίων ενός τρισυσταδικού συμπολυμερούς ABC, όπου α) οι συστάδες A και B είναι αδιάλυτες και η C διαλυτή (μικκύλια «πυρήνα-κελύφους-κορώνας»), η συστάδα A είναι αδιάλυτη και οι B και C διαλυτές, με την αδιάλυτη συστάδα β) στο άκρο της αλυσίδας (μικκύλια με ακτινικά διαχωρισμένη κορώνα), ή στο κέντρο της αλυσίδας, με αποτέλεσμα το σχηματισμό είτε γ) μικτής κορώνας, είτε δ) κορώνας αποτελούμενης από δύο ξεχωριστά ημισφαίρια («διπρόσωπα» μικκύλια).

Ο χαρακτηρισμός των μικκυλιακών συστημάτων αμφιφιλικών συμπολυμερών κατά συστάδες καθίσταται δυνατός μέσω της χρήσης διαφόρων πειραματικών τεχνικών. Τεχνικές μικροσκοπίας οι οποίες παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για το σχήμα και το μέγεθος των μικκυλίων είναι, η ηλεκτρονική μικροσκοπία διαπερατότητας (Transmission Electron Microscopy, TEM), η πιο πρόσφατη παραλλαγή της κρυογονικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διαπερατότητας (cryo-TEM) και η μικροσκοπία ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM). Επίσης, τεχνικές σκέδασης όπως η σκέδαση νετρονίων και ακτίνων X σε μικρές γωνίες (SANS και SAXS), αλλά και η δυναμική και στατική σκέδαση φωτός (DLS και SLS), αποτελούν χρήσιμα πειραματικά εργαλεία για τη μελέτη των μικκυλιακών συστημάτων *in situ* και η χρήση τους είναι ιδιαίτερος διαδεδομένη. Μέσω των μετρήσεων σκέδασης εξάγονται σημαντικές παράμετροι του συστήματος,

συμπεριλαμβανομένων της ακτίνας του πυρήνα, της ακτίνας του μικκυλίου, του μοριακού βάρους του μικκυλίου, μέσω του οποίου υπολογίζεται ο αριθμός συσσωμάτωσης, καθώς και της υδροδυναμικής και της γυροσκοπικής ακτίνας του μικκυλίου. Η υδροδυναμική ακτίνα εξάγεται επίσης μέσω μετρήσεων ιξωδομετρίας, οι οποίες επιπροσθέτως παρέχουν το εσωτερικό ιξώδες του συστήματος. Φασματοσκοπικές μετρήσεις φθορισμού χρησιμοποιούνται συνήθως για τον προσδιορισμό της κρίσιμης μικκυλιακής συγκέντρωσης και τη διερεύνηση της δυναμικής των αλυσίδων. Η τελευταία μελετάται επίσης μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR). Τέλος, λιγότερο διαδεδομένες αλλά χρήσιμες τεχνικές είναι αυτές της υπερφυγοκέντρωσης (ultracentrifugation) και της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC) οι οποίες παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την κατανομή του μεγέθους ή/και του βάρους των μικκυλίων και την ισορροπία με τις μεμονωμένες αλυσίδες στο διάλυμα.

Η επιφανειοδραστική ιδιότητα των μικκυλιακών συστημάτων καθιστά δυνατή τη χρήση τους σε πλήθος τεχνολογικών και φαρμακευτικών εφαρμογών ως μέσα διασποράς, γαλακτωματοποιητές, διαβρέκτες, σταθεροποιητές αφρού, κροκιδωτές, τροποποιητές ιξώδους, κ.τ.λ.⁶⁰ Εκτός αυτού, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα μικκύλια των αμφιφιλικών συμπολυμερών κατά συστάδες, βρίσκουν εφαρμογή, με τη μορφή κολλοειδών διασπορών, σε μεγάλο αριθμό βιολογικών και βιοϊατρικών διεργασιών, οι οποίες αφορούν την ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμάκων, την ανάπτυξη διαγνωστικών μέσων, την τροποποίηση επιφανειών, καθώς και γονιδιακές θεραπείες.^{60, 63} Η ικανότητα αυτοοργάνωσης των αμφιφιλικών συμπολυμερών επιτρέπει το σχεδιασμό και την ανάπτυξη λειτουργικών νανο-υλικών κατάλληλων για χρήση στο ταχέως αναπτυσσόμενο πεδίο της νανοβιοτεχνολογίας, όπως επισημαίνεται και μέσω της ανασκόπησης των Harada και Kataoka.⁶³

Με βάση τα όσα προαναφέρθηκαν, καθίστανται εμφανείς οι λόγοι για τους οποίους η ειδική περίπτωση των αμφιφιλικών συμπολυμερών κατά συστάδες με συστάδες από πολυηλεκτρολύτες αποτελεί ένα συναρπαστικό αντικείμενο έρευνας. Τα συμπολυμερή αυτά συνδυάζουν τα δομικά χαρακτηριστικά των πολυηλεκτρολυτών, των αμφιφιλικών συμπολυμερών και των επιφανειοδραστικών ουσιών, γεγονός που τους προσδίδει αρκετά μοναδικές και ασυνήθιστες ιδιότητες και πολλές δυνατότητες εξειδικευμένου σχεδιασμού (custom design). Η αυτοοργάνωση

των πολυηλεκτρολυτικών συμπολυμερών σε υδατικό διάλυμα, επηρεάζεται από πλήθος εξωτερικών παραμέτρων, όπως το pH, η θερμοκρασία και η αλατότητα, οι οποίες σχετίζονται με (ή προσδιορίζονται από) διάφορες τεχνολογικές και βιολογικές διεργασίες και εφαρμογές. Παράλληλα, τα σχηματιζόμενα μικκύλια φέρουν πολυηλεκτρολυτική κορώνα και αντιστοιχούν σε κολλοειδή σωματίδια, των οποίων οι ιδιότητες εξαρτώνται από το βαθμό διάστασης των φορτισμένων ομάδων, το pH και τη συγκέντρωση του άλατος στο διάλυμα, καθώς και τις πολικές αλληλεπιδράσεις του συστήματος. Επιπροσθέτως, τα πολυηλεκτρολυτικά μικκύλια παρέχουν τη δυνατότητα μελέτης των ιδιοτήτων των πολυηλεκτρολυτών σε ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση αλυσίδων και στο πλαίσιο αυτό αποτελούν συστήματα ανάλογα των σφαιρικών πολυηλεκτρολυτικών βουρτσών (spherical polyelectrolyte brushes). Οι λόγοι αυτοί έχουν αποτελέσει το κίνητρο για τη διεξοδική διερεύνηση των ιδιοτήτων των πολυηλεκτρολυτικών αμφιφιλικών συμπολυμερών κατά συστάδες και έχουν οδηγήσει στη διεξαγωγή πολυπληθών θεωρητικών και πειραματικών μελετών, όπως άλλωστε καταδεικνύουν και οι διάφορες ανασκοπήσεις που έχουν δημοσιευτεί στο συγκεκριμένο πεδίο,⁶⁶⁻⁷⁰ με ειδική μνεία σε αυτή των Föster, Abetz και Müller.⁶⁸

Οι θεωρητικές μελέτες της αυτοοργάνωσης των πολυηλεκτρολυτικών αμφιφιλικών δισυσταδικών συμπολυμερών και των ιδιοτήτων των μικκυλίων που αυτά σχηματίζουν,⁷¹⁻⁷⁴ καθώς και των ανάλογων συστημάτων των σφαιρικών βουρτσών από πολυηλεκτρολύτες,⁷⁵⁻⁷⁷ ασχολούνται κυρίως με τη διερεύνηση της πιθανής μορφολογίας των μικκυλίων. Ιδιαίτερα εστιάζουν στις παραμέτρους που καθορίζουν τη μορφολογία αυτή (N_{agg} , R_c , L), συναρτήσει τόσο των ιδιοτήτων του συμπολυμερούς, όπως της σύστασης, δηλαδή το βαθμό πολυμερισμού των επιμέρους συστάδων, και του βαθμού εξουδετέρωσης των φορτισμένων ομάδων της πολυηλεκτρολυτικής συστάδας, όσο και των συνθηκών του διαλύματος, όπως η συγκέντρωση του συμπολυμερούς, το pH και η συγκέντρωση του άλατος. Παράλληλα, παρέχουν πολύτιμες προβλέψεις αναφορικά με τη διαμόρφωση της πολυηλεκτρολυτικής κορώνας των μικκυλίων και τον τρόπο που αυτή επηρεάζεται από τις συνθήκες του διαλύματος, καθώς και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φορτισμένων μικκυλίων στο διάλυμα. Ιδιαίτερη βαρύτητα δίνεται στην επίδραση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος, καθώς η μεταβολή (ενίσχυση ή εξασθένηση) των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων του συστήματος διαδραματίζει μείζονα ρόλο στη διαδικασία της αυτοοργάνωσης των συμπολυμερών με πολυηλεκτρολυτικές

συστάδες, στη μορφολογία και τις ιδιότητες των μικκυλίων, καθώς και στη διαμόρφωση της πολυηλεκτρολυτικής κορώνας.

Στο ίδιο πλαίσιο κινείται η πλειοψηφία των πειραματικών μελετών στο συγκεκριμένο πεδίο.⁷⁸⁻¹⁰³ Χαρακτηριστικά παραδείγματα πολυηλεκτρολυτικών δισυσταδικών συμπολυμερών που έχουν μελετηθεί αποτελούν τα συμπολυμερή πολυστυρενίου-πολυ(ακρυλικού οξέος) (PS-PAA), τα οποία αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης των ερευνητικών ομάδων των Eisenberg^{78, 79} και van der Maarel,⁸⁰⁻⁸² πολυ(ισοβουτυλενίου)-πολυ(μεθακρυλικού οξέος) (PIB-PMAA) και πολυ(ακρυλικού *n*-βουτυλεστέρα)-πολυ(ακρυλικού οξέος) (P*n*BA-PAA), που μελέτησε η ομάδα του Müller,⁸⁴⁻⁸⁷ πολυστυρενίου-πολυ(μεθακρυλικού οξέος) (PS-PMAA), για τα οποία πραγματοποίησε εκτενή μελέτη η ομάδα του Procházka,⁸⁸⁻⁹¹ πολυ(*tert*-βουτυλοστυρενίου)-(μετά νατρίου άλατος του πολυ(σουλφονομένου στυρενίου)) (P*t*BS-NaPSS), που διερεύνησε ο Guenoun και οι συνεργάτες του,^{92, 93} καθώς και πολυ(μεθακρυλικού οξέος)-πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMAA-PMMA), τα οποία μελετήθηκαν από την ομάδα των Tam και Gan.^{98, 99}

Ειδικό ενδιαφέρον εδώ παρουσιάζει η πειραματική μελέτη πολυηλεκτρολυτικών δισυσταδικών συμπολυμερών πολυ(ακρυλικού *n*-βουτυλεστέρα)-πολυ((1-αιθοξυκαρβονυλο)βινυλοδισφωφονικού οξέος) (PBuA-PECVPD) της ομάδας των Giacomelli και Borsali,¹⁰¹ καθώς η συγκεκριμένη πολυηλεκτρολυτική συστάδα φέρει αρκετές δομικές ομοιότητες με τον πολυηλεκτρολύτη SCPI που χρησιμοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης. Επίσης ενδιαφέρουσες είναι οι μελέτες που αφορούν τις ιδιότητες των σφαιρικών πολυηλεκτρολυτικών βουρτσών, εξαιτίας της αναλογίας μεταξύ των συγκεκριμένων συστημάτων και των πολυηλεκτρολυτικών μικκυλίων. Στο πεδίο αυτό, είναι αντιπροσωπευτικές οι μελέτες του Ballauff και των συνεργατών του,¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ οι οποίες αφορούν κολλοειδή σωματίδια πολυστυρενίου (PS), στην επιφάνεια των οποίων έχουν εμβολιαστεί χημικά γραμμικές πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες πολυ(ακρυλικού οξέος) (PAA) ή πολυ(σουλφονομένου στυρενίου) (PSS).

Στην περίπτωση των τρισυσταδικών συμπολυμερών, τα πολυηλεκτρολυτικά αμφιφιλικά τρισυσταδικά συμπολυμερή που έχουν μελετηθεί πειραματικά είναι σαφώς λιγότερα.¹⁰⁷⁻¹²¹ Η ομάδα του Hatton διερεύνησε την αυτοοργάνωση τρισυσταδικών μεθακρυλικών πολυαμφολυτών συναρτήσεως της αρχιτεκτονικής του μακρομορίου, δηλαδή της διάταξης των επιμέρους συστάδων, καθώς και των

συνθηκών του διαλύματος και κυρίως του pH, η τιμή του οποίου καθόριζε το φορτίο των συστάδων. Διαπίστωσαν το σχηματισμό μικκυλίων μορφολογίας «πυρήνα-κελύφους-κορώνας» ή μικτής κορώνας, ανάλογα με τις συνθήκες του συστήματος.¹⁰⁷ Μικκύλια τύπου «πυρήνα-κελύφους-κορώνας» σχηματίζονται επίσης ως συνέπεια της αυτοοργάνωσης τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτικών συμπολυμερών πολυ(ακρυλικού 2-αιθυλοεξυλεστέρα)-πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα)-πολυ(ακρυλικού οξέος) (PEHA-PMMA-PAAC) και πολυστυρενίου-πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα)-πολυ(ακρυλικού οξέος) (PS-PMMA-PAA), τα οποία μελετήθηκαν από τον Κήϊζ και τους συνεργάτες του¹⁰⁸ και τους Yu και Eisenberg,¹⁰⁹ αντίστοιχα.

Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για συμπολυμερή πολυστυρενίου-πολυ(2-βινυλοπυριδίνης)-πολυαιθυλενοξειδίου (PS-P2VP-PEO) από τις ομάδες των Gohy και Jérôme,¹¹⁰⁻¹¹² και του Procházka,¹¹³ καθώς και για το αντίστοιχο συμπολυμερές πολυισοπρενίου-πολυ(2-βινυλοπυριδίνης)-πολυαιθυλενοξειδίου (PI-P2VP-PEO), το οποίο διερευνήθηκε από τον Πίσπα και τους συνεργάτες του.¹¹⁴ Τα παραπάνω τρισυσταδικά συμπολυμερή σχηματίζουν μικκύλια μορφολογίας «πυρήνα-κελύφους-κορώνας» με τη χαρακτηριστική ιδιότητα της απόκρισης στις αλλαγές των συνθηκών του διαλύματος. Συγκεκριμένα, για τιμές του pH > 5 οι συστάδες της P2VP είναι αφόρτιστες και σχηματίζουν το κέλυφος γύρω από τον πυρήνα των μικκυλίων, ενώ για pH < 5 η πρωτονίωση των αζώτων του πυριδινικού δακτυλίου καθιστά τις συστάδες της P2VP διαλυτές, οπότε η κορώνα των μικκυλίων αποτελείται από δύο στρώματα (Σχήμα 1.9α και β).

Μία άλλη κατηγορία τρισυσταδικών συμπολυμερών είναι αυτά που αποτελούνται από δύο υδρόφοβες συστάδες και μία πολυηλεκτρολυτική, με την πολυηλεκτρολυτική συστάδα στο κέντρο της αλυσίδας, των οποίων τα μικκύλια χαρακτηρίζονται από μορφολογία τύπου «λουλουδιού» (“flower-like” micelles). Τέτοια παραδείγματα αποτελούν τα συμπολυμερή τύπου ABA πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα)-πολυ(μεθακρυλικού οξέος)-πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMMA-PMAA-PMMA) της ομάδας των Tam και Gan,¹¹⁷ πολυστυρενίου-πολυ(ακρυλικού οξέος)-πολυ(μεθακρυλικού *n*-βουτυλεστέρα) (PS-PAA-*n*BMA) και πολυ(2-βινυλοπυριδίνης)-πολυ(ακρυλικού οξέος)-πολυ(μεθακρυλικού *n*-βουτυλεστέρα) (P2VP-PAA-*n*BMA), τα οποία βέβαια σε όξινο pH σχηματίζουν μικκύλια «πυρήνα-κελύφους-κορώνας» λόγω της πρωτονίωσης της P2VP, σύμφωνα

με τα πειραματικά αποτελέσματα του Τσιτσιλιάνη και των συνεργατών του.^{118, 119}

Τέλος, ακόμα δύο από τα λιγоста παραδείγματα πολυηλεκτρολυτικών μικκυλίων με μικτή κορώνα είναι αυτά που σχηματίζουν τα συμπολυμερή πολυαιθυλενοξειδίου-πολυστυρενίου-πολυ(4-βινυλοπυριδίνης) (PEO-PS-P4VP), τα οποία παρουσιάζονται στη μελέτη του Chen και των συνεργατών του,¹²⁰ καθώς και τα αντίστοιχα μικκύλια του συμπολυμερούς πολυ(αιθυλενογλυκόλης)-πολυ(ακρυλικού *n*-βουτυλεστέρα)-πολυ(μεθακρυλικού 2-(διμεθυλαμινο)αιθυλεστέρα) (PEG-P*n*BA-PDMAEMA) της ομάδας του Won.¹²¹ Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο εναλλακτικός τρόπος που ανέπτυξε η ομάδα του Procházka για το σχηματισμό μικκυλίων της συγκεκριμένης μορφολογίας, ο οποίος έγκειται στην ανάμειξη διαλυμάτων πολυστυρενίου-πολυ(μεθακρυλικού οξέος) (PS-PMAA) και πολυστυρενίου-πολυαιθυλενοξειδίου (PS-PEO) με αποτέλεσμα το σχηματισμό μικκυλίων αποτελούμενα από πυρήνα PS και μικτή κορώνα PMAA και PEO.^{122, 123}

1.2. Πρωτεΐνες

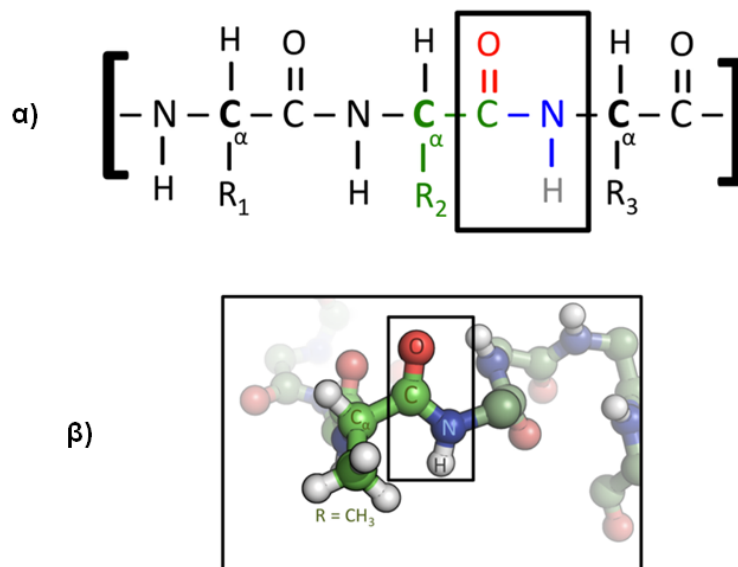
Στα πολυηλεκτρολυτικά μακρομόρια συγκαταλέγονται και οι πρωτεΐνες, οι οποίες είναι βιοχημικές ενώσεις αποτελούμενες από ένα ή περισσότερα πολυπεπίδια, συνήθως αναδίπλωμένα σε σφαιρική ή ινώδη δομή, και υποβοηθούν διάφορες βιολογικές διαδικασίες. Τα πολυπεπίδια είναι γραμμικές πολυμερικές αλυσίδες αμινοξέων, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους μέσω των πεπτιδικών δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ των καρβοξυλικών ομάδων και των αμινομάδων των γειτονικών αμινοξέων. Η ακολουθία των αμινοξέων μίας πρωτεΐνης καθορίζεται από την ακολουθία ενός γονιδίου και κωδικοποιείται από τον γενετικό κώδικα του DNA ή του mRNA των κυττάρων. Γενικά, ο γενετικός κώδικας κωδικοποιεί 20 αμινοξέα, όμως τα αμινοξέα που συνιστούν την πρωτεΐνη συχνά υφίστανται χημικές αλλαγές είτε κατά τη σύνθεση της πρωτεΐνης, είτε αμέσως μετά, κατά το στάδιο της μεταμεταγραφικής τροποποίησης, γεγονός που μεταβάλλει τις φυσικές και χημικές ιδιότητες, την αναδίπλωση, τη σταθερότητα, τη δραστηριότητα και τελικά τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης.¹²⁴⁻¹²⁶

Παρομοίως με άλλα βιολογικά μακρομόρια, π.χ. οι πολυσακχαρίτες και τα νουκλεϊκά οξέα, οι πρωτεΐνες αποτελούν βασικά συστατικά των οργανισμών και συμμετέχουν σχεδόν σε κάθε διαδικασία που λαμβάνει χώρα εντός των κυττάρων. Πολλές πρωτεΐνες δρουν ως ένζυμα που καταλύουν βιοχημικές αντιδράσεις και είναι ζωτικής σημασίας για το μεταβολισμό. Ορισμένες πρωτεΐνες έχουν δομικές ή μηχανικές λειτουργίες, όπως η ακτίνη και η μυοσίνη στους μύες ή οι πρωτεΐνες του κυτταρικού σκελετού, οι οποίες ευθύνονται για τη διατήρηση του σχήματος των κυττάρων. Άλλες πρωτεΐνες επιτελούν σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος στα κύτταρα, την ανοσολογική απόκριση, την κυτταρική προσκόλληση, αλλά και τον κύκλο ζωής των κυττάρων. Οι πρωτεΐνες είναι επίσης απαραίτητες στη διατροφή των ζωικών οργανισμών, δεδομένου ότι οι ζωικοί οργανισμοί δεν είναι σε θέση να συνθέσουν όλα τα αμινοξέα που χρειάζονται και πρέπει να λαμβάνουν τα απαραίτητα εξ αυτών μέσω της τροφής τους. Μέσω της διαδικασίας της πέψης, οι πρωτεΐνες που λαμβάνονται από την τροφή διασπώνται σε ελεύθερα αμινοξέα, τα οποία εν συνεχεία χρησιμοποιούνται στο μεταβολισμό.

Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των πολυπεπτιδίων είναι η ικανότητα της αναδίπλωσής τους σε σφαιρική δομή. Ο βαθμός αναδίπλωσης των

πρωτεϊνών σε μία καθορισμένη δομή ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό. Ορισμένες πρωτεΐνες αναδιπλώνονται σε μία εξαιρετικά άκαμπτη δομή, η οποία εμφανίζει μικρές διακυμάνσεις και ως εκ τούτου θεωρείται ως ενιαία δομή. Άλλες πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από τη δυνατότητα αναδιάταξης από μία διαμόρφωση σε άλλη, γεγονός που συνήθως συνδέεται με το μηχανισμό της μεταγωγής σήματος. Επομένως, η δομή της πρωτεΐνης λειτουργεί ως μέσο ρύθμισης είτε της λειτουργικότητας μίας πρωτεΐνης, είτε της δραστηριότητας ενός ενζύμου. Η διαδικασία της αναδίπλωσης δεν είναι απαραίτητη για τη λειτουργικότητα όλων των πρωτεϊνών, καθώς κάποιες πρωτεΐνες εμφανίζουν λειτουργικότητα στην αναδιαταγμένη κατάσταση.

Όπως προαναφέρθηκε η πρωτεϊνική αλυσίδα αποτελείται από αμινοξέα συνδεδεμένα μέσω πεπτιδικών δεσμών. Όλα τα αμινοξέα εμφανίζουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένων ενός ατόμου α-άνθρακα, ο οποίος συνδέεται ομοιοπολικά με μία καρβοξυλική ομάδα, μία αμινομάδα και μία πλευρική αλυσίδα. Η χημική δομή του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ δύο γειτονικών αμινοξέων μίας πρωτεϊνικής αλυσίδας, καθώς και η τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ του αμινοξέος αλανίνη και ενός γειτονικού αμινοξέος, παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.10.



Σχήμα 1.10: α) Χημική δομή του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ δύο γειτονικών αμινοξέων μίας πρωτεϊνικής αλυσίδας και β) τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ του αμινοξέος αλανίνη και ενός γειτονικού αμινοξέος.

Οι πλευρικές αλυσίδες των βασικών αμινοξέων που απαρτίζουν τις πρωτεΐνες, ποικίλουν ως προς τη χημική δομή και τις ιδιότητες, ενώ ο συνδυασμός όλων των

πλευρικών αλυσίδων καθορίζει ουσιαστικά την τρισδιάστατη δομή και τη χημική δραστικότητα του πρωτεϊνικού μορίου. Επιπροσθέτως, οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων ευθύνονται για το φορτίο και κατ' επέκταση τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, τα αμινοξέα αργινίνη και λυσίνη φέρουν θετικά φορτισμένες αμινομάδες, ενώ το ασπαρτικό και το γλουταμινικό οξύ αρνητικά φορτισμένες καρβοξυλικές ομάδες. Η κατανομή των συγκεκριμένων αμινοξέων στην επιφάνεια του πρωτεϊνικού μορίου καθορίζει το συνολικό φορτίο της πρωτεΐνης, συναρτήσει βέβαια του pH του διαλύματος. Όσο αυξάνεται η τιμή του pH οι φορτισμένες ομάδες της αργινίνης και της λυσίνης αποπρωτονιώνονται και για $\text{pH} > 12$ είναι ουδέτερες, ενώ αντίστοιχα οι φορτισμένες ομάδες του ασπαρτικού και του γλουταμινικού οξέος πρωτονιώνονται καθώς μειώνεται το pH και για $\text{pH} < 4$ θεωρούνται κυρίως ουδέτερες.

Το συνολικό καθαρό φορτίο του πρωτεϊνικού μορίου είναι συνάρτηση του αριθμού και του είδους των επιφανειακών αμινοξέων, καθώς και του pH του διαλύματος. Υπάρχει μία συγκεκριμένη τιμή του pH για την οποία ο συνολικός αριθμός των επιφανειακών αρνητικών φορτίων της πρωτεΐνης είναι ίσος με τον αντίστοιχο αριθμό των θετικών και το συνολικό καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης είναι ίσο με μηδέν. Η τιμή αυτή του pH καλείται το ισοηλεκτρικό σημείο (isoelectric point, pI) της πρωτεΐνης. Το πρωτεϊνικό μόριο εμφανίζει τη χαμηλότερη τιμή της διαλυτότητάς του για $\text{pH} = \text{pI}$. Όταν η πρωτεΐνη φέρει επιφανειακό φορτίο, η διαλυτότητα του πρωτεϊνικού μορίου αυξάνεται καθώς η αλληλεπίδραση με τα μόρια του υδατικού διαλύτη είναι προτιμότερη από ότι η αλληλεπίδραση με άλλα πρωτεϊνικά μόρια. Στην αντίθετη περίπτωση, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων είναι περισσότερο πιθανές, γεγονός που οδηγεί στην καθίζηση της πρωτεΐνης.

Η τρισδιάστατη δομή ενός πρωτεϊνικού μορίου που προκύπτει από τη φυσική αναδίπλωση της πρωτεΐνης ονομάζεται εγγενής διαμόρφωση και διαχωρίζεται σε τέσσερα επιμέρους δομικά επίπεδα. Η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης αφορά την αλληλουχία των αμινοξέων του πρωτεϊνικού μακρομορίου. Η δευτεροταγής δομή αναφέρεται στις επαναλαμβανόμενες συμμετρικές τοπικές δομές, που σχηματίζονται μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ των πεπτιδικών δεσμών της κύριας αλυσίδας της πρωτεΐνης. Τα πλέον κοινά παραδείγματα δευτεροταγούς δομής είναι η α -έλικα, το β -φύλλο και η β -στροφή. Το συνολικό σχήμα του πρωτεϊνικού μορίου, δηλαδή η

χωρική συσχέτιση των επιμέρους δευτεροταγών δομικών μονάδων, αποτελεί την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης. Η τριτοταγής δομή γενικά σταθεροποιείται μέσω μη τοπικών αλληλεπιδράσεων, συνηθέστερα μέσω του σχηματισμού ενός υδρόφοβου πυρήνα, αλλά και μέσω γεφυρών άλατος, δεσμών υδρογόνου, δισουλφιδικών δεσμών, καθώς και της διάταξης των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων. Τέλος, η τεταρτοταγής δομή αφορά τη δομή που σχηματίζεται ως συνέπεια της αλληλεπίδρασης διαφορετικών πρωτεϊνικών μορίων, τα οποία σε αυτή την περίπτωση καλούνται υπομονάδες και λειτουργούν ως ένα ενιαίο πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Η τεταρτοταγής δομή σταθεροποιείται μέσω των αντίστοιχων μη ομοιοπολικών δεσμών που σταθεροποιούν και την τριτοταγή δομή.

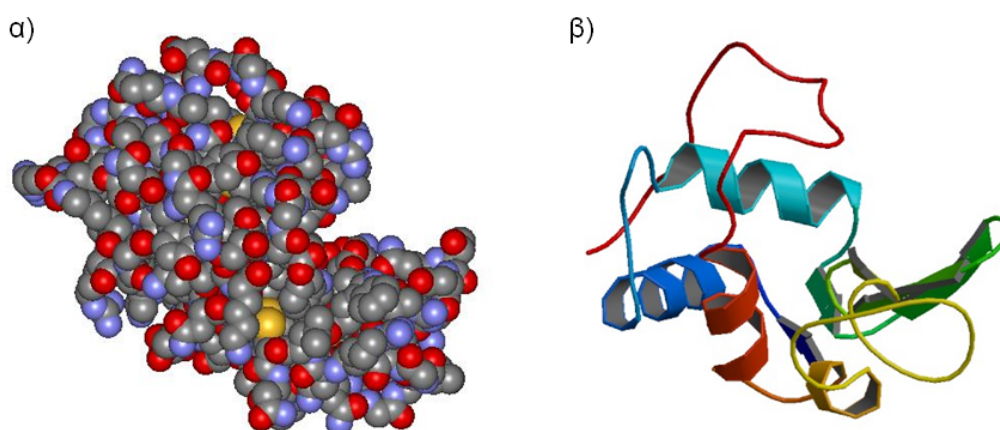
Οι πρωτεΐνες δύναται να διαχωριστούν σε τρεις κύριες κατηγορίες, οι οποίες σχετίζονται με την τυπική τριτοταγή δομή τους. Τις κατηγορίες αυτές αποτελούν οι σφαιρικές, οι ινώδεις και οι μεμβρανικές πρωτεΐνες. Σχεδόν όλες οι σφαιρικές πρωτεΐνες είναι διαλυτές και οι περισσότερες δρουν ως ένζυμα. Οι ινώδεις είναι συνήθως δομικές πρωτεΐνες, όπως το κολλαγόνο, το οποίο αποτελεί το κύριο συστατικό του συνδετικού ιστού, ή/και η κερατίνη, το πρωτεϊνικό συστατικό των μαλλιών και των νυχιών. Αντίστοιχα, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες λειτουργούν συχνά είτε ως υποδοχείς, είτε ως κανάλια μέσω των οποίων πολικά και φορτισμένα μόρια διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη.

Η εξακρίβωση της δομής ενός πρωτεϊνικού μορίου παρέχει σημαντικές πληροφορίες αναφορικά με τον τρόπο με τον οποίο η πρωτεΐνη εκτελεί την εκάστοτε λειτουργία. Οι πλέον διαδεδομένες πειραματικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την εξακρίβωση της πρωτεϊνικής δομής είναι η κρυσταλλογραφία ακτίνων X (X-ray crystallography) και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), οι οποίες παρέχουν δομική πληροφορία σε ατομικό επίπεδο, ενώ η δευτεροταγής δομή του πρωτεϊνικού μορίου διερευνάται συνήθως μέσω φασματοσκοπικών μετρήσεων κυκλικού διχρωισμού (CD). Η εξακριβωμένη, μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων X και φασματοσκοπίας NMR, τρισδιάστατη δομή των περισσότερων πρωτεϊνών διατίθεται σε διάφορες πρωτεϊνικές βάσεις δεδομένων οι οποίες είναι προσβάσιμες στο διαδίκτυο.¹²⁷

Τυπικό παράδειγμα σφαιρικής πρωτεΐνης που δρα ως ένζυμο αποτελεί η λυσοζύμη, η οποία απαντάται σε αφθονία σε διάφορες εκκρίσεις του οργανισμού, όπως τα δάκρυα, το σάλιο, το γάλα και τη βλέννα, ενώ μεγάλες ποσότητες λυσοζύμης

βρίσκονται επίσης στο ασπράδι του αυγού. Η λυσοζύμη είναι ένα ισχυρό ένζυμο ιδιαίτερης βιολογικής σημασίας, καθώς καταστρέφει τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων και ως εκ τούτου αποτελεί βασική άμυνα του οργανισμού εναντίων των θετικών κατά Gram βακτηρίων αλλά και διαφόρων μυκήτων. Εξαιτίας της αντιβακτηριδιακής της δράσης, αποτελεί βασικό συστατικό του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος και για το λόγο αυτό είναι σημαντικό μέρος της διατροφής των εμβρύων, ως μέσο πρόληψης διαφόρων βακτηριακών ασθενειών, ενώ παράλληλα μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία τροφίμων για την αποφυγή της αλλοίωσης των τροφίμων.

Η λυσοζύμη αποτελείται από 129 αμινοξέα¹²⁸ και το μοριακό της βάρος είναι περί τα 14.7 kg mol^{-1} . Εξαιτίας του μικρού της μεγέθους, της ευρείας διαθεσιμότητας και της σταθερότητάς της, έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας αναφορικά με τη λειτουργικότητα και τη δομή της.^{129, 130} Η δομή του πρωτεϊνικού μορίου της λυσοζύμης παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.11α σε μοριακή αναπαράσταση (CPK),¹³¹ ενώ η δευτεροταγής δομή της λυσοζύμης, η οποία συνίσταται από 4 περιοχές α -έλικας και 5 περιοχές β -πτυχωτής επιφάνειας, οι οποίες συνδέονται μέσω περιοχών β -στροφών και τυχαίας διαμόρφωσης, παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.11β.¹³² Το μόριο της λυσοζύμης εμφανίζει θετικό συνολικό καθαρό φορτίο για τιμές του pH μικρότερες του pI της πρωτεΐνης, το οποίο είναι περίπου ίσο με 11.5, ενώ η απόλυτη τιμή του φορτίου εξαρτάται από το pH του διαλύματος. Για παράδειγμα, σε $\text{pH} \approx 7$ το συνολικό φορτίο της λυσοζύμης είναι ίσο με + 8.^{133, 134}



Σχήμα 1.11: Το πρωτεϊνικό μόριο της λυσοζύμης σε αναπαράσταση α) μοριακή (CPK), όπου τα άτομα άνθρακα, αζώτου, οξυγόνου και θείου είναι χρωματισμένα γκρι, μπλε, κόκκινα και κίτρινα, αντίστοιχα, και β) της δευτεροταγούς δομής, όπου φαίνονται οι περιοχές α -έλικας, β -πτυχωτής επιφάνειας, β -στροφής και τυχαίας διαμόρφωσης.

1.3. Σύμπλοκα πολυηλεκτρολυτών με πρωτεΐνες

Η σύμπλεξη μεταξύ πρωτεϊνών και πολυηλεκτρολυτών βιολογικής ή συνθετικής προέλευσης, βρίσκεται στο επίκεντρο έντονης ερευνητικής μελέτης, εξαιτίας του μεγάλου αριθμού πιθανών τεχνολογικών εφαρμογών οι οποίες σχετίζονται με διαδικασίες εγκλεισμού, διαχωρισμού, καθαρισμού, σταθεροποίησης, διαλυτοποίησης ή/και ακινητοποίησης πρωτεϊνών. Η σύμπλεξη καθιστά δυνατή την ανάπτυξη λειτουργικών βιολογικών νανοϋλικών και βιο-οργανικών υβριδίων, με ενδεχόμενη χρήση σε συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων πρωτεϊνικής φύσης, βιοαισθητήρων καθώς και σε διάφορες άλλες νανοβιοτεχνολογικές διεργασίες. Στην περίπτωση αυτή είναι εμφανές ότι η διατήρηση της βιοχημικής δραστηρότητας του πρωτεϊνικού μορίου αποτελεί βασικό παράγοντα. Εκτός αυτού, η μελέτη της διαδικασίας της σύμπλεξης πολυηλεκτρολυτών με πρωτεΐνες προσφέρει καλύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φορτισμένων βιολογικών μακρομορίων, με αποτέλεσμα την απόκτηση σημαντικών πληροφοριών σχετικά με τις διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα σε διάφορα βιολογικά συστήματα.^{135, 136}

Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αντίθετων φορτίων των δύο ειδών μακρομορίων ευθύνονται κυρίως για τη σύμπλεξη πολυηλεκτρολυτών και πρωτεϊνών σε υδατικό μέσο. Ακόμα και στην περίπτωση που το συνολικό καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης είναι ίδιο με αυτό του πολυηλεκτρολύτη, η σύμπλεξη είναι δυνατή μέσω της αλληλεπίδρασης αντίθετα φορτισμένων επιφανειακών τμημάτων του πρωτεϊνικού μορίου και της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας. Επίσης σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις του συστήματος, καθώς τόσο κομμάτια του μορίου της πρωτεΐνης όσο και ο κύριος κορμός των περισσοτέρων πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων χαρακτηρίζονται από αυξημένη υδροφοβικότητα. Ως εκ τούτου, η δομή των σχηματιζόμενων συμπλόκων καθορίζεται από μία λεπτή ισορροπία μεταξύ της ηλεκτροστατικά και της υδροφοβικά καθοδηγούμενης πρόσδεσης, της ενδομοριακής και της διαμοριακής αναδιάταξης του πολυηλεκτρολύτη και της πρωτεΐνης, καθώς και της εκτόπισης ή/και συμπίκνωσης των αντισταθμιστικών ιόντων.

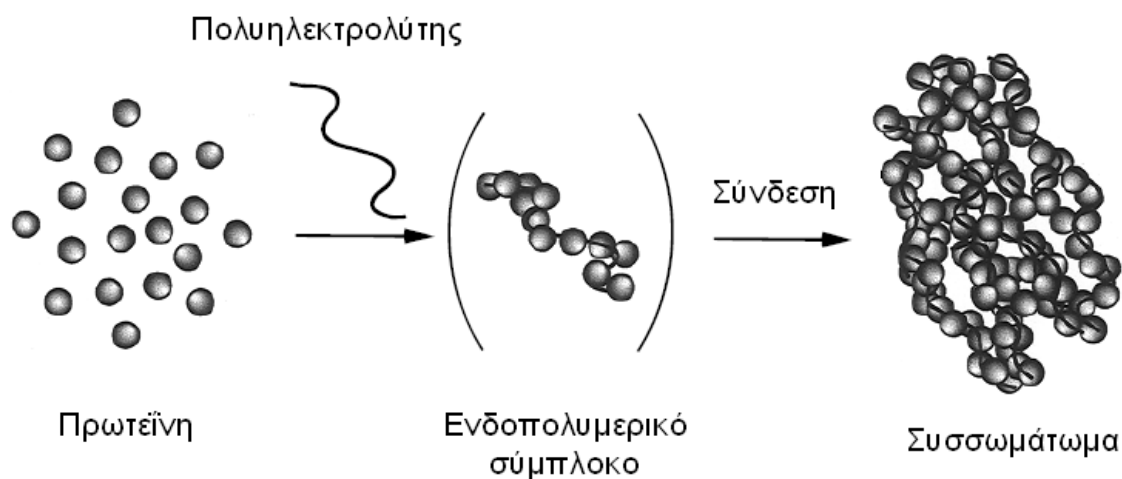
Η διαδικασία της σύμπλεξης πολυηλεκτρολυτών και πρωτεϊνών καθώς και η δομή των σχηματιζόμενων συμπλόκων επηρεάζονται από πλήθος παραμέτρων, με σημαντικότερες την αναλογία μεταξύ των δύο συστατικών, τη συγκέντρωση, το pH,

τη θερμοκρασία και την ιοντική ισχύ του διαλύματος. Εξίσου σημαντική θεωρείται και η χημική δομή των μακρομορίων, καθώς έχει διερευνηθεί διεξοδικά η επίδραση παραμέτρων όπως το μοριακό βάρος, η πυκνότητα φορτίου, η ακαμψία και η υδροφοβικότητα της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας, καθώς και η διαμόρφωση και η επιφανειακή κατανομή των φορτίων του πρωτεϊνικού μορίου. Αναλυτική παρουσίαση των διαφόρων πειραματικών μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί στο συγκεκριμένο πεδίο, αποτελούν οι ανασκοπήσεις του Tribet¹³⁵ και των Cooper, Dubin, Kayitmazer και Turksen.¹³⁶

Ανάλογα με τις συνθήκες του εκάστοτε συστήματος, η σύμπλεξη ενδέχεται να οδηγήσει στο σχηματισμό συμπλόκων διαφορετικής φυσικής κατάστασης, η οποία σχετίζεται άμεσα με τη διαλυτότητά τους. Συγκεκριμένα, όταν ο βαθμός αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο μακρομορίων είναι σχετικά μικρός, τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα είναι αρκετά ενυδατωμένα και επομένως διαλυτά. Όσο ο βαθμός αλληλεπίδρασης αυξάνεται, η εξουδετέρωση των φορτίων γίνεται μεγαλύτερη, με αποτέλεσμα τη μείωση της διαλυτότητας των συμπλόκων, γεγονός που επιφέρει το διφασικό διαχωρισμό του διαλύματος, δηλαδή το σχηματισμό είτε μίας δεύτερης πυκνής υγρής φάσης (coacervation), είτε στερεού ιζήματος. Τέλος, σε μερικές περιπτώσεις είναι πιθανός ο σχηματισμός πηκτώματος.

Σύμφωνα με τις πειραματικές μελέτες των Dubin και Kokufuta,¹³⁷ ο μηχανισμός της σύμπλεξης μεταξύ πρωτεϊνών και πολυηλεκτρολυτών μπορεί να περιγραφεί ως εξής: Κατά την προσθήκη του πολυηλεκτρολύτη στο πρωτεϊνικό διάλυμα τα μόρια της πρωτεΐνης προσδένονται ηλεκτροστατικά στην πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα σχηματίζοντας ένα ενδοπολυμερικό σύμπλοκο (intrapolymer complex), στο οποίο τα φορτία του πολυηλεκτρολύτη εξουδετερώνονται από τα αντίθετα φορτία της πρωτεΐνης. Καθώς ο αριθμός των προσδεμένων πρωτεϊνικών μορίων ανά πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα αυξάνεται, η εξουδετέρωση των φορτίων γίνεται εντονότερη και τα ενδοπολυμερικά σύμπλοκα μπορούν να θεωρηθούν ουδέτερα. Στο επόμενο στάδιο λαμβάνει χώρα η σύνδεση μεταξύ των ουδέτερων ενδοπολυμερικών συμπλόκων, η οποία συνεπάγεται το σχηματισμό μεγάλων σε μέγεθος συσσωματωμάτων που αποτελούνται από υψηλό αριθμό αλυσίδων πολυηλεκτρολυτών και πρωτεϊνικών μορίων. Τα συσσωματώματα αυτά ενδέχεται να συνδεθούν περαιτέρω, σχηματίζοντας ακόμα μεγαλύτερα συσσωματώματα. Προφανώς, όσο το μέγεθος των συσσωματωμάτων και ο βαθμός

εξουδετέρωσης των φορτίων των δύο ειδών μακρομορίων αυξάνεται, η διαλυτότητα των συσσωματωμάτων μειώνεται και πλέον είναι πιθανός ο διαφασικός διαχωρισμός του διαλύματος. Μία σχηματική αναπαράσταση του συγκεκριμένου μηχανισμού της σύμπλεξης πρωτεϊνών και πολυηλεκτρολυτών παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.12.



Σχήμα 1.12: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού της σύμπλεξης πρωτεϊνών και πολυηλεκτρολυτών, σύμφωνα με τις πειραματικές μελέτες της ομάδας των Dubin και Kokufuta.¹³⁷

Όπως υποδηλώνει η σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού της σύμπλεξης, μία ικανοποιητική περιγραφή ενός συστήματος συμπλόκων πολυηλεκτρολυτών και πρωτεϊνών προϋποθέτει την εξαγωγή πληροφοριών αναφορικά με διάφορες παραμέτρους του συστήματος, όπως:

- i. τον αριθμό των προσδεμένων πρωτεϊνικών μορίων ανά πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα,
- ii. το μέγεθος των ενδοπολυμερικών συμπλόκων και το βαθμό της συσσωμάτωσής τους,
- iii. τη φυσική κατάσταση των συσσωματωμάτων των ενδοπολυμερικών συμπλόκων,
- iv. τον τρόπο με τον οποίο τα πρωτεϊνικά μόρια προσδέονται στην πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα, δηλαδή τις ενεργές θέσεις πρόσδεσης του συστήματος,
- v. την τοπική αναδιάταξη των τμημάτων της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας κατά την πρόσδεση, αλλά και την πιθανή διατάραξη της διαμόρφωσης του

- πρωτεϊνικού μορίου,
- vi. το βαθμό εξουδετέρωσης των φορτίων των δύο μακρομορίων και το ενεργό φορτίο των σχηματιζόμενων συμπλόκων,
 - vii. τη συγκέντρωση των συμπλεγμένων και των ελεύθερων πρωτεϊνικών μορίων ή/και πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων και
 - viii. την επίδραση τόσο των συνθηκών του διαλύματος, όσο και των δομικών χαρακτηριστικών των δύο ειδών μακρομορίων στις παραμέτρους αυτές.

Πλήθος πειραματικών τεχνικών βρίσκει εφαρμογή στη μελέτη της σύμπλεξης μεταξύ πολυηλεκτρολυτών και πρωτεϊνών και στο χαρακτηρισμό των σχηματιζόμενων συμπλόκων.¹³⁵ Τεχνικές μικροσκοπίας, όπως μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM), αλλά και ηλεκτρονικής και οπτικής μικροσκοπίας, έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης πολλαπλών στρωμάτων πολυηλεκτρολυτών ή σφαιρικών πολυηλεκτρολυτικών βουρτσών και πρωτεϊνών. Ευρέως διαδεδομένες είναι οι τεχνικές σκέδασης, είτε πρόκειται για σκέδαση νετρονίων σε μικρές γωνίες (SANS), είτε για δυναμική, στατική ή/και ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός (DLS, SLS, ELS), καθώς παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες αναφορικά με τη δομή, το μέγεθος και το ενεργό φορτίο των συμπλόκων. Ιδιαίτερως χρήσιμη έχει αποδειχθεί η τεχνική της θολωσιμετρίας (turbidimetry) για την εξακρίβωση της στοιχειομετρίας των δύο μακρομορίων κατά το σχηματισμό των συμπλόκων, καθώς και για τον προσδιορισμό των κρίσιμων συνθηκών που οδηγούν στο σχηματισμό διαλυτών συμπλόκων ή το φασικό διαχωρισμό του διαλύματος. Η στοιχειομετρία μεταξύ της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας και των πρωτεϊνικών μορίων και η σταθερά πρόσδεσης του συστήματος, εξάγονται επίσης μέσω μετρήσεων θερμοδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC), καθώς και συνεχούς ηλεκτροφόρησης μέσω τριχοειδούς ανάλυσης μετώπου (Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis, FACCE). Μετρήσεις ιξωδομετρίας και ρεολογίας χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση του εσωτερικού ιξώδους και των ιξωδοελαστικών ιδιοτήτων του συστήματος, αντίστοιχα. Τέλος, όπως προαναφέρθηκε, η διατήρηση της δομής των πρωτεϊνικών μορίων κατά τη σύμπλεξη αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την πιθανή εφαρμογή συστημάτων συμπλόκων πολυηλεκτρολυτών και πρωτεϊνών σε νανοβιοτεχνολογικές διεργασίες. Για το λόγο αυτό, η δομή της συμπλεγμένης

πρωτεΐνης διερευνάται συνήθως μέσω τεχνικών φασματοσκοπίας φθορισμού, υπερύθρου (infrared spectroscopy, IR) και κυκλικού διχρωισμού (Circular Dichroism spectroscopy, CD), ενώ μελέτες της θερμικής σταθερότητας της πρωτεΐνης μετά τη σύμπλεξη πραγματοποιούνται με χρήση διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry, DSC).

Αρκετές θεωρητικές και προσομοιωτικές μέθοδοι ¹³⁸⁻¹⁴¹ έχουν εφαρμοστεί με σκοπό την εξαγωγή χρήσιμων προβλέψεων σχετικά με το είδος των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πολυηλεκτρολυτών και πρωτεϊνών, το μηχανισμό της σύμπλεξης, αλλά και τις ιδιότητες των σχηματιζόμενων συμπλόκων, συναρτήσει της αναλογίας των δύο συστατικών, του φορτίου των μακρομορίων, του μήκους της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας, καθώς και του pH και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος, όπως παρουσιάζεται και στην ανασκόπηση των de Vries και Cohen Stuart.¹⁴⁰

Από το πλήθος των διαφόρων πειραματικών μελετών της σύμπλεξης πολυηλεκτρολυτών και πρωτεϊνών,¹⁴²⁻¹⁷⁹ ξεχωριστή αναφορά χρήζουν οι μελέτες του Dubin και των συνεργατών του, οι οποίοι χρησιμοποίησαν κυρίως τεχνικές θολωσιμετρίας και δυναμικής, στατικής και ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός,¹⁴²⁻¹⁵¹ καθώς και ηλεκτροφόρησης μέσω τριχοειδούς^{152, 153} και ρεολογίας,^{154, 155} για τη διερεύνηση διαφορετικών συστημάτων, με ιδιαίτερη έμφαση στο σύστημα του πολυηλεκτρολύτη πολυ(χλωριούχο διμεθυλοδιαλλαμμόνιο) (PDMDAAC) και της αλβουμίνης βοδινού ορού (BSA).^{144-150, 154, 155} Οι μελέτες αυτές διερεύνησαν επισταμένως τη δομή των σχηματιζόμενων συμπλόκων στη διαλυτή κατάσταση, αλλά και στην κατάσταση του διφασικού διαχωρισμού. Ιδιαίτερο βάρος δόθηκε στην εξακρίβωση της στοιχειομετρίας μεταξύ των δύο μακρομορίων καθώς και τις συνθήκες που οδηγούν στο διφασικό διαχωρισμό του διαλύματος. Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση του μοριακού βάρους, της πυκνότητας φορτίου και της υδροφοβικότητας της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας, της κατανομής του επιφανειακού φορτίου της πρωτεΐνης, καθώς και του pH και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος. Μία σύνοψη των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στην ανασκόπηση των Kizilay, Kayitmazer και Dubin.¹⁵⁶

Ανάλογο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι πειραματικές μελέτες της σύμπλεξης του μετά καλίου άλατος της πολυ(θειικής βινυλικής αλκοόλης) (KPVS) με τις πρωτεΐνες λυσοζύμη, ριβονουκλεάση (RNase) και αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA), που

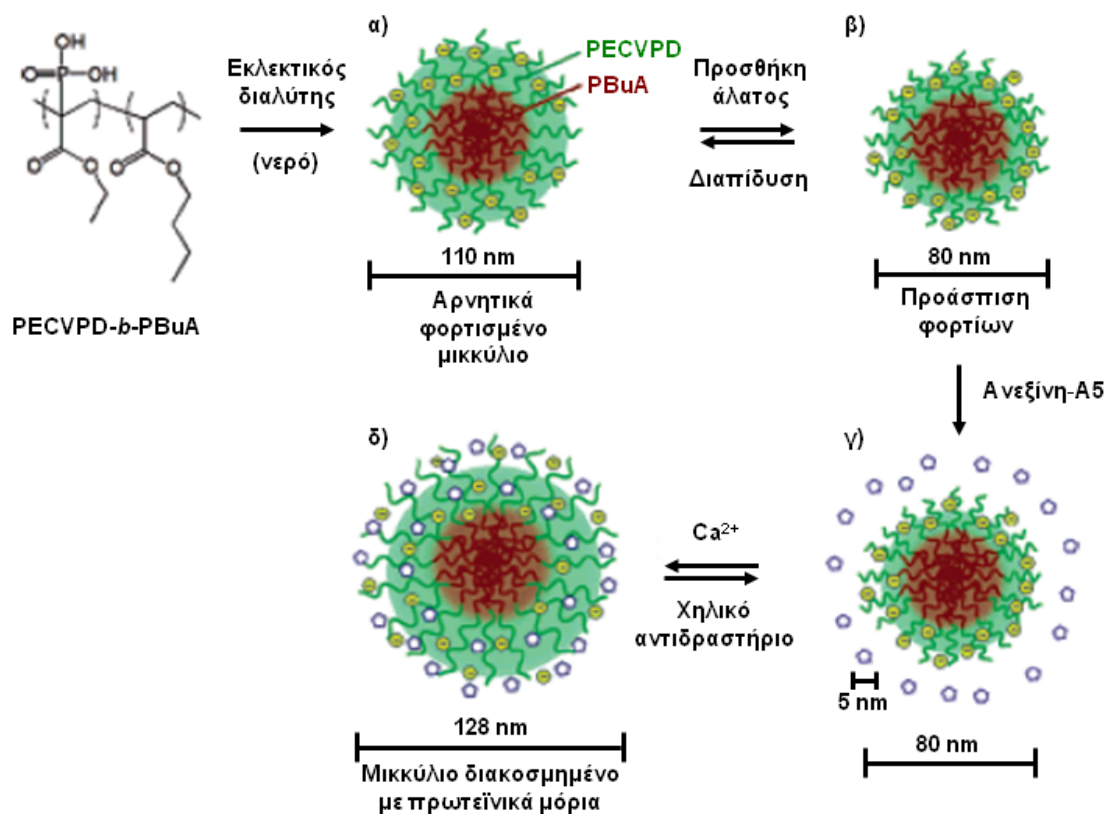
πραγματοποίησε η ομάδα του Kokufuta μέσω τεχνικών θολοσιμετρίας και σκέδασης φωτός,^{157, 158} καθώς και των διεξοδικών μετρήσεων σκέδασης νετρονίων σε μικρές γωνίες (SANS) του συστήματος του πολυ(σουλφονομένου στυρενίου) (PSS) και της λυσοζύμης, της ομάδας των Cousin, Gummel και Boué.¹⁶²⁻¹⁶⁶ Χαρακτηριστικά παραδείγματα της εφαρμογής της θερμοδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης στη διερεύνηση της σύμπλεξης πολυηλεκτρολυτών και πρωτεϊνών, αποτελούν η μελέτη του συστήματος της υδροχλωρικής πολυ(αλλυλαμίνης) (PAH) και της BSA, που πραγματοποίησε η ομάδα του Ball,¹⁶⁸ καθώς και της σύμπλεξης των πολυηλεκτρολυτών πολυ(ακρυλικού οξέος) (PAA) και πολυ(βινυλοσουλφονικού οξέος) (PVS) με τη λυσοζύμη, της ομάδας της Romanini.¹⁶⁹ Αντίστοιχα παραδείγματα φασματοσκοπικών μελετών συνιστούν οι μετρήσεις φθορισμού του συστήματος του KPVS και της παπαΐνης, που πραγματοποίησε η ομάδα του Izumi,¹⁷⁰ της αλβουμίνης και διαφόρων πολυηλεκτρολυτών, του Teramoto και των συνεργατών του,¹⁷¹ της λυσοζύμης και του πολυ(2-(ακρυλαμιδο)-2-μεθυλοπροπανοσουλφονικού) νατρίου (PAMPS), της ομάδας των Morishima και Sato,^{172, 173} καθώς και οι φασματοσκοπικές μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού που πραγματοποίησε ο Xia και οι συνεργάτες του για το σύστημα του PDMDAAC και της αιμογλοβίνης,¹⁷⁴ η ομάδα της Fattuggia για τους πολυηλεκτρολύτες PAA και PVS και τις πρωτεΐνες καταλάση και χυμοθρυψίνη,¹⁷⁵ και οι Gao και Yao για το σύστημα της λυσοζύμης και των πολυηλεκτρολυτών πολυ(ισοβουτυλενίου-*alt*-μηλεϊνικού οξέος) (PIMA) και πολυ(1-δεκατετρακενίου-*alt*-μηλεϊνικού οξέος) (PTMA).¹⁷⁶ Τέλος, η θερμική σταθερότητα των συμπλεγμένων πρωτεϊνικών μορίων μελετήθηκε με χρήση διαφορικής θερμοδομετρίας σάρωσης για συστήματα διαφόρων πολυηλεκτρολυτών, όπως PSS, PAA και PVS και διαφορετικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της λυσοζύμης, από την ομάδα του Mattiasson,¹⁷⁷ για τα σύμπλοκα που σχηματίζει η λυσοζύμη με τον φυσικό πολυσακχαρίτη ηπαρίνη, από τον van de Weert και τους συνεργάτες του,¹⁷⁸ καθώς και για τα συστήματα των πολυηλεκτρολυτών ηπαρίνη, PVS, PSS και Nafion και διαφόρων πρωτεϊνών όπως της λυσοζύμης και της RNase A, από την ομάδα του E. Sedláč.¹⁷⁹

Όσον αφορά την αλληλεπίδραση πολυηλεκτρολυτικών αμφιφιλικών συμπολυμερών κατά συστάδες με αντίθετα φορτισμένα μακρομόρια, οι περισσότερες πειραματικές μελέτες αφορούν συστήματα πολυηλεκτρολυτικών μικκυλίων και αντίθετα φορτισμένων πολυηλεκτρολυτών ή/και επιφανειοδραστικών ουσιών.

Συγκεκριμένα, η ομάδα του Kabanov μελέτησε την αλληλεπίδραση των μικκυλίων που σχηματίζει το δυσσταδικό συμπολυμερές πολυστυρενίου-πολυ(βρωμιούχου τεταρτοταγούς άλατος *N*-αιθυλο-4-βυνιλοπυριδίνης) (PS-PEVP) και του πολυ(μεθακρυλικού νατρίου) (PMANa),¹⁸⁰ ο Pergushov και οι συνεργάτες του διερεύνησαν το σύστημα των μικκυλίων του PIB-PMAA και της P4VP,¹⁸¹ το παρόμοιο σύστημα των μικκυλίων του PS-PMAA και της P2VP μελετήθηκε από την ομάδα του Matějček,¹⁸² ενώ η Kulebyakina και οι συνεργάτες της διερεύνησαν την αλληλεπίδραση μικκυλίων PS-P4VP και του PMAA, καθώς και του δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS).¹⁸³ Αντίστοιχες μελέτες τρισταδικών πολυηλεκτρολυτικών συμπολυμερών συνιστούν η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των μικκυλίων του PS-P2VP-PEO και του SDS, που πραγματοποίησε η ομάδα του Nakashima,¹⁸⁴ η μελέτη της ενσωμάτωσης νανοσωματιδίων χρυσού στην κορώνα των μικκυλίων που σχηματίζει το συμπολυμερές PEO-PS-P4VP, του Chen και των συνεργατών του,¹²⁰ καθώς και της αλληλεπίδρασης των μικκυλίων του PEG-PnBA-PDMAEMA με DNA, που μελετήθηκε από την ομάδα του Won.¹²¹

Οι πειραματικές μελέτες της αλληλεπίδρασης πολυηλεκτρολυτικών μικκυλίων και πρωτεϊνών είναι σαφώς περιορισμένες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η διερεύνηση της πρόσδεσης των μορίων της ανεξίνης-A5 στην πολυηλεκτρολυτική κορώνα των μικκυλίων που σχηματίζει το δυσσταδικό αμφιφιλικό συμπολυμερές PBuA-PECVPD, που πραγματοποίησε η ομάδα των Giacomelli και Borsali.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης, η αυτοοργάνωση του συμπολυμερούς PBuA-PECVPD σε υδατικό μέσο οδηγεί στο σχηματισμό μικκυλίων, των οποίων ο πυρήνας αποτελείται από τις υδρόφοβες συστάδες του PBuA και η κορώνα από τις υδρόφιλες συστάδες του PECVPD, οι οποίες φέρουν αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες. Κατά την προσθήκη άλατος στο διάλυμα λαμβάνει χώρα η προάσπιση των φορτίων της πολυηλεκτρολυτικής κορώνας, γεγονός που επιφέρει τη συρρίκνωσή της και την αντίστοιχη μείωση του μεγέθους των μικκυλίων. Η προσθήκη της ανεξίνης-A5 στο διάλυμα των μικκυλίων πραγματοποιείται παρουσία μικρής ποσότητας άλατος και η πρόσδεση των πρωτεϊνικών μορίων στις πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες της κορώνας των μικκυλίων επιτυγχάνεται μόνο παρουσία ιόντων ασβεστίου. Η πρόσδεση των μορίων της ανεξίνης-A5 συνεπάγεται την αύξηση του μεγέθους των μικκυλίων, ενώ η όλη διαδικασία είναι αντιστρεπτή μέσω της προσθήκης ενός χηλικού αντιδραστηρίου το οποίο συμπλέκει το ασβέστιο

και επιφέρει την αποδέσμευση των πρωτεϊνικών μορίων. Η σχηματική αναπαράσταση της παραπάνω διαδικασίας παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.13.



Σχήμα 1.13: Σχηματική αναπαράσταση της πρόσδεσης των μορίων της ανεξίνης-A5 στην πολυηλεκτρολυτική κορώνα των μικκυλίων του δισυσταδικού αμφιφιλικού συμπολυμερούς PBuA-PECVPD, σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα της ομάδας των Giacomelli και Borsali.¹⁸⁵

Αντίστοιχο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι μελέτες της αλληλεπίδρασης σφαιρικών πολυηλεκτρολυτικών βουρτσών και πρωτεϊνών. Στο πεδίο αυτό ιδιαίτερα εκτεταμένη μελέτη έχει πραγματοποιήσει η ομάδα των Wittemann και Ballauff,¹⁸⁸⁻¹⁹² οι οποίοι διερεύνησαν την πρόσδεση διαφόρων πρωτεϊνικών μορίων σε πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες PSS και PAA, συνδεδεμένες με το ένα άκρο τους στην επιφάνεια σφαιρικών κolloειδών σωματιδίων PS, δίνοντας ιδιαίτερη βαρύτητα στην εξακρίβωση του μηχανισμού της πρόσδεσης των πρωτεϊνικών μορίων, στην επίδραση της κατανομής του επιφανειακού φορτίου της πρωτεΐνης, αλλά και των αντισταθμιστικών ιόντων εντός του πολυηλεκτρολυτικού στρώματος, καθώς και στη διερεύνηση της δομής της συμπλεγμένης πρωτεΐνης.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι πλήθος πειραματικών μελετών αφορά την

αλληλεπίδραση πολυηλεκτρολυτικών δισυσταδικών και τρισυσταδικών συμπολυμερών, των οποίων όλες οι συστάδες είναι υδρόφιλες με διάφορα είδη αντίθετα φορτισμένων μακρομορίων ή/και σωματιδίων, όπως ομοπολυμερικούς πολυηλεκτρολύτες και πολυηλεκτρολύτες κατά συστάδες, πρωτεΐνες, επιφανειοδραστικές ουσίες, μεταλλικά νανοσωματίδια, πολυσθενή ιόντα, κ.τ.λ. Στα συστήματα αυτά, η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ των αντίθετα φορτισμένων ειδών συνεπάγεται την εξουδετέρωση των φορτίων τους, με αποτέλεσμα το σχηματισμό δομών παρόμοιων με αυτές των μικκυλίων, όπου ο πυρήνας αποτελείται από τα ηλεκτροστατικά συμπλεγμένα είδη, ενώ η κορώνα σχηματίζεται από τα διαλυτά τμήματα των μακρομορίων. Στο πλαίσιο αυτό, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ανασκοπήσεις των ομάδων του Gohy¹⁹³ και του Voets.¹⁹⁴

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

2.1. Πειραματικές τεχνικές

2.1.1. Σκέδαση φωτός

Οι τεχνικές σκέδασης φωτός χρησιμοποιούνται ευρέως για τη μελέτη πολυμερικών διαλυμάτων και παρέχουν σημαντικές πληροφορίες αναφορικά με τις στατικές και θερμοδυναμικές ιδιότητες των πολυμερικών μορίων στο διάλυμα. Η βασική αρχή λειτουργίας των τεχνικών αυτών έγκειται στη μέτρηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από το διάλυμα σε διάφορες κατευθύνσεις σε σχέση με την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Όταν μία δέσμη ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας προσπίπτει στα μόρια μίας ουσίας, το ηλεκτρικό πεδίο του κύματος αλληλεπιδρά με τα φορτία των μορίων μεταβάλλοντας τη χωρική τους κατανομή. Η δυνατότητα μεταβολής της χωρικής κατανομής των φορτίων ενός μορίου εκφράζεται από το μέτρο της πολωσιμότητας του μορίου. Η χωρική κατανομή των φορτίων του μορίου ακολουθεί τη χρονική μεταβολή του ηλεκτρικού πεδίου της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, με αποτέλεσμα τα μόρια να συμπεριφέρονται ως ταλαντούμενα ηλεκτρικά δίπολα, τα οποία εκπέμπουν ακτινοβολία ίδιας συχνότητας με την προσπίπτουσα, προς όλες τις κατευθύνσεις.

2.1.1.1. Στατική σκέδαση φωτός

Στην περίπτωση της στατικής σκέδασης φωτός (Static Light Scattering, SLS),¹⁹⁵⁻¹⁹⁸ η μέση χρονική τιμή της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, μετράται συναρτήσει της γωνίας σκέδασης θ και της συγκέντρωσης του διαλύματος c και εκφράζεται μέσω του λόγου Rayleigh, R_θ , ο οποίος ορίζεται ως:

$$R_\theta = \frac{d^2 I_s}{V f I_0} \quad (2.1)$$

όπου d είναι η απόσταση μεταξύ δείγματος και ανιχνευτή, V ο όγκος σκέδασης, f ο παράγοντας διόρθωσης ως προς το επίπεδο πόλωσης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και I_s , I_0 οι εντάσεις της σκεδαζόμενης και προσπίπτουσας ακτινοβολίας, αντίστοιχα.

Σε ένα αραιό σύστημα, όπως για παράδειγμα ένα αέριο, τα μόρια κατανομούνται τυχαία στο χώρο και σε μεγάλες αποστάσεις μεταξύ τους, οπότε η συνεισφορά κάθε μορίου στην ένταση σκέδασης μπορεί να θεωρηθεί ανάλογη του αριθμού τους. Στην περίπτωση όμως πυκνών συστημάτων, όπως τα καθαρά υγρά και τα διαλύματα, τα μόρια βρίσκονται σε κοντινές αποστάσεις, οπότε η ακτινοβολία που σκεδάζεται από κάθε μόριο αλληλεπιδρά με εκείνη που προέρχεται από άλλα μόρια. Η πιθανότητα για καταστρεπτική συμβολή αυξάνεται και το φαινόμενο αυτό μειώνει την ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Η περιγραφή του φαινομένου αυτού μπορεί να γίνει μέσω της θεωρίας των διακυμάνσεων Einstein-Smoluchowski, η οποία λαμβάνει υπόψη τις τοπικές διακυμάνσεις της διηλεκτρικής σταθεράς, σε κλίμακα της τάξης μεγέθους του μήκους κύματος, οι οποίες προέρχονται από διακυμάνσεις πυκνότητας σε ένα καθαρό υγρό ή/και από διακυμάνσεις συγκέντρωσης σε ένα διάλυμα. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η συνεισφορά των διακυμάνσεων συγκέντρωσης στη σκέδαση εκφράζεται μέσω της σχέσης:

$$\Delta R_{\theta} = R_{\theta, \text{διαλύματος}} - R_{\theta, \text{διαλύτη}} \quad (2.2)$$

Όπως φαίνεται στη σχέση (2.1), ο λόγος R_{θ} εξαρτάται από τη γεωμετρία της πειραματικής διάταξης. Για το λόγο αυτό στην πράξη υπολογίζεται ο απόλυτος λόγος R_{θ} , ο οποίος κανονικοποιείται ως προς πρότυπους διαλύτες όπως το τολουόλιο, ως εξής:

$$R_{\theta} = R_T \frac{n_0^2}{n_T^2} \frac{I_S}{I_{S,T}} \quad (2.3)$$

όπου R_T ο λόγος Rayleigh του τολουολίου, n_0 και n_T οι δείκτες διάθλασης του διαλύτη και του τολουολίου και I_S και $I_{S,T}$ οι εντάσεις της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας του διαλύματος και του τολουολίου, αντίστοιχα.

Στην περίπτωση των πολυμερικών διαλυμάτων, η διαφορά ΔR_{θ} συνδέεται με τα μοριακά χαρακτηριστικά του πολυμερούς και τις θερμοδυναμικές ιδιότητες του διαλύματος μέσω της εξίσωσης Zimm:

$$\frac{K c}{\Delta R_{\theta}} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{1}{3} R_g^2 q^2 \right) + 2A_2 c \quad (2.4)$$

όπου M_w το μοριακό βάρος του πολυμερούς, R_g η γυροσκοπική ακτίνα του πολυμερούς, A_2 ο δεύτερος συντελεστής Virial, ο οποίος εκφράζει αλληλεπιδράσεις

μεταξύ δύο μορίων και q το διάνυσμα σκέδασης, το οποίο ορίζεται ως:

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.5)$$

όπου λ το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η σταθερά K δίνεται από τη σχέση:

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda^4 N_A} \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)^2 \quad (2.6)$$

όπου N_A ο αριθμός του Avogadro και $\partial n/\partial c$ ο διαφορικός δείκτης διάθλασης.

Μέσω της εξίσωσης (2.4) και με βάση μετρήσεις σε πολλαπλές γωνίες θ και συγκεντρώσεις c , προκύπτει το διάγραμμα Zimm. Από το διάγραμμα αυτό με διπλή προέκταση των μετρούμενων τιμών του λόγου $Kc/\Delta R_\theta$ σε μηδενική γωνία σκέδασης και μηδενική συγκέντρωση, εξάγεται το μοριακό βάρος M_w ως το αντίστροφο της κοινής τεταγμένης επί της αρχής, ενώ ο συντελεστής A_2 και η γυροσκοπική ακτίνα R_g υπολογίζονται από τις κλίσεις των ευθειών για $\theta = 0$ και $c = 0$, αντίστοιχα.

Μέσω της σχέσης (2.4) διαπιστώνεται ότι ο διαφορικός δείκτης διάθλασης $\partial n/\partial c$ του πολυμερικού διαλύματος, είναι παράμετρος απαραίτητη για την ανάλυση των μετρήσεων στατικής σκέδασης φωτός. Η παράμετρος αυτή αποτελεί το μέτρο της μεταβολής του δείκτη διάθλασης του διαλύματος συναρτήσει της αύξησης της συγκέντρωσης του πολυμερούς, είναι χαρακτηριστική του κάθε συστήματος πολυμερούς-διαλύτη και μετράται με τη χρήση διαφορικών διαθλασιμέτρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση συμπολυμερών κατά συστάδες και διαλυμάτων που περιέχουν δύο ή περισσότερα μόρια τα οποία δεν παρουσιάζουν ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ τους, ο διαφορικός δείκτης διάθλασης του διαλύματος $(\partial n/\partial c)_{ολικό}$ μπορεί να υπολογιστεί ως σταθμισμένος μέσος όρος των διαφορικών δεικτών διάθλασης $(\partial n/\partial c)_1$ και $(\partial n/\partial c)_2$ των επιμέρους συστατικών, ως εξής:

$$\left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_{ολικό} = w_1 \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_1 + w_2 \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_2 \quad (2.7)$$

όπου w_1 και w_2 τα κλάσματα βάρους των δύο συστατικών.

2.1.1.2. Δυναμική σκέδαση φωτός

Η τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS),¹⁹⁵⁻

¹⁹⁸ στηρίζεται στο γεγονός ότι η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας ενός συστήματος, είτε πρόκειται για καθαρό υγρό είτε για πολυμερικό διάλυμα, παρουσιάζει διακυμάνσεις συναρτήσει του χρόνου. Οι διακυμάνσεις αυτές οφείλονται στο ότι τα μόρια του συστήματος βρίσκονται σε κίνηση Brown και οι μεταξύ τους αποστάσεις διαρκώς μεταβάλλονται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η σκεδαζόμενη ακτινοβολία να υπόκειται σε ενισχυτική ή καταστρεπτική συμβολή και οι διακυμάνσεις της έντασης που προκύπτουν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη χρονική κλίμακα της κίνησης των μορίων.

Οι διακυμάνσεις της έντασης I της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας συναρτήσει του χρόνου t , εκφράζονται μέσω της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης:

$$g_2(q, \tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (2.8)$$

όπου q το διάνυσμα σκέδασης και τ ο χρόνος υστέρησης ή χρόνος δειγματοληψίας. Για μικρούς χρόνους υστέρησης η συσχέτιση είναι ισχυρή, ενώ για μεγαλύτερους χρόνους υστέρησης η συσχέτιση φθίνει εκθετικά, υποδηλώνοντας την απώλεια συσχέτισης μεταξύ της αρχικής και τελικής κατάστασης του συστήματος κατά την πάροδο μεγάλων χρονικών διαστημάτων, συγκριτικά με τους χαρακτηριστικούς χρόνους της διαδικασίας διάχυσης. Η εκθετική αυτή μείωση της συσχέτισης συνδέεται με την κίνηση των μορίων του συστήματος και συγκεκριμένα με τον συντελεστή διάχυσης D .

Η μετρούμενη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης της σκεδαζόμενης έντασης $g_2(q, \tau)$, συνδέεται με την συνάρτηση αυτοσυσχέτισης του σκεδαζόμενου ηλεκτρικού πεδίου $g_1(q, \tau)$ μέσω της εξίσωσης Siegert:

$$g_2(q, \tau) = 1 + \beta g_1^2(q, \tau) \quad (2.9)$$

όπου β είναι ένας συντελεστής διόρθωσης, ο οποίος εξαρτάται από την πειραματική διάταξη.

Στην απλή περίπτωση διάχυσης μονοδιάσπαρτων μη αλληλεπιδρώντων σωματιδίων η $g_1(q, \tau)$ δίνεται από τη σχέση:

$$g_1(q, \tau) = \exp(-\Gamma \tau) \quad (2.10)$$

όπου Γ ο ρυθμός υστέρησης ή σταθερά χαλάρωσης του συστήματος, ο οποίος

συνδέεται με το συντελεστή διάχυσης D και το διάλυσμα σκέδασης q , ως εξής:

$$\Gamma = Dq^2 \quad (2.11)$$

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

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (2.12)$$

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

Στις περισσότερες περιπτώσεις τα συστήματα είναι πολυδιάσπαρτα και η $g_1(q, \tau)$ εκφράζεται ως άθροισμα των εκθετικών μειώσεων που αντιστοιχούν σε κάθε ένα είδος σωματιδίων του συστήματος, οπότε:

$$g_1(q, \tau) = \sum_{i=1}^n G_i(\Gamma_i) \exp(-\Gamma_i \tau) = \int G(\Gamma) \exp(-\Gamma \tau) d\Gamma \quad (2.13)$$

όπου $G(\Gamma)$ η συνάρτηση κατανομής των χρόνων χαλάρωσης, η οποία εξαρτάται από την κατανομή μεγεθών των σωματιδίων του συστήματος.

Για την ανάλυση της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης $g_1(q, \tau)$ έχουν αναπτυχθεί διάφορες μαθηματικές διαδικασίες. Δύο από τις πλέον διαδεδομένες διαδικασίες αυτές, είναι η μέθοδος των αθροισμάτων (cumulants method)¹⁹⁹ και οι τεχνικές κανονικοποίησης (regularization methods), οι οποίες εφαρμόζονται μέσω του προγράμματος CONTIN.²⁰⁰

Σύμφωνα με τη μέθοδο των αθροισμάτων, η $g_1(q, \tau)$ εκφράζεται ως ένα πολυώνυμο 2^{ης} ή 3^{ης} τάξης ως προς το χρόνο τ , μέσω της σχέσης:

$$\ln g_1(q, \tau) = -\bar{\Gamma} \tau + \frac{\mu_2}{2!} \tau^2 - \frac{\mu_3}{3!} \tau^3 \quad (2.14)$$

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 (2.11) η οποία μετασχηματίζεται σε:

$$\bar{\Gamma} = D_z q^2 \quad (2.15)$$

Επιπροσθέτως, μέσω του συντελεστή μ_2 υπολογίζεται ο δείκτης πολυδιασποράς (polydispersity index) του συστήματος, PDI , ο οποίος ορίζεται ως:

$$PDI = \frac{\mu_2}{\Gamma^2} \quad (2.16)$$

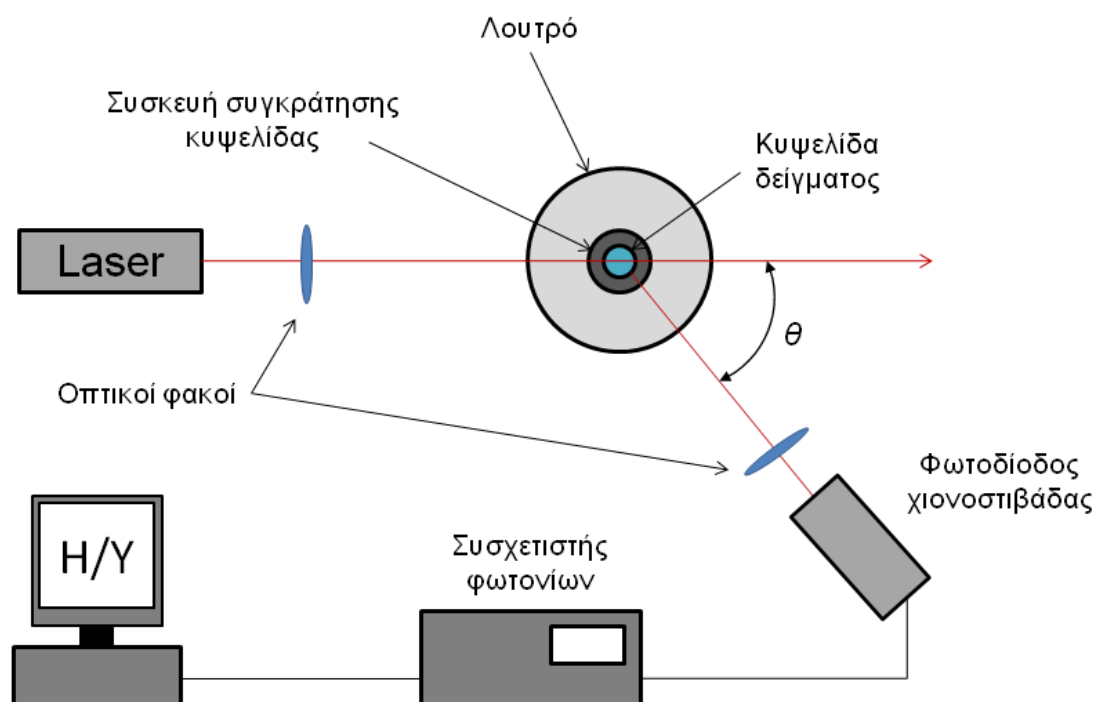
Με χρήση του προγράμματος CONTIN, υπολογίζονται οι πιθανές λύσεις της εξίσωσης (2.13) για την συνάρτηση $G(\Gamma)$, μέσω ενός αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace. Εν συνεχεία, το πρόγραμμα επιλέγει τη βέλτιστη δυνατή λύση για την $G(\Gamma)$, απορρίπτοντας λύσεις που παρουσιάζουν πολυπλοκότητα, υποθέτοντας είτε ότι αυτές είναι λιγότερο πιθανές από φυσική άποψη, είτε ότι οφείλονται σε 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, μέσω των σχέσεων (2.11) και (2.12).

2.1.1.3. Πειραματική διάταξη στατικής και δυναμικής σκέδασης φωτός

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις στατικής και δυναμικής σκέδασης φωτός, αποτελείται από ένα ολοκληρωμένο σύστημα γωνιομέτρου (ALVGmbH, μοντέλο ALV/CGS-3), το οποίο περιλαμβάνει μία πηγή laser He-Ne μήκους κύματος $\lambda = 632.8$ nm και ισχύος 22 mW, μία συσκευή συγκράτησης της κυψελίδας του δείγματος, κυλινδρική κυψελίδα χαλαζία διαμέτρου 1 cm (Helma), η οποία εμβαπτίζεται σε λουτρό ελεγχόμενης θερμοκρασίας που περιέχει υγρό παρόμοιου δείκτη διάθλασης με αυτόν του γυαλιού της κυψελίδας, συνήθως τολουόλιο, και μία φωτοδίοδο χιονοστιβάδας η οποία ανιχνεύει τη σκεδαζόμενη ακτινοβολία σε διαφορετικές γωνίες στο εύρος 20-150°. Το σήμα της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας που ανιχνεύεται, οδηγείται σε ένα συσχετιστή φωτονίων (ALVGmbH, μοντέλο ALV-5000/EPP), ο οποίος καθιστά δυνατή τη μέτρηση της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης και εν συνεχεία τα δεδομένα παρέχονται σε έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή (H/Y), μέσω του οποίου πραγματοποιείται ο έλεγχος της πειραματικής διάταξης. Η σχηματική αναπαράσταση της διάταξης παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.1.

Λόγω της ευαισθησίας της συγκεκριμένης τεχνικής στην παρουσία μεγάλων σωματιδίων, όπως αυτά της σκόνης, τα προς μελέτη δείγματα φιλτράρονταν πριν τη μέτρηση, μέσω φίλτρων υδρόφιλης μεμβράνης PTFE διαμέτρου πόρων 0.45 μm

(Millipore, τύπου Millex-LCR).



Σχήμα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης στατικής και δυναμικής σκέδασης φωτός.

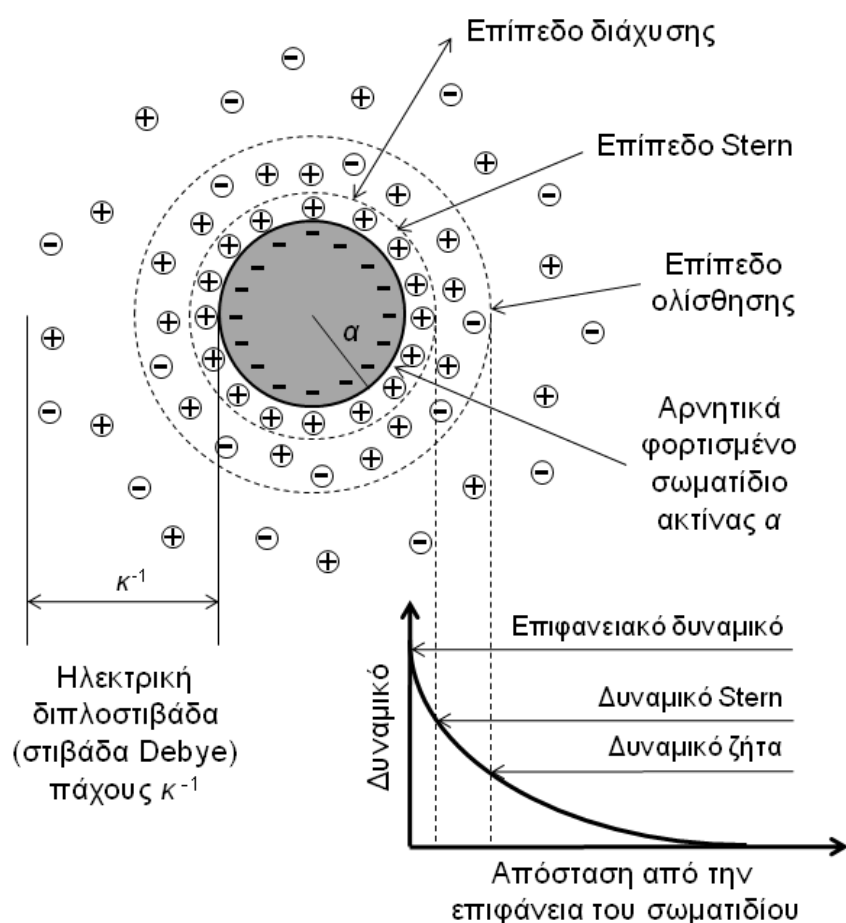
2.1.1.4. Ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός

Όταν ένα φορτισμένο σωματίδιο ή μακρομόριο βρεθεί σε περιβάλλον πολικού διαλύτη, τα επιφανειακά φορτία του σωματιδίου αλληλεπιδρούν με τα ιόντα του διαλύτη μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό γύρω από το σωματίδιο μίας ηλεκτρικής διπλοστιβάδας (Electrical Double Layer, EDL), η οποία καλείται και στιβάδα Debye. Η διπλοστιβάδα αυτή αποτελείται κυρίως από ιόντα αντίθετου φορτίου ως προς το επιφανειακό φορτίο του σωματιδίου, των οποίων η συγκέντρωση μειώνεται καθώς αυξάνεται η απόσταση από την επιφάνεια του φορτίου. Ως αποτέλεσμα, το δυναμικό της διπλοστιβάδας παρουσιάζει εκθετική μείωση συναρτήσει της απόστασης από την επιφάνεια του σωματιδίου.²⁰¹⁻²⁰³

Η ηλεκτρική διπλοστιβάδα αποτελείται από δύο επιμέρους στιβάδες, τη στιβάδα Stern και τη στιβάδα διάχυσης. Η στιβάδα Stern αποτελείται αποκλειστικά από ιόντα αντίθετου φορτίου ως προς το επιφανειακό φορτίο, τα οποία είναι ισχυρά προσδεμένα στην επιφάνεια του σωματιδίου και κινούνται μαζί με αυτό. Αντίθετα, η στιβάδα διάχυσης αποτελείται από ελεύθερα ιόντα, τα οποία κινούνται στο διάλυμα υπό την επίδραση της ηλεκτροστατικής έλξης και για το λόγο αυτό είναι χαλαρά

συνδεδεμένη με το σωματίδιο. Μέρος της στιβάδας διάχυσης μπορεί να κινηθεί υπό την επίδραση ενός εξωτερικού πεδίου. Το υποθετικό επίπεδο το οποίο διαχωρίζει τα ιόντα της στιβάδας διάχυσης τα οποία μπορούν να κινηθούν, από τα ιόντα που παραμένουν προσκολλημένα στην επιφάνεια του σωματιδίου ονομάζεται επίπεδο ολίσθησης. Το δυναμικό στο όριο του επιπέδου ολίσθησης ορίζεται ως το δυναμικό ζήτα και αποτελεί σαφή ένδειξη του φορτίου της ηλεκτρικής διπλοστιβάδας.

Η σχηματική αναπαράσταση της ηλεκτρικής διπλοστιβάδας για την περίπτωση ενός αρνητικά φορτισμένου σωματιδίου, καθώς και των επιμέρους επιπέδων και αντίστοιχων δυναμικών παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.2.



Σχήμα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση της ηλεκτρικής διπλοστιβάδας (στιβάδα Debye), που σχηματίζεται γύρω από ένα αρνητικά φορτισμένο σωματίδιο σε περιβάλλον πολικού διαλύτη, των επιμέρους επιπέδων που την αποτελούν, του δυναμικού συναρτήσει της απόστασης από την επιφάνεια του σωματιδίου και των χαρακτηριστικών τιμών του.

Ένας τρόπος υπολογισμού του δυναμικού ζήτα είναι μέσω πειραμάτων ηλεκτροφόρησης, δηλαδή εφαρμογής ενός εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου στο διάλυμα των φορτισμένων σωματιδίων. Η εφαρμογή του πεδίου εξαναγκάζει τα

φορτισμένα σωματίδια να κινηθούν προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο και η ταχύτητά τους είναι ανάλογη της έντασης του πεδίου, συγκεκριμένα:

$$v = \mu_e E \quad (2.17)$$

όπου v η ταχύτητα του σωματιδίου, E η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου και μ_e η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του σωματιδίου. Μέσω της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας και με τη χρήση θεωρητικών μοντέλων, καθίσταται δυνατός ο υπολογισμός του δυναμικού ζήτα.

Το πλέον διαδεδομένο θεωρητικό μοντέλο για τον υπολογισμό του δυναμικού ζήτα, είναι αυτό του Smoluchowski, το οποίο ισχύει στην περίπτωση που το μέγεθος του φορτισμένου σωματιδίου είναι πολύ μεγαλύτερο από το πάχος της ηλεκτρικής διπλοστιβάδας, δηλαδή στο όριο $ka \gg 1$. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα συνδέεται με το δυναμικό ζήτα μέσω της σχέσης:

$$\mu_e = \frac{\varepsilon \zeta_P}{\eta} \quad (2.18)$$

όπου ε η διηλεκτρική σταθερά και η το ιξώδες του διαλύτη, αντίστοιχα και ζ_P το δυναμικό ζήτα.

Η τεχνική της ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός (Electrophoretic Light Scattering, ELS),²⁰¹⁻²⁰³ συνδυάζει πειράματα ηλεκτροφόρησης και σκέδασης φωτός για τον υπολογισμό της ταχύτητας v των φορτισμένων σωματιδίων σε διάλυμα, τα οποία κινούνται υπό την επίδραση ενός εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου. Μία δέσμη ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας I_0 προσπίπτει στο διάλυμα, κάθετα ως προς τη διεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου E . Η σκεδαζόμενη ακτινοβολία I_S υπόκειται μεταβολή συχνότητας λόγω φαινομένου Doppler, το οποίο οφείλεται στην κίνηση των σωματιδίων. Η μετατόπιση της συχνότητας κατά Doppler, $\Delta\nu$ ορίζεται ως:

$$\Delta\nu = \nu_S - \nu_0 \quad (2.19)$$

όπου ν_S και ν_0 οι συχνότητες της σκεδαζόμενης και της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, αντίστοιχα και συνδέεται με την ταχύτητα των σωματιδίων και το διάνυσμα σκέδασης μέσω της σχέσης:

$$\Delta\nu = \frac{\vec{v} \cdot \vec{q}}{2\pi} = \frac{vq}{2\pi} \cos\phi \quad (2.20)$$

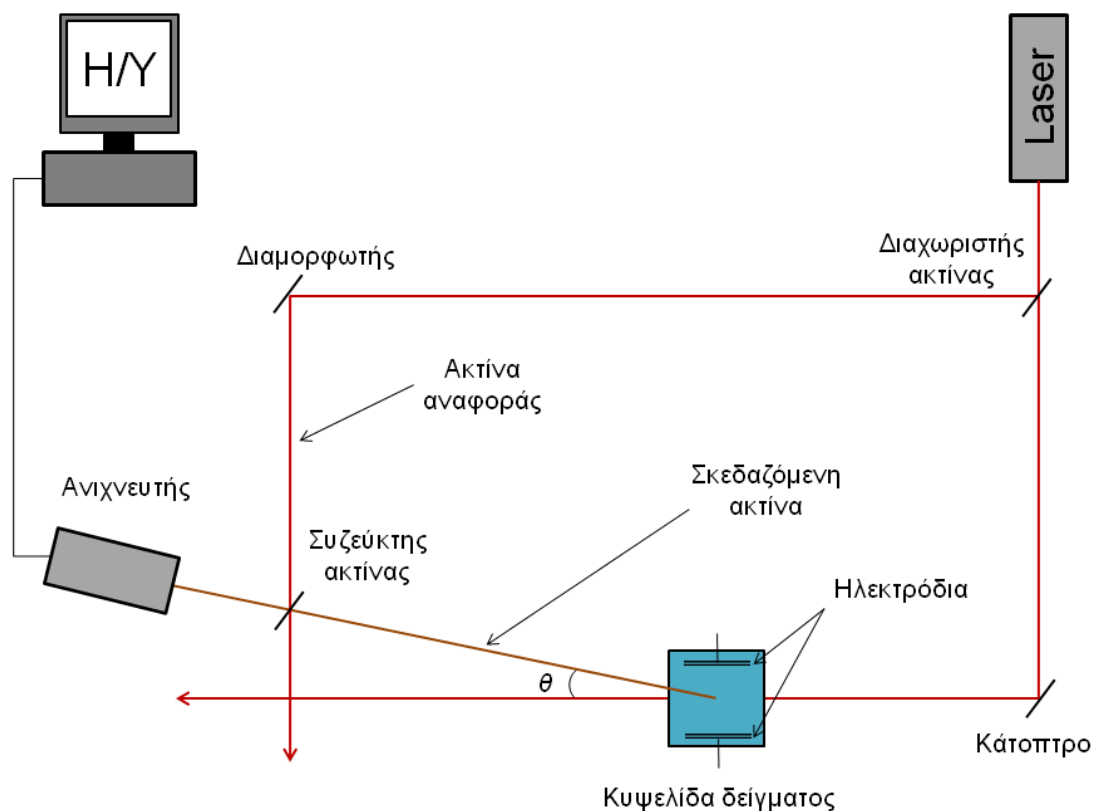
όπου φ η γωνία μεταξύ των διανυσμάτων ταχύτητας και σκέδασης, η οποία στη συγκεκριμένη περίπτωση ($\vec{I}_0 \perp \vec{E}$ και $\vec{E} \parallel \vec{v}$) είναι ίση με $\theta/2$, με θ τη γωνία σκέδασης. Οπότε η σχέση (2.20) σε συνδυασμό και με τη σχέση (2.5) μετασχηματίζεται σε:

$$\Delta\nu = \frac{2n\nu}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \cos\left(\frac{\theta}{2}\right) = \frac{n\nu}{\lambda} \sin\theta \quad (2.21)$$

Αρα μετρώντας τη μεταβολή $\Delta\nu$ υπολογίζεται η ταχύτητα v και μέσω αυτής, με χρήση των εξισώσεων (2.17) και (2.18), το δυναμικό ζήτα.

2.1.1.5. Πειραματική διάταξη ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός

Η σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός (Brookhaven, μοντέλο ZetaPlus), παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.3.



Σχήμα 2.3: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός.

Η διάταξη αποτελείται από μία πηγή laser στερεής κατάστασης με μήκος κύματος $\lambda = 660 \text{ nm}$ και ισχύ 35 mW , ένα διαχωριστή ακτίνας ο οποίος διαχωρίζει την ακτίνα του laser στις ακτίνες πρόσπτωσης και αναφοράς, την κυψελίδα του

δείγματος, το σύστημα των ηλεκτροδίων το οποίο τοποθετείται μέσα στην κυψελίδα και εφαρμόζει το εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο, ένα διαμορφωτή ο οποίος μετατρέπει τη συχνότητα της ακτίνας αναφοράς, έτσι ώστε να είναι συγκρίσιμη με τη μετατόπιση συχνότητας κατά Doppler που έχει υποστεί η σκεδαζόμενη ακτίνα, ένα συζεύκτη ακτίνας ο οποίος συνδυάζει τη σκεδαζόμενη ακτίνα στις 15° με την ακτίνα αναφοράς και τον ανιχνευτή ο οποίος παρέχει τα δεδομένα σε έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή (H/Y), μέσω του οποίου πραγματοποιείται ο έλεγχος της πειραματικής διάταξης.

2.1.2. Φασματοσκοπικές μέθοδοι

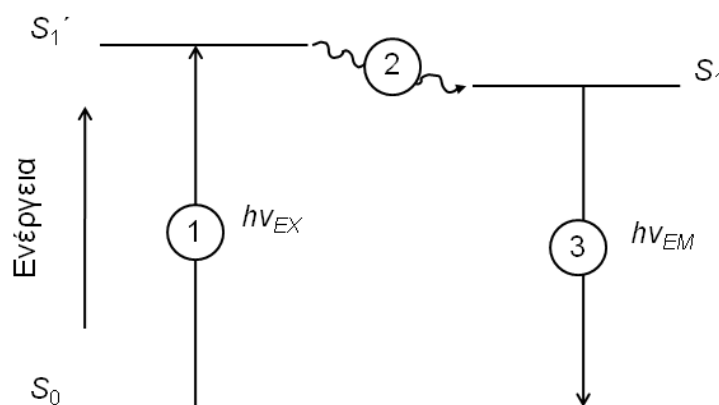
Πλήθος φασματοσκοπικών τεχνικών είναι διαθέσιμο για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ της ύλης και της ακτινοβολούμενης ενέργειας, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για τη δομή της ύλης σε ατομικό και μοριακό επίπεδο. Κατά την αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με το υπό μελέτη δείγμα, η ενέργεια της ακτινοβολίας μεταφέρεται στα μόρια του δείγματος προκαλώντας συνήθως το συντονισμό τους, δηλαδή τη σύζευξη μεταξύ δύο διαφορετικών ιδιοκαταστάσεων ενέργειας του συστήματος. Μάλιστα, η σύζευξη αυτή είναι ισχυρότερη όταν η ενέργεια ή η συχνότητα της ακτινοβολίας είναι ίση με τη διαφορά ενέργειας ή συχνότητας των δύο ιδιοκαταστάσεων. Εφόσον οι ιδιοκαταστάσεις ενέργειας είναι χαρακτηριστικές του κάθε μορίου, η απόκριση του συστήματος συναρτήσει της ακτινοβολούμενης ενέργειας, η οποία εκφράζεται μέσω της συχνότητας της ακτινοβολίας, καθιστά δυνατή την ταυτοποίηση των μορίων καθώς και την εξαγωγή πληροφοριών σχετικά με τη δομή του δείγματος.

2.1.2.1. Φασματοσκοπία φθορισμού

Η τεχνική της φασματοσκοπίας φθορισμού (fluorescence spectroscopy)^{204, 205} βασίζεται στο φαινόμενο του φθορισμού, δηλαδή την εκπομπή ακτινοβολίας από ένα διεγερμένο μόριο. Γενικά, όταν ένα μόριο που βρίσκεται στη θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση αλληλεπιδρά με ακτινοβολία κατάλληλης συχνότητας, το μόριο απορροφά την ακτινοβολούμενη ενέργεια και διεγείρεται, δηλαδή μεταπίπτει σε υψηλότερη ενεργειακή στάθμη. Η διέγερση αυτή διατηρείται για μικρό χρονικό διάστημα, καθώς το μόριο αποβάλλει την απορροφημένη ενέργεια είτε υπό μορφή θερμότητας, είτε μέσω εκπομπής ακτινοβολίας και επιστρέφει στη θεμελιώδη κατάσταση. Η αποδιέγερση του μορίου μέσω εκπομπής ακτινοβολίας, ονομάζεται

φωταύγεια και όταν συμβαίνει σε σύντομο χρονικό διάστημα (10^{-9} - 10^{-6} s) από τη στιγμή της διέγερσης, χαρακτηρίζεται ως φθορισμός.

Πιο αναλυτικά, το φαινόμενο του φθορισμού μπορεί να περιγραφεί ως μία διαδικασία τριών σταδίων, η οποία αναπαρίσταται σχηματικά στο απλοποιημένο διάγραμμα Jablonski (Σχήμα 2.4). Κατά το πρώτο στάδιο, ένα φωτόνιο ενέργειας $h\nu_{EX}$, το οποίο παρέχεται από μία εξωτερική πηγή ακτινοβολίας, απορροφάται από το μόριο που βρίσκεται στη θεμελιώδη ηλεκτρονιακή κατάσταση S_0 . Αποτέλεσμα της απορρόφησης αυτής, είναι η μετάβαση ενός ηλεκτρονίου από τη θεμελιώδη κατάσταση S_0 στη πρώτη διεγερμένη ηλεκτρονιακή απλή κατάσταση S_1' . Κάθε ηλεκτρονιακή κατάσταση διαχωρίζεται σε επιμέρους δονητικά επίπεδα και η μετάβαση συνήθως πραγματοποιείται στο υψηλότερο ενεργειακά δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης κατάστασης (S_1'). Στο δεύτερο στάδιο, κατά τη διάρκεια ζωής της διεγερμένης κατάστασης, το μόριο χάνει ενέργεια λόγω των αλλαγών της διαμόρφωσής του ή των συγκρούσεων με τα μόρια του περιβάλλοντός του. Η απώλεια της ενέργειας αυτής, οδηγεί στη μετάβαση του ηλεκτρονίου από το υψηλότερο στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης κατάστασης S_1 και η διαδικασία αυτή καλείται δονητική επαναφορά. Τέλος, στο τρίτο στάδιο λαμβάνει χώρα η αποδιέγερση του μορίου, δηλαδή η μετάπτωση του ηλεκτρονίου από το χαμηλότερο ενεργειακά δονητικό επίπεδο της κατάστασης S_1 στη θεμελιώδη κατάσταση S_0 με παράλληλη εκπομπή ακτινοβολίας ενέργειας $h\nu_{EM}$.



Σχήμα 2.4: Απλοποιημένο διάγραμμα Jablonski, το οποίο αναπαριστά σχηματικά τις τρεις επιμέρους διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά το φαινόμενο του φθορισμού.

Λόγω της δονητικής επαναφοράς, η ενέργεια της ακτινοβολίας εκπομπής $h\nu_{EM}$ είναι μικρότερη της ακτινοβολίας διέγερσης $h\nu_{EX}$, ή ισοδύναμα η ακτινοβολία εκπομπής μετατοπίζεται προς μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με την

ακτινοβολία διέγερσης και η διαφορά αυτή καλείται μετατόπιση Stokes. Η μετατόπιση Stokes ευθύνεται για την ευαισθησία των φασματοσκοπικών τεχνικών φθορισμού, καθώς επιτρέπει την ανίχνευση της ακτινοβολίας εκπομπής ανεξάρτητα από την ακτινοβολία διέγερσης.

Επίσης, επειδή οι μεταπτώσεις από τη θεμελιώδη κατάσταση S_0 στη διεγερμένη κατάσταση S_1 και αντίθετα, μπορούν να πραγματοποιηθούν σε οποιοδήποτε δονητικό επίπεδο της κάθε κατάστασης, στην πράξη καταγράφεται η κατανομή των ενεργειών $h\nu_{EX}$ και $h\nu_{EM}$, η οποία αποτελεί το φάσμα διέγερσης και εκπομπής, αντίστοιχα. Πειραματικά, το φάσμα εκπομπής λαμβάνεται με διέγερση σε καθορισμένο μήκος κύματος και καταγραφή της έντασης φθορισμού συναρτήσει του μήκους κύματος, ενώ το φάσμα διέγερσης 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.

Το φαινόμενο του φθορισμού επηρεάζεται από πλήθος παραγόντων. Ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες είναι η δομή του μορίου, η οποία πρέπει να είναι τέτοια ώστε να επιτρέπει τις ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις στις οποίες οφείλεται το φαινόμενο. Για το λόγο αυτό φθορισμό εμφανίζουν κυρίως ενώσεις που περιέχουν αρωματικούς δακτυλίους. Επίσης σημαντική είναι η φύση του διαλύτη και συγκεκριμένα η πολικότητά του. Όσο πιο πολικός είναι ο διαλύτης, τόσο πιο έντονο είναι το φαινόμενο του φθορισμού. Εξαιτίας του γεγονότος αυτού, η φασματοσκοπία φθορισμού εφαρμόζεται σε μελέτες της πολικότητας του περιβάλλοντος των φθοριζόντων μορίων. Τέλος, άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν το φθορισμό είναι η θερμοκρασία, το pH και η συγκέντρωση του διαλύματος. Μάλιστα, όσον αφορά τη συγκέντρωση του διαλύματος, η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης για αραιά διαλύματα, ενώ για πυκνά διαλύματα η εξάρτηση γίνεται πολυωνυμική.

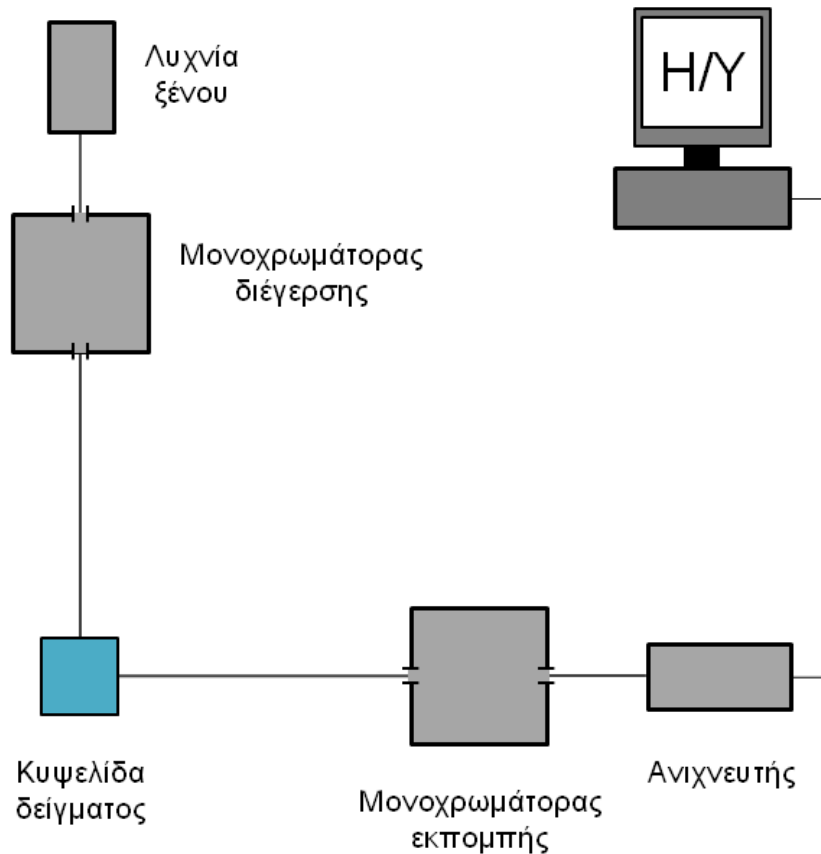
Στην περίπτωση ουσιών που δεν εμφανίζουν φθορισμό, είναι δυνατή η χρήση μοριακών φθοριζόντων ιχνηθετών για τη μελέτη κυρίως της διαμόρφωσης της ουσίας, μέσω του φάσματος φθορισμού του ιχνηθέτη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το πυρένιο, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για τη διερεύνηση της διαμόρφωσης πολυμερικών αλυσίδων σε διάλυμα. Το πυρένιο είναι ένα εξαιρετικά υδρόφοβο μόριο και για το λόγο αυτό σε ένα σύστημα το οποίο αποτελείται από υδρόφοβες και υδρόφιλες περιοχές, όπως για παράδειγμα μία πολυμερική αλυσίδα

που αποτελείται από υδρόφιλες και υδρόφοβες ομάδες ή συστάδες σε υδατικό διάλυμα, το πυρένιο εντοπίζεται στις υδρόφοβες περιοχές. Επιπροσθέτως, το φάσμα φθορισμού του πυρενίου, το οποίο λαμβάνεται με διέγερση στα 335 nm, επηρεάζεται σημαντικά από την πολικότητα του περιβάλλοντος του. Συγκεκριμένα, ο χαρακτηριστικός λόγος της έντασης της πρώτης κορυφής περί τα 372 nm προς την ένταση της τρίτης κορυφής περί τα 383 nm, I_1/I_3 , που εξάγεται από το φάσμα εκπομπής του πυρενίου, χρησιμοποιείται ως ένδειξη της πολικότητας του περιβάλλοντός του. Μέσω του λόγου I_1/I_3 καθίσταται δυνατή η εξαγωγή σημαντικών πληροφοριών αναφορικά με τη διαμόρφωση μίας πολυμερικής αλυσίδας σε υδατικό διάλυμα, την ύπαρξη υδρόφοβων περιοχών, καθώς και το μέγεθος ή/και τον αριθμό τους.

Μία άλλη εφαρμογή της φασματοσκοπίας φθορισμού αφορά τη μελέτη της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών.^{206, 207} Πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν τα αμινοξέα τρυπτοφάνη, τυροσίνη και φαινυλαλανίνη εμφανίζουν εγγενή φθορισμό. Από τα τρία αυτά αρωματικά αμινοξέα, η τρυπτοφάνη παρουσιάζει τον ισχυρότερο φθορισμό με το μεγαλύτερο συντελεστή κβαντικής απόδοσης, ο οποίος ορίζεται ως ο λόγος του αριθμού των εκπεμπόμενων φωτονίων προς τον αντίστοιχο αριθμό των απορροφούμενων φωτονίων. Για το λόγο αυτό, κατά τις πειραματικές μετρήσεις φασματοσκοπίας φθορισμού πρωτεϊνικών δειγμάτων, συνήθως επιλέγεται η εκλεκτική διέγερση του μορίου της τρυπτοφάνης, χρησιμοποιώντας ακτινοβολία διέγερσης μήκους κύματος 295 nm. Το φάσμα εκπομπής της τρυπτοφάνης εμφανίζει μία κορυφή στην περιοχή των 300-400 nm, της οποίας η ένταση και η θέση του μεγίστου επηρεάζονται σημαντικά από την πολικότητα του περιβάλλοντος του αμινοξέος. Συγκεκριμένα, όσο πιο υδρόφοβο είναι το περιβάλλον της τρυπτοφάνης τόσο πιο ισχυρή είναι η ένταση φθορισμού και χαμηλότερο το μήκος κύματος του μεγίστου. Επομένως, μέσω του φάσματος φθορισμού ενός πρωτεϊνικού δείγματος εξάγονται σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης και την πιθανή αποδιάταξή της, καθώς η αποδιάταξη της πρωτεΐνης έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του περιβάλλοντος των μορίων της τρυπτοφάνης. Στην περίπτωση της εγγενούς διαμόρφωσης, τα μόρια της τρυπτοφάνης βρίσκονται στο υδρόφοβο περιβάλλον του εσωτερικού της πρωτεΐνης, ενώ κατά την πλήρη ή μερική αποδιάταξη της πρωτεΐνης έρχονται σε επαφή με το υδρόφιλο περιβάλλον του διαλύτη και η αλλαγή αυτή καταγράφεται στο φάσμα φθορισμού.

2.1.2.2. Πειραματική διάταξη φασματοσκοπίας φθορισμού

Η πειραματική διάταξη φθορισμομετρίας που χρησιμοποιήθηκε (Jobin Yvon-Spex, μοντέλο Fluorolog-3, FL3-21), διαθέτει ως πηγή ακτινοβολίας μία λυχνία ξένου η οποία παρέχει ακτινοβολία στην περιοχή 250-700 nm. Μέσω ενός μονοχρωμάτορα διέγερσης πραγματοποιείται η ανάλυση της πολυχρωματικής ακτινοβολίας με τη χρήση διπλού φράγματος περίθλασης και παραγωγή μονοχρωματικής ακτινοβολίας. Η μονοχρωματική ακτινοβολία κατευθύνεται στην κυψελίδα του δείγματος και η εκπεμπόμενη ακτινοβολία ανιχνεύεται στις 90°, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η ανίχνευση της ακτινοβολίας διέγερσης (παράσιτη ακτινοβολία). Η ακτινοβολία εκπομπής, μετά τη διέλευση από ένα μονοχρωμάτορα εκπομπής μονού φράγματος περίθλασης, φθάνει στον ανιχνευτή ο οποίος είναι ένας φωτοπολλαπλασιαστής που καταγράφει την ένταση της ακτινοβολίας και παρέχει τα δεδομένα σε έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Στην είσοδο και την έξοδο κάθε μονοχρωμάτορα υπάρχουν σχισμές διέλευσης ακτινοβολίας μεταβλητού εύρους, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη ρύθμιση της ευαισθησίας και της διακριτικής ικανότητας της τεχνικής. Η σχηματική αναπαράσταση της διάταξης παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.5.



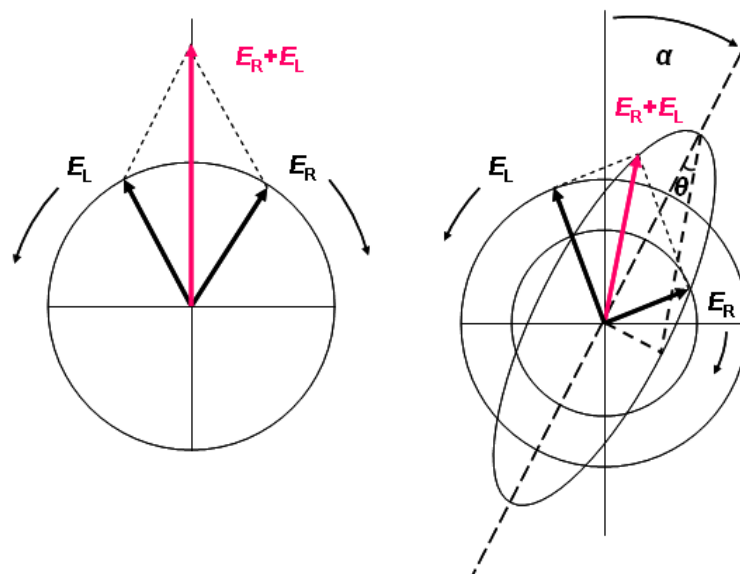
Σχήμα 2.5: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης φασματοσκοπίας φθορισμού.

Για τη μελέτη πολυμερικών διαλυμάτων με χρήση ιχνηθέτη πυρενίου, το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης επιλέχθηκε στα 335 nm και η καταγραφή του φάσματος εκπομπής πραγματοποιήθηκε στην περιοχή 350-700 nm. Η προσθήκη του ιχνηθέτη στα πολυμερικά διαλύματα πραγματοποιήθηκε μέσω της προσθήκης κατάλληλης ποσότητας διαλύματος πυρενίου σε ακετόνη και μετά την εξάτμιση της ακετόνης τα διαλύματα αφέθηκαν 24 ώρες, ώστε να επιτευχθεί εξισορρόπηση. Η τελική συγκέντρωση του πυρενίου ήταν της τάξης του 1 μM . Αντίστοιχα, για τη μελέτη πρωτεϊνικών διαλυμάτων επιλέχθηκε ακτινοβολία διέγερσης με μήκος κύματος 295 nm και το φάσμα εκπομπής καταγράφηκε στην περιοχή 350-500 nm. Η καταγραφή των φασμάτων εκπομπής και στις δύο περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε ανά 1 nm, με χρόνο ολοκλήρωσης 0.5 s, ενώ το εύρος των σχισμών διέλευσης ορίστηκε στο 1 nm.

2.1.2.3. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού

Η τεχνική της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού (Circular Dichroism, CD, spectroscopy) χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη της δομής και της διαμόρφωσης βιολογικών μακρομορίων, όπως οι πρωτεΐνες και βασίζεται στην οπτική ενεργότητα ορισμένων ουσιών.^{208, 209} Ως οπτικά ενεργές χαρακτηρίζονται οι ουσίες οι οποίες μεταβάλλουν το επίπεδο πόλωσης του γραμμικά πολωμένου φωτός που διέρχεται μέσω αυτών.

Το γραμμικά πολωμένο φως μπορεί να αναλυθεί σε δύο κυκλικά πολωμένες συνιστώσες ίδιου πλάτους και φάσης αλλά αντίθετης φοράς, δηλαδή σε δεξιόστροφα και αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένο φως. Οι οπτικά ενεργές ουσίες εμφανίζουν διαφορετικό δείκτη διάθλασης n καθώς και μοριακό συντελεστή απορρόφησης ϵ για κάθε μία από τις κυκλικά πολωμένες συνιστώσες του φωτός και οι ιδιότητες αυτές ορίζονται ως κυκλική διπλοθλαστικότητα και κυκλικός διχρωισμός, αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, όταν γραμμικά πολωμένο φως έντασης E διέρχεται μέσω μίας οπτικά ενεργής ουσίας, οι συνιστώσες E_R και E_L του δεξιόστροφα και αριστερόστροφα πολωμένου φωτός παρουσιάζουν διαφορά τόσο φάσης, λόγω της κυκλικής διπλοθλαστικότητας, όσο και πλάτους, λόγω του κυκλικού διχρωισμού. Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη στρέψη του επιπέδου πόλωσης του φωτός κατά γωνία α και τη μετατροπή του επιπέδου πόλωσης από γραμμικό σε ελλειπτικό, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.6.



Σχήμα 2.6: Σχηματική αναπαράσταση της στρέψης του επιπέδου πόλωσης του φωτός και της μετατροπής του από επίπεδα πολωμένο σε ελλειπτικά πολωμένο, κατά τη διέλευση μέσω οπτικά ενεργών ουσιών.

Η τεχνική της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού μετρά, συναρτήσει του μήκους κύματος λ , τη διαφορά απορρόφησης των κυκλικά πολωμένων συνιστωσών του φωτός, η οποία ορίζεται ως:

$$\Delta A = A_R - A_L \quad (2.22)$$

όπου οι δείκτες R και L αντιστοιχούν στη δεξιόστροφη και αριστερόστροφη κυκλική πόλωση και συνδέεται με τη διαφορά των μοριακών συντελεστών απορρόφησης μέσω του νόμου Beer-Lambert:

$$\Delta A = (\varepsilon_R - \varepsilon_L)Cl = \Delta\varepsilon Cl \quad (2.23)$$

όπου C η μοριακή κατ' όγκο συγκέντρωση του δείγματος, l το μήκος της οπτικής διαδρομής σε cm και η διαφορά $\Delta\varepsilon$ ορίζεται ως ο μοριακός κυκλικός διχρωισμός.

Εναλλακτικά, ο κυκλικός διχρωισμός μπορεί να εκφραστεί ως η ελλειπτικότητα του επιπέδου πόλωσης του φωτός, η οποία ορίζεται μέσω της γωνίας θ , όπου:

$$\tan \theta = \frac{E_R - E_L}{E_R + E_L} \quad (2.24)$$

και επειδή η εφαπτομένη της γωνίας θ είναι συνήθως μικρή, μπορεί να θεωρηθεί ίση με τη γωνία θ σε ακτίνια.

Με μετατροπή των εντάσεων του ηλεκτρικού πεδίου σε εντάσεις ακτινοβολίας

και κατάλληλη ανάπτυξη, καθώς και μετατροπή της γωνίας θ σε μοίρες η σχέση (2.24) μετασχηματίζεται σε:

$$\theta = \Delta A \left(\frac{\ln 10}{4} \right) \left(\frac{180}{\pi} \right) \quad (2.25)$$

Στην πράξη χρησιμοποιείται η μοριακή ελλειπτικότητα $[\theta]$ ώστε να εξαλειφθούν οι επιδράσεις της συγκέντρωσης του δείγματος C και του μήκους της οπτικής διαδρομής l , όπου:

$$[\theta] = \frac{100\theta}{Cl} \quad (2.26)$$

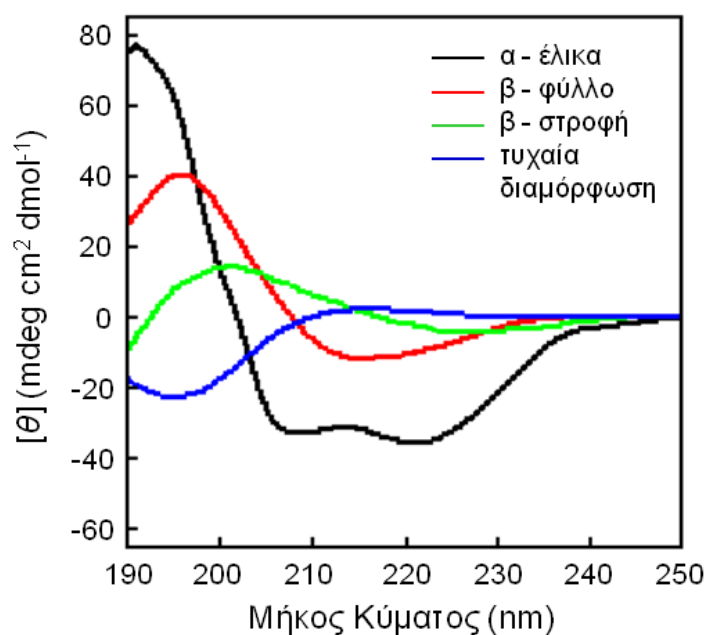
Μέσω των σχέσεων (2.23), (2.25) και (2.26) εξάγεται η σχέση που συνδέει τη μοριακή ελλειπτικότητα με το μοριακό κυκλικό διχρωισμό:

$$[\theta] = 100 \Delta \varepsilon \left(\frac{\ln 10}{4} \right) \left(\frac{180}{\pi} \right) = 3298.2 \Delta \varepsilon \quad (2.27)$$

Μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού είναι η μελέτη της δομής και της διαμόρφωσης βιολογικών μορίων και ιδιαίτερα πρωτεϊνών. Όπως προαναφέρθηκε, μία ουσία εμφανίζει το φαινόμενο του κυκλικού διχρωισμού όταν είναι οπτικά ενεργή, δηλαδή διαθέτει κατάλληλες ομάδες οι οποίες είτε είναι ασύμμετρες, είτε βρίσκονται σε ασύμμετρο περιβάλλον. Στην περίπτωση των πρωτεϊνών μία τέτοια ομάδα είναι ο πεπτιδικός δεσμός, το περιβάλλον του οποίου είναι ασύμμετρο και αποτελεί άμεση συνέπεια της δευτεροταγούς δομής του μορίου. Ως αποτέλεσμα το φάσμα κυκλικού διχρωισμού μίας πρωτεΐνης στην περιοχή του άπω υπεριώδους (190-250 nm), όπου κυριαρχεί η συνεισφορά του πεπτιδικού δεσμού, χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της δευτεροταγούς δομής του μορίου. Κάθε μία από τις χαρακτηριστικές δευτεροταγείς δομές του πρωτεϊνικού μορίου, όπως η α -έλικα, το β -φύλλο, η β -στροφή και η τυχαία διαμόρφωση, εμφανίζει χαρακτηριστικές κορυφές στο φάσμα κυκλικού διχρωισμού, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.7.

Συγκεκριμένα το φάσμα της α -έλικας εμφανίζει δύο αρνητικές κορυφές περί τα 222 και 208 nm και μία ισχυρή θετική περί τα 190 nm, του β -φύλλου μία ευρεία αρνητική κορυφή περί τα 215 nm και μία θετική περί τα 195 nm, της β -στροφής μία ευρεία ασθενή αρνητική κορυφή περί τα 225 nm και μία ισχυρότερη θετική περί τα 205 nm και τέλος, αυτό της τυχαίας διαμόρφωσης μία ισχυρή αρνητική κορυφή περί

τα 195 nm και μία ασθενή θετική κορυφή περί τα 215 nm.



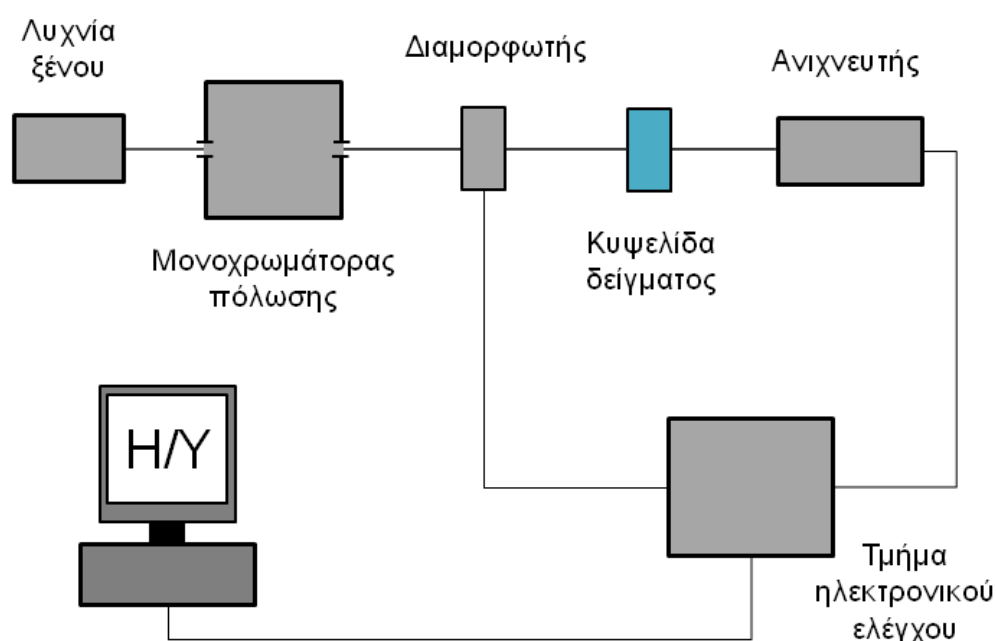
Σχήμα 2.7: Χαρακτηριστικά φάσματα κυκλικού διχρωισμού, στην περιοχή του άπω υπεριώδους, των διαφόρων δευτεροταγών δομών διαμόρφωσης ενός πρωτεϊνικού μορίου.

Εφόσον κάθε είδος δευτεροταγούς δομής αντιστοιχεί σε ένα χαρακτηριστικό φάσμα κυκλικού διχρωισμού και με βάση την υπόθεση ότι το φάσμα μίας πρωτεΐνης μπορεί να θεωρηθεί ως ο γραμμικός συνδυασμός των φασμάτων των δευτεροταγών δομών που την αποτελούν, καθίσταται δυνατός ο ποσοστιαίος υπολογισμός των επιμέρους δευτεροταγών δομών πρωτεϊνικού δείγματος άγνωστης διαμόρφωσης, μέσω της ανάλυσης του φασματός του. Τα υπολογιστικά προγράμματα που εφαρμόζονται για την ανάλυση φασμάτων κυκλικού διχρωισμού, χρησιμοποιούν μαθηματικές μεθόδους ανάλυσης, ώστε να ανακατασκευάσουν ένα πειραματικό φάσμα, συνδυάζοντας φάσματα ενός συνόλου πρωτεϊνών αναφοράς γνωστής δομής, με όσο το δυνατόν μικρότερη απόκλιση από το προς ανάλυση φάσμα. Με τον τρόπο αυτό εξάγονται τα ποσοστά συμμετοχής των επιμέρους δομών στη συνολική διαμόρφωση του μορίου της πρωτεΐνης.^{210, 211}

2.1.2.4. Πειραματική διάταξη φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού

Η πειραματική διάταξη του φασματοπολωσίμετρου κυκλικού διχρωισμού που χρησιμοποιήθηκε (Jasco Corporation, μοντέλο Jasco-715), διαθέτει ως πηγή μία λυχνία ξένου, της οποίας η ακτινοβολία διέρχεται μέσω ενός διπλού μονοχρωμάτορα πόλωσης. Η εξερχόμενη γραμμικά πολωμένη ακτινοβολία μετατρέπεται σε κυκλικά

πολωμένη με τη χρήση ενός διαμορφωτή, κατευθύνεται στην κυψελίδα του δείγματος (κυψελίδα χαλαζία εύρους 1 mm) και τέλος ανιχνεύεται, μετά τη διέλευση από το δείγμα, με τη βοήθεια ενός φωτοπολλαπλασιαστή, ο οποίος μετατρέπει την ένταση της ακτινοβολίας σε ηλεκτρικό σήμα. Το τμήμα ηλεκτρονικού ελέγχου της διάταξης πραγματοποιεί ανάλυση του ηλεκτρικού σήματος που φτάνει στον φωτοπολλαπλασιαστή, σε συνιστώσες συνεχούς και εναλλασσόμενου ρεύματος. Εν συνεχεία, εξασφαλίζει τη σταθερότητα της συνιστώσας του συνεχούς, ενισχύει τη συνιστώσα του εναλλασσόμενου, της οποίας η συχνότητα είναι αυτή του διαμορφωτή και το πλάτος αποτελεί το μέτρο του κυκλικού διχρωισμού και τέλος τη μετατρέπει σε ψηφιακό σήμα, το οποίο παρέχεται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή που ελέγχει τη διάταξη. Η σχηματική αναπαράσταση της διάταξης παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.8.



Σχήμα 2.8: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού.

Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού αναλύθηκαν με χρήση του λογισμικού πακέτου CDPto,²¹² το οποίο παρέχει τα προγράμματα ανάλυσης: SELCON3 που χρησιμοποιεί τη μέθοδο της αυτο-συνέπειας (self-consistent method), CONTIN που χρησιμοποιεί τη μέθοδο ψευδο-ορθογώνιας παλινδρόμησης (ridge regression method) και CDSSTR το οποίο αποτελεί μετεξέλιξη του προγράμματος VARSLC που χρησιμοποιεί τη μέθοδο ανάλυσης ιδιαζουσών τιμών (singular value decomposition method) με δυνατότητα μεταβλητής επιλογής (variable selection), καθώς και με χρήση της ανάλυσης μέσω νευρωνικών δικτύων (neural network analysis) του προγράμματος K2D.²¹³ Συνήθως, τα αποτελέσματα που προέκυπταν από τις διάφορες

μεθόδους ήταν παρόμοια, οπότε τα ποσοστά των επιμέρους δευτεροταγών δομών των πρωτεϊνικών δειγμάτων υπολογίζονταν ως μέσοι όροι των αποτελεσμάτων όλων των μεθόδων.

2.1.2.5. Φασματοσκοπία υπερύθρου

Η τεχνική της φασματοσκοπίας υπερύθρου (infrared spectroscopy, IR) μελετά την αλληλεπίδραση της υπέρυθρης ακτινοβολίας με την ύλη και εξάγει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη δονητική κατάσταση των μορίων, μιας και η ενέργεια που απαιτείται για να πραγματοποιηθούν δονητικές μεταβάσεις στο μόριο αντιστοιχεί σε αυτή την περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.^{214, 215}

Για να καταστεί δυνατή η απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας και ο συντονισμός του μορίου, πρέπει η ενέργεια της ακτινοβολίας να ισούται με την ενέργεια των κανονικών τρόπων δόνησης του μορίου. Στην απλούστερη περίπτωση ενός διατομικού μορίου, η δόνηση του μορίου προσεγγίζεται με το μοντέλο του απλού αρμονικού ταλαντωτή και η ενέργεια των δονητικών επιπέδων του συστήματος δίνεται από τη σχέση:

$$E_{vib} = \left(n + \frac{1}{2} \right) h c \nu \quad (2.28)$$

όπου E_{vib} η ενέργεια ταλάντωσης του μορίου, n ο κβαντικός αριθμός ($n = 0, 1, 2, \dots$), h η σταθερά του Planck, c η ταχύτητα του φωτός και ν η συχνότητα ταλάντωσης του μορίου σε κυματάρητους (cm^{-1}), η οποία δίνεται από τη σχέση:

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.29)$$

όπου k η σταθερά δύναμης και μ η ανηγμένη μάζα του συστήματος, η οποία ορίζεται συναρτήσει των μαζών m_1 και m_2 των ατόμων του μορίου ως:

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (2.30)$$

Όπως φαίνεται από τη σχέση (2.28), η ενέργεια του συστήματος είναι κβαντισμένη και οι μόνες επιτρεπτές μεταβάσεις είναι αυτές μεταξύ δύο διαδοχικών δονητικών επιπέδων, για τις οποίες ικανοποιείται ο κανόνας επιλογής $\Delta E = h c \nu$ ή ισοδύναμα $\Delta n = \pm 1$. Από τις επιτρεπτές μεταβάσεις ενεργές στο υπέρυθρο είναι μόνο

αυτές που προκαλούν μεταβολή της διπολικής ροπής του μορίου και οδηγούν στην εμφάνιση κορυφής απορρόφησης με συχνότητα ν_0 στο φάσμα υπερύθρου.

Στην πραγματικότητα ένα διατομικό μόριο απέχει αρκετά από το μοντέλο του απλού αρμονικού ταλαντωτή και το σύστημα παρουσιάζει αναρμονικότητα. Ως αποτέλεσμα, είναι δυνατό να πραγματοποιηθούν μεταβάσεις μεταξύ μη διαδοχικών δονητικών επιπέδων και να οδηγήσουν στην εμφάνιση κορυφών απορρόφησης με συχνότητα $n\nu_0$ ($n = 2, 3, \dots$), οι οποίες ονομάζονται υπέρτονες. Επίσης είναι δυνατή η εμφάνιση κορυφών που προκύπτουν ως γραμμικός συνδυασμός κανονικών τρόπων δόνησης με συχνότητα $n_1\nu_1 \pm n_2\nu_2$.

Στην περίπτωση ενός πολυατομικού μορίου με N άτομα, ο αριθμός των κανονικών τρόπων δόνησης είναι ίσος με $3N - 6$ για μη γραμμικά μόρια και $3N - 5$ για γραμμικά μόρια και χωρίζονται σε δονήσεις έκτασης και κάμψης. Οποιαδήποτε δόνηση του μορίου μπορεί να περιγραφεί ως γραμμικός συνδυασμός των κανονικών τρόπων δόνησης, όμως δεν οδηγούν όλοι οι κανονικοί τρόποι δόνησης στην εμφάνιση κορυφών απορρόφησης, είτε λόγω ενεργειακού εκφυλισμού, είτε λόγω του ότι δεν προκαλείται αλλαγή της διπολικής ροπής του μορίου.

Ανάλογα με τη φυσική κατάσταση του προς μελέτη δείγματος, χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές για τη μέτρηση του φάσματος υπερύθρου. Η πλέον διαδεδομένη είναι αυτή της διαπερατότητας, η οποία χρησιμοποιείται όταν το δείγμα μπορεί να παρασκευαστεί υπό τη μορφή λεπτού φιλμ ή να διασπαρεί υπό τη μορφή σκόνης σε αδρανές υλικό. Κατά τη μέτρηση του φάσματος η υπέρυθρη ακτινοβολία διέρχεται κάθετα από το συνολικό πάχος του δείγματος και κατευθύνεται σε κατάλληλο ανιχνευτή. Οπότε το φάσμα υπερύθρου καταγράφεται ως η μεταβολή της διαπερατότητας T , η οποία ορίζεται από το λόγο της διερχόμενης προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία, συναρτήσει της συχνότητας ν εκφρασμένης σε κυματαριθμούς (cm^{-1}). Η απορρόφηση του δείγματος A συνδέεται με την διαπερατότητα T μέσω της σχέσης:

$$A = -\log T \quad (2.31)$$

και δίνεται από το νόμο Beer-Lambert:

$$A = \varepsilon C d \quad (2.32)$$

όπου ε ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης, C η συγκέντρωση και d το πάχος του

δείγματος, αντίστοιχα.

Μία εναλλακτική τεχνική είναι αυτή της αποσβεννύμενης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance, ATR), η οποία καθιστά δυνατή τη μέτρηση του δείγματος υπό οποιαδήποτε μορφή (στερεό ή υγρό) χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Η τεχνική ATR εφαρμόζεται συνήθως στην φασματική περιοχή του μέσου υπέρυθρου (από 4000 έως 400 cm^{-1}) και αποτελεί ένα είδος τεχνικής ολικής εσωτερικής ανάκλασης, στην οποία το δείγμα τοποθετείται σε επαφή με ένα στοιχείο εσωτερικής ανάκλασης (Internal Reflection Element, IRE), το οποίο είναι ένας κρύσταλλος διαφανής στο υπέρυθρο με υψηλό δείκτη διάθλασης. Η υπέρυθρη ακτινοβολία εισέρχεται στον κρύσταλλο, προσπίπτει στη διεπιφάνεια μεταξύ του κρυστάλλου και του δείγματος υπό γωνία θ , μεγαλύτερη της κρίσιμης γωνίας θ_c , ώστε να ανακλαστεί ολικά, εξέρχεται από τον κρύσταλλο και κατευθύνεται σε κατάλληλο ανιχνευτή. Η κρίσιμη γωνία θ_c ορίζεται ως:

$$\theta_c = \sin^{-1} \frac{n_2}{n_1} \quad (2.33)$$

όπου n_1 και n_2 οι δείκτες διάθλασης του κρυστάλλου και του δείγματος αντίστοιχα, με $n_1 > n_2$.

Κατά την ανάκλαση δημιουργείται ένα στάσιμο κύμα στο πυκνό μέσο (κρύσταλλος), το οποίο όταν μεταβαίνει στο αραιό μέσο (δείγμα) μετατρέπεται σε αποσβεννύμενο κύμα με ένταση ηλεκτρικού πεδίου E , η οποία μειώνεται εκθετικά συναρτήσει της απόστασης από τη μεσεπιφάνεια μέσω της σχέσης:

$$E = E_0 \exp\left(-\frac{z}{d_p}\right) \quad (2.34)$$

όπου E_0 η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου στη μεσεπιφάνεια, z η απόσταση από τη μεσεπιφάνεια και d_p το βάθος διείσδυσης (penetration depth) του αποσβεννύμενου κύματος στο αραιό μέσο, το οποίο ορίζεται ως η απόσταση στην οποία η ένταση του αποσβεννύμενου κύματος πέφτει στο $1/e$ της έντασης στη μεσεπιφάνεια και δίνεται από τη σχέση:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \theta - (n_2/n_1)^2}} \quad (2.35)$$

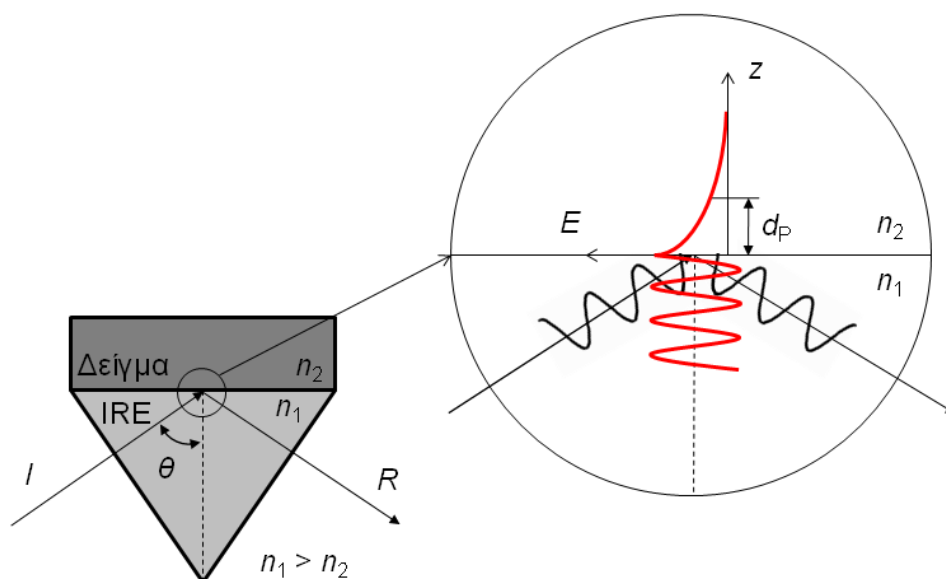
όπου λ το μήκος κύματος της υπέρυθρης ακτινοβολίας.

Το αποσβεννύμενο κύμα αλληλεπιδρά με το δείγμα και ανακλάται εξασθενημένο λόγω της μερικής απορρόφησής του. Συνεπώς, η τεχνική ATR μετρά την ανακλαστικότητα R του εξασθενημένου κύματος η οποία δίνεται μέσω της σχέσης:

$$R = 1 - \varepsilon C d_E \quad (2.36)$$

όπου d_E το ενεργό πάχος (effective depth) του δείγματος, το οποίο ορίζεται ως το πάχος του δείγματος που στην αντίστοιχη μέτρηση διαπερατότητας θα απέδιδε την ίδια απορρόφηση, είναι ανάλογο του βάθους διείσδυσης d_p και εξαρτάται από τη γεωμετρία της διάταξης.

Η σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου της ολικής ανάκλασης παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.9, όπου αναπαρίστανται ο κρύσταλλος εσωτερικής ανάκλασης (IRE) σε επαφή με το δείγμα, η εισερχόμενη (I) και η ανακλώμενη (R) ακτινοβολία, καθώς και σε μεγέθυνση η δημιουργία του στάσιμου κύματος, το αποσβεννύμενο κύμα και το βάθος διείσδυσης.



Σχήμα 2.9: Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου της ολικής ανάκλασης.

Το δονητικό φάσμα υπερέθρου, είναι χαρακτηριστικό για κάθε μόριο και παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την ενέργεια των δονήσεων του μορίου μέσω της συχνότητας εμφάνισης των κορυφών, τον πολικό χαρακτήρα της δόνησης μέσω της έντασης της κορυφής, το χημικό περιβάλλον των δεσμών μέσω του σχήματος της κορυφής και την πόλωση των δονήσεων, δηλαδή τον πιθανό

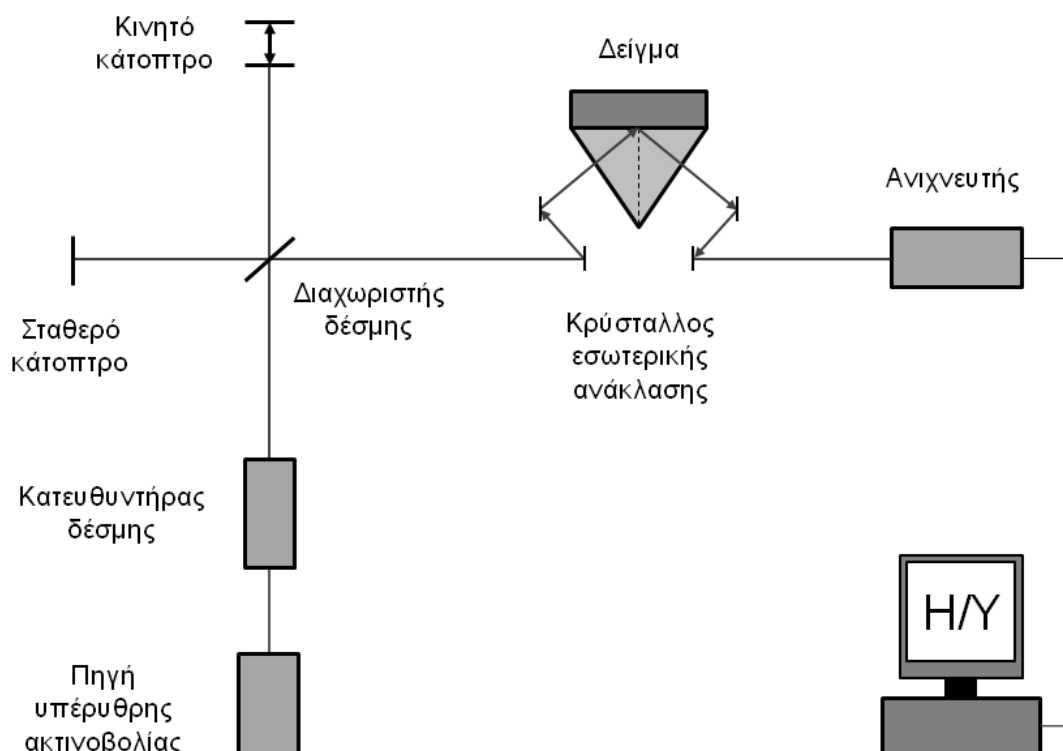
προσανατολισμό της διπολικής ροπής και κατ' επέκταση του μορίου.

Ειδικά στην περίπτωση των πρωτεϊνών, η φασματοσκοπία υπερύθρου χρησιμοποιείται για τη μελέτη της δευτεροταγούς δομής του μορίου.^{216, 217} Οι κύριες χαρακτηριστικές κορυφές ενός πρωτεϊνικού δείγματος είναι οι κορυφές Amide I και II, οι οποίες εμφανίζονται στις περιοχές 1700-1600 και 1600-1500 cm^{-1} , αντίστοιχα και δεν επικαλύπτονται από δονήσεις των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων. Η κορυφή Amide I προέρχεται κατά 80 % από τη δόνηση έκτασης του δεσμού C=O και κατά 20 % από τη δόνηση έκτασης του δεσμού C-N της πεπτιδικής ομάδας, ενώ η κορυφή Amide II προέρχεται από δονήσεις κάμψης του δεσμού N-H και έκτασης του δεσμού C-N. Καθώς κάθε είδος της δευτεροταγούς δομής του μορίου (α -έλικα, β -φύλλο ή β -στροφή), σχετίζεται με ένα χαρακτηριστικό μοτίβο δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ομάδων C=O και H-N, εμφανίζει αντιπροσωπευτικές κορυφές Amide I και II. Επομένως, με βάση τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των κορυφών αυτών του υπερύθρου φάσματος, όπως η συχνότητα εμφάνισης, η ένταση και η μορφή, εξάγονται σημαντικές πληροφορίες αναφορικά με τη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης.

2.1.2.6. Πειραματική διάταξη φασματοσκοπίας υπερύθρου

Η πειραματική διάταξη του φωτομέτρου υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier που χρησιμοποιήθηκε (Bruker, μοντέλο Equinox 55), διαθέτει πηγή υπερύθρου ακτινοβολίας η οποία εκπέμπει στην περιοχή του μέσου υπερύθρου. Η πολυχρωματική ακτινοβολία της πηγής διέρχεται από έναν κατευθυντήρα δέσμης και κατευθύνεται σε ένα συμβολόμετρο Michelson, αποτελούμενο από ένα διαχωριστή δέσμης, ένα σταθερό και ένα κινητό κάτοπτρο, το οποίο χρησιμοποιείται για την διαμόρφωση της συχνότητας της ακτινοβολίας. Στη συνέχεια η ακτινοβολία κατευθύνεται στη διάταξη της εσωτερικής ανάκλασης (SENSIR Technologies, μοντέλο Dura SamplIR II), η οποία αποτελείται από τα κατάλληλα κάτοπτρα, μία βάση που φέρει κρύσταλλο διαμαντιού με διάμετρο 1 mm, δείκτη διάθλασης $n_C = 2.41$ και κυματοδηγό ZnSe. Τέλος η ανακλώμενη ακτινοβολία οδηγείται σε κατάλληλο θερμοηλεκτρικό ανιχνευτή, ο οποίος παρέχει τα δεδομένα σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, όπου πραγματοποιείται ο μετασχηματισμός Fourier του σήματος και εξάγεται το φάσμα υπερύθρου. Στην περίπτωση της συγκεκριμένης διάταξης η χρήσιμη φασματική περιοχή είναι από 5000 έως 525 cm^{-1} . Η συλλογή των δεδομένων

γίνεται υπό ροή αζώτου στην οπτική διαδρομή των εξαρτημάτων ATR, έτσι ώστε να απομακρύνονται οι υδρατμοί και το διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας. Η σχηματική αναπαράσταση της διάταξης παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.10.



Σχήμα 2.10: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης φασματοσκοπίας υπερέυθρου.

Οι φασματοσκοπικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με διακριτική ικανότητα 2 cm^{-1} και κάθε φάσμα αποτελεί το μέσο όρο τριών διαδοχικών φασμάτων των 100 σαρώσεων. Η συλλογή των φασμάτων αφορούσε λεπτά φιλμ, τα οποία προέκυπταν από την εναπόθεση μικρής ποσότητας του εξεταζόμενου διαλύματος στην επιφάνεια του κρυστάλλου διαμαντιού και την εξάτμιση του διαλύτη υπό ροή αζώτου.

2.1.3. Θερμιδομετρικές μέθοδοι

Οι αλλαγές της διαμόρφωσης βιολογικών μακρομορίων, όπως οι πρωτεΐνες, οι οποίες πραγματοποιούνται είτε κατά τη θέρμανση του μορίου είτε κατά την αλληλεπίδρασή του με άλλα μόρια, συνδέονται με θερμοδυναμικά καθοδηγούμενες διαδικασίες. Για το λόγο αυτό η θερμοδυναμική μελέτη των φαινομένων αυτών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς παρέχει σημαντικές πληροφορίες αναφορικά με τις ενδομοριακές ή/και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα. Η καταγραφή των μεταβολών των θερμοδυναμικών παραμέτρων του συστήματος πραγματοποιείται με τη χρήση θερμιδομετρικών τεχνικών και έγκειται

στη μέτρηση της θερμότητας που απορροφάται ή εκλύεται από το σύστημα κατά την πραγματοποίηση των συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων.

2.1.3.1. Θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης

Η τεχνική της θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) ²¹⁸⁻²²³ χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση των θερμοδυναμικών παραμέτρων, κυρίως των αλληλεπιδράσεων πρόσδεσης μεταξύ βιολογικών μακρομορίων σε διάλυμα, οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό συμπλόκων. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην απευθείας μέτρηση της θερμότητας που απορροφάται ή εκλύεται κατά την πρόσδεση των μορίων, μέσω της οποίας πραγματοποιείται ο υπολογισμός της μεταβολής της ενθαλπίας ΔH του συστήματος, της σταθεράς πρόσδεσης K_B , και της στοιχειομετρίας N της αλληλεπίδρασης. Μέσω των παραμέτρων αυτών υπολογίζεται η μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας Gibbs ΔG και της εντροπίας ΔS του συστήματος, με χρήση των σχέσεων:

$$\Delta G = -RT \ln K_B = \Delta H - T \Delta S \quad (2.37)$$

όπου R η παγκόσμια σταθερά των αερίων και T η απόλυτη θερμοκρασία.

Οι θερμοδυναμικές αυτές παράμετροι παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με το μηχανισμό της αλληλεπίδρασης και τις δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των αλληλεπιδρώντων μορίων, είτε πρόκειται για δεσμούς υδρογόνου, δυνάμεις van der Waals, ηλεκτροστατικές ή/και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Η διεξαγωγή ενός πειράματος θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης πραγματοποιείται με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένου θερμιδόμετρου, το οποίο αποτελείται από δύο πανομοιότητες κυψελίδες δείγματος και αναφοράς σε σχήμα νομίσματος. Οι κυψελίδες είναι κατασκευασμένες από χημικά αδρανές υλικό υψηλής θερμικής αγωγιμότητας και περιβάλλονται από έναν αδιαβατικό κλωβό, του οποίου η θερμοκρασία ελέγχεται με τη χρήση υδατόλουτρου ελεγχόμενης θερμοκρασίας. Οι θερμοκρασιακές διαφορές μεταξύ των κυψελίδων αναφοράς και δείγματος καθώς και μεταξύ των κυψελίδων και του κλωβού, ανιχνεύονται με τη χρήση κυκλωμάτων ελέγχου θερμοστοιχείων υψηλής ευαισθησίας. Κατάλληλες θερμικές αντιστάσεις, προσαρτημένες στις κυψελίδες και στον κλωβό, ενεργοποιούνται όταν είναι απαραίτητο, έτσι ώστε το όλο σύστημα να διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία.

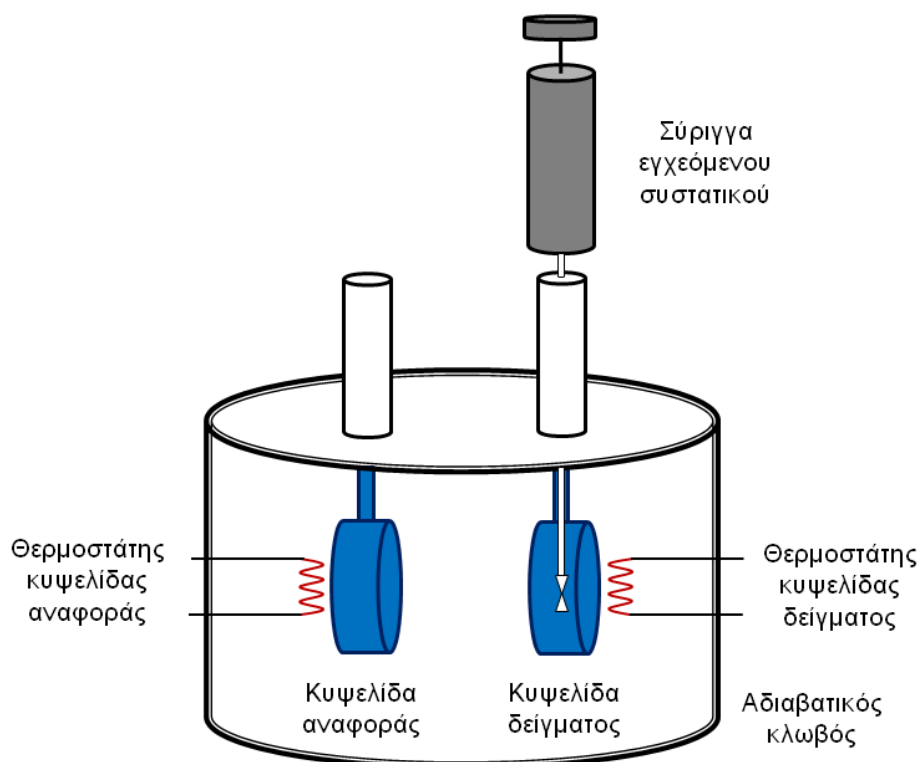
Κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, το διάλυμα ενός εκ των δύο

αλληλεπιδρώντων μορίων τοποθετείται στην κυψελίδα του δείγματος και με τη χρήση σύριγγας ακριβείας προστίθενται σε αυτό διαδοχικά μικρές ποσότητες του διαλύματος του δεύτερου αλληλεπιδρώντος συστατικού. Η θερμότητα που απορροφάται ή εκλύεται κατά την αλληλεπίδραση των δύο συστατικών σε κάθε έγχυση, μετράται διαφορικά σε σχέση με την κυψελίδα αναφοράς, η οποία περιέχει καθαρό διαλύτη. Η μέτρηση της θερμότητας της αλληλεπίδρασης πραγματοποιείται σε πραγματικό χρόνο, μέσω της παρεχόμενης ισχύος στην κυψελίδα του δείγματος, η οποία απαιτείται για τη διατήρηση σταθερής θερμοκρασιακής διαφοράς μεταξύ των δύο κυψελίδων. Ο χειρισμός της σύριγγας ακριβείας πραγματοποιείται μέσω ενός ηλεκτρομηχανικού συστήματος, ελεγχόμενο από ηλεκτρονικό υπολογιστή. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος υπάρχει η δυνατότητα ανάδευσης, μέσω της περιστροφής της σύριγγας η οποία φέρει κατάλληλα διαμορφωμένο άκρο, με σκοπό την επίτευξη ταχύτερης ανάμειξης του διαλύματος. Η σχηματική αναπαράσταση ενός θερμιδόμετρου ισόθερμης τιτλοδότησης παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.11α.

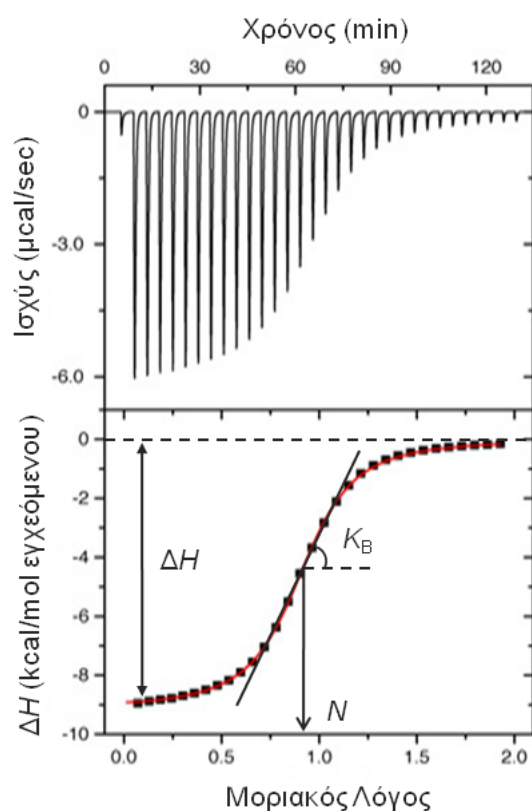
Τα αποτελέσματα του πειράματος καταγράφονται ως η ισχύς που παρέχεται στην κυψελίδα του δείγματος συναρτήσει του χρόνου και στην περίπτωση εξώθερμης αλληλεπίδρασης είναι της μορφής που παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.11β (επάνω). Σε κάθε έγχυση του διαλύματος του ενός συστατικού στο άλλο εκλύεται θερμότητα, η οποία μειώνεται με την πάροδο του χρόνου, καθώς μειώνεται ο αριθμός των διαθέσιμων θέσεων πρόσδεσης μεταξύ των αλληλεπιδρώντων μορίων και τελικά η παρατηρούμενη έκλυση θερμότητας αντιστοιχεί στη θερμότητα διάχυσης του εγχόμενου συστατικού στο διαλύτη. Η μεταβολή της ενθαλπίας του συστήματος που πραγματοποιείται σε κάθε έγχυση υπολογίζεται από το ολοκλήρωμα της κάθε κορυφής και με τον τρόπο αυτό κατασκευάζεται η καμπύλη της ισόθερμης τιτλοδότησης, δηλαδή το διάγραμμα της μεταβολής της ενθαλπίας ΔH συναρτήσει του μοριακού λόγου των δύο συστατικών, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.11β (κάτω).

Από τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της καμπύλης τιτλοδότησης και με εφαρμογή κατάλληλων μοντέλων πρόσδεσης, υπολογίζονται οι θερμοδυναμικές παράμετροι του συστήματος. Συγκεκριμένα η συνολική μεταβολή της ενθαλπίας του συστήματος ΔH δίνεται από το εύρος της καμπύλης, η σταθερά πρόσδεσης K_B από την κλίση της εφαπτομένης και η στοιχειομετρία της αλληλεπίδρασης N από τη θέση του σημείου καμπής.

α)



β)



Σχήμα 2.11: α) Σχηματική αναπαράσταση ενός θερμιδόμετρου ισόθερμης τιτλοδότησης και β) θερμιδομετρικά αποτελέσματα εκφρασμένα ως η μεταβολή της ισχύος συναρτήσει του χρόνου (επάνω), ή ως η μεταβολή της ενθαλπίας του συστήματος συναρτήσει του μοριακού λόγου των αλληλεπιδρώντων μορίων (κάτω).

2.1.3.2. Πειραματική διάταξη θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης

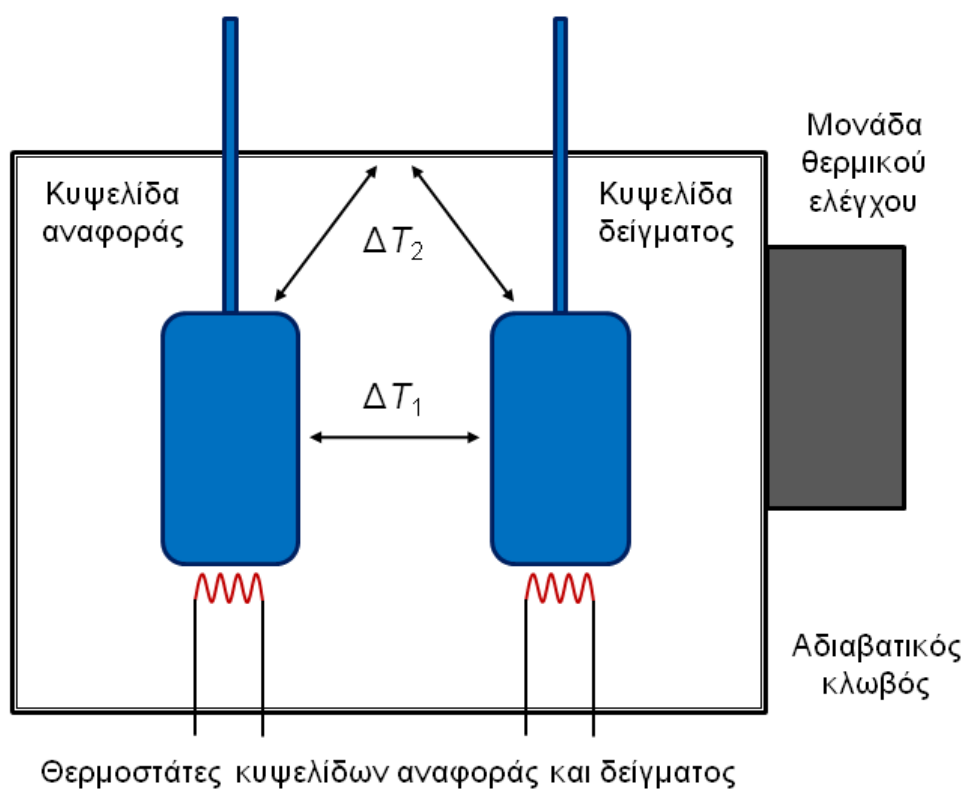
Οι πειραματικές μετρήσεις θερμιδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση κατάλληλου θερμιδόμετρου (Microcal, μοντέλο MSC-ITC), χωρητικότητας κυψελίδων αναφοράς και δείγματος 1.7 ml. Σε κάθε πείραμα οι κυψελίδες πληρούνταν με όγκο διαλύματος διαλύτη/δείγματος 1.4 ml, από το οποίο είχε απομακρυνθεί ο διαλυμένος αέρας ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων, γεγονός που θα οδηγούσε στη συλλογή προβληματικών δεδομένων. Στην κυψελίδα του δείγματος τοποθετήθηκε διάλυμα πρωτεΐνης συγκέντρωσης 0.2 mg/ml, ενώ στην κυψελίδα αναφοράς το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα. Η ίδια διαδικασία απομάκρυνσης του αέρα ακολουθήθηκε και για το διάλυμα του εγγεόμενου συστατικού που περιείχε η σύριγγα ακριβείας, το οποίο ήταν διάλυμα πολυηλεκτρολύτη συγκέντρωσης 0.8 mg/ml. Η έγχυση πραγματοποιήθηκε με μία σειρά 38 διαδοχικών βημάτων των 6 μl, ανά χρονικά διαστήματα των 300 sec και υπό συνεχή ανάδευση συχνότητας 400 rpm. Τα πειραματικά δεδομένα κανονικοποιήθηκαν ως προς τη γραμμή βάσης του οργάνου και εν συνεχεία αφαιρέθηκε η θερμότητα διάχυσης του πολυηλεκτρολύτη στο ρυθμιστικό διάλυμα, η οποία μετρήθηκε ξεχωριστά. Με τον τρόπο αυτό προέκυψε η καμπύλη τιτλοδότησης, στην οποία προσαρμόστηκαν κατάλληλα μοντέλα πρόσδεσης με χρήση του λογισμικού προγράμματος ORIGIN, καταλήγοντας στον υπολογισμό των θερμοδυναμικών παραμέτρων ΔH , K_B και N της αλληλεπίδρασης. Όλες οι πειραματικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο φορές, ώστε να επιβεβαιωθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

2.1.3.3. Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry, DSC)²¹⁸⁻²²³ είναι μία τεχνική θερμικής ανάλυσης, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη μεταπτώσεων φάσης και αλλαγών διαμόρφωσης βιολογικών μορίων, όπως οι πρωτεΐνες, οι οποίες λαμβάνουν χώρα κατά τη θέρμανσή τους. Μέσω των πειραμάτων διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης καθίσταται δυνατός ο υπολογισμός βασικών θερμοδυναμικών παραμέτρων του υπό μελέτη φαινομένου, όπως η θερμοκρασία T_m και η μεταβολή της ενθαλπίας ΔH της μετάβασης, καθώς και η μεταβολή της θερμοχωρητικότητας υπό σταθερή πίεση ΔC_p του συστήματος.

Η διεξαγωγή των πειραματικών μετρήσεων διαφορικής θερμιδομετρίας

σάρωσης πραγματοποιείται με τη χρήση κατάλληλου θερμιδόμετρου, το οποίο αποτελείται από έναν κλωβό υψηλής θερμικής αγωγιμότητας στον οποίο εσωκλείονται δύο κυλινδρικές κυψελίδες δείγματος και αναφοράς, όπως αναπαρίσταται στο Σχήμα 2.12. Η θερμοκρασία του αδιαβατικού κλωβού ελέγχεται από μία εξωτερική μονάδα θερμικού ελέγχου, ενώ η θερμοκρασία των κυψελίδων αναφοράς και δείγματος μεταβάλλεται με χρήση κατάλληλου συστήματος θερμοστατών. Η διάταξη διατηρείται σε σχετικά υψηλή πίεση, περίπου 1.9 atm, ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων, γεγονός που θα διατάρασσε την ομαλή συλλογή δεδομένων. Η αυξημένη αυτή τιμή της πίεσης επίσης οδηγεί στην ανύψωση του σημείου ζέσεως των υδατικών διαλυμάτων, επιτρέποντας τη θέρμανσή τους έως τους 120 °C.



Σχήμα 2.12: Σχηματική αναπαράσταση ενός διαφορικού θερμιδόμετρου σάρωσης.

Κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, το πρωτεϊνικό διάλυμα τοποθετείται στην κυψελίδα του δείγματος, ενώ στην κυψελίδα αναφοράς τοποθετείται καθαρός διαλύτης και η θερμοκρασία των δύο κυψελίδων αυξάνεται γραμμικά με σταθερό ρυθμό u , στο επιθυμητό θερμοκρασιακό εύρος. Οι διαφορές θερμοκρασιών ΔT_1 μεταξύ των δύο κυψελίδων και ΔT_2 μεταξύ των κυψελίδων και του αδιαβατικού κλωβού ελέγχονται ηλεκτρονικά. Η εξωτερική μονάδα θερμικού ελέγχου διατηρεί τη

θερμοκρασία του κλωβού ίση με αυτή των κυψελίδων, ενώ το σύστημα των θερμοστατών εξισορροπεί την θερμοκρασιακή διαφορά μεταξύ των κυψελίδων, η οποία προκύπτει από την ενδόθερμη διαδικασία της αποδιάταξης του πρωτεϊνικού μορίου λόγω της θέρμανσης. Η εξισορρόπηση της θερμοκρασιακής διαφοράς πραγματοποιείται παρέχοντας την απαιτούμενη ισχύ P στην κυψελίδα του δείγματος, η οποία καταγράφεται και οδηγεί στον υπολογισμό της θερμοχωρητικότητας C_p μέσω της σχέσης:

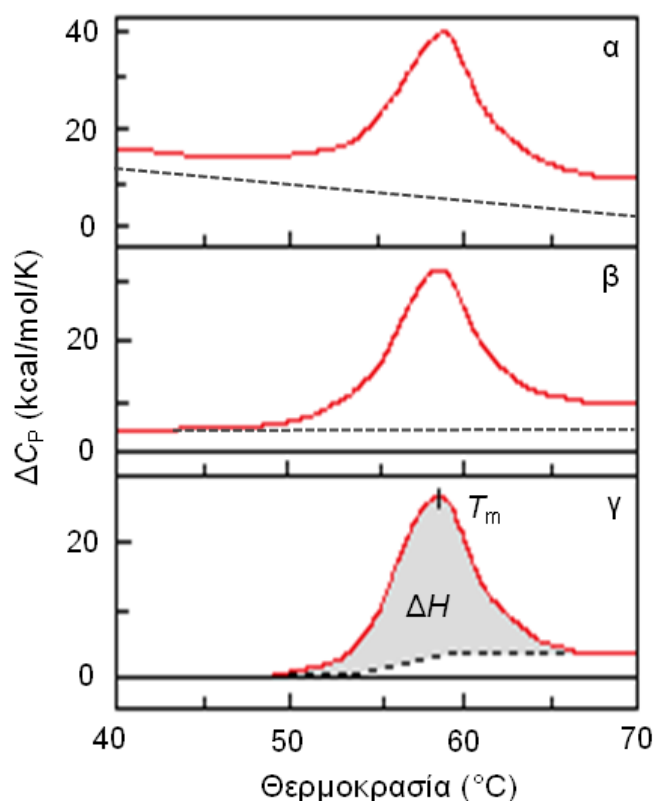
$$C_p = \frac{P}{u} \quad (2.38)$$

όπου $P = dQ/dt$ με Q τη θερμότητα που παρέχεται στην κυψελίδα, $u = dT/dt$ με T τη θερμοκρασία και t το χρόνο.

Η μεταφορά των διαλυμάτων στις κυψελίδες γίνεται μέσω τριχοειδών διόδων με τη χρήση ειδικής σύριγγας. Ο μικρός ενεργός όγκος των κυψελίδων, περίπου 0.5 ml, επιτρέπει την άμεση αποκατάσταση θερμικής ισορροπίας σε όλο τον όγκο του διαλύματος, ενώ οι τριχοειδείς δίοδοι επιτρέπουν την ελεύθερη διαστολή/συστολή των διαλυμάτων, χωρίς τη μεταβολή του ενεργού όγκου τους. Παρόλα αυτά, η θερμική διαστολή των κυψελίδων και των διαλυμάτων δεν επηρεάζει τη μέτρηση της θερμοχωρητικότητας, διότι οι δύο κυψελίδες είναι όμοιες και τα δύο διαλύματα διαφέρουν ελάχιστα ως προς τους συντελεστές θερμικής διαστολής, καθώς το προς μελέτη πρωτεϊνικό διάλυμα είναι συνήθως πολύ αραιό.

Στην περίπτωση της θερμικής αποδιάταξης ενός πρωτεϊνικού διαλύματος, η μορφή των αποτελεσμάτων ενός πειράματος διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης, αναφορικά με τη μεταβολή της θερμοχωρητικότητας ΔC_p συναρτήσει της θερμοκρασίας, παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.13. Η παρατηρούμενη κορυφή αποτελεί την πειραματική καταγραφή της θερμικά επαγόμενης αποδιάταξης, ενώ η γραμμική συμπεριφορά εκατέρωθεν της ενδόθερμης κορυφής αναπαριστά τη θερμοχωρητικότητα της λειτουργικής και της αποδιαταγμένης κατάστασης του πρωτεϊνικού μορίου στο διάλυμα. Η διακεκομμένη γραμμή στο Σχήμα 2.13α αντιστοιχεί στη θερμική συμπεριφορά του καθαρού διαλύτη, η οποία μετράται ξεχωριστά και αποτελεί τη μηδενική στάθμη αναφοράς του οργάνου. Η μηδενική στάθμη αναφοράς αφαιρείται από τα πειραματικά δεδομένα του πρωτεϊνικού διαλύματος και εν συνεχεία πραγματοποιείται αναγωγή σε μοριακό επίπεδο,

διαιρώντας με τον αριθμό των moles του δείγματος, οπότε τα δεδομένα λαμβάνουν τη μορφή που παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.13β. Η θερμοχωρητικότητα της αποδιαταγμένης κατάστασης είναι πάντα μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της λειτουργικής κατάστασης, όπως καταδεικνύει και η διακεκομμένη γραμμή. Για το λόγο αυτό στα δεδομένα προσαρμόζεται η χημική στάθμη αναφοράς, η οποία αντιστοιχεί στη διαφορά αυτή της θερμοχωρητικότητας των δύο καταστάσεων και αναπαρίσταται με τη σιγμοειδή διακεκομμένη καμπύλη στο Σχήμα 2.13γ. Το εμβαδό μεταξύ της καμπύλης ΔC_p και της χημικής στάθμης αναφοράς ισούται με τη συνολική μεταβολή της ενθαλπίας ΔH του συστήματος, ενώ η θέση του μεγίστου της κορυφής αντιστοιχεί στη θερμοκρασία T_m της μετάβασης.



Σχήμα 2.13: Μορφή των αποτελεσμάτων ενός πειράματος διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης, καθώς και η επεξεργασία που πραγματοποιείται για τη διεξαγωγή των θερμοδυναμικών παραμέτρων της διαδικασίας θερμικής αποδιάταξης ενός πρωτεϊνικού διαλύματος.

2.1.3.4. Πειραματική διάταξη διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης

Οι πειραματικές μετρήσεις διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση κατάλληλου θερμιδόμετρου (Microcal, μοντέλο

VP-DSC), χωρητικότητας κυψελίδων αναφοράς και δείγματος 0.52 ml. Σε κάθε πείραμα οι κυψελίδες πληρούνταν με τον κατάλληλο όγκο διαλύματος διαλύτη/δείγματος, από το οποίο είχε απομακρυνθεί ο διαλυμένος αέρας ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων. Πριν από τη μέτρηση του δείγματος, διεξάγονταν τέσσερις ή πέντε διαδοχικές μετρήσεις του διαλύτη, έτσι ώστε να επιτευχθεί η συλλογή της καλύτερης δυνατής μηδενικής στάθμης αναφοράς του οργάνου. Η μέτρηση του πρωτεϊνικού δείγματος πραγματοποιήθηκε με μία θερμική σάρωση ρυθμού θέρμανσης 1.5 K/min, η οποία ακολουθήθηκε από μία δεύτερη σάρωση, ώστε να διερευνηθεί η αντιστρεπτότητα της μετάβασης. Τα πειραματικά δεδομένα κανονικοποιήθηκαν ως προς τη μηδενική στάθμη αναφοράς του οργάνου και τη χημική στάθμη αναφοράς του πρωτεϊνικού μορίου και με κατάλληλη επεξεργασία υπολογίστηκαν οι θερμοδυναμικές παράμετροι ΔH και T_m της μετάβασης.

2.2. Υλικά

2.2.1. Πολυηλεκτρολύτες

Οι συνθετικοί πολυηλεκτρολύτες που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, προέκυψαν μέσω αντίδρασης προσθήκης του χλωροσουλφονικού ισοκυανικού εστέρα (chlorosulfonyl isocyanate, CSI) στο διπλό δεσμό C=C των μονομερικών μονάδων ισοπρενίου, είτε ομοπολυμερών πολυισοπρενίου (PI), είτε συμπολυμερών κατά συστάδες πολυστυρενίου-*b*-πολυισοπρενίου (PS-PI), πολυστυρενίου-*b*-πολυισοπρενίου-*b*-πολυαιθυλενοξειδίου (PS-PI-PEO) ή πολυισοπρενίου-*b*-πολυστυρενίου-*b*-πολυαιθυλενοξειδίου (PI-PS-PEO).

Τα πρόδρομα πολυμερή συντέθηκαν με τη μέθοδο του ζωντανού ανιοντικού πολυμερισμού με τεχνικές υψηλού κενού, η οποία παρέχει ελεγχόμενα μοριακά χαρακτηριστικά και χαμηλή πολυδιασπορά μοριακών βαρών.^{224, 225} Επιπροσθέτως, ο πολυμερισμός πραγματοποιήθηκε με διαδικασίες που εξασφαλίζουν τη μέγιστη δυνατή καθαρότητα όλων των αντιδραστηρίων και των συσκευών.

Ο πολυμερισμός του ισοπρενίου πραγματοποιήθηκε σε βενζόλιο με χρήση απαρχητή *s*-BuLi, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες ώστε να καταναλωθεί όλη η ποσότητα του μονομερούς. Ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με προσθήκη απαερωμένης μεθανόλης, το πολυμερές καταβυθίστηκε σε περίσσεια μεθανόλης και τέλος ξηράθηκε υπό κενό, ώστε να απομακρυνθεί ο διαλύτης. Για τη σύνθεση του δισυσταδικού συμπολυμερούς PS-PI πραγματοποιήθηκε αρχικά ο πολυμερισμός της συστάδας του πολυστυρενίου σε βενζόλιο με χρήση απαρχητή *s*-BuLi, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκε το μονομερές του ισοπρενίου στο ζωντανό πολυστυρυλολίθιο, ώστε να πραγματοποιηθεί ο πολυμερισμός της δεύτερης συστάδας, ο οποίος αφέθηκε να ολοκληρωθεί για 24 ώρες. Ο τερματισμός του πολυμερισμού της δεύτερης συστάδας έγινε με προσθήκη απαερωμένης μεθανόλης, το συμπολυμερές καταβυθίστηκε σε περίσσεια μεθανόλης και τέλος ξηράθηκε υπό κενό. Αντίστοιχα, στην περίπτωση του τρισυσταδικού συμπολυμερούς PS-PI-PEO πραγματοποιήθηκε ο πολυμερισμός της συστάδας του στυρενίου και της συστάδας του ισοπρενίου, υπό τις ίδιες συνθήκες, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Μετέπειτα προστέθηκε το μονομερές του αιθυλενοξειδίου, ο πολυμερισμός του οποίου διεξήχθη για 48 ώρες παρουσία φωσφαζίνης (*t*-BuP₄) στους 40 °C. Τέλος, για το τρισυσταδικό συμπολυμερές PI-PS-PEO αρχικά

πραγματοποιήθηκε ο πολυμερισμός της συστάδας του πολυισοπρενίου και εν συνεχεία προστέθηκε το μονομερές του στυρενίου μαζί με μικρή ποσότητα THF. Μετά τον πολυμερισμό της δεύτερης συστάδας πραγματοποιήθηκε ο πολυμερισμός της συστάδας του πολυαιθυλενοξειδίου, υπό προσθήκη *t*-BuP₄ και θέρμανση στους 40 °C. Ο τερματισμός του πολυμερισμού και για τα δύο τρισυσταδικά συμπολυμερή έγινε με προσθήκη μεθανόλης και δύο σταγόνων πυκνού HCl και τα συμπολυμερή ξηράθηκαν υπό κενό.

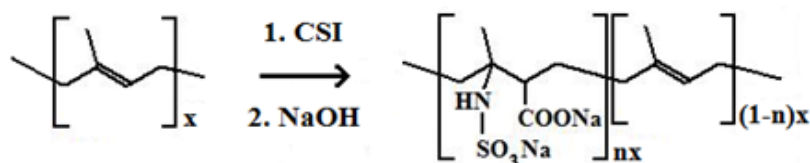
Ο προσδιορισμός των μοριακών βαρών και της κατανομής μοριακών βαρών των πολυμερικών δειγμάτων, έγινε μέσω μετρήσεων χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC), ενώ για τον προσδιορισμό της σύστασης πραγματοποιήθηκαν φασματοσκοπικές μετρήσεις πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Τα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού των δειγμάτων αναφορικά με τις τιμές των μοριακών βαρών M_w , των κατανομών μοριακών βαρών M_w/M_n , της ποσοστιαίας κατά βάρος σύστασης και του αριθμού των μονομερικών μονάδων κάθε συστάδας, συνοψίζονται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1: Μοριακά χαρακτηριστικά των πρόδρομων πολυμερών.

Δείγμα	M_w (g mol ⁻¹)	M_w/M_n	% κ.β. PI	μ.μ. PI	% κ.β. PS	μ.μ. PS	% κ.β. PEO	μ.μ. PEO
PI-54K	54000	1.05	100	794	-	-	-	-
PI-21K	21000	1.06	100	309	-	-	-	-
PS-PI	83650	1.02	88	1083	12	96	-	-
PS-PI-PEO	57300	1.01	47.7	402	7.5	41	44.8	583
PI-PS-PEO	27800	1.03	56.6	231	19.5	52	23.9	151

Για τη διεξαγωγή της αντίδρασης προσθήκης η επιθυμητή ποσότητα του αποξηραμένου πολυμερούς διαλύθηκε σε ξηρό διαιθυλαιθέρα σε συγκέντρωση 2 - 5 % κ. β. εντός δίλαιμης σφαιρικής φιάλης, εφοδιασμένης με κατάλληλη είσοδο/έξοδο αζώτου, διάφραγμα και αναδευτήρα. Στη συνέχεια η προκαθορισμένη ποσότητα του χλωροσουλφονικού ισοκυανικού εστέρα (CSI, από την εταιρία ACROS), σε 10 %

μοριακή περίσσεια επί των διπλών δεσμών της συστάδας του πολυισοπρενίου, προστέθηκε στάγδην στο διάλυμα, μέσω του διαφράγματος με χρήση αεροστεγούς σύριγγας, υπό συνεχή ροή αζώτου και ανάδευση στους 0 °C και η αντίδραση αφέθηκε να ολοκληρωθεί για 6 ώρες, υπό τις ίδιες συνθήκες απουσία φωτός. Ανάλογα με τη σύσταση του πολυμερούς παρατηρήθηκε σχηματισμός λευκού ιζήματος ή έντονη αύξηση του ιξώδους. Στο τέλος της περιόδου αυτής η περίσσεια του CSI εξουδετερώθηκε με προσθήκη μικρής ποσότητας μεθανόλης και εν συνεχεία εξατμίστηκαν οι διαλύτες στους 40 °C υπό ροή αζώτου. Η υδρόλυση των προϊόντων της αντίδρασης προσθήκης, πραγματοποιήθηκε με προσθήκη, μέσω του διαφράγματος στάγδην, μίγματος νερού/μεθανόλης σε αναλογία 1:2, το οποίο περιείχε NaOH σε διπλάσια περίσσεια επί των διπλών δεσμών και το διάλυμα θερμάνθηκε στους 85 °C για 24 ώρες υπό ροή αζώτου ώστε να επιτευχθεί επαναροή. Το προϊόν της αντίδρασης απομονώθηκε με εξάτμιση όλων των διαλυτών, ο καθαρισμός των τελικών πολυμερών επιτεύχθηκε με διαπίδυση μέσω ημιπερατής μεμβράνης (dialysis) με απεσταγμένο νερό και τα στερεά δείγματα απομονώθηκαν σε περιστροφικό αποστακτήρα (rotor evaporator).²²⁶⁻²³⁰ Η σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης προσθήκης παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.14.

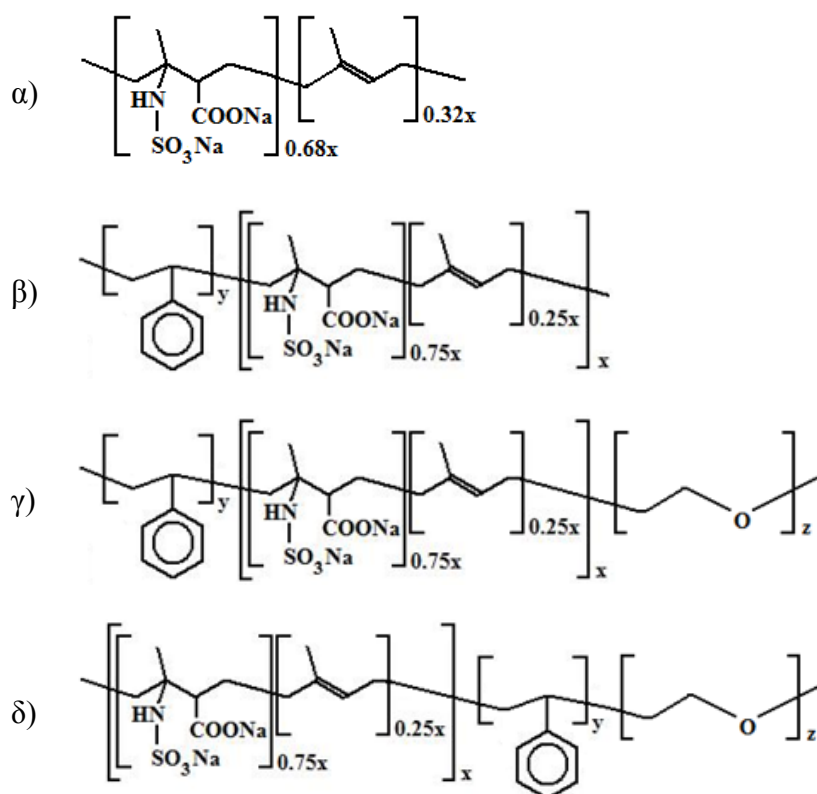


Σχήμα 2.14: Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης προσθήκης του χλωροσουλφονικού ισοκυανικού εστέρα (CSI) στο διπλό δεσμό των μονομερικών μονάδων του πολυισοπρενίου.

Η αντίδραση προσθήκης έχει ως αποτέλεσμα την εισαγωγή ομάδων σουλφαμινικού νατρίου και καρβοξυλικών ομάδων στο μεγαλύτερο ποσοστό των μονομερικών μονάδων του πολυισοπρενίου. Το ποσοστό αυτό εξαρτάται από την απόδοση της αντίδρασης και συγκεκριμένα είναι περίπου 68 % για το ομοπολυμερές και περίπου 75 % για τα συμπολυμερή. Ο πολυηλεκτρολύτης που προκύπτει, το μετά νατρίου άλας του πολυ((σουλφαμινο-καρβοξυλο)ισοπρενίου) (sodium poly((sulfamate-carboxylate)isoprene), SCPI), είναι ουσιαστικά ένα τυχαίο συμπολυμερές, το οποίο αποτελείται από τροποποιημένες και μη μονάδες ισοπρενίου.

Η μοριακή δομή των ομοπολυμερικών και πολυσυσταδικών πολυηλεκτρολυτών της παρούσας μελέτης παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.15, ενώ στον Πίνακα 2.2

συνοψίζονται τα μοριακά τους χαρακτηριστικά.



Σχήμα 2.15: Μοριακή δομή α) του ομοπολυμερικού πολυηλεκτρολύτη SCPI, β) του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών γ) PS-SCPI-PEO και δ) SCPI-PS-PEO.

Πίνακας 2.2: Μοριακά χαρακτηριστικά των ομοπολυμερικών και πολυσυσταδικών πολυηλεκτρολυτών.

Δείγμα	M_w (g mol^{-1})	% κ.β. SCPI	% κ.β. PS	% κ.β. PEO	$\frac{\partial n}{\partial c}$ (ml g^{-1})
SCPI-54K	153900	100	-	-	0.157
SCPI-21K	59900	100	-	-	0.157
PS-SCPI	233900	95.7	4.3	-	0.159
PS-SCPI-PEO	113200	73.5	3.8	22.7	0.154
SCPI-PS-PEO	59800	79.8	9.1	11.1	0.159

Στον Πίνακα 2.2 περιλαμβάνονται και οι τιμές του διαφορικού δείκτη διάθλασης $\partial n/\partial c$ του κάθε δείγματος, ο οποίος στην περίπτωση του ομοπολυμερικού πολυηλεκτρολύτη SCPI μετρήθηκε με χρήση διαφορικού διαθλασίμετρου (Brookhaven, μοντέλο BI-DNDC), σε συνθήκες οσμωτικής ισορροπίας μεταξύ του πολυηλεκτρολυτικού διαλύματος και του διαλύτη, ενώ στην περίπτωση των πολυσυσταδικών πολυηλεκτρολυτών υπολογίστηκε με βάση τη σχέση (2.7) και των γνωστών από τη βιβλιογραφία τιμών για το πολυστυρένιο και το πολυαιθυλοαινοξείδιο, $(\partial n/\partial c)_{PS} = 0.21 \text{ ml g}^{-1}$ και $(\partial n/\partial c)_{PEO} = 0.135 \text{ ml g}^{-1}$.

2.2.2. Πρωτεΐνη

Η λυσοζύμη που χρησιμοποιήθηκε είναι εμπορικά διαθέσιμη (από την εταιρία Fluka), προέρχεται από το ασπράδι αυγού κότας (hen egg white lysozyme, HEWL), έχει υποστεί καθαρισμό με διαπίδυση και λυοφιλοποίηση ώστε να ληφθεί σε στερεή μορφή, έχει μοριακό βάρος $M_w = 14700 \text{ g mol}^{-1}$ και χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω κατεργασία.

2.2.3. Παρασκευή διαλυμάτων πολυηλεκτρολυτών

Η πυκνότητα φορτίου των συγκεκριμένων ομοπολυμερικών και πολυσυσταδικών πολυηλεκτρολυτών εξαρτάται από το pH, λόγω της παρουσίας στην ίδια πολυηλεκτρολυτική μονομερική μονάδα, τόσο των ισχυρά φορτισμένων ομάδων SO_3^- , όσο και των ασθενώς φορτισμένων ομάδων COO^- , οι οποίες εξουδετερώνονται σε χαμηλές τιμές του pH. Για το λόγο αυτό η μελέτη της συμπεριφοράς, των ιδιοτήτων και της αυτοοργάνωσής τους σε υδατικά διαλύματα πραγματοποιήθηκε τόσο σε pH 7 ή και σε pH 9 όπου και οι δύο δραστικές ομάδες είναι αρνητικά φορτισμένες, όσο και σε pH 3 όπου η εξουδετέρωση των καρβοξυλικών ομάδων έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της πυκνότητας φορτίου περίπου στο μισό.

Στην περίπτωση του ομοπολυμερικού πολυηλεκτρολύτη SCPI, ο οποίος είναι απευθείας διαλυτός σε νερό, παρασκευάστηκε ένα ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7, προσθέτοντας κατάλληλη ποσότητα διαλύματος NaOH και φωσφορικό νάτριο σε συγκέντρωση 5 mM και ένα διάλυμα με pH 3, προσθέτοντας κατάλληλη ποσότητα διαλύματος HCl, σε απεσταγμένο νερό. Η ιοντική ισχύς I και των δύο διαλυμάτων ρυθμίστηκε στα 10 mM, με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας NaCl. Τα διαλύματα του πολυηλεκτρολύτη παρασκευάστηκαν με διάλυση ζυγισμένης ποσότητας του

στερεού πολυμερούς στον κατάλληλο όγκο των παραπάνω διαλυμάτων και τα διαλύματα αφέθηκαν να εξισορροπήσουν ολονυχτίς. Η συγκέντρωση των διαλυμάτων ήταν της τάξης των μερικών mg/ml, συνήθως από 1 έως 5 mg/ml, ενώ κατά περιπτώσεις πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες αραιώσεις.

Οι πολυσυσταδικοί πολυηλεκτρολύτες δεν είναι απευθείας διαλυτοί σε νερό και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε οργανικός συνδιαλύτης. Σε κάθε περίπτωση η κατάλληλη ποσότητα του στερεού πολυμερούς προστέθηκε σε 10 ml THF και το διάλυμα θερμάνθηκε στους 60 °C ολονυχτίς, ώστε να επιτευχθεί διόγκωση της συστάδας του πολυστυρενίου. Η συγκεκριμένη διαδικασία υποβοηθήθηκε με χρήση κατεργασίας με υπερήχους για περίπου 1 λεπτό. Μετά τη θέρμανση, ο κατάλληλος όγκος απεσταγμένου νερού προστέθηκε στάγδην στο διάλυμα, υπό συνεχή ανάδευση. Κατά το στάδιο αυτό παρατηρήθηκε ανάπτυξη γαλαζωπής απόχρωσης ή θολερότητας, γεγονός που επιβεβαιώνει το σχηματισμό μικκυλίων. Στο τελικό στάδιο απομακρύνθηκε το THF, με θέρμανση, υπό ανάδευση, στους 65 °C και τα διαλύματα αφέθηκαν για εξισορρόπηση ολονυχτίς. Η συγκέντρωση των διαλυμάτων ήταν και πάλι της τάξης των μερικών mg/ml, συνήθως από 0.1 έως 5 mg/ml για το δισυσταδικό πολυηλεκτρολύτη ή έως 1 mg/ml για τους τρισυσταδικούς πολυηλεκτρολύτες, οι οποίοι παρουσιάζουν μειωμένη διαλυτότητα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, ενώ κατάλληλες αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν κατά περίπτωση. Το pH των διαλυμάτων ρυθμίστηκε στην επιθυμητή τιμή 3, 7 ή 9 με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος HCl ή NaOH συγκέντρωσης 0.1 M, μετά την παρασκευή τους.

2.2.4. Παρασκευή διαλυμάτων συμπλόκων

Η μελέτη της σύμπλεξης του ομοπολυμερικού και των πολυσυσταδικών πολυηλεκτρολυτών με τα μόρια της πρωτεΐνης λυσοζύμης, καθώς και των ιδιοτήτων και της συμπεριφοράς των σχηματιζόμενων συμπλόκων, συναρτήσει των συνθηκών του διαλύματος, πραγματοποιήθηκε τόσο σε pH 7 όσο και 3.

Τα διαλύματα των πολυηλεκτρολυτών παρασκευάστηκαν με τον τρόπο που περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα, ενώ η παρασκευή των πρωτεϊνικών διαλυμάτων έγινε με διάλυση ζυγισμένης ποσότητας λυσοζύμης στον κατάλληλο όγκο των ίδιων διαλυμάτων, στα οποία προστέθηκε NaN_3 σε συγκέντρωση 200 ppm, ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη βακτηρίων. Η συγκέντρωση των διαλυμάτων της

λυσοζύμης ήταν στην περιοχή των 0.1 - 2 mg/ml.

Τα διαλύματα των συμπλόκων παρασκευάστηκαν με ανάμειξη υπό ανάδευση κατάλληλων ποσοτήτων των διαλυμάτων των πολυηλεκτρολυτών και της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του ομοπολυμερικού πολυηλεκτρολύτη, προστέθηκαν διαφορετικές ποσότητες του διαλύματος του πολυηλεκτρολύτη στην ίδια ποσότητα διαλύματος λυσοζύμης, ενώ στην περίπτωση των πολυσυσταδικών πολυηλεκτρολυτών, πραγματοποιήθηκε η αντίθετη διαδικασία, δηλαδή διαφορετικές ποσότητες του διαλύματος της λυσοζύμης προστέθηκαν στην ίδια ποσότητα διαλύματος πολυηλεκτρολύτη. Σε όλες τις περιπτώσεις στα διαλύματα προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος, ώστε να επιτευχθεί σταθερός τελικός όγκος. Με τον τρόπο αυτό η συγκέντρωση του ενός συστατικού παρέμενε σταθερή σε όλη τη σειρά των διαλυμάτων, ενώ του άλλου συστατικού διέφερε, μεταβάλλοντας έτσι την αναλογία φορτίων στο διάλυμα των συμπλόκων.

Κατά την ανάμειξη τα διαλύματα εμφάνισαν γαλαζωπή απόχρωση ή θολερότητα, γεγονός που επιβεβαιώνει το σχηματισμό συμπλόκων. Μετά την παρασκευή τους τα διαλύματα αφέθηκαν να εξισορροπήσουν ολονυχτίς. Στην περίπτωση του ομοπολυμερικού πολυηλεκτρολύτη SCPI και του δυσυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, μετά την εξισορρόπηση παρατηρήθηκε κατά περιπτώσεις, ανάλογα με την αναλογία των δύο συστατικών και τις συνθήκες του διαλύματος, ο διαφασικός διαχωρισμός των διαλυμάτων (coacervation), ο οποίος χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό μίας πυκνής υγρής φάσης λευκού χρώματος.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι λόγω της ευαισθησίας της τεχνικής σκέδασης φωτός και της απαίτησης για καθαρά δείγματα, δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή κατά την παρασκευή των διαλυμάτων ώστε να αποφευχθεί η ύπαρξη σωματιδίων σκόνης. Για το λόγο αυτό, όλα τα υγρά δείγματα, διαλύτες και διαλύματα, φιλτράρονταν μέσω φίλτρων διαμέτρου πόρων 0.45 μm (Millipore, τύπου Millex-LCR) και τα γυάλινα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν καθαρίζονταν επισταμένως. Επίσης επισημαίνεται ότι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων οι πειραματικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΟΛΥΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΗΣ SCPI

ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΤΟΥ ΜΕ ΛΥΣΟΖΥΜΗ

3.1. Ιδιότητες σε διάλυμα του πολυηλεκτρολύτη μετά νατρίου άλας του πολυ((σουλφαμινο-καρβοξυλο)ισοπρενίου) (SCPI)

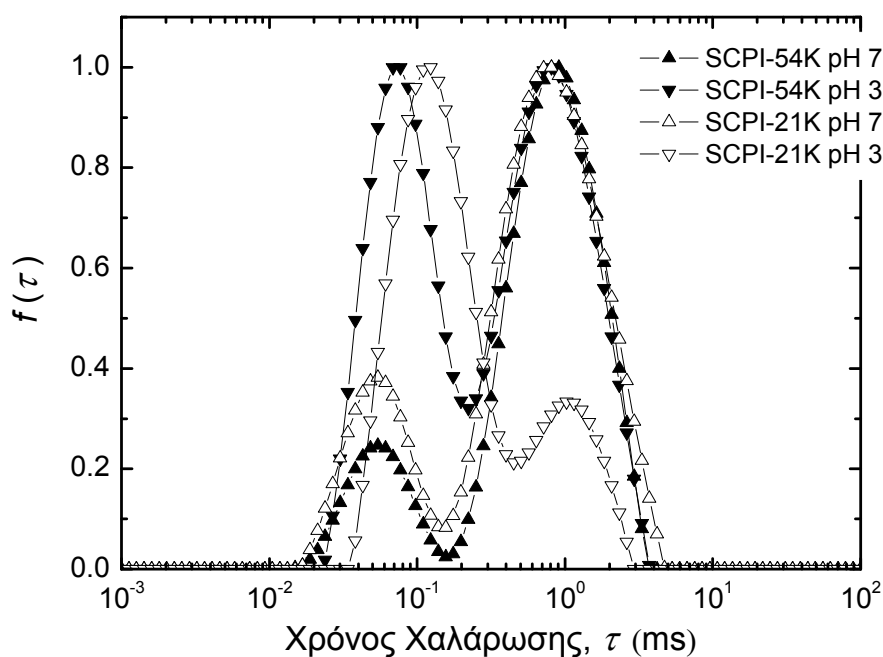
Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της μοριακής δομής του πολυηλεκτρολύτη SCPI (Σχήμα 2.15α), προσδίδουν ξεχωριστό ενδιαφέρον στη μελέτη των ιδιοτήτων και της συμπεριφοράς του σε υδατικά διαλύματα. Η πλέον σημαντική ιδιότητα του συγκεκριμένου πολυηλεκτρολύτη, είναι το γεγονός ότι φέρει στην ίδια τροποποιημένη μονομερική μονάδα δύο αρνητικά φορτισμένες ομάδες με διαφορετική απόκριση στις αλλαγές του pH. Συγκεκριμένα, τις ισχυρά φορτισμένες, ανεξάρτητα της τιμής του pH, ομάδες SO_3^- και τις ασθενώς φορτισμένες ομάδες COO^- , οι οποίες εξουδετερώνονται σε χαμηλές τιμές του pH. Το γεγονός αυτό, επιτρέπει τη μεταβολή της πυκνότητας φορτίου και κατ' επέκταση των ιδιοτήτων και της συμπεριφοράς του πολυηλεκτρολύτη, ανάλογα με τις συνθήκες του διαλύματος. Επιπροσθέτως, η παρουσία μη τροποποιημένων ομάδων ισοπρενίου, έχει ως αποτέλεσμα ο πολυηλεκτρολύτης να έχει εν μέρει υδροφοβικό χαρακτήρα, γεγονός που ενισχύει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις του συστήματος. Η επίδραση της μακρομοριακής δομής και διαμόρφωσης, καθώς και των ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, στις ιδιότητες και τη συμπεριφορά σε διάλυμα του πολυηλεκτρολύτη SCPI, μελετήθηκε συναρτήσει του μοριακού βάρους και της συγκέντρωσης του πολυηλεκτρολύτη, καθώς και του pH, της ιοντικής ισχύος και της θερμοκρασίας του διαλύματος.

3.1.1. Ιδιότητες σε διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος

Η διερεύνηση των ιδιοτήτων του πολυηλεκτρολύτη SCPI, πραγματοποιήθηκε σε υδατικά διαλύματα με διαφορετικές τιμές pH και χαμηλή ιοντική ισχύ I , για δύο δείγματα διαφορετικού μοριακού βάρους.

Αρχικά, διενεργήθηκαν μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) και στο Σχήμα 3.1 παρουσιάζονται οι κατανομές των χρόνων χαλάρωσης του συστήματος, για μετρήσεις σε γωνία σκέδασης $\theta = 90^\circ$, διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml, των

δύο πολυηλεκτρολυτών SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 και pH 3 με $I = 0.01$ M.

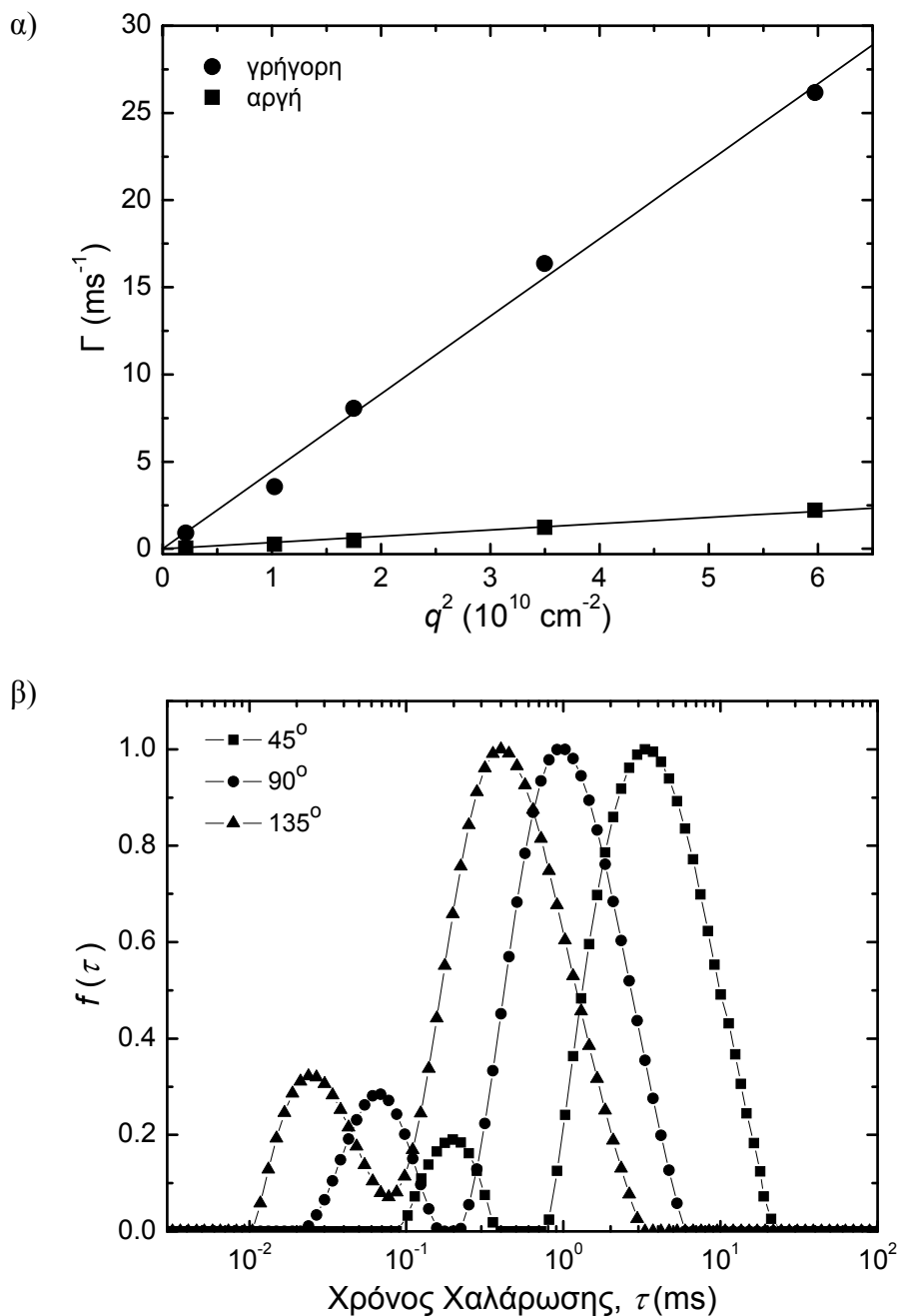


Σχήμα 3.1: Κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις 90° , για διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/ml των πολυηλεκτρολυτών SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 και pH 3 με $I = 0.01$ M.

Όπως παρατηρείται, σε όλες τις περιπτώσεις οι κατανομές εμφανίζουν δύο κορυφές, μία σε μικρότερους και μία σε μεγαλύτερους χρόνους χαλάρωσης. Οι κορυφές αυτές αντιστοιχούν στη γρήγορη και στην αργή διαδικασία χαλάρωσης του συστήματος (fast and slow mode) και αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα των διαλυμάτων πολυηλεκτρολυτών. Για να διαπιστωθεί το κατά πόσο οι κορυφές αυτές αντιστοιχούν σε κινήσεις λόγω διάχυσης, εξετάζεται η γωνιακή εξάρτηση των κατανομών, μέσω μετρήσεων σε διαφορετικές γωνίες σκέδασης $\theta = 25, 45, 60, 90$ και 135° . Με βάση τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών, υπολογίζεται για κάθε μία κορυφή ο μέσος ρυθμός χαλάρωσης $\bar{\Gamma}$, ο οποίος ορίζεται ως το αντίστροφο του μέσου χρόνου χαλάρωσης $\bar{\tau}$, που αντιστοιχεί στο μέγιστο της κορυφής. Οι τιμές του $\bar{\Gamma}$ για τη γρήγορη και την αργή διαδικασία χαλάρωσης, συναρτήσει του τετραγώνου του διανύσματος σκέδασης q^2 , που αντιστοιχεί σε κάθε γωνία σκέδασης θ , για το διάλυμα του δείγματος SCPI-54K συγκέντρωσης 1 mg/ml σε pH 7 με $I = 0.01$ M, παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.2α, ενώ στο Σχήμα 3.2β παρατίθενται οι αντίστοιχες κατανομές στις $45, 90$ και 135° .

Η εξάρτηση που εξάγεται μεταξύ του $\bar{\Gamma}$ και του q^2 είναι γραμμική και για τις δύο διαδικασίες χαλάρωσης, γεγονός που αποδεικνύει ότι οι αντίστοιχες κορυφές

οφείλονται σε κινήσεις λόγω διάχυσης. Η παρατήρηση αυτή ισχύει και για τα υπόλοιπα διαλύματα που μελετήθηκαν, οπότε μέσω των σχέσεων (2.11) και (2.12) εξάγονται οι τιμές των συντελεστών διάχυσης, για κάθε διαδικασία χαλάρωσης, D_f και D_s , καθώς και των αντίστοιχων υδροδυναμικών ακτίνων R_{hf} και R_{hs} . Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 3.1.



Σχήμα 3.2: α) Γωνιακή εξάρτηση του μέσου ρυθμού χαλάρωσης της γρήγορης και της αργής διαδικασίας, για το διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δείγματος SCPI-54K σε pH 7 με $I = 0.01$ M. β) Οι αντίστοιχες κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις 45, 90, και 135°.

Στο πλαίσιο της ανάλυσης των κατανομών του Σχήματος 3.1 και με σκοπό τη διερεύνηση της συνεισφοράς της κάθε κορυφής στη συνολική κατανομή και κατ' επέκταση στη συνολική ένταση σκέδασης του διαλύματος, υπολογίστηκαν οι απόλυτες εντάσεις σκέδασης της γρήγορης και της αργής διαδικασίας χαλάρωσης A_f και A_s , σύμφωνα με τη μέθοδο που προτάθηκε από τον M. Sedláč²³¹ και με χρήση των σχέσεων:

$$A_f = \frac{I/I_{tol}}{1 + A_s/A_f} \quad \& \quad A_s = \frac{I/I_{tol}}{1 + A_f/A_s} \quad (3.1)$$

όπου I η ένταση σκέδασης του διαλύματος, διορθωμένη ως προς την ένταση σκέδασης του διαλύτη και I_{tol} η ένταση σκέδασης του πρότυπου διαλύτη τολουολίου, ενώ τα A_f και A_s υπολογίζονται από το ολοκλήρωμα της αντίστοιχης κορυφής. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής περιλαμβάνονται επίσης στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1: Τιμές των συντελεστών διάχυσης D , των υδροδυναμικών ακτίνων R_h και των απόλυτων εντάσεων σκέδασης A , που αντιστοιχούν στη γρήγορη και στην αργή διαδικασία χαλάρωσης, των διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml των δειγμάτων SCPI, σε pH 7 και pH 3 με $I = 0.01$ M.

Δείγμα	pH	D_f ($10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	D_s ($10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	R_{hf} (nm)	R_{hs} (nm)	A_f	A_s	A_s/A_f
SCPI-54K	7	4.45 ± 0.1	3.6 ± 0.01	5.51	68.1	0.33	1.86	5.64
	3	4.05 ± 0.19	3.61 ± 0.01	6.05	67.9	0.9	1.23	1.37
SCPI-21K	7	4.77 ± 0.22	3.22 ± 0.01	5.32	76.1	0.3	1.24	4.13
	3	2.59 ± 0.13	3.04 ± 0.02	9.46	80.6	4.12	1.3	0.32

Όπως προαναφέρθηκε, σε pH 7 οι πολυηλεκτρολύτες SCPI φέρουν δύο αρνητικά φορτία ανά μονομερική μονάδα, ενώ σε pH 3 η πρωτονίωση της καρβοξυλικής ομάδας, οδηγεί στη μείωση της πυκνότητας φορτίου της αλυσίδας στο μισό. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η πρωτονίωση του αζώτου της σουλφαμικής ομάδας, λαμβάνει χώρα σε τιμές του pH μικρότερες του 2.²³² Η μεταβολή της πυκνότητας φορτίου λόγω της αλλαγής του pH επηρεάζει σημαντικά τους χρόνους χαλάρωσης και τους αντίστοιχους συντελεστές διάχυσης της κάθε διαδικασίας

χαλάρωσης των διαλυμάτων των πολυηλεκτρολυτών. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.1 και στον Πίνακα 3.1, ο D_f μειώνεται καθώς μειώνεται η πυκνότητα φορτίου και μάλιστα η μείωση αυτή είναι εντονότερη στην περίπτωση του δείγματος SCPI-21K, ενώ ο D_s παραμένει πρακτικά σταθερός. Ωστόσο, η συνεισφορά της αργής διαδικασίας χαλάρωσης στη συνολική κατανομή παρουσιάζει σημαντική εξασθένηση για μικρότερες τιμές της πυκνότητας φορτίου, όπως καταδεικνύει η μείωση της σχετικής απόλυτης έντασης σκέδασης της αργής προς την γρήγορη διαδικασία χαλάρωσης A_s/A_f . Παρόμοια συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί και στην περίπτωση διαλυμάτων πολυ(μεθακρυλικού οξέος).²³³

Οι παρατηρούμενες μεταβολές μπορούν να αποδοθούν στη θεώρηση ότι η γρήγορη διαδικασία χαλάρωσης αντιστοιχεί στη συζευγμένη διάχυση των μεμονωμένων αλυσίδων του πολυηλεκτρολύτη και των αντισταθμιστικών ιόντων του διαλύματος, ενώ η αργή διαδικασία χαλάρωσης αποδίδεται κυρίως στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων του πολυηλεκτρολύτη, δηλαδή στο σχηματισμό περιοχών πολλαπλών αλυσίδων (multichain domains). Καθώς μειώνεται η πυκνότητα φορτίου της αλυσίδας, τόσο οι αλληλεπιδράσεις της με τα αντισταθμιστικά ιόντα, όσο και ο σχηματισμός περιοχών πολλαπλών αλυσίδων μειώνονται, λόγω της εξασθένησης των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων του συστήματος.

Επιπροσθέτως, αναφορικά με την επίδραση του μοριακού βάρους στις ιδιότητες του πολυηλεκτρολύτη, παρατηρείται ότι σε pH 7 δεν σημειώνονται ιδιαίτερα σημαντικές μεταβολές των κατανομών των χρόνων χαλάρωσης και των αντίστοιχων συντελεστών διάχυσης D_f και D_s , μεταξύ των δύο δειγμάτων. Παρατηρείται μόνο μικρή αύξηση της συνεισφοράς της αργής διαδικασίας χαλάρωσης στη συνολική κατανομή, καθώς αυξάνεται το μοριακό βάρος. Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνευτεί ως αύξηση του αριθμού ή/και της πυκνότητας των περιοχών πολλαπλών αλυσίδων.

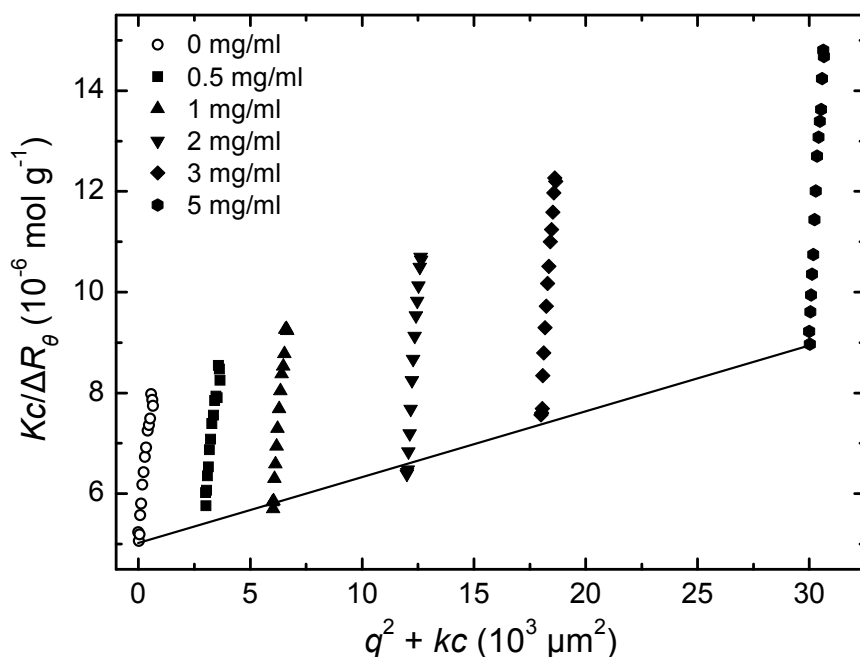
Αντιθέτως, σε pH 3 οι αλλαγές που προκαλούνται από τη μείωση της πυκνότητας φορτίου της αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη, είναι περισσότερο έκδηλες στην περίπτωση του δείγματος μικρότερου μοριακού βάρους SCPI-21K. Συγκεκριμένα, παρατηρείται αξιοσημείωτη μείωση της σχετικής έντασης σκέδασης της αργής διαδικασίας χαλάρωσης, παράλληλα με σημαντική μείωση του συντελεστή D_f . Προφανώς, η μείωση του μοριακού βάρους στην περίπτωση της χαμηλής

πυκνότητας φορτίου οδηγεί στην εξασθένηση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που προκάλεσαν τον σχηματισμό των αρχικών περιοχών πολλαπλών αλυσίδων. Συγχρόνως, παρατηρείται ο σχηματισμός νέων συσσωματωμάτων πολλαπλών αλυσίδων, τα οποία χαρακτηρίζονται από μικρότερο συντελεστή διάχυσης D_s και κατ' επέκταση μεγαλύτερη υδροδυναμική ακτίνα R_h . Τα συσσωματώματα αυτά πιθανότατα αποτελούνται από διαφορετικό αριθμό αλυσίδων και έχουν διαφορετική πυκνότητα, σε σχέση με τις αντίστοιχες περιοχές πολλαπλών αλυσίδων που σχηματίζονται σε pH 7.

Η συμπεριφορά αυτή, ενδεχομένως οφείλεται στο γεγονός ότι οι μικρότερες σε μήκος αλυσίδες, ανταποκρίνονται στη μείωση της πυκνότητας του φορτίου τους, η οποία οδηγεί σε μειωμένη διαλυτότητα, μέσω του σχηματισμού περισσότερο πυκνών και συμπαγών συσσωματωμάτων, σε αντίθεση με τις μεγαλύτερες σε μήκος αλυσίδες, οι οποίες μπορούν να αντισταθμίσουν τη μείωση του φορτίου τους μέσω αναδιάταξης της διαμόρφωσής τους. Η παρατηρούμενη συσσωμάτωση του δείγματος SCPI-21K σε pH 3, συνδέεται άμεσα με τον εν μέρει υδροφοβικό χαρακτήρα της αλυσίδας και έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση της διαλυτότητας του πολυηλεκτρολύτη, γεγονός που οδηγεί σε περαιτέρω συσσωμάτωση και τελικά καθίζηση του διαλύματος, μετά την πάροδο περίπου δύο εβδομάδων. Αντιθέτως, τα υπόλοιπα διαλύματα πολυηλεκτρολυτών που μελετήθηκαν (του δείγματος SCPI-54K σε pH 7 και pH 3 και του δείγματος SCPI-21K σε pH 7) παρέμεναν σταθερά για πολύ μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα.

Συμπληρωματικά με τις μετρήσεις δυναμικής σκέδασης, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός (SLS) σε πολλαπλές γωνίες, συναρτήσει της συγκέντρωσης του πολυηλεκτρολύτη. Στο Σχήμα 3.3 παρουσιάζεται ένα τυπικό διάγραμμα Zimm, του δείγματος SCPI-54K σε pH 3 με $I = 0.01$ M, όπου η συγκέντρωση του διαλύματος κυμαίνεται από 0.5 έως 5 mg/ml. Μέσω της ανάλυσης του διαγράμματος Zimm, εξάγονται οι τιμές του μοριακού βάρους M_w , της γυροσκοπικής ακτίνας R_g και του δεύτερου συντελεστή Virial A_2 και τα αποτελέσματα και των δύο δειγμάτων σε pH 7 και σε pH 3 με $I = 0.01$ M συνοψίζονται στον Πίνακα 3.2, συμπεριλαμβανομένων των τιμών της υδροδυναμικής ακτίνας R_h , που εξάγεται από τις ταυτόχρονες μετρήσεις δυναμικής σκέδασης σε πολλαπλές γωνίες και του χαρακτηριστικού λόγου $\rho = R_g/R_h$, ο οποίος παρέχει πληροφορίες σχετικά με το σχήμα, την πυκνότητα και τη γενικότερη διαμόρφωση

των σκεδαζόντων σωματιδίων.



Σχήμα 3.3: Τυπικό διάγραμμα Zimm του δείγματος SCPI-54K σε pH 3 με $I = 0.01 \text{ M}$. Η συγκέντρωση του διαλύματος κυμαίνεται από 0.5 έως 5 mg/ml.

Πίνακας 3.2: Συνοπτικά αποτελέσματα των μετρήσεων στατικής και δυναμικής σκέδασης φωτός σε πολλαπλές γωνίες, των δειγμάτων SCPI σε pH 7 και σε pH 3 με $I = 0.01 \text{ M}$.*

Δείγμα	pH	M_w (10^5 g mol^{-1})	R_g (nm)	R_h (nm)	$\rho = R_g/R_h$	A_2 ($10^{-4} \text{ mol ml g}^{-2}$)
SCPI-54K	7	1.89	87.2	63.6	1.37	1.8
	3	1.92	55.9	29.5	1.89	3.7
SCPI-21K	7	0.91	84.8	58.9	1.44	6
	3	4.06	35	17.8	1.96	0.5

* Μέση τιμή σχετικών σφαλμάτων: $M_w \pm 4\%$, $R_g \pm 3\%$, $R_h \pm 7\%$, $A_2 \pm 13\%$.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι εφόσον έχει διαπιστωθεί, από τις μετρήσεις δυναμικής σκέδασης, ότι τα συγκεκριμένα διαλύματα πολυηλεκτρολυτών περιέχουν δύο διαφορετικά είδη σκεδαζόντων σωματιδίων, η ανάλυση των μετρήσεων στατικής σκέδασης δεν είναι απολύτως ακριβής και οι προσδιοριζόμενες τιμές των

παραμέτρων M_w , R_g , R_h και A_2 , αποτελούν στην ουσία ένα σύνθετο μέσο όρο των αντίστοιχων τιμών όλων των σκεδαζόντων σωματιδίων του διαλύματος, ο οποίος εξαρτάται από τη σχετική τους συγκέντρωση, μάζα, μέγεθος, σχήμα και πυκνότητα. Εν τούτοις, μέσω των αποτελεσμάτων αυτών είναι δυνατή η εξαγωγή κάποιων συμπληρωματικών πληροφοριών για τα μελετώμενα συστήματα.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2, οι πειραματικές τιμές του M_w είναι λίγο μεγαλύτερες από τις πραγματικές τιμές των πολυηλεκτρολυτών (Πίνακας 2.2: M_w SCPI-54K $\approx 1.54 \times 10^5$ g mol⁻¹ και M_w SCPI-21K $\approx 6 \times 10^4$ g mol⁻¹), εκτός από την περίπτωση του δείγματος SCPI-21K σε pH 3, όπου παρατηρείται μεγαλύτερη διαφορά. Επομένως, οι μετρήσεις στατικής σκέδασης επίσης καταδεικνύουν την αυξημένη τάση για συσσωμάτωση του συγκεκριμένου δείγματος (SCPI-21K), υπό αυτές τις συνθήκες του διαλύματος (pH 3), όπως προαναφέρθηκε.

Με βάση τα όσα συζητήθηκαν παραπάνω, η σκέδαση των υπόλοιπων διαλυμάτων πολυηλεκτρολυτών επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία των περιοχών πολλαπλών αλυσίδων. Οπότε, οι τιμές των M_w , R_g και R_h πιθανότατα ανταποκρίνονται περισσότερο στη μάζα και στο μέγεθος των περιοχών πολλαπλών αλυσίδων, παρά στα αντίστοιχα χαρακτηριστικά των μεμονωμένων αλυσίδων. Η γενική τάση για το δείγμα SCPI-54K είναι ότι ενώ το M_w παραμένει σταθερό, οι R_g και R_h μειώνονται καθώς ελαττώνεται η πυκνότητα φορτίου της αλυσίδας. Η μεταβολή αυτή μπορεί να ερμηνευτεί κυρίως ως μείωση του μεγέθους των περιοχών πολλαπλών αλυσίδων, η οποία ενδεχομένως οφείλεται στη ενδομοριακή συσσωμάτωση μεταξύ τμημάτων της αλυσίδας, η υδροφοβικότητα των οποίων αυξάνεται, καθώς μειώνεται η πυκνότητα φορτίου. Επίσης, η παρατηρούμενη τάση ενδέχεται να οφείλεται στη μείωση του σχηματισμού περιοχών πολλαπλών αλυσίδων λόγω της εξασθένησης των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, η οποία λαμβάνει χώρα στις μικρότερες τιμές του pH.

Ωστόσο, καθώς οι πειραματικές τιμές του M_w δεν διαφέρουν κατά πολύ από τις πραγματικές τιμές των πολυηλεκτρολυτών, μπορεί να θεωρηθεί ότι οι περιοχές πολλαπλών αλυσίδων έχουν σχετικά μικρή μάζα και πυκνότητα, δηλαδή αποτελούνται από μικρό αριθμό αλυσίδων, καθώς και ότι είναι σχετικά λίγες σε αριθμό. Συγχρόνως, οι τιμές του χαρακτηριστικού λόγου ρ υποδηλώνουν ότι η διαμόρφωση των σκεδαζόντων σωματιδίων του διαλύματος είναι σχετικά χαλαρή.²³⁴
²³⁵ Τέλος, η τιμή του συντελεστή A_2 είναι σημαντικά μικρότερη στην περίπτωση του

δείγματος SCPI-21K σε pH 3, υποδεικνύοντας τη μείωση της ποιότητας του διαλύτη, γεγονός που επιβεβαιώνεται από την παρατηρούμενη αργή καθίζηση του πολυηλεκτρολύτη υπό αυτές τις συνθήκες.

Προκειμένου να εξαχθούν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με το ενεργό φορτίο των σωματιδίων που περιέχονται στα διαλύματα των πολυηλεκτρολυτών, καθώς και την πολικότητα του μικροπεριβάλλοντος των αλυσίδων των πολυηλεκτρολυτών, διενεργήθηκαν συμπληρωματικές μετρήσεις ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός^{18, 54} και φασματοσκοπίας φθορισμού με χρήση ιχνηθέτη πυρενίου,^{56, 57} σε διαλύματα συγκέντρωσης 5 mg/ml των δύο δειγμάτων SCPI, υπό τις ίδιες συνθήκες pH και ιοντικής ισχύος. Οι μετρούμενες τιμές του δυναμικού ζήτα, ζ_p , και του χαρακτηριστικού λόγου των εντάσεων της πρώτης προς την τρίτη κορυφή του φάσματος εκπομπής του πυρενίου, I_1/I_3 , παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3: Τιμές του δυναμικού ζήτα και του χαρακτηριστικού λόγου I_1/I_3 , που εξάγονται από τις αντίστοιχες μετρήσεις ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός και φασματοσκοπίας φθορισμού, των διαλυμάτων συγκέντρωσης 5 mg/ml των δειγμάτων SCPI, σε pH 7 και pH 3 με $I = 0.01$ M.

Δείγμα	pH	ζ_p (mV)	I_1/I_3
SCPI-54K	7	- 39.5 ± 3	1.02
	3	- 41 ± 1	1.03
SCPI-21K	7	- 56.9 ± 3	1.22
	3	- 52 ± 4	1.22

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός, το δυναμικό ζήτα των σωματιδίων είναι αρνητικό, όπως αναμένεται για αρνητικά φορτισμένες αλυσίδες. Η απόλυτη τιμή του ζ_p παραμένει πρακτικά ανεξάρτητη του pH για το δείγμα SCPI-54K, ενώ στην αντίστοιχη περίπτωση του δείγματος SCPI-21K παρατηρείται μικρή μείωση ως συνέπεια της μείωσης της πυκνότητας φορτίου της αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη. Η συμπεριφορά αυτή, είναι πιθανότατα συνέπεια του γεγονότος ότι το μετρούμενο φορτίο βρίσκεται κατανεμημένο στην περιφέρεια των σωματιδίων. Επομένως, παρόλο που η πυκνότητα

φορτίου της αλυσίδας μειώνεται, η κατανομή των φορτίων δεν μεταβάλλεται σημαντικά, καθώς τα σωματίδια που σχηματίζονται στο διάλυμα προσπαθούν να διατηρήσουν τη διαλυτότητά τους εκθέτοντας φορτία στην επιφάνειά τους.

Επιπροσθέτως, μία μικρή αύξηση της απόλυτης τιμής του ζ_r παρατηρείται για το δείγμα μικρότερου μοριακού βάρους. Η παρατήρηση αυτή, ενδέχεται να συσχετίζεται με το γεγονός ότι οι πιθανές αναδιατάξεις και οι περιορισμοί της διαμόρφωσης της αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη, επιτρέπουν μεγαλύτερη έκθεση φορτίων στην περίπτωση των αλυσίδων μικρότερου μήκους, οι οποίες υπόκεινται σε περιορισμένο αριθμό επιτρεπτών διαμορφώσεων. Άλλωστε, στην περίπτωση των αλυσίδων μεγαλύτερου μήκους, η ενδομοριακή σύνδεση μεταξύ διαφορετικών υδρόφοβων τμημάτων (η οποία οδηγεί σε μικρότερο αριθμό εκτεθειμένων φορτίων) είναι περισσότερο πιθανή από ότι στην περίπτωση των αλυσίδων μικρότερου μήκους.

Ο χαρακτηριστικός λόγος I_1/I_3 που εξάγεται από τις φασματοσκοπικές μετρήσεις φθορισμού, παρέχει μία εκτίμηση του αριθμού ή/και του μεγέθους των υδρόφοβων μικροπεριοχών που υπάρχουν στο διάλυμα, δεδομένου ότι ο λόγος αυτός επηρεάζεται σημαντικά από την πολικότητα του περιβάλλοντος του πυρενίου. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.3, η τιμή του λόγου I_1/I_3 είναι η ίδια και για τις δύο διαφορετικές τιμές του pH, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο αριθμός ή/και το μέγεθος των υδρόφοβων μικροπεριοχών είναι ανεξάρτητα της πυκνότητας φορτίου της αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη. Βέβαια, το συμπέρασμα αυτό ισχύει για το μικροπεριβάλλον του πυρενίου διότι, λόγω του μικρού του μεγέθους, ο ιχνηθέτης είναι ευαίσθητος σε αλλαγές της πολικότητας σε πολύ τοπική κλίμακα.

Αντιθέτως, ο λόγος I_1/I_3 φαίνεται να εξαρτάται από το μοριακό βάρος της αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη. Συγκεκριμένα, το δείγμα με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος εμφανίζει μικρότερες τιμές I_1/I_3 , οι οποίες αντιστοιχούν σε μεγαλύτερο αριθμό ή/και μέγεθος υδρόφοβων μικροπεριοχών στο διάλυμα. Η διαπίστωση αυτή, πιθανότατα συνδέεται με την παρουσία μεγαλύτερου αριθμού υδρόφοβων τμημάτων/μικροπεριοχών στην αλυσίδα μεγαλύτερου μήκους. Επίσης, οι μεγαλύτερου μήκους αλυσίδες είναι σε θέση να υιοθετήσουν μεγαλύτερο αριθμό διαμορφώσεων, επιτρέποντας έτσι την ενδομοριακή και διαμοριακή συσσωμάτωση των υδρόφοβων τμημάτων τους, σχηματίζοντας καλά καθορισμένες υδρόφοβες περιοχές.

Επισημαίνεται ότι τα συμπεράσματα που εξάγονται με βάση τις τιμές του ζ_p και του λόγου I_1/I_3 , ανταποκρίνονται κυρίως στην περίπτωση μεμονωμένων πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων, οπότε η εφαρμογή τους στην περίπτωση των περιοχών ή των συσσωματωμάτων πολλαπλών αλυσίδων δεν είναι βέβαιη. Ωστόσο, η πολύ τοπική δομή των σωματιδίων αυτών, θα πρέπει να συσχετίζεται κατά κάποιον τρόπο με τη δομή των μεμονωμένων αλυσίδων, εκ των οποίων αποτελούνται.

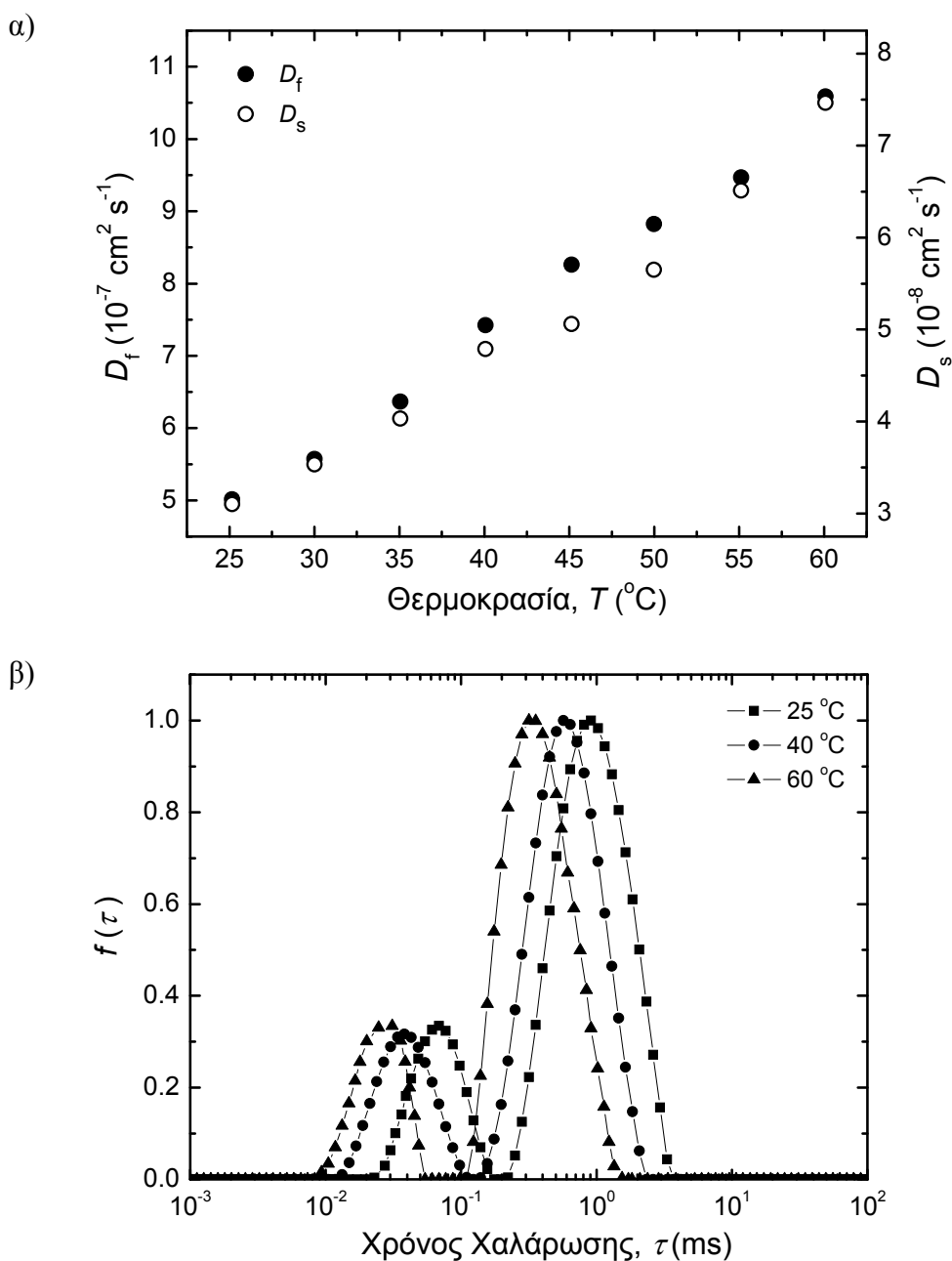
3.1.2. Επίδραση της θερμοκρασίας

Με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης της θερμοκρασίας στις ιδιότητες σε διάλυμα του πολυηλεκτρολύτη SCPI,^{36, 48, 236-240} διεξήχθησαν μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός, για το διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δείγματος SCPI-54K σε pH 7 με $I = 0.01$ M, στο εύρος θερμοκρασιών από 25 έως 60 °C. Η αύξηση της θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκε ανά 5 °C και το διάλυμα του πολυηλεκτρολύτη παρέμενε σε κάθε θερμοκρασία 15 λεπτά, πριν από κάθε μέτρηση, ώστε να επιτευχθεί εξισορρόπηση. Στο Σχήμα 3.4α παρουσιάζεται η θερμοκρασιακή εξάρτηση των συντελεστών διάχυσης της γρήγορης και της αργής διαδικασίας χαλάρωσης, D_f και D_s , ενώ στο Σχήμα 3.4β παρατίθενται οι αντίστοιχες κατανομές των χρόνων χαλάρωσης του διαλύματος στις 90° και στη θερμοκρασία των 25, 40 και 60 °C. Σημειώνεται ότι για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων, έχει ληφθεί υπόψη η μεταβολή του ιξώδους του διαλύτη συναρτήσει της θερμοκρασίας.

Αμφότεροι οι συντελεστές D_f και D_s αυξάνονται με τον ίδιο ρυθμό, καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία του διαλύματος. Συγχρόνως, η συνεισφορά της κάθε διαδικασίας χαλάρωσης στη συνολική κατανομή παραμένει πρακτικά αμετάβλητη. Η παρατηρούμενη αύξηση των τιμών των συντελεστών D_f και D_s , αντιστοιχεί σε μείωση των τιμών των αντίστοιχων υδροδυναμικών ακτίνων R_{hf} και R_{hs} , από 4.9 σε 2.3 nm και από 79 σε 32.8 nm, αντίστοιχα. Όπως διαπιστώνεται, η επίδραση της θερμοκρασίας είναι ιδιαίτερος σημαντική και οδηγεί σε μείωση του μεγέθους των σωματιδίων στο διάλυμα κατά περίπου 50 %, στο υπό μελέτη εύρος θερμοκρασιών.

Επίσης, τόσο η συνολική ένταση σκέδασης του διαλύματος, η οποία εκφράζεται μέσω του λόγου I/I_{tot} , όσο και οι απόλυτες εντάσεις σκέδασης της κάθε διαδικασίας χαλάρωσης A_f και A_s , παρουσιάζουν αντίστοιχη μείωση καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία. Αντιθέτως, δεν παρατηρείται ιδιαίτερη μεταβολή του λόγου A_s/A_f , όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.5, όπου παρουσιάζεται η θερμική εξάρτηση του λόγου I/I_{tot} ,

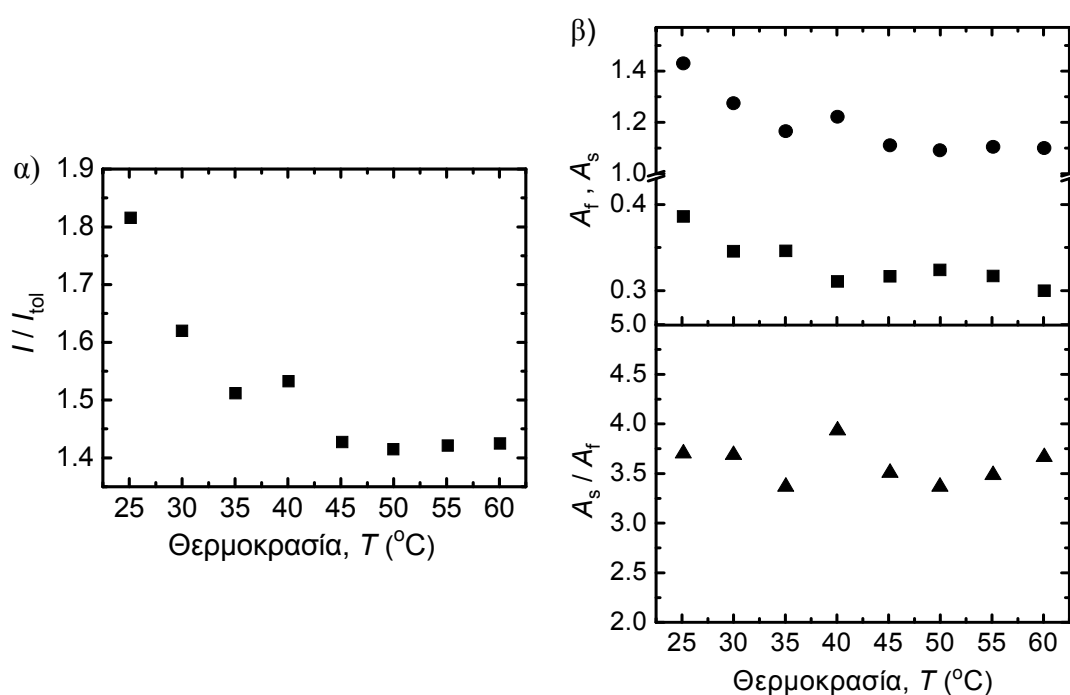
των απόλυτων εντάσεων A_f και A_s , καθώς και του λόγου τους A_s/A_f .



Σχήμα 3.4: α) Θερμοκρασιακή εξάρτηση των συντελεστών διάχυσης της γρήγορης και της αργής διαδικασίας χαλάρωσης, D_f και D_s , για το διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δείγματος SCPI-54K σε pH 7 με $I = 0.01$ M. β) Οι αντίστοιχες κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις 90° και στη θερμοκρασία των 25, 40 και 60 °C.

Εφόσον, η αύξηση της θερμοκρασίας επηρεάζει εξίσου και τις δύο διαδικασίες χαλάρωσης του συστήματος, συμπεραίνεται ότι οι παρατηρούμενες μεταβολές οφείλονται στην ενίσχυση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των τμημάτων της αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη. Η ενίσχυση αυτή, έχει ως αποτέλεσμα τόσο οι

μεμονωμένες αλυσίδες, όσο και οι περιοχές πολλαπλών αλυσίδων, να υιοθετούν λιγότερο εκτεταμένες διαμορφώσεις, γεγονός που συνεπάγεται τη μείωση του μεγέθους τους. Παράλληλα, ο σχετικός αριθμός των δύο διαφορετικών σκεδαζόντων σωματιδίων του διαλύματος πιθανότατα διατηρείται σταθερός, καθώς η σχετική συνεισφορά της κάθε διαδικασίας χαλάρωσης στη συνολική κατανομή παραμένει σταθερή. Παρόμοια επίδραση της θερμοκρασίας, έχει παρατηρηθεί στην περίπτωση διαλυμάτων του μετά νατρίου άλατος του πολυ(σουλφοοκτακρυλικού μεθυλεστερά),²³⁷ καθώς και στην περίπτωση του σχηματισμού πολλαπλών στρωμάτων πολυ(σουλφονομένου στυρενίου).²³⁹

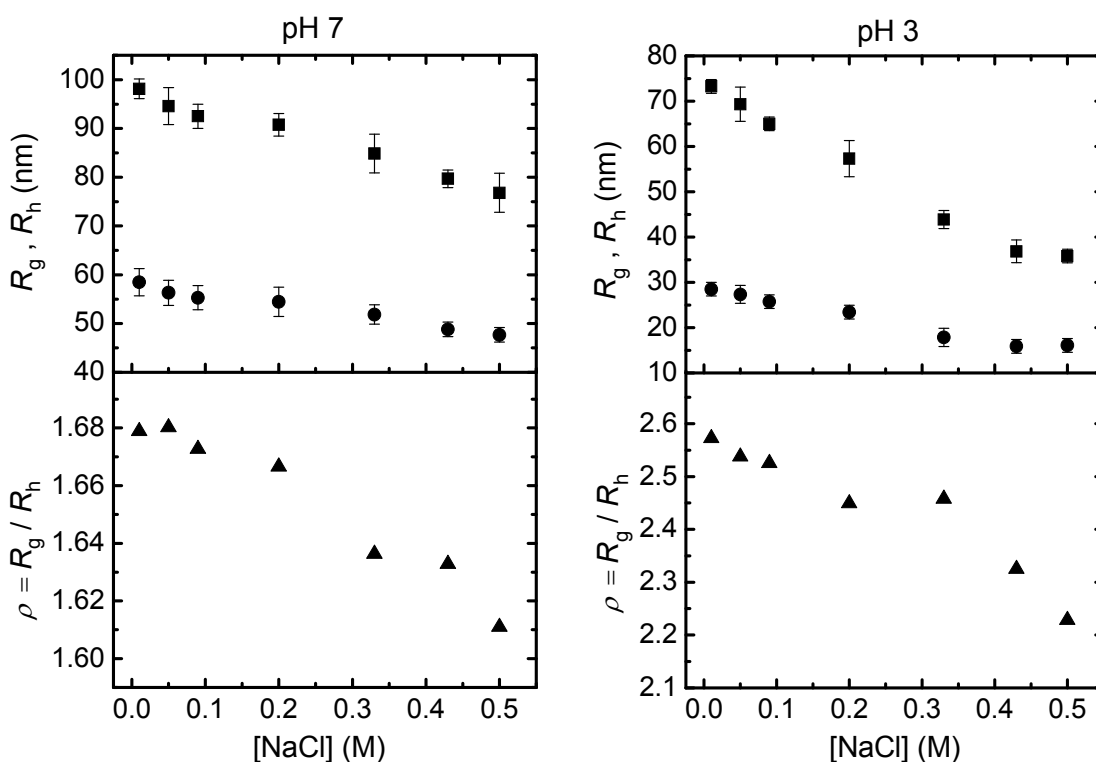


Σχήμα 3.5: Θερμοκρασιακή εξάρτηση α) της συνολικής έντασης σκέδασης του διαλύματος I/I_{tot} , β) των απόλυτων εντάσεων σκέδασης της γρήγορης A_f (τετράγωνα) και της αργής A_s (κύκλοι) διαδικασίας χαλάρωσης, καθώς και του λόγου τους A_s/A_f , για το διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δείγματος SCPI-54K σε pH 7 με $I = 0.01$ M.

3.1.3. Επίδραση της ιοντικής ισχύος

Μία από τις πιο σημαντικές παραμέτρους, που επηρεάζουν τις ιδιότητες σε διάλυμα των πολυηλεκτρολυτών, είναι η ιοντική ισχύς του διαλύματος. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του άλατος, λαμβάνει χώρα η σταδιακή προάσπιση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αλυσίδων του πολυηλεκτρολύτη, η οποία επιδρά σημαντικά στη δυναμική του συστήματος.²³⁻³²

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση αυτή στις ιδιότητες των συγκεκριμένων πολυηλεκτρολυτών, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις δυναμικής και στατικής σκέδασης φωτός σε διαλύματα του δείγματος μεγαλύτερου μοριακού βάρους SCPI-54K και στις δύο τιμές του pH, συναρτήσει της συγκέντρωσης του άλατος NaCl. Η αύξηση της συγκέντρωσης του NaCl έγινε μέσω σταδιακής προσθήκης κατάλληλων ποσοτήτων υδατικού διαλύματος NaCl συγκέντρωσης 1 M σε pH 7 ή σε pH 3, στα ήδη παρασκευασμένα διαλύματα του πολυηλεκτρολύτη. Στο Σχήμα 3.6 παρουσιάζονται οι τιμές των ακτίνων R_g και R_h , οι οποίες εξάγονται από στατικές και δυναμικές μετρήσεις σε πολλαπλές γωνίες, καθώς και του χαρακτηριστικού τους λόγου ρ για διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δείγματος SCPI-54K, τόσο σε pH 7 όσο και σε pH 3, συναρτήσει της συγκέντρωσης του NaCl, η οποία κυμαίνεται από 0.01 έως 0.5 M.



Σχήμα 3.6: Εξάρτηση από την ιοντική ισχύ των ακτίνων R_g (τετράγωνα) και R_h (κύκλοι), καθώς και του χαρακτηριστικού τους λόγου ρ , για το διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δείγματος SCPI-54K, τόσο σε pH 7 όσο και σε pH 3.

Μέσω του Σχήματος 3.6 διαπιστώνεται ότι τόσο οι τιμές των δύο ακτίνων R_g και R_h , όσο και του λόγου τους ρ , μειώνονται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του NaCl και η τάση αυτή είναι ακόμα εντονότερη σε pH 3. Ανάλογες μεταβολές έχουν

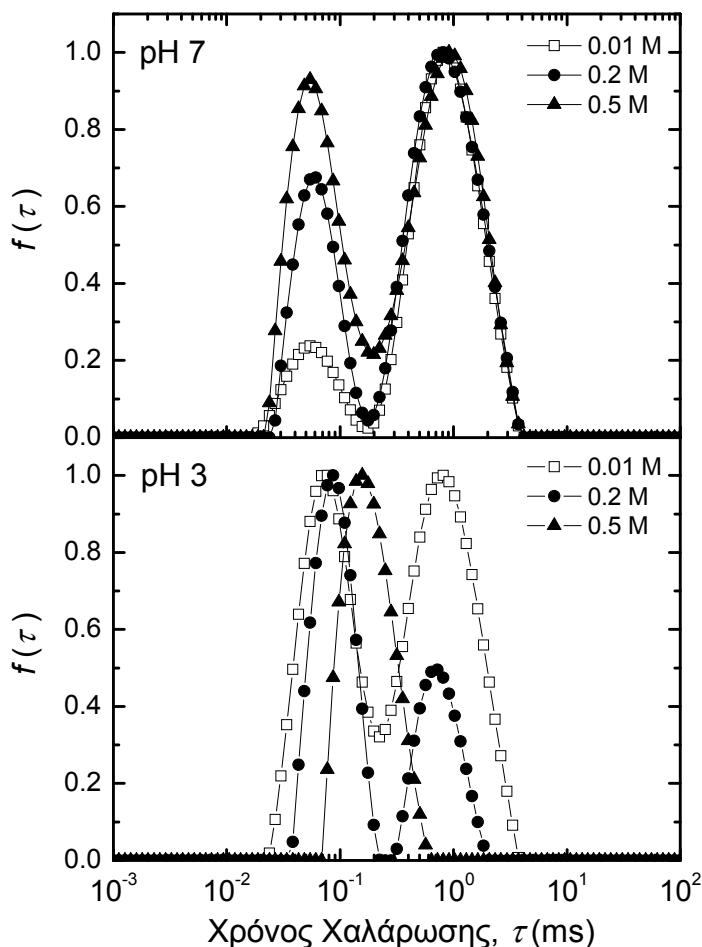
παρατηρηθεί και στις περιπτώσεις διαλυμάτων υδροφοβικά τροποποιημένων πολυ(2-βινυλοπυριδινών) και πολυ(σουλφονομένου στυρενίου),²⁸ του πολυσακχαρίτη χιτοζάνη,²⁹ καθώς και του πολυ(ακρυλικού νατρίου).³⁰

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι τιμές των R_g και R_h , που εξάγονται από μετρήσεις σε πολλαπλές γωνίες, αντιστοιχούν κυρίως στο μέγεθος των περιοχών πολλαπλών αλυσίδων του διαλύματος, οι οποίες σχηματίζονται λόγω των ηλεκτροστατικών και των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αλυσίδων του πολυηλεκτρολύτη. Προφανώς, καθώς αυξάνεται η ιοντική ισχύς του διαλύματος, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων εξασθενούν, εξαιτίας της επαγόμενης προάσπισης των φορτίων. Επομένως, οι παρατηρούμενες μεταβολές των R_g , R_h και ρ υποδηλώνουν την αναδιοργάνωση των αλυσίδων του πολυηλεκτρολύτη, η οποία πιθανότατα συνοδεύεται από το διαχωρισμό των αρχικών περιοχών πολλαπλών αλυσίδων. Ο διαχωρισμός αυτός εκφράζεται μέσω της μείωσης τόσο του μεγέθους, όσο και της πυκνότητας των περιοχών πολλαπλών αλυσίδων, αυξανόμενης της ιοντικής ισχύος. Η επίδραση αυτή είναι εντονότερη σε pH 3, επειδή οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις στην περίπτωση αυτή, είναι ασθενέστερες των αντίστοιχων σε pH 7, λόγω της μειωμένης πυκνότητας φορτίου της αλυσίδας.

Η υποδηλούμενη αναδιοργάνωση των αλυσίδων του πολυηλεκτρολύτη και ο πιθανός διαχωρισμός ή ακόμα και η εξάλειψη των περιοχών πολλαπλών αλυσίδων, επιβεβαιώνονται περαιτέρω μέσω του μετασχηματισμού των κατανομών των χαρακτηριστικών χρόνων χαλάρωσης των διαλυμάτων, συναρτήσει της αυξανόμενης ιοντικής ισχύος. Στο Σχήμα 3.7 παρουσιάζονται οι κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις 90°, για το διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δείγματος SCPI-54K, σε pH 7 και σε pH 3, για διαφορετικές τιμές της ιοντικής ισχύος, $I = 0.01, 0.2$ και 0.5 M.

Είναι εμφανές ότι σε pH 7, παρατηρείται μείωση της σχετικής συνεισφοράς της αργής διαδικασίας χαλάρωσης ως προς την αντίστοιχη της γρήγορης διαδικασίας χαλάρωσης στη συνολική κατανομή, καθώς αυξάνεται η ιοντική ισχύς του διαλύματος. Η μείωση αυτή επίσης καταδεικνύεται από τις μεταβολές των απόλυτων εντάσεων σκέδασης της κάθε διαδικασίας χαλάρωσης A_f και A_s , καθώς και του λόγου τους A_s/A_f , συναρτήσει της ιοντικής ισχύος, οι οποίες παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.8. Παρόλο που οι απόλυτες εντάσεις και των δύο διαδικασιών χαλάρωσης αυξάνονται, η αύξηση της απόλυτης έντασης A_f είναι περισσότερο έντονη, με αποτέλεσμα ο λόγος A_s/A_f να μειώνεται, καθώς αυξάνει η ιοντική ισχύς. Οι παρατηρούμενες μεταβολές

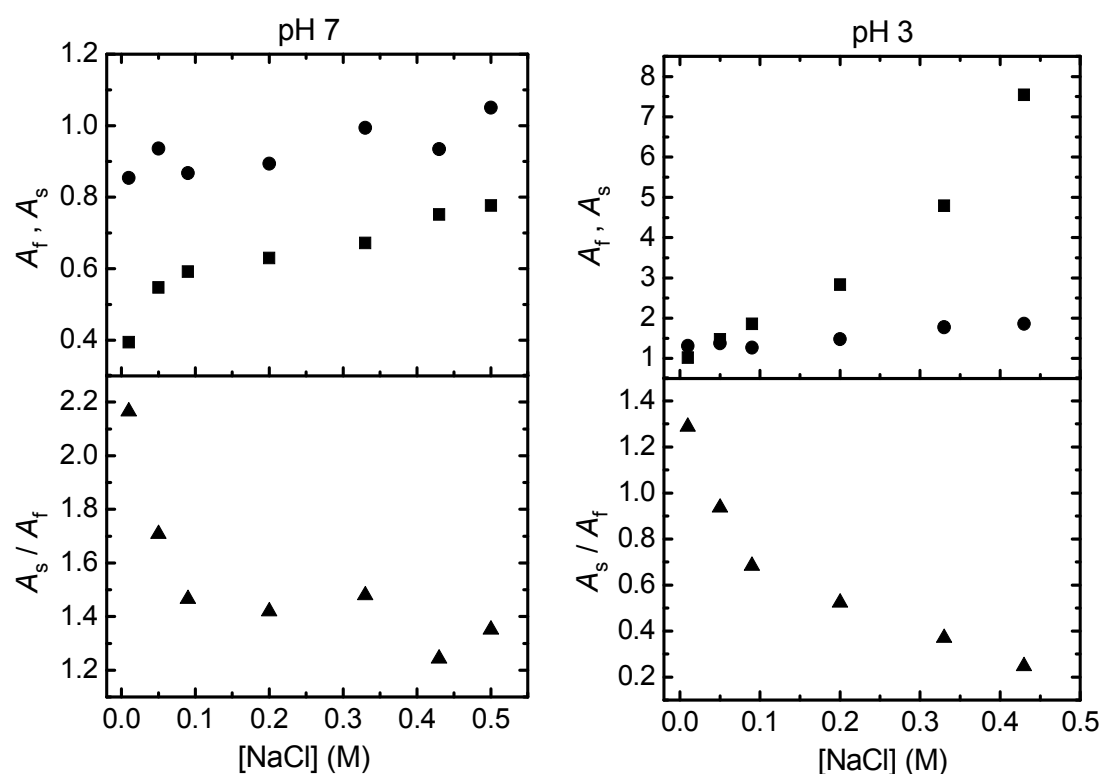
υποδεικνύουν τη μείωση του μεγέθους ή/και του αριθμού των περιοχών πολλαπλών αλυσίδων του διαλύματος.



Σχήμα 3.7: Κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις 90° , για το διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δείγματος SCPI-54K, τόσο σε pH 7 όσο και σε pH 3, για διαφορετικές τιμές της ιοντικής ισχύος, $I = 0.01, 0.2$ και 0.5 M.

Σε pH 3, η μείωση της σχετικής συνεισφοράς της αργής διαδικασίας χαλάρωσης, η οποία εκφράζεται μέσω του λόγου A_s/A_f , είναι ακόμα πιο έντονη. Στην περίπτωση μάλιστα της μεγαλύτερης τιμής ιοντικής ισχύος, $I = 0.5$ M, διαπιστώνεται η ύπαρξη μίας μόνο διαδικασίας χαλάρωσης, η οποία αντιστοιχεί σε ενδιάμεσο χρόνο χαλάρωσης, συγκριτικά με τις αρχικές διαδικασίες. Αυτή η διαδικασία χαλάρωσης, δεν μπορεί να αποδοθεί σε μεμονωμένες αλυσίδες του πολυηλεκτρολύτη, καθώς αντιστοιχεί σε σκεδάζοντα σωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους. Πιθανότατα, υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες του διαλύματος, λαμβάνει χώρα μία αναδιοργάνωση των αλυσίδων του πολυηλεκτρολύτη σε συσσωματώματα διαφορετικής μορφής. Οι μειωμένες τιμές του λόγου ρ υποδηλώνουν ότι τα συσσωματώματα αυτά περιέχουν

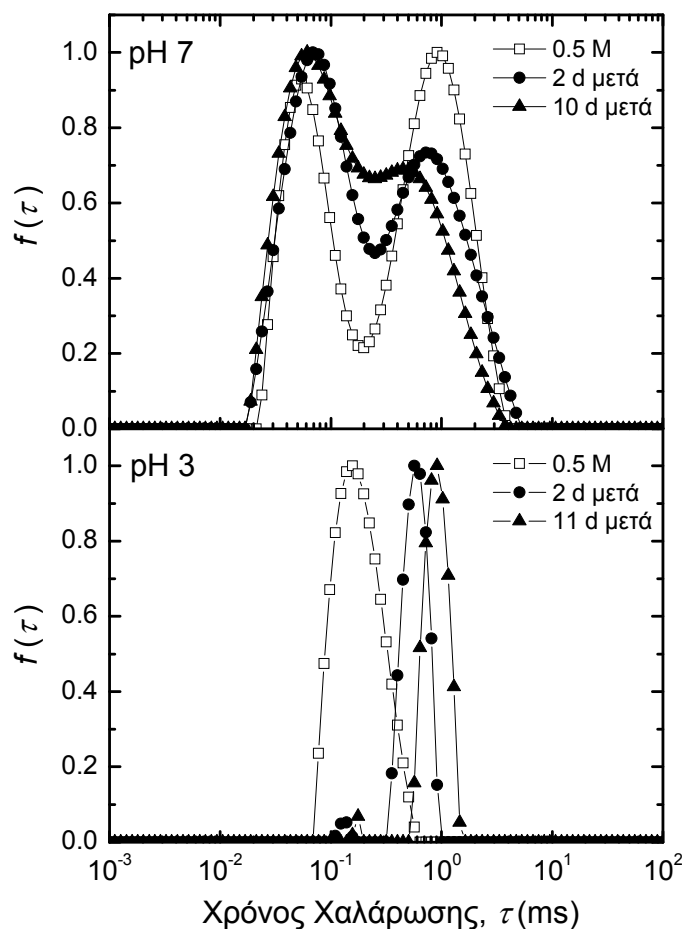
προφανώς μεγαλύτερο αριθμό αλυσίδων, έχουν μικρότερο μέγεθος και ενδεχομένως μεγαλύτερη πυκνότητα, σε σχέση με τις αρχικές περιοχές πολλαπλών αλυσίδων. Επιπλέον επιβεβαίωση στο συμπέρασμα αυτό, αποτελεί η παρατηρούμενη αύξηση των τιμών της έντασης σκέδασης του διαλύματος, συναρτήσει της αυξανόμενης ιοντικής ισχύος. Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων του πολυηλεκτρολύτη, διαδραματίζουν μείζονα ρόλο, καθώς αυξάνεται η ιοντική ισχύς του διαλύματος.



Σχήμα 3.8: Εξάρτηση από την ιοντική ισχύ των απόλυτων εντάσεων σκέδασης της γρήγορης A_f (τετράγωνα) και της αργής A_s (κύκλοι) διαδικασίας χαλάρωσης, καθώς και του λόγου τους A_s/A_f , για το διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δείγματος SCPI-54K, τόσο σε pH 7 όσο και σε pH 3.

Μία ιδιαίτερως ενδιαφέρουσα επίδραση της επαγόμενης προάσπισης των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, η οποία λαμβάνει χώρα στο διάλυμα στην περίπτωση των υψηλών τιμών της ιοντικής ισχύος, είναι η χρονική εξέλιξη των διαλυμάτων. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.9, το ίδιο διάλυμα σε pH 7 με $I = 0.5$ M, κατά τη μέτρησή του μετά από 2 και 10 μέρες, παρουσιάζει σημαντική μείωση της σχετικής συνεισφοράς της αργής διαδικασίας χαλάρωσης. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η αναδιοργάνωση των περιοχών πολλαπλών αλυσίδων εξελίσσεται με

το χρόνο και μάλιστα μπορεί να χαρακτηριστεί ως μία σχετικά αργή κινητικά διαδικασία.



Σχήμα 3.9: Χρονική εξέλιξη των κατανομών των χρόνων χαλάρωσης στις 90°, για το διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δείγματος SCPI-54K, σε pH 7 και σε pH 3 με $I = 0.5$ M, μετά από 2 μέρες και μετά από 10 ή 11 μέρες.

Αντιθέτως, σε pH 3 η χρονική εξέλιξη του διαλύματος με $I = 0.5$ M μετά από 2 και 11 μέρες, έχει ως αποτέλεσμα τη σχεδόν πλήρη εξάλειψη της γρήγορης διαδικασίας χαλάρωσης και την παράλληλη επανεμφάνιση της αργής διαδικασίας χαλάρωσης ή τη μετατόπιση της προϋπάρχουσας γρήγορης διαδικασίας σε μεγαλύτερους χρόνους χαλάρωσης. Η μετάβαση αυτή μπορεί να αποδοθεί σε δευτερογενή συσσωμάτωση των αλυσίδων του πολυηλεκτρολύτη, καθώς η εκτεταμένη προάσπιση των φορτίων, η οποία επέρχεται στις υψηλές τιμές της ιοντικής ισχύος, επιδεινώνει σημαντικά τη διαλυτότητα των αλυσίδων και τελικά οδηγεί στην καθίζηση του διαλύματος. Σημειώνεται επίσης ότι στη συγκεκριμένη περίπτωση η δευτερογενής συσσωμάτωση των αλυσίδων, ενισχύεται περαιτέρω εξαιτίας του εν μέρει υδροφοβικού χαρακτήρα του πολυηλεκτρολύτη SCPI.

3.2. Σύμπλεξη του πολυηλεκτρολύτη SCPI με λυσοζύμη

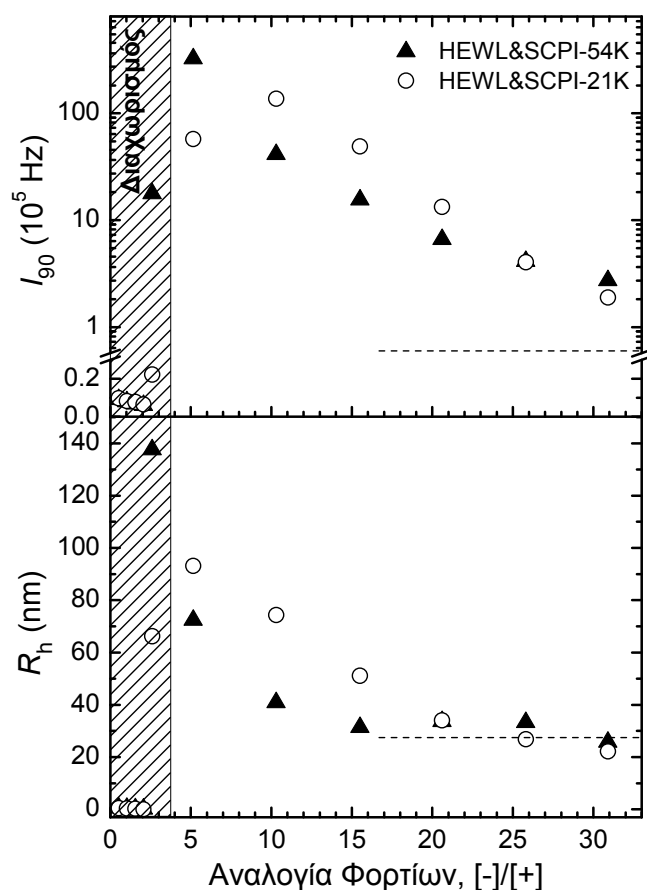
Η διαδικασία της σύμπλεξης μεταξύ πολυηλεκτρολυτών και πρωτεϊνών, καθοδηγείται κυρίως από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο ειδών μακρομορίων. Η αλληλεπίδραση των φορτισμένων τμημάτων της αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη με τα αντίθετα φορτισμένα επιφανειακά τμήματα του πρωτεϊνικού μορίου αποτελεί τη βάση του μηχανισμού της σύμπλεξης. Παρόλα αυτά, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις του συστήματος διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο. Επομένως, τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της δομής του πολυηλεκτρολύτη SCPI (δηλαδή η εξαρτώμενη από το pH πυκνότητα φορτίου και ο εν μέρει υδροφοβικός χαρακτήρας της αλυσίδας), προσδίδουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη μελέτη της σύμπλεξης του συγκεκριμένου πολυηλεκτρολύτη με τη λυσοζύμη. Εκτός αυτού, η επίσης εξαρτώμενη από το pH τιμή του θετικού καθαρού φορτίου της λυσοζύμης, αποτελεί επιπρόσθετο σημείο ενδιαφέροντος του υπό μελέτη συστήματος. Η διερεύνηση της διαδικασίας σύμπλεξης, καθώς και των ιδιοτήτων σε διάλυμα και της δομής των σχηματιζόμενων συμπλόκων μεταξύ του πολυηλεκτρολύτη SCPI και της λυσοζύμης, πραγματοποιήθηκε συναρτήσει της συγκέντρωσης και του μοριακού βάρους του πολυηλεκτρολύτη, καθώς και του pH και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος. Επίσης, ιδιαίτερο βάρος δόθηκε στη μελέτη της δομής της πρωτεΐνης μετά τη σύμπλεξη.

3.2.1. Σύμπλεξη σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M

Η διαδικασία της σύμπλεξης μεταξύ της λυσοζύμης (HEWL) και των δύο πολυηλεκτρολυτών διαφορετικού μοριακού βάρους, SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, διερευνήθηκε αρχικά μέσω μετρήσεων δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS). Σε pH 7, η αλυσίδα του πολυηλεκτρολύτη φέρει δύο αρνητικά φορτία ανά μονομερική μονάδα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ενώ το μόριο της λυσοζύμης φέρει καθαρό θετικό φορτίο ίσο με + 8.^{133, 134} Υπό αυτές της συνθήκες η ηλεκτροστατικά καθοδηγούμενη σύμπλεξη αναμένεται να ευνοείται σημαντικά.

Στο Σχήμα 3.10 παρουσιάζονται οι τιμές της έντασης σκέδασης στις 90° , I_{90} , οι οποίες έχουν διορθωθεί ως προς την αύξηση της συγκέντρωσης, καθώς και της υδροδυναμικής ακτίνας R_h , οι οποίες εξάγονται από τις μετρήσεις DLS των διαλυμάτων των συμπλόκων, συναρτήσει της αναλογίας φορτίων του πολυηλεκτρολύτη ως προς τα φορτία της πρωτεΐνης στο διάλυμα, [-]/[+]. Η αναλογία

των φορτίων του εκάστοτε διαλύματος, προσδιορίζεται ως η μοριακή αναλογία του συνολικού αριθμού των αρνητικών ως προς τα αντίστοιχα θετικά φορτία στον κύριο όγκο του διαλύματος. Η συγκέντρωση της HEWL είναι σταθερή και ίση με 0.25 mg/ml και στις δύο σειρές των διαλυμάτων, ενώ η συγκέντρωση των δειγμάτων SCPI-54K και SCPI-21K, κυμαίνεται από 0.01 έως 0.6 mg/ml. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν κατά προσέγγιση, τις αντίστοιχες τιμές των I_{90} και R_h των διαλυμάτων των καθαρών πολυηλεκτρολυτών. Συγκεκριμένα, για διαλύματα συγκέντρωσης 0.5 mg/ml του δείγματος SCPI-54K, είναι $I_{90} \approx 65$ kHz και $R_h \approx 30$ nm, ενώ του δείγματος SCPI-21K, είναι $I_{90} \approx 50$ kHz και $R_h \approx 25$ nm. Οι αντίστοιχες τιμές για τη λυσοζύμη είναι ακόμα μικρότερες, δηλαδή $I_{90} \approx 20$ kHz και $R_h \approx 1.8$ nm, για διάλυμα συγκέντρωσης 0.5 mg/ml.



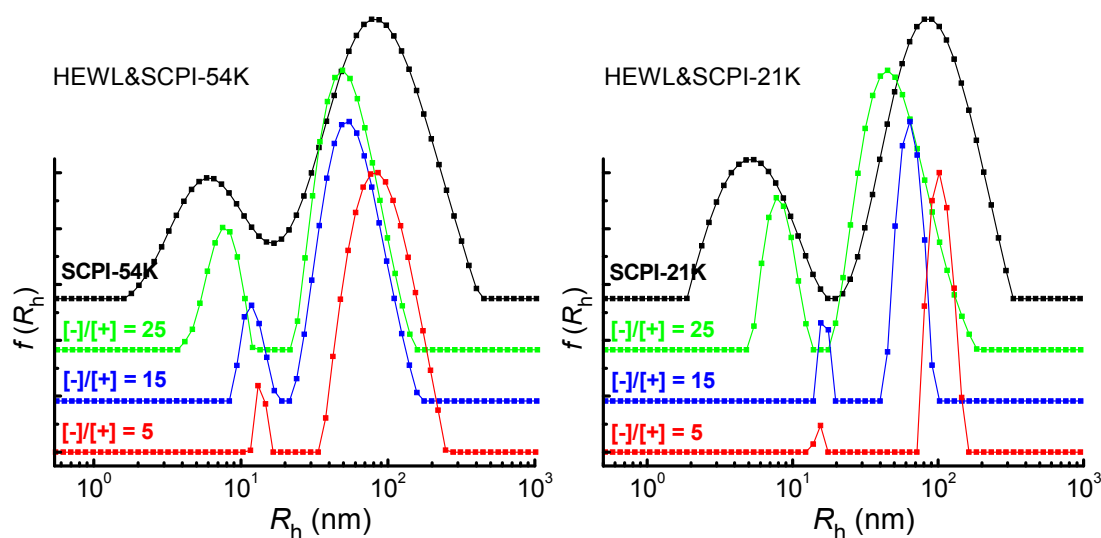
Σχήμα 3.10: Ένταση σκέδασης στις 90°, I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων [-]/[+], για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και των δειγμάτων SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν κατά προσέγγιση τις αντίστοιχες τιμές των διαλυμάτων των πολυηλεκτρολυτικών.

Όπως φαίνεται, οι τιμές της έντασης σκέδασης I_{90} (η οποία είναι ανάλογη της μάζας των σκεδαζόντων σωματιδίων) και της υδροδυναμικής ακτίνας R_h , είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες τιμές των διαλυμάτων των αμιγών συστατικών στις περισσότερες περιπτώσεις. Το γεγονός αυτό αποτελεί απόδειξη του ότι η σύμπλεξη λαμβάνει πράγματι χώρα. Επιπλέον, οι ιδιότητες σε διάλυμα και η δομή των συμπλόκων εξαρτώνται τόσο από την αναλογία των φορτίων, όσο και από το μοριακό βάρος του πολυηλεκτρολύτη SCPI. Στο εύρος τιμών της αναλογίας φορτίων από 0.5 έως 3 (πλούσια σε πρωτεΐνη περιοχή), παρατηρείται ο διφασικός διαχωρισμός των διαλυμάτων των συμπλόκων (coacervation). Στην περίπτωση αυτή, οι αντίστοιχες τιμές των I_{90} και R_h προέρχονται από τη μέτρηση του υπερκείμενου διαλύματος. Για $[-]/[+] < 3$, διαπιστώνεται η ύπαρξη μόνο ελεύθερης λυσοζύμης στο υπερκείμενο διάλυμα, οπότε συμπεραίνεται ότι όλες οι αλυσίδες του πολυηλεκτρολύτη έχουν συμπλεχθεί. Μετά το σχηματισμό τους, τα σύμπλοκα πιθανότατα υφίστανται δευτερογενή συσσωμάτωση, η οποία οδηγεί στο διφασικό διαχωρισμό του διαλύματος. Για $[-]/[+] = 3$, παραμένουν στο υπερκείμενο διάλυμα μεγάλα σε μέγεθος σύμπλοκα ή συσσωματώματα.

Τα υπόλοιπα διαλύματα συμπλόκων δεν παρουσιάζουν διφασικό διαχωρισμό και παραμένουν διαυγή για μεγάλα χρονικά διαστήματα, έως και μερικούς μήνες. Η μέγιστη τιμή του μεγέθους των συμπλόκων, παρατηρείται για αναλογία φορτίων περίπου ίση με 5. Οι μεγαλύτερες τιμές της αναλογίας φορτίων, έχουν ως αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση τόσο της μάζας, όσο και του μεγέθους των συμπλόκων. Ειδικά στην περίπτωση των υψηλών τιμών της αναλογίας φορτίων (πλούσια σε πολυηλεκτρολύτη περιοχή), το μέγεθος των συμπλόκων είναι σχεδόν ίσο με το αντίστοιχο μέγεθος των πολυηλεκτρολυτών, ενώ η μάζα τους παραμένει σημαντικά μεγαλύτερη. Επομένως, εξάγεται το συμπέρασμα ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυηλεκτρολύτη και κάθε αλυσίδα αλληλεπιδρά με λιγότερα μόρια λυσοζύμης, τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα περιλαμβάνουν μειούμενο αριθμό αλυσίδων πολυηλεκτρολύτη και πρωτεϊνικών μορίων. Η σύγκριση των δύο διαφορετικού μοριακού βάρους πολυηλεκτρολυτών, υποδηλώνει ότι το δείγμα SCPI-21K σχηματίζει μεγαλύτερα και πυκνότερα σύμπλοκα, στο ενδιάμεσο εύρος τιμών της αναλογίας φορτίων. Προφανώς, η περισσότερο εκτεταμένη διαμόρφωση της μικρότερου μήκους αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη, καθιστά δυνατή την αλληλεπίδρασή της με αυξημένο αριθμό πρωτεϊνικών μορίων, σε σχέση με τη

μεγαλύτερου μήκους. Παρόμοια εξάρτηση από το μοριακό βάρος του πολυηλεκτρολύτη, έχει παρατηρηθεί και στις περιπτώσεις της σύμπλεξης μεταξύ του μετά καλίου άλατος της πολυ(θειικής βινυλικής αλκοόλης) και της λυσοζύμης,¹⁵⁷ καθώς και μεταξύ του πολυσακχαρίτη χιτοζάνη και της ινσουλίνης.¹⁵⁹

Οι τιμές της υδροδυναμικής ακτίνας R_h που παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.10, προκύπτουν από τις μετρήσεις DLS μέσω της ανάλυσης cumulants και στην ουσία αποτελούν μία μέση τιμή του μεγέθους των σκεδαζόντων σωματιδίων των διαλυμάτων των συμπλόκων. Μία περισσότερο λεπτομερής περιγραφή του είδους και του μεγέθους των σωματιδίων στο διάλυμα, εξάγεται μέσω της ανάλυσης CONTIN, η οποία παρέχει τις κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων του συστήματος. Στο Σχήμα 3.11 παρουσιάζονται οι κατανομές αυτές στις 90° , για τις δύο σειρές διαλυμάτων συμπλόκων της HEWL και των πολυηλεκτρολυτών SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, για αντιπροσωπευτικές τιμές της αναλογίας φορτίων, καθώς και οι αντίστοιχες κατανομές των διαλυμάτων των πολυηλεκτρολυτών, για λόγους σύγκρισης.



Σχήμα 3.11: Κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90° , για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και των δειγμάτων SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, για $[-]/[+] = 5, 15$ και 25 . Οι αντίστοιχες κατανομές των διαλυμάτων των πολυηλεκτρολυτών παρατίθενται επίσης, για λόγους σύγκρισης.

Όπως διαπιστώνεται, σε όλες τις περιπτώσεις οι κατανομές των διαλυμάτων των συμπλόκων εμφανίζουν δύο κορυφές, μία σε μικρότερες και μία σε μεγαλύτερες ακτίνες, γεγονός που υποδηλώνει ότι στα διαλύματα συνυπάρχουν δύο διαφορετικού

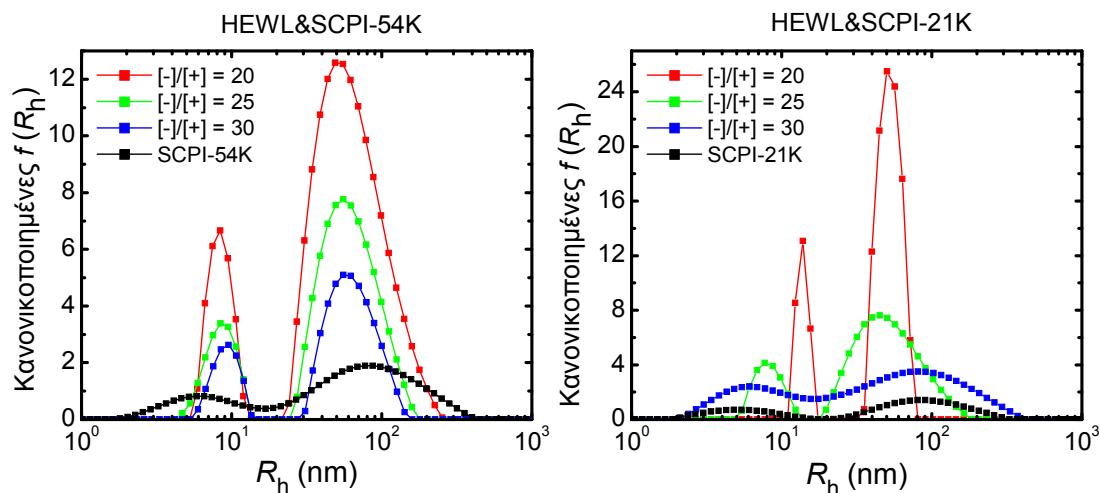
μεγέθους είδη σωματιδίων. Τα σωματίδια αυτά πιθανότατα αντιστοιχούν σε δύο διαφορετικά είδη συμπλόκων, δηλαδή σε μεγάλα συσσωματώματα συμπλόκων που αποτελούνται από υψηλό αριθμό αλυσίδων πολυηλεκτρολύτη και πρωτεϊνικών μορίων και σε μικρότερα σύμπλοκα αποτελούμενα από σχετικά μικρό αριθμό αλυσίδων πολυηλεκτρολύτη και πρωτεϊνικών μορίων. Παρομοίως, οι αντίστοιχες κατανομές των διαλυμάτων των πολυηλεκτρολυτών εμφανίζουν δύο κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν στο μέγεθος των μεμονωμένων αλυσίδων του πολυηλεκτρολύτη και των περιοχών πολλαπλών αλυσίδων, όπως έχει ήδη αναφερθεί.

Καθώς αυξάνεται η αναλογία φορτίων των διαλυμάτων των συμπλόκων, και για τους δύο πολυηλεκτρολύτες, παρατηρείται μείωση τόσο του μεγέθους των δύο διαφορετικών σωματιδίων, όσο και της σχετικής συνεισφοράς στη συνολική κατανομή των μεγαλύτερων συσσωματωμάτων. Η μεταβολή αυτή, έχει ως αποτέλεσμα την παρατηρούμενη μείωση των τιμών της μέσης υδροδυναμικής ακτίνας R_h (Σχήμα 3.10).

Μολονότι οι κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων για τα διαλύματα των συμπλόκων εμφανίζουν σημαντικές ομοιότητες με τις αντίστοιχες κατανομές των διαλυμάτων των πολυηλεκτρολυτών, ειδικά στην περίπτωση των υψηλών τιμών της αναλογίας φορτίων, είναι σχεδόν βέβαιο ότι αντιστοιχούν σε σύμπλοκα και όχι σε ελεύθερες αλυσίδες πολυηλεκτρολύτη. Το συμπέρασμα αυτό, βασίζεται στο γεγονός ότι η ένταση σκέδασης και κατ' αναλογία η μάζα των σκεδαζόντων σωματιδίων, για τα διαλύματα των συμπλόκων, είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των διαλυμάτων των πολυηλεκτρολυτών, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.10. Προκειμένου να καταστεί η διαφορά αυτή εμφανέστερη, παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.12 οι κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων για τις δύο σειρές διαλυμάτων συμπλόκων της HEWL και των δειγμάτων SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, για τις μεγαλύτερες τιμές της αναλογίας φορτίων, οι οποίες έχουν κανονικοποιηθεί ως προς την ένταση σκέδασης του διαλύματος. Συγκεκριμένα, κάθε κατανομή έχει υποστεί κατάλληλη κανονικοποίηση, έτσι ώστε η εκάστοτε μέγιστη τιμή να αντιστοιχεί στην συνολική ένταση σκέδασης του διαλύματος, η οποία εκφράζεται μέσω του λόγου I/I_{tot} της σχέσης (3.1).

Είναι εμφανές ότι ακόμα και για τις υψηλότερες τιμές της αναλογίας φορτίων, η ένταση των κατανομών των διαλυμάτων των συμπλόκων είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη ένταση των κατανομών των διαλυμάτων των

πολυηλεκτρολυτών, αποδεικνύοντας ότι η μάζα των σωματιδίων που περιέχονται στα διαλύματα των συμπλόκων είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των διαλυμάτων των πολυηλεκτρολυτών. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν ελεύθερες αλυσίδες πολυηλεκτρολύτη στα διαλύματα των συμπλόκων.

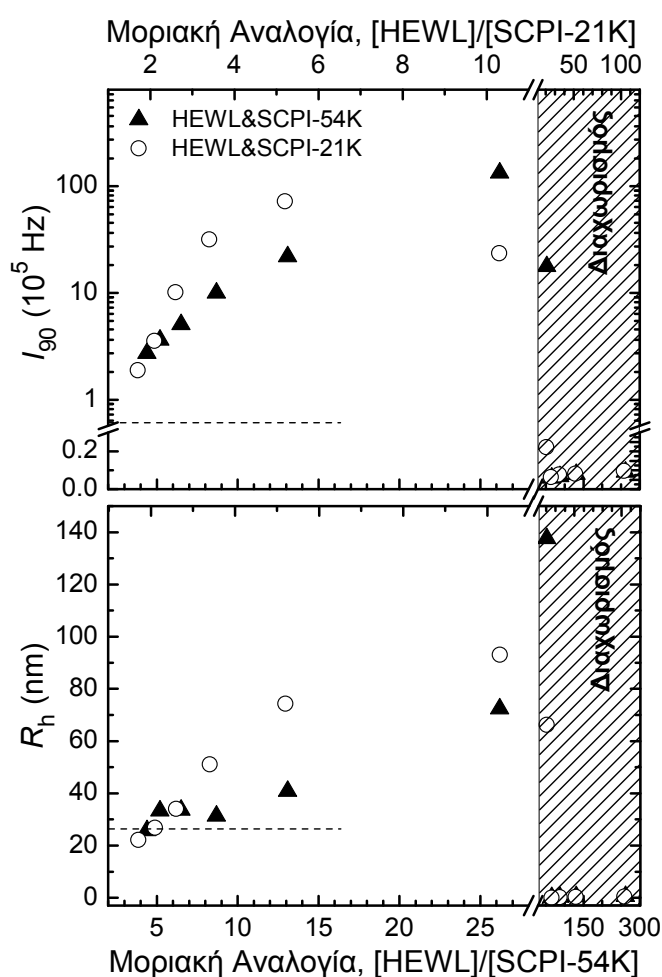


Σχήμα 3.12: Κανονικοποιημένες, ως προς τη συνολική ένταση του διαλύματος, κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90° , για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και των δειγμάτων SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, για $[-]/[+] = 20, 25$ και 30 . Οι αντίστοιχες κανονικοποιημένες κατανομές των διαλυμάτων των πολυηλεκτρολυτών παρατίθενται επίσης, για λόγους σύγκρισης.

Ένας εναλλακτικός τρόπος παρουσίασης των αποτελεσμάτων των μετρήσεων DLS του Σχήματος 3.10, είναι εφικτός μέσω της αναπαράστασής τους συναρτήσει της μοριακής αναλογίας των δύο συστατικών των διαλυμάτων των συμπλόκων. Δηλαδή, της αναλογίας των συνολικών moles της λυσοζύμης, ως προς τα αντίστοιχα moles των πολυηλεκτρολυτών στον συνολικό όγκο του διαλύματος, $[\text{HEWL}]/[\text{SCPI-54K}]$ και $[\text{HEWL}]/[\text{SCPI-21K}]$. Η αναλογία αυτή ουσιαστικά υποδηλώνει τον αριθμό των πρωτεϊνικών μορίων που αντιστοιχούν σε κάθε μία αλυσίδα του πολυηλεκτρολύτη. Στο Σχήμα 3.13 παρουσιάζονται οι τιμές της έντασης σκέδασης στις 90° , I_{90} , και της υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , συναρτήσει της μοριακής αναλογίας, για τις δύο σειρές διαλυμάτων συμπλόκων της HEWL και των πολυηλεκτρολυτών SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M.

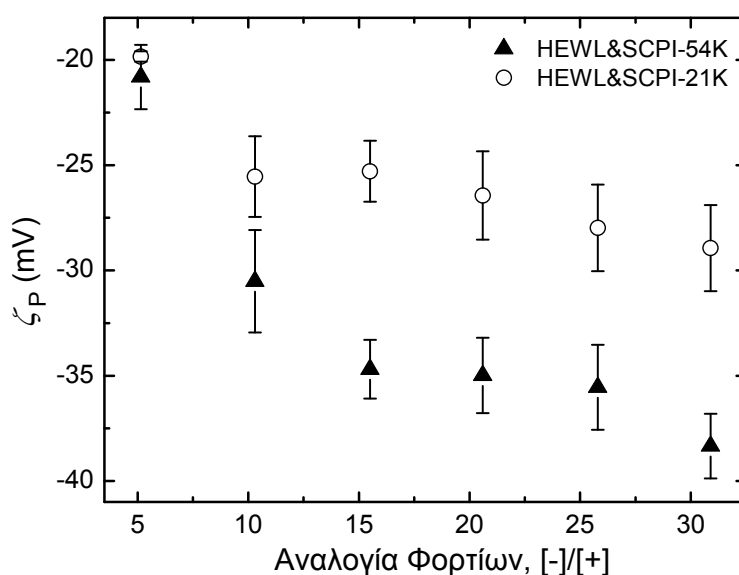
Τόσο οι τιμές της έντασης σκέδασης I_{90} , όσο και της υδροδυναμικής ακτίνας R_h , αυξάνονται καθώς αυξάνεται η μοριακή αναλογία. Οι παρατηρούμενες μεταβολές καταδεικνύουν την αύξηση τόσο της μάζας, όσο και του μεγέθους των συμπλόκων, η

οποία τελικά οδηγεί στο διφασικό διαχωρισμό του διαλύματος. Η συμπεριφορά αυτή, επιβεβαιώνει το συμπέρασμα ότι καθώς αυξάνεται ο αριθμός των πρωτεϊνικών μορίων που αλληλεπιδρούν με κάθε αλυσίδα του πολυηλεκτρολύτη, δηλαδή καθώς αυξάνεται η μοριακή αναλογία ή αντίστοιχα μειώνεται η αναλογία φορτίων, το μέγεθος των συμπλόκων αυξάνεται, όπως επίσης και ο συνολικός αριθμός πρωτεϊνικών μορίων και αλυσίδων πολυηλεκτρολύτη που περιέχουν. Η αύξηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα, στην περιοχή των υψηλών τιμών της μοριακής αναλογίας, τα σύμπλοκα να μην είναι πλέον διαλυτά και επομένως να επέρχεται ο διφασικός διαχωρισμός του διαλύματος.



Σχήμα 3.13: Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της μοριακής αναλογίας $[\text{HEWL}]/[\text{SCPI-54K}]$ (κάτω άξονας x) ή $[\text{HEWL}]/[\text{SCPI-21K}]$ (επάνω άξονας x), για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και των δειγμάτων SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν κατά προσέγγιση τις αντίστοιχες τιμές των διαλυμάτων των πολυηλεκτρολυτών.

Με σκοπό την απόκτηση πληροφοριών σχετικά με το ενεργό φορτίο των συμπλόκων, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός (ELS), για τις δύο σειρές διαλυμάτων συμπλόκων της HEWL και των δειγμάτων SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Τα διαλύματα που παρουσίασαν διφασικό διαχωρισμό, εξαιρέθηκαν λόγω ανεπαρκούς σήματος. Οι μετρούμενες τιμές του δυναμικού ζήτα, ζ_p , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων, παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.14. Συγκριτικά, διάλυμα λυσοζύμης συγκέντρωσης 1 mg/ml έχει μετρούμενη τιμή $\zeta_p \approx +7$ mV, ενώ για διαλύματα των πολυηλεκτρολυτών SCPI-54K και SCPI-21K συγκέντρωσης 2 mg/ml οι αντίστοιχες τιμές είναι $\zeta_p \approx -45$ mV και $\zeta_p \approx -55$ mV.



Σχήμα 3.14: Δυναμικό ζήτα, ζ_p , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων [-]/[+], για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και των δειγμάτων SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M.

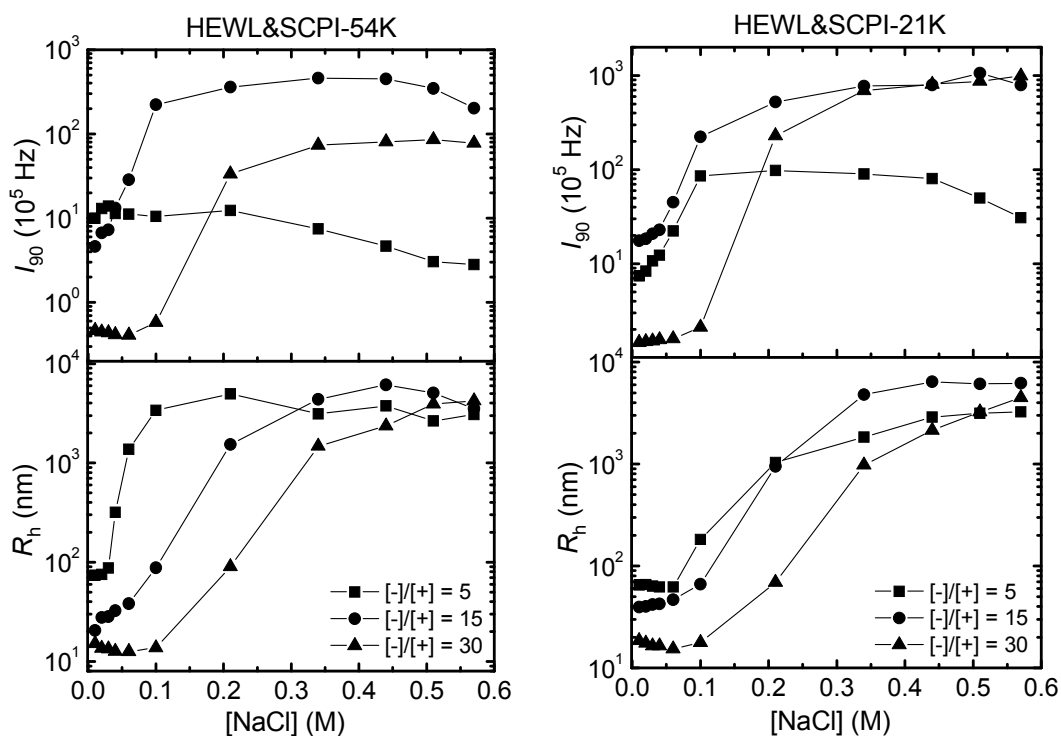
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ELS, δείχνουν ότι το ζ_p εξαρτάται από το μοριακό βάρος του πολυηλεκτρολύτη και ότι εμφανίζει αυξανόμενες αρνητικές τιμές, καθώς αυξάνεται η αναλογία φορτίων. Το συγκεκριμένο γεγονός υποδηλώνει ότι το ενεργό αρνητικό φορτίο των συμπλόκων, αυξάνεται συναρτήσει της συγκέντρωσης του πολυηλεκτρολύτη. Η παρατηρούμενη τάση, φαίνεται να είναι σε συμφωνία με τη θεώρηση ότι στις υψηλότερες τιμές της αναλογίας φορτίων, κάθε αλυσίδα πολυηλεκτρολύτη αλληλεπιδρά με λιγότερα πρωτεϊνικά μόρια. Ως αποτέλεσμα, ο βαθμός της εξουδετέρωσης των φορτίων της αλυσίδας μειώνεται και το ενεργό αρνητικό φορτίο των συμπλόκων αυξάνεται κατ' απόλυτη τιμή. Επιπροσθέτως, τα

σύμπλοκα που σχηματίζονται μεταξύ της HEWL και του δείγματος SCPI-21K, εμφανίζουν μειωμένες τιμές ενεργού φορτίου, συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές των συμπλόκων της HEWL και του δείγματος SCPI-54K. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει το συμπέρασμα ότι οι μικρότερες σε μήκος αλυσίδες πολυηλεκτρολύτη, αλληλεπιδρούν με μεγαλύτερο αριθμό πρωτεϊνικών μορίων, από ότι οι μεγαλύτερες. Επομένως, ο βαθμός εξουδετέρωσης των αρνητικών φορτίων της αλυσίδας, είναι μεγαλύτερος στην περίπτωση του συστήματος της HEWL και του δείγματος SCPI-21K.

Εν συνεχεία, διερευνήθηκε η επίδραση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος, στις ιδιότητες και τη δομή των ήδη σχηματισμένων συμπλόκων. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις DLS, συναρτήσει της συγκέντρωσης του άλατος NaCl. Η αύξηση της συγκέντρωσης του NaCl έγινε μέσω σταδιακής προσθήκης κατάλληλων ποσοτήτων υδατικού διαλύματος NaCl συγκέντρωσης 1 M σε pH 7 στα ήδη παρασκευασμένα διαλύματα των συμπλόκων. Στο Σχήμα 3.15 παρατίθενται οι αντίστοιχες τιμές της έντασης σκέδασης I_{90} και της υδροδυναμικής ακτίνας R_h για τρία αντιπροσωπευτικά διαλύματα με αναλογία φορτίων περίπου 5, 15 και 30, των δύο σειρών διαλυμάτων συμπλόκων της HEWL και των δειγμάτων SCPI-54K και SCPI-21K σε pH 7 συναρτήσει της ιοντικής ισχύος, η οποία κυμαίνεται από 0.01 έως 0.57 M.

Διαπιστώνεται ότι τόσο η μάζα, όσο και το μέγεθος των συμπλόκων, εμφανίζουν δραματική αύξηση καθώς αυξάνεται η ιοντική ισχύς του διαλύματος. Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι η παρατηρούμενη ασυνέπεια της μεταβολής των τιμών της έντασης I_{90} για τα διαλύματα με $[-]/[+] = 5$, οφείλεται στην καθίζηση που επέρχεται στα διαλύματα, εξαιτίας της ιδιαίτερα μεγάλης αύξησης της μάζας και του μεγέθους των συμπλόκων. Η ίδια παρατήρηση ισχύει και για τα υπόλοιπα διαλύματα του συστήματος της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, στην περίπτωση των υψηλότερων τιμών της ιοντικής ισχύος, με ανάλογη επίδραση και στις τιμές της ακτίνας R_h . Ακόμα βέβαια και στις περιπτώσεις που δεν παρατηρείται μείωση των τελικών τιμών των I_{90} και R_h , η καθίζηση επιβεβαιώνεται μέσω της μακροσκοπικής παρατήρησης των διαλυμάτων, μετά την πάροδο λίγων ημερών. Επιπροσθέτως, η μάζα και το μέγεθος των συμπλόκων στις υψηλότερες τιμές της ιοντικής ισχύος, προφανώς είναι εκτός των ορίων ανίχνευσης του οργάνου, με αποτέλεσμα σε κάποιες περιπτώσεις, οι τιμές των I_{90} και R_h να καταλήγουν στις ίδιες φαινομενικά τελικές

σταθερές τιμές.

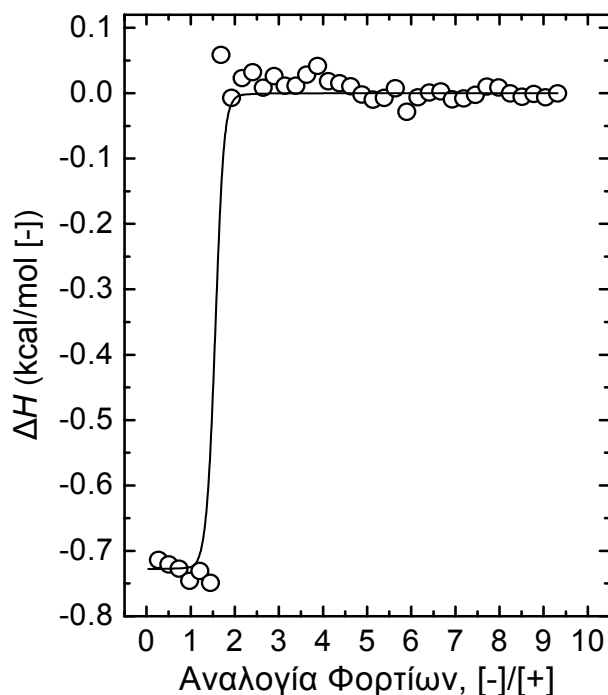


Σχήμα 3.15: Εξάρτηση από την ιοντική ισχύ της έντασης σκέδασης στις 90°, I_{90} , και της υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , για αντιπροσωπευτικά διαλύματα με $[-]/[+] = 5, 15$ και 30 , των σειρών διαλυμάτων συμπλόκων της HEWL και των δειγμάτων SCPI-54K και SCPI-21K σε pH 7.

Σύμφωνα με τις παρατηρούμενες μεταβολές, εξάγεται το συμπέρασμα ότι καθώς αυξάνει η ιοντική ισχύς του διαλύματος, επέρχεται σταδιακή εξασθένηση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων του συστήματος και πλέον οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις αρχίζουν να διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο. Άλλωστε, στο συγκεκριμένο σύστημα, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ενισχύονται περαιτέρω λόγω του εν μέρει υδροφοβικού χαρακτήρα του πολυηλεκτρολύτη SCPI. Ως αποτέλεσμα, λαμβάνει χώρα εκτεταμένη δευτερογενής συσσωμάτωση των συμπλόκων, η οποία τελικά οδηγεί στην καθίζηση του διαλύματος. Αντίστοιχη συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί στην περίπτωση συμπλόκων του πολυ(σουλφονομένου στυρενίου) και της λυσοζύμης, όπου διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη άλατος στο διάλυμα, οδήγησε στη συνένωση των συμπλόκων σε μεγαλύτερα συσσωματώματα.¹⁶⁵

Τέλος, η αλληλεπίδραση μεταξύ της λυσοζύμης και του πολυηλεκτρολύτη μεγαλύτερου μοριακού βάρους, μελετήθηκε μέσω μετρήσεων θερμοδομετρίας ισόθερμης τιτλοδότησης (ITC), ώστε να αποκτηθούν περαιτέρω πληροφορίες σχετικά

με τις θερμοδυναμικές παραμέτρους και τη στοιχειομετρία της αλληλεπίδρασης πρόσδεσης του συστήματος.^{168, 169} Η πειραματικά προσδιοριζόμενη μεταβολή της ενθαλπίας του συστήματος, ΔH , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$, για το σύστημα της HEWL και του δείγματος SCPI-54K σε pH 7 με $I = 0.01$ M, παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.16.



Σχήμα 3.16: Μεταβολή της ενθαλπίας ΔH , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$, για το σύστημα της HEWL και του δείγματος SCPI-54K σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Η συνεχόμενη γραμμή αντιπροσωπεύει το προσαρμοσμένο μοντέλο πρόσδεσης.

Η μεταβολή της ενθαλπίας υποδηλώνει ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ της λυσοζύμης και της αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη είναι εξώθερμη και πιθανότατα αμιγώς ηλεκτροστατική. Η συνολική μεταβολή ΔH της αλληλεπίδρασης είναι ίση με 790 kcal/mol του εγγεόμενου πολυηλεκτρολύτη SCPI-54K ή ισοδύναμα 0.73 kcal/mol των εγγεόμενων αρνητικών φορτίων. Η τιμή της σταθεράς πρόσδεσης K_B είναι μεγαλύτερη από 1×10^8 M⁻¹, γεγονός που καθιστά τον προσδιορισμό της εκτός των ορίων ανάλυσης του θερμιδόμετρου. Τέλος, η στοιχειομετρία της αλληλεπίδρασης N υπολογίζεται ότι αντιστοιχεί στο 1.4 της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$. Η τιμή αυτή της στοιχειομετρίας, ισοδυναμεί σε μοριακή αναλογία των αρνητικών φορτίων του συστήματος προς τα μόρια της λυσοζύμης, $[-]/[HEWL]$, περίπου ίση με 11. Δηλαδή, κάθε πρωτεϊνικό μόριο δεσμεύει περίπου 11 αρνητικά

φορτία της αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη. Η υπολογιζόμενη στοιχειομετρία είναι διαφορετική από αυτή που αναμένεται με βάση το γεγονός ότι το μόριο της λυσοζύμης φέρει καθαρό θετικό φορτίο ίσο με + 8 σε pH 7. Η διαφορά αυτή πιθανότατα οφείλεται στους τοπολογικούς περιορισμούς που επιβάλλει η χωρική διαμόρφωση της αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη. Εφόσον κάθε αλυσίδα φέρει κατά προσέγγιση συνολικό αριθμό αρνητικών φορτίων ίσο με 1100, η μέγιστη δυνατότητα πρόσδεσης υπολογίζεται περί τα 100 πρωτεϊνικά μόρια ανά αλυσίδα του πολυηλεκτρολύτη.

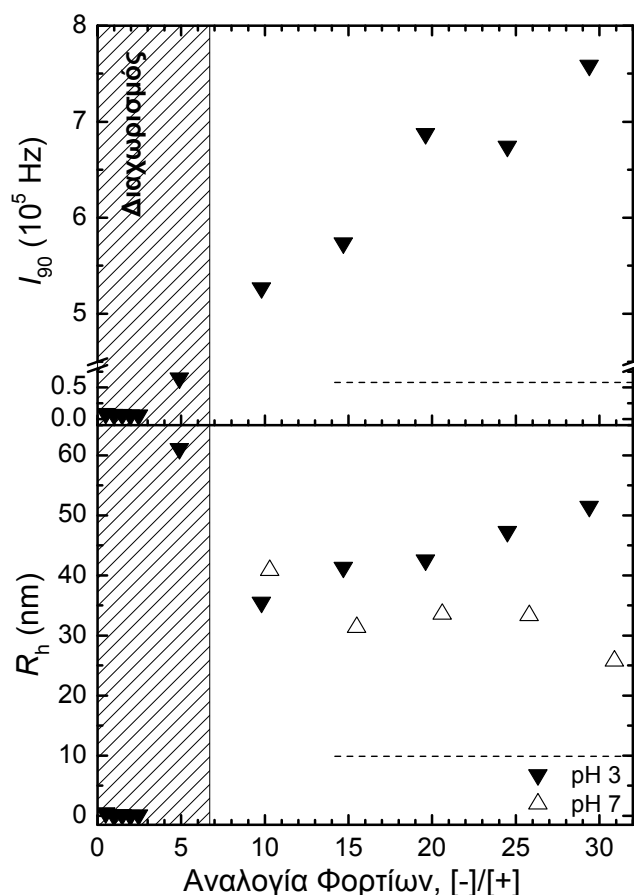
Επιπλέον, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.16, στην περιοχή των τιμών της αναλογίας φορτίων ακριβώς μετά τον κορεσμό της αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη, δηλαδή για $1.5 < [-]/[+] < 4$, τα δεδομένα της μέτρησης ITC καταδεικνύουν την ύπαρξη μικρού πλεονάσματος ενθαλπικής συνεισφοράς. Σύμφωνα με τα αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα της μεταβολής της ισχύος συναρτήσει του χρόνου, διαπιστώνεται ότι στην περιοχή αυτή, η εξισορρόπηση του συστήματος μετά από κάθε έγχυση, πραγματοποιείται σε μεγαλύτερους χαρακτηριστικούς χρόνους, από ότι για τιμές της αναλογίας φορτίων μικρότερες του 1.5. Η συμπεριφορά αυτή υποδηλώνει ότι το μετρούμενο θερμικό σήμα, στη συγκεκριμένη περιοχή, ενδεχομένως οφείλεται σε ενδόθερμες αλληλεπιδράσεις, οι οποίες σχετίζονται με διαδικασίες συσσωμάτωσης των τμημάτων των αλυσίδων του πολυηλεκτρολύτη, εξαιτίας των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους και γενικά χαρακτηρίζονται από αργή κινητική.

3.2.2. Σύμπλεξη σε pH 3 και ιοντική ισχύ 0.01 M

Οι εξαρτώμενες από το pH τιμές της πυκνότητας φορτίου της αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη και του φορτίου του μορίου της λυσοζύμης αποτελούν ισχυρό κίνητρο για τη συμπληρωματική μελέτη της σύμπλεξης σε pH 3. Σε αυτή την τιμή του pH, η λυσοζύμη φέρει θετικό καθαρό φορτίο ίσο με + 14,^{133, 134} ενώ η πυκνότητα φορτίου της αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη είναι μειωμένη στο μισό, σε σχέση με την αντίστοιχη σε pH 7, όπως έχει ήδη αναφερθεί.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων DLS των διαλυμάτων συμπλόκων της HEWL και του πολυηλεκτρολύτη SCPI-54K σε pH 3 με $I = 0.01$ M, παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.17, όπου παρατίθενται οι διορθωμένες ως προς την αύξηση της συγκέντρωσης τιμές της έντασης σκέδασης στις 90°, I_{90} , και οι αντίστοιχες τιμές της

υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων [-]/[+] του συστήματος. Η συγκέντρωση της HEWL διατηρείται σταθερή και ίση με 0.075 mg/ml σε όλη τη σειρά των διαλυμάτων, ενώ η συγκέντρωση του πολυηλεκτρολύτη SCPI-54K κυμαίνεται από 0.01 έως 0.6 mg/ml. Όπως και στην αντίστοιχη περίπτωση του Σχήμα 3.10, οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν κατά προσέγγιση, τις αντίστοιχες τιμές των I_{90} και R_h , για διάλυμα συγκέντρωσης 0.5 mg/ml του δείγματος SCPI-54K, οι οποίες είναι $I_{90} \approx 70$ kHz και $R_h \approx 10$ nm. Επίσης συμπεριλαμβάνονται οι αντίστοιχες τιμές της R_h του ίδιου συστήματος σε pH 7, για λόγους σύγκρισης.



Σχήμα 3.17: Ένταση σκέδασης στις 90°, I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων [-]/[+], για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 3 με $I = 0.01$ M. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν κατά προσέγγιση τις αντίστοιχες τιμές του διαλύματος του πολυηλεκτρολύτη. Οι αντίστοιχες τιμές της R_h του ίδιου συστήματος σε pH 7, συμπεριλαμβάνονται για λόγους σύγκρισης.

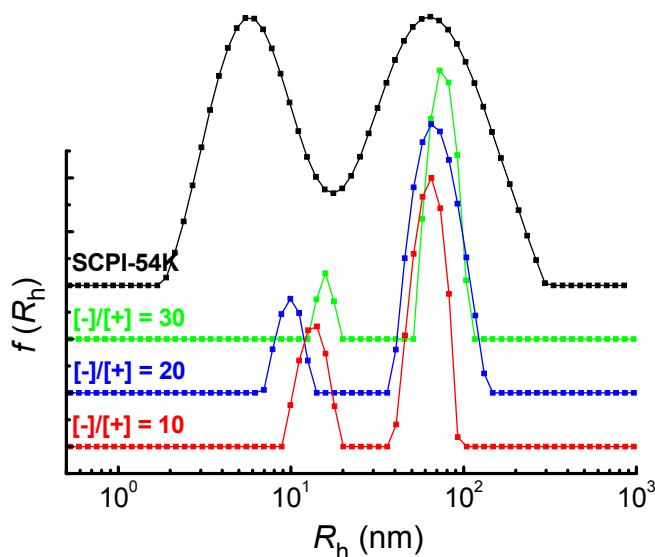
Για τις χαμηλές τιμές της αναλογίας φορτίων τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με τα αντίστοιχα σε pH 7. Στο εύρος τιμών της αναλογίας φορτίων από 0.5 έως 5

(πλούσια σε πρωτεΐνη περιοχή), παρατηρείται και πάλι ο διφασικός διαχωρισμός των διαλυμάτων των συμπλόκων. Η μέτρηση του υπερκείμενου διαλύματος για $[-]/[+] < 5$ καταδεικνύει την ύπαρξη μόνο ελεύθερης λυσοζύμης, γεγονός που υποδηλώνει ότι όλες οι αλυσίδες του πολυηλεκτρολύτη έχουν συμπλεχθεί. Για $[-]/[+] = 5$, παραμένουν στο υπερκείμενο διάλυμα μεγάλα σε μέγεθος σύμπλοκα ή συσσωματώματα.

Τα υπόλοιπα διαλύματα συμπλόκων δεν παρουσιάζουν διφασικό διαχωρισμό και παραμένουν διαυγή. Σε αντίθεση με την αντίστοιχη συμπεριφορά σε pH 7, τόσο η μάζα, όσο και το μέγεθος των συμπλόκων σε pH 3 εμφανίζουν μία σχετικά μικρή αύξηση, καθώς αυξάνεται η αναλογία φορτίων. Επιπλέον, η σύγκριση μεταξύ των δύο συστημάτων δείχνει ότι στην ενδιάμεση περιοχή τιμών της αναλογίας φορτίων, η μάζα των συμπλόκων που σχηματίζονται σε pH 3 είναι σημαντικά μικρότερη από ότι σε pH 7, ενώ στην περιοχή υψηλών τιμών της αναλογίας φορτίων (πλούσια σε πολυηλεκτρολύτη περιοχή) είναι μεγαλύτερη. Σημειώνεται ότι για τις τιμές της έντασης I_{90} , η κλίμακα του Σχήματος 3.17 είναι γραμμική, ενώ η αντίστοιχη κλίμακα του Σχήματος 3.10 είναι λογαριθμική. Επίσης, το μέγεθος των συμπλόκων σε pH 3 είναι γενικά μεγαλύτερο από αυτό σε pH 7, γεγονός που πιθανότατα υποδηλώνει μία περισσότερο εκτεταμένη διαμόρφωση των συμπλόκων. Προφανώς, σε pH 3 η σύμπλεξη είναι ασθενέστερη λόγω της μειωμένης πυκνότητας φορτίου της αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη.^{142, 143} Ως αποτέλεσμα, τα σύμπλοκα που σχηματίζονται σε pH 3 αποτελούνται από μικρό σχετικά αριθμό αλυσίδων πολυηλεκτρολύτη και πρωτεϊνικών μορίων, ο οποίος, όπως φαίνεται, αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του πολυηλεκτρολύτη.

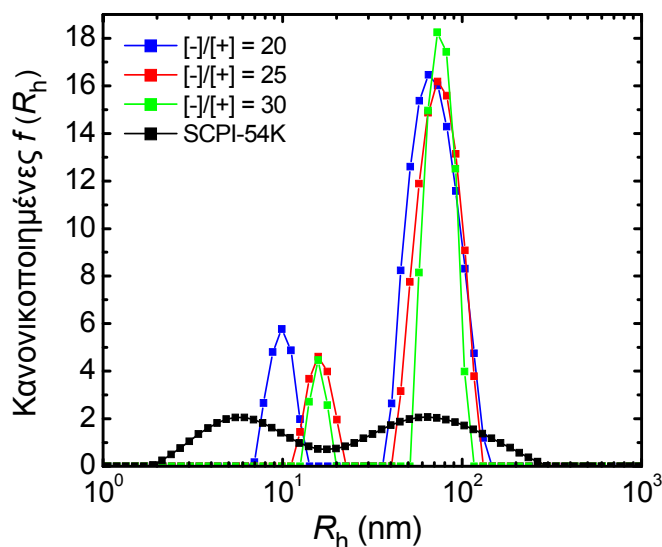
Οι κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90°, για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 3 με $I = 0.01$ M, για αντιπροσωπευτικές τιμές της αναλογίας φορτίων, παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.18, όπου επίσης παρατίθεται η αντίστοιχη κατανομή του διαλύματος του πολυηλεκτρολύτη για λόγους σύγκρισης. Σε αντιστοιχία με τις κατανομές του ίδιου συστήματος σε pH 7 (Σχήμα 3.11), οι κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων σε pH 3 εμφανίζουν δύο κορυφές, υποδηλώνοντας την ύπαρξη δύο διαφορετικών ειδών συμπλόκων στο διάλυμα, αποτελούμενα από μεγαλύτερο και μικρότερο αριθμό αλυσίδων πολυηλεκτρολύτη και πρωτεϊνικών μορίων. Επιπροσθέτως, το μέγεθος και των δύο σωματιδίων, καθώς και η σχετική συνεισφορά στη συνολική κατανομή των

μεγαλύτερων σωματιδίων, παρουσιάζουν μία μικρή σχετικά αύξηση, καθώς αυξάνεται η αναλογία φορτίων. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην παρατηρούμενη αύξηση των τιμών της μέσης υδροδυναμικής ακτίνας R_h του Σχήματος 3.17.



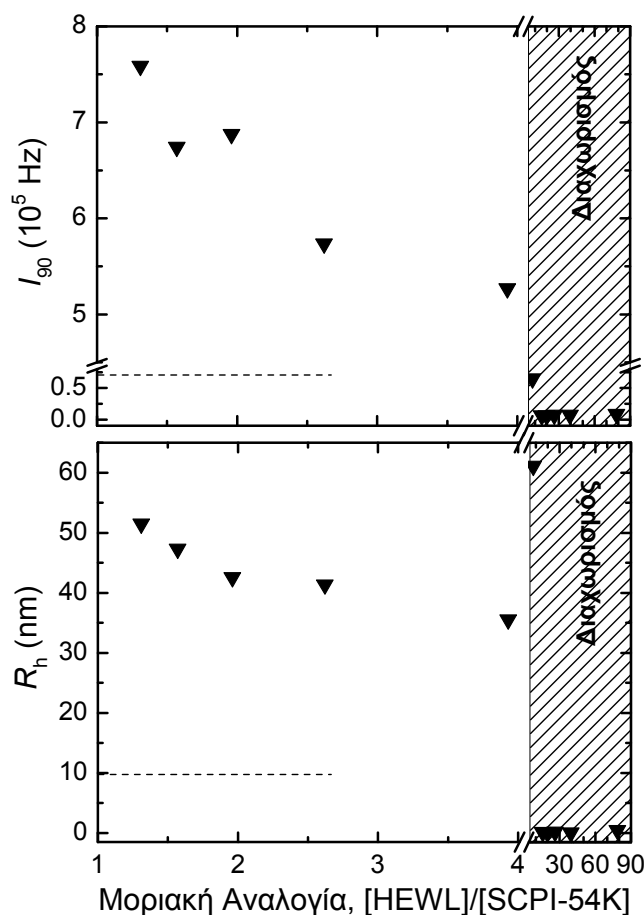
Σχήμα 3.18: Κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90° , για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 3 με $I = 0.01$ M, για $[-]/[+] = 10, 20$ και 30 . Η αντίστοιχη κατανομή του διαλύματος του πολυηλεκτρολύτη παρατίθεται επίσης, για λόγους σύγκρισης.

Οι σημαντικά μεγαλύτερες τιμές της έντασης σκέδασης I_{90} και κατ' επέκταση της μάζας των σκεδαζόντων σωματιδίων, που εμφανίζουν τα διαλύματα των συμπλόκων σε σχέση με το αντίστοιχο διάλυμα του πολυηλεκτρολύτη, επιβεβαιώνει για ακόμα μία φορά ότι οι κατανομές του Σχήματος 3.18 αντιστοιχούν σε σύμπλοκα και όχι σε ελεύθερες αλυσίδες πολυηλεκτρολύτη. Περαιτέρω επιβεβαίωση σε αυτό το συμπέρασμα, προσδίδουν οι κανονικοποιημένες, ως προς τη συνολική ένταση σκέδασης του διαλύματος, I/I_{tot} , κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων των διαλυμάτων συμπλόκων της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 3 με $I = 0.01$ M, για τις μεγαλύτερες τιμές της αναλογίας φορτίων, οι οποίες παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.19. Όπως φαίνεται, η ένταση των κατανομών των διαλυμάτων των συμπλόκων είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη ένταση της κατανομής του διαλύματος του πολυηλεκτρολύτη, καταδεικνύοντας την απουσία ελεύθερων αλυσίδων πολυηλεκτρολύτη στα διαλύματα των συμπλόκων.



Σχήμα 3.19: Κανονικοποιημένες, ως προς τη συνολική ένταση του διαλύματος, κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90° , για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 3 με $I = 0.01$ M, για $[-]/[+] = 20, 25$ και 30 . Η αντίστοιχη κανονικοποιημένη κατανομή του διαλύματος του πολυηλεκτρολύτη παρατίθεται επίσης, για λόγους σύγκρισης.

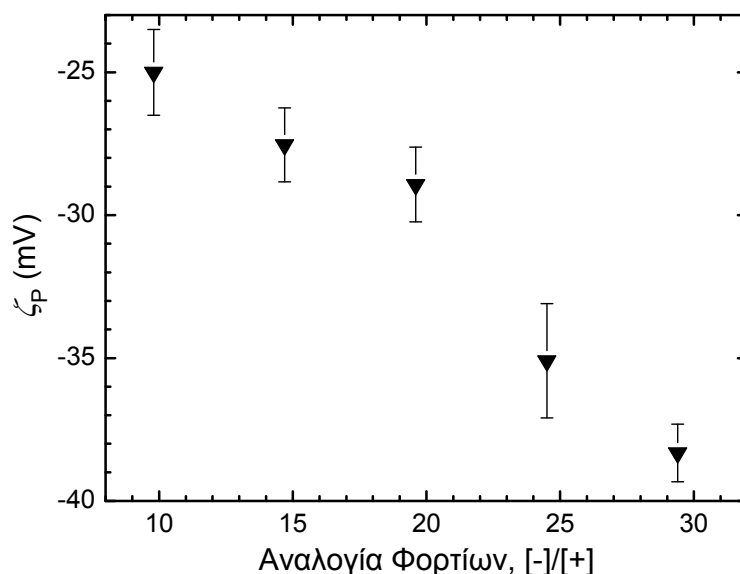
Αναφορικά με την εξάρτηση της μάζας και του μεγέθους των συμπλόκων από τη μοριακή αναλογία των δύο συστατικών, στο Σχήμα 3.20 παρουσιάζονται οι τιμές της έντασης σκέδασης στις 90° , I_{90} , και της υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , συναρτήσει της μοριακής αναλογίας $[\text{HEWL}]/[\text{SCPI-54K}]$, για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και του πολυηλεκτρολύτη SCPI-54K, σε pH 3 με $I = 0.01$ M. Διαπιστώνεται ότι τόσο οι τιμές του I_{90} όσο και της R_h , εμφανίζουν μικρή μείωση καθώς αυξάνεται η μοριακή αναλογία. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η μάζα και το μέγεθος των συμπλόκων μειώνεται συναρτήσει της μοριακής αναλογίας. Ισοδύναμα, τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα στις χαμηλές τιμές της μοριακής αναλογίας, περιλαμβάνουν μεγαλύτερο αριθμό αλυσίδων πολυηλεκτρολύτη από ότι στις υψηλότερες. Καθώς αυξάνει η μοριακή αναλογία, κάθε αλυσίδα αλληλεπιδρά με μεγαλύτερο αριθμό πρωτεϊνικών μορίων, οπότε ο βαθμός της εξουδετέρωσης των φορτίων ενισχύεται. Ως αποτέλεσμα, στην περιοχή των υψηλών τιμών της μοριακής αναλογίας, το συνολικό φορτίο των συμπλόκων δεν επαρκεί για τη διατήρηση της διαλυτότητάς τους και επέρχεται ο διφασικός διαχωρισμός του διαλύματος.



Σχήμα 3.20: Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της μοριακής αναλογίας $[\text{HEWL}]/[\text{SCPI-54K}]$, για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 3 με $I = 0.01$ M. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν κατά προσέγγιση τις αντίστοιχες τιμές του διαλύματος του πολυηλεκτρολύτη.

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός (ELS), για τα σταθερά διαλύματα συμπλόκων της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 3 με $I = 0.01$ M και τα αποτελέσματα των τιμών του δυναμικού ζ $_{\text{p}}$, συναρτήσει της αναλογίας φορτίων, παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.21. Συγκριτικά, διάλυμα λυσοζύμης συγκέντρωσης 1 mg/ml σε pH 3 έχει μετρούμενη τιμή ζ $_{\text{p}} \approx +11$ mV, ενώ για διάλυμα του πολυηλεκτρολύτη SCPI-54K συγκέντρωσης 2 mg/ml, η αντίστοιχη τιμή είναι ζ $_{\text{p}} \approx -40$ mV. Το δυναμικό ζ $_{\text{p}}$ των διαλυμάτων των συμπλόκων σε pH 3, παρουσιάζει ανάλογη συμπεριφορά με αυτή που παρατηρήθηκε σε pH 7 (Σχήμα 3.14) και εμφανίζει αυξανόμενες αρνητικές τιμές, συναρτήσει της αναλογίας φορτίων. Προφανώς, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυηλεκτρολύτη και κάθε αλυσίδα αλληλεπιδρά με μικρότερο αριθμό πρωτεϊνικών μορίων, η εξουδετέρωση των αρνητικών φορτίων της αλυσίδας μειώνεται, με αποτέλεσμα η

απόλυτη τιμή του ενεργού αρνητικού φορτίου των συμπλόκων να αυξάνεται.

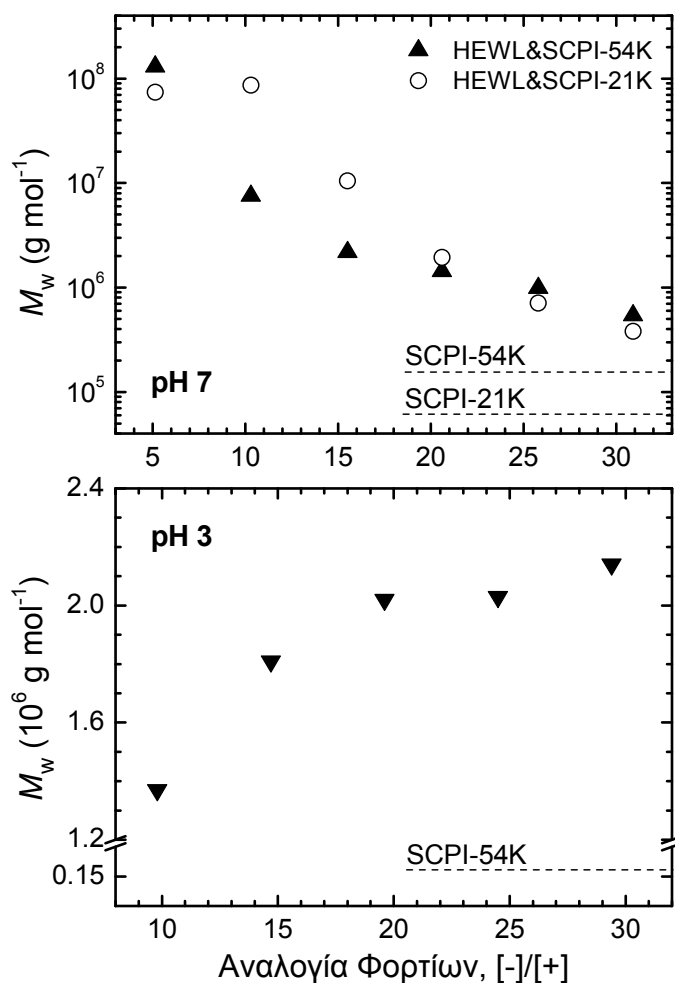


Σχήμα 3.21: Δυναμικό ζήτα, ζ_P , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων [-]/[+], για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 3 με $I = 0.01$ M.

3.2.3. Δομή των συμπλόκων

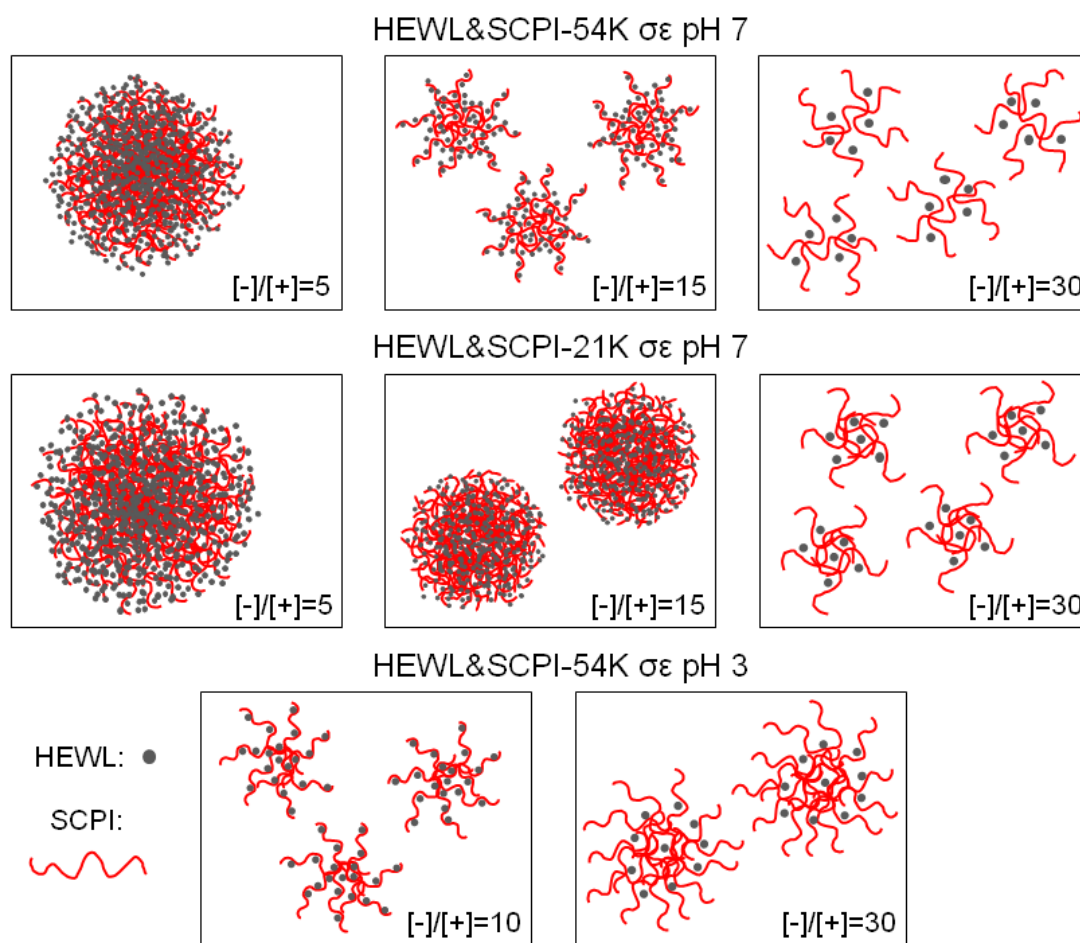
Με σκοπό την απόκτηση μίας περισσότερο λεπτομερούς εικόνας αναφορικά με τη δομή των συμπλόκων, εξετάζεται η εξάρτηση του φαινόμενου μοριακού βάρους των συμπλόκων από την αναλογία φορτίων. Στο Σχήμα 3.22 παρουσιάζονται οι τιμές του μοριακού βάρους M_w , που εξάγονται από μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός (SLS), για τα σταθερά διαλύματα συμπλόκων των συστημάτων της HEWL και των πολυηλεκτρολυτών SCPI-54K και SCPI-21K σε pH 7 με $I = 0.01$ M, καθώς και του συστήματος της HEWL και του πολυηλεκτρολύτη SCPI-54K σε pH 3 με $I = 0.01$ M, συναρτήσει της αναλογίας φορτίων [-]/[+]. Για λόγους σύγκρισης, οι αντίστοιχες τιμές του M_w των πολυηλεκτρολυτών σημειώνονται με διακεκομμένες γραμμές.

Όπως αναμένεται, σε όλες τις περιπτώσεις, το μοριακό βάρος M_w των συμπλόκων εμφανίζει ανάλογη συμπεριφορά με αυτή που παρατηρήθηκε για την ένταση σκέδασης I_{90} των μετρήσεων DLS. Μέσω της σύγκρισης των τιμών του M_w των συμπλόκων, των πολυηλεκτρολυτών και της λυσοζύμης, συνυπολογίζοντας πάντα τη μοριακή αναλογία των δύο συστατικών στο διάλυμα, καθίσταται δυνατός ο κατά προσέγγιση υπολογισμός του αριθμού των αλυσίδων πολυηλεκτρολύτη και πρωτεϊνικών μορίων που περιέχονται στα σύμπλοκα. Με τον τρόπο αυτό εξάγεται η σχηματική αναπαράσταση της δομής των συμπλόκων του Σχήματος 3.23.



Σχήμα 3.22: Φαινόμενο μοριακό βάρος, M_w , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων [-]/[+], για τα διαλύματα συμπλόκων της HEWL και των δειγμάτων SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 με $I = 0.01\ M$, καθώς και της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 3 με $I = 0.01\ M$. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν τις αντίστοιχες τιμές των πολυηλεκτρολυτών.

Όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 3.23, σε pH 7 και στην περιοχή χαμηλών τιμών της αναλογίας φορτίων, κάθε σύμπλοκο αποτελείται από αρκετές εκατοντάδες αλυσίδες πολυηλεκτρολύτη και αρκετές χιλιάδες πρωτεϊνικά μόρια. Υπό αυτές τις συνθήκες, κάθε αλυσίδα αλληλεπιδρά με μεγάλο αριθμό μορίων λυσοζύμης, σχηματίζοντας ένα ενδοπολυμερικό σύμπλοκο. Εξαιτίας της εξουδετέρωσης των φορτίων, τα συγκεκριμένα ενδοπολυμερικά σύμπλοκα εμφανίζουν μειωμένη διαλυτότητα και επομένως συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μεγάλα συσσωματώματα, σύμφωνα με το μηχανισμό σύμπλεξης που προτάθηκε από την ομάδα των Dubin και Kokufuta.¹³⁷



Σχήμα 3.23: Σχηματική αναπαράσταση της δομής των συμπλόκων, συναρτήσει της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$, για τα συστήματα της HEWL και των δειγμάτων SCPI-54K και SCPI-21K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, καθώς και της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 3 με $I = 0.01$ M.

Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυηλεκτρολύτη στην περιοχή των μεγαλύτερων τιμών της αναλογίας φορτίων, ο αριθμός των πρωτεϊνικών μορίων που αλληλεπιδρούν με κάθε αλυσίδα μειώνεται, οδηγώντας σε περιορισμένη εξουδετέρωση φορτίων, γεγονός που παρεμποδίζει τη συσσωμάτωση των ενδοπολυμερικών συμπλόκων. Επομένως, τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα αποτελούνται από μειούμενους αριθμούς αλυσίδων πολυηλεκτρολύτη και πρωτεϊνικών μορίων. Επιπροσθέτως, το γεγονός ότι το μέγεθος των συμπλόκων που σχηματίζονται στις χαμηλές τιμές της αναλογίας φορτίων (Σχήμα 3.10), φαίνεται να είναι δυσανάλογο του αριθμού των αλυσίδων πολυηλεκτρολύτη και πρωτεϊνικών μορίων που περιλαμβάνουν, υποδηλώνει ότι καθώς αυξάνεται ο αριθμός συσσωμάτωσης των συμπλόκων, η δομή τους γίνεται περισσότερο συμπαγής.

Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και για το σύστημα του πολυηλεκτρολύτη μικρότερου μοριακού βάρους σε pH 7. Η διαφοροποίηση έγκειται στο γεγονός ότι η περισσότερο εκτεταμένη διαμόρφωση της μικρότερου μήκους αλυσίδας, επιτρέπει την αυξημένη αλληλεπίδραση με τα μόρια της λυσοζύμης. Οπότε, η εξουδετέρωση των φορτίων αυξάνεται, προκαλώντας μεγαλύτερο βαθμό συσσωμάτωσης των ενδοπολυμερικών συμπλόκων. Ως αποτέλεσμα, για μία δεδομένη τιμή της αναλογίας φορτίων, τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα του συστήματος της αλυσίδας μικρότερου μήκους, αποτελούνται από μεγαλύτερο αριθμό αλυσίδων πολυηλεκτρολύτη και πρωτεϊνικών μορίων και χαρακτηρίζονται από πιο συμπαγή δομή, συγκριτικά με τα αντίστοιχα σύμπλοκα του συστήματος της μεγαλύτερης σε μήκος αλυσίδας.

Σε pH 3, η μειωμένη πυκνότητα φορτίου της αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη προκαλεί την εξασθένηση της σύμπλεξης.^{142, 143} Ως εκ τούτου, κάθε αλυσίδα αλληλεπιδρά με σχετικά μικρό αριθμό πρωτεϊνικών μορίων και ο βαθμός της επαγόμενης εξουδετέρωσης των φορτίων δεν είναι αρκετά υψηλός ώστε να οδηγήσει σε σημαντική μείωση της διαλυτότητας των ενδοπολυμερικών συμπλόκων. Επομένως, ο αριθμός συσσωμάτωσης των ενδοπολυμερικών συμπλόκων είναι σημαντικά μικρότερος από τον αντίστοιχο του ίδιου συστήματος σε pH 7.

Σε αντίθεση με την παρατηρούμενη συμπεριφορά σε pH 7, σε pH 3 παρατηρείται μία μικρή αύξηση του αριθμού των αλυσίδων πολυηλεκτρολύτη που περιλαμβάνονται στα σύμπλοκα, συναρτήσει της αυξανόμενης αναλογίας φορτίων. Μία πιθανή εξήγηση του φαινομένου αυτού, είναι ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυηλεκτρολύτη και κάθε αλυσίδα αλληλεπιδρά με λιγότερα μόρια λυσοζύμης, ο αριθμός των μη αλληλεπιδρώντων τμημάτων της αλυσίδας αυξάνεται. Ως εκ τούτου, κάθε πρωτεϊνικό μόριο δύναται να αλληλεπιδράσει με περισσότερες από μία αλυσίδες του πολυηλεκτρολύτη, αυξάνοντας έτσι τον αριθμό των αλυσίδων που περιέχουν τα σύμπλοκα. Προφανώς, η συγκεκριμένη συμπεριφορά είναι περισσότερο έκδηλη σε pH 3, λόγω του αυξημένου επιφανειακού φορτίου της λυσοζύμης, το οποίο παρέχει περισσότερες θέσεις πρόσδεσης, καθώς και της μειωμένης πυκνότητας φορτίου της αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη, γεγονός που εξασθενεί την ηλεκτροστατική άπωση μεταξύ των αλυσίδων.

Τέλος, είναι δυνατή η διατύπωση ενός γενικού σχολίου σχετικά με τον παρατηρούμενο διφασικό διαχωρισμό των διαλυμάτων των συμπλόκων και των τριών

υπό μελέτη συστημάτων, ο οποίος λαμβάνει χώρα στην περιοχή των χαμηλών τιμών της αναλογίας φορτίων. Όπως φαίνεται, η διαλυτότητα των σχηματιζόμενων συμπλόκων επηρεάζεται σημαντικά από τη δομή τους και τη διαμόρφωση των αλυσίδων του πολυηλεκτρολύτη που περιλαμβάνουν. Για τις χαμηλές τιμές της αναλογίας φορτίων (πλούσια σε πρωτεΐνη περιοχή), ο αριθμός των μη αλληλεπιδρώντων τμημάτων της αλυσίδας είναι ιδιαίτερα μικρός, επειδή κάθε αλυσίδα αλληλεπιδρά με μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών μορίων. Επομένως, τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα εμφανίζουν συμπαγή δομή και εξαιρετικά μειωμένη διαλυτότητα, λόγω του αυξημένου βαθμού εξουδετέρωσης των φορτίων, με αποτέλεσμα να επέρχεται ο διαφασικός διαχωρισμός του διαλύματος.

Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυηλεκτρολύτη και συνεπάγεται μεγαλύτερες τιμές της αναλογίας φορτίων, ο αριθμός των μη αλληλεπιδρώντων τμημάτων της αλυσίδας αυξάνεται, με αποτέλεσμα η δομή των συμπλόκων να γίνεται πιο χαλαρή. Η δομή αυτή μπορεί να χαρακτηριστεί ως περισσότερο «μαλλιαρή», λόγω των ελεύθερων τμημάτων των αλυσίδων,^{163, 164} και προφανώς επιτρέπει μεγαλύτερη αλληλεπίδραση με τα μόρια του διαλύτη, αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητα των συμπλόκων.

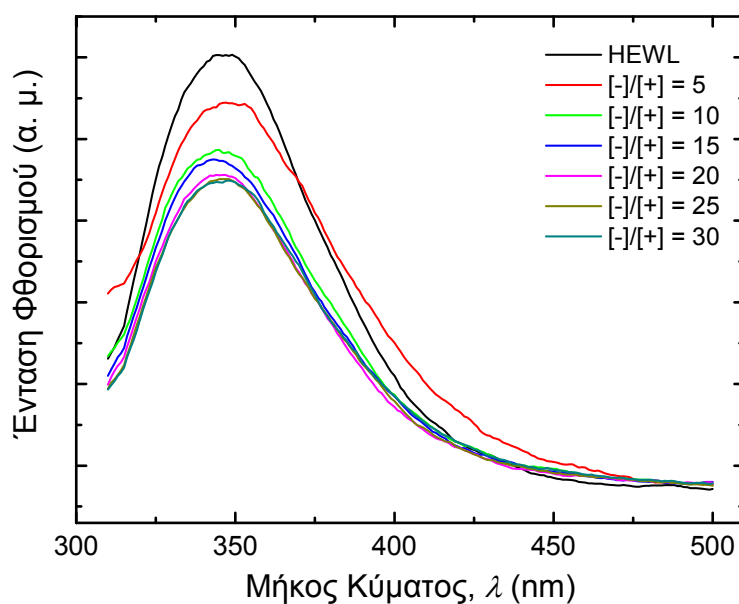
3.2.4. Δομή της συμπλεγμένης πρωτεΐνης

Η διατήρηση της ενζυμικής δραστηριότητας, η οποία σχετίζεται άμεσα με τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, αποτελεί ζήτημα μείζονος σημασίας στις περισσότερες εφαρμογές που περιλαμβάνουν σύμπλοκα πρωτεϊνών και πολυηλεκτρολυτών. Για το λόγο αυτό, η δομή της συμπλεγμένης λυσοζύμης που περιέχεται στα σύμπλοκα, διερευνήθηκε με τη βοήθεια διαφόρων φασματοσκοπικών τεχνικών. Τα αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα για τα σύμπλοκα της λυσοζύμης με τον μεγαλύτερου μοριακού βάρους πολυηλεκτρολύτη σε pH 7, παρουσιάζονται παρακάτω.

Αρχικά, τα σταθερά διαλύματα συμπλόκων του συστήματος της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, μελετήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού¹⁷⁰⁻¹⁷³ και τα ληφθέντα φάσματα εκπομπής παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.24. Το αντίστοιχο φάσμα διαλύματος ελεύθερης HEWL συγκέντρωσης 0.25 mg/ml περιλαμβάνεται επίσης για λόγους σύγκρισης.

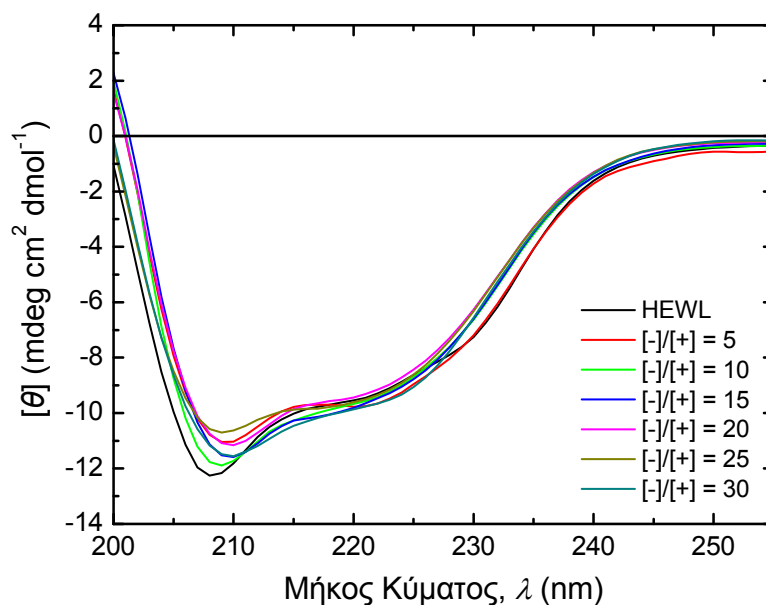
Διαπιστώνεται ότι παρά τις μικρές διαφοροποιήσεις της έντασης, όλα τα

φάσματα εμφανίζουν μέγιστο περί τα 345 nm. Μία μικρή μετατόπιση προς το ερυθρό, μικρότερη των 3 nm, παρατηρείται για το διάλυμα με $[-]/[+] = 5$, το οποίο άλλωστε παρουσιάζει το μεγαλύτερο βαθμό σύμπλεξης. Η μετατόπιση αυτή, ενδεχομένως σχετίζεται με μικρές αλλαγές του περιβάλλοντος της τρυπτοφάνης ή με το σχηματισμό στενά συνδεδεμένων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων εντός των συμπλόκων.^{170, 171} Ωστόσο, η μετατόπιση αυτή δεν φαίνεται να σχετίζεται με την αποδιάταξη της λυσοζύμης, η οποία εκδηλώνεται με μετατόπιση προς το ερυθρό μεγαλύτερη των 10 nm.^{241, 241}



Σχήμα 3.24: Φάσματα φθορισμού, των σταθερών διαλυμάτων συμπλόκων, του συστήματος της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Συμπεριλαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα της ελεύθερης HEWL.

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκαν φασματοσκοπικές μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού (CD), ώστε να διερευνηθεί η διαμόρφωση της λυσοζύμης που περιέχεται στα σύμπλοκα.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ Στο Σχήμα 3.25 παρουσιάζονται τα φάσματα CD, στην περιοχή του άπω υπεριώδους, των σταθερών διαλυμάτων συμπλόκων του συστήματος HEWL και SCPI-54K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, καθώς και της ελεύθερης HEWL σε συγκέντρωση 0.25 mg/ml. Είναι εμφανές ότι τα γενικά φασματικά χαρακτηριστικά της εγγενούς πρωτεΐνης διατηρούνται και ότι οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των φασμάτων CD της ελεύθερης και της συμπλεγμένης λυσοζύμης είναι μικρές.



Σχήμα 3.25: Φάσματα κυκλικού διχρωισμού, στην περιοχή του άπω υπεριώδους, των σταθερών διαλυμάτων συμπλόκων, του συστήματος της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Συμπεριλαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα της ελεύθερης HEWL.

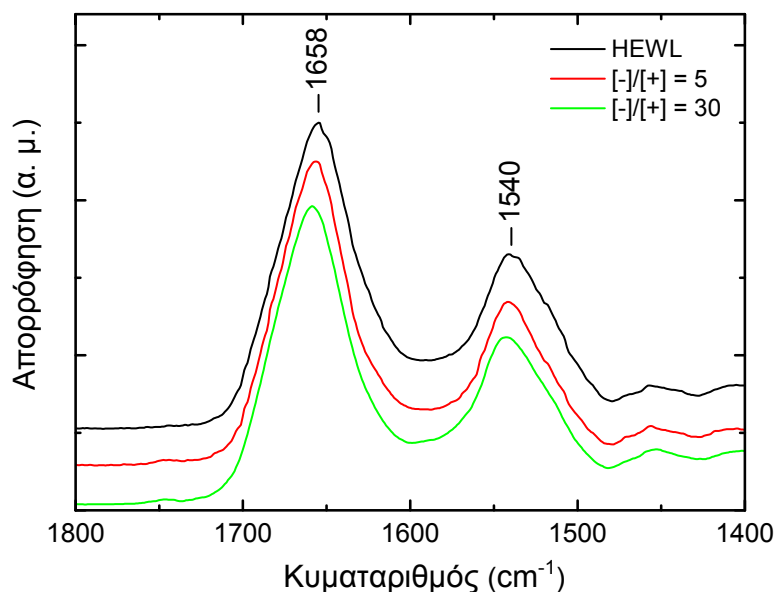
Η ανάλυση των φασμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω των προγραμμάτων SELCON3, CONTIN και CDSSTR, που παρέχει το λογισμικό πακέτο CDPro, καθώς και μέσω της μεθόδου των νευρωνικών δικτύων, που παρέχει το πρόγραμμα K2D. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν παρόμοια, οπότε στον Πίνακα 3.4 παρουσιάζονται τα ποσοστά των επιμέρους δευτεροταγών δομών της πρωτεΐνης τα οποία προκύπτουν από το μέσο όρο των αποτελεσμάτων όλων των μεθόδων.

Η ανάλυση των φασμάτων CD, καταδεικνύει μία μικρή μείωση, της τάξης του 4 %, του ποσοστού των α-ελίκων, για τα διαλύματα συμπλόκων στην περιοχή υψηλών τιμών της αναλογίας φορτίων και συγκεκριμένα για τα διαλύματα με $[-]/[+] = 20, 25$ και 30. Η μείωση αυτή, ενδέχεται να οφείλεται στο γεγονός ότι στην περιοχή των υψηλών τιμών της αναλογίας φορτίων, υπάρχει σχετικά μεγάλη πιθανότητα κάθε μόριο λυσοζύμης να αλληλεπιδρά με περισσότερες από μία αλυσίδες του πολυηλεκτρολύτη ή ακόμα και με διαφορετικά τμήματα της ίδιας αλυσίδας. Επομένως, το μόριο της λυσοζύμης υπόκειται σε αυξημένο βαθμό διατακτικών δυνάμεων, με αποτέλεσμα τη μικρή διατάραξη της διαμόρφωσης του. Παρόλα αυτά, η διατάραξη αυτή δεν είναι αρκετά σημαντική ώστε να προκαλέσει την αποδιάταξη της πρωτεΐνης.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶

Πίνακας 3.4: Συγκεντρωτικά ποσοστά των επιμέρους δευτεροταγών δομών της πρωτεΐνης, όπως εξάγονται από την ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού, των διαλυμάτων συμπλόκων του συστήματος της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, καθώς και της ελεύθερης HEWL.

Δείγμα	α-έλικα (%)	β-φύλλο (%)	Τυχαία διαμόρφωση (%)
HEWL	35	13	52
$[-]/[+] = 5$	34	14	52
$[-]/[+] = 10$	36	17	47
$[-]/[+] = 15$	35	19	46
$[-]/[+] = 20$	32	20	48
$[-]/[+] = 25$	30	16	54
$[-]/[+] = 30$	31	17	52

Με τον ίδιο σκοπό, διενεργήθηκαν επίσης φασματοσκοπικές μετρήσεις μέσου υπερύθρου (IR) για τα αντίστοιχα σύμπλοκα. Στο Σχήμα 3.26 παρουσιάζονται τα φάσματα IR, στην περιοχή των κορυφών Amide I και II, για δύο αντιπροσωπευτικές τιμές της αναλογίας φορτίων $[-]/[+] = 5$ και 30, του συστήματος της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, καθώς και το αντίστοιχο φάσμα ελεύθερης HEWL, για λόγους σύγκρισης. Τα φάσματα έχουν υποστεί κανονικοποίηση ως προς την ένταση της κορυφής Amide I, αφού προηγουμένως διορθώθηκαν ως προς τη φασματική συνεισφορά του πολυηλεκτρολύτη, μέσω κατάλληλης αφαίρεσης του αντίστοιχου φάσματος. Η παρατηρούμενη σταθερότητα της μορφής των κορυφών Amide I και II, καθώς και της συχνότητας μεγίστου περί τους 1658 και 1540 cm^{-1} , αντίστοιχα, ανεξάρτητα από την τιμή της αναλογίας φορτίων, καταδεικνύει την απουσία σημαντικών αλλαγών της διαμόρφωσης του μορίου της λυσοζύμης, όπως αυτές που παρατηρούνται κατά την αποδιάταξη του μορίου.^{243, 244}

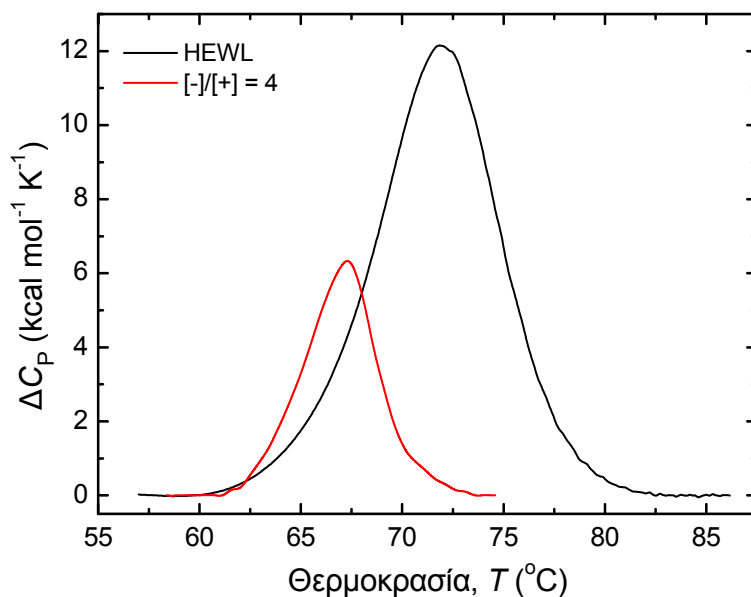


Σχήμα 3.26: Φάσματα μέσου υπερύθρου, στην περιοχή των κορυφών Amide I και II, για δύο αντιπροσωπευτικές τιμές της αναλογίας φορτίων $[-]/[+] = 5$ και 30 , του συστήματος της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Συμπεριλαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα της ελεύθερης HEWL.

Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC) με σκοπό την απόκτηση πληροφοριών σχετικά με τη θερμική σταθερότητα της συμπλεγμένης λυσοζύμης.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ Οι μεταβολές της θερμοχωρητικότητας ΔC_p συναρτήσει της θερμοκρασίας, που καταγράφονται κατά τη διάρκεια των πρώτων θερμικών σαρώσεων, ρυθμού θέρμανσης 1.5 K/min, ενός διαλύματος ελεύθερης HEWL συγκέντρωσης 0.5 mg/ml και ενός διαλύματος συμπλόκων με αναλογία φορτίων $[-]/[+] = 4$, του συστήματος της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, επίσης συγκέντρωσης 0.5 mg/ml σε λυσοζύμη, αντιπαραβάλλονται στο Σχήμα 3.27.

Για το μόριο της ελεύθερης λυσοζύμης διαπιστώνεται αντιστρεπτή θερμική αποδιάταξη, σε ποσοστό μεγαλύτερο του 60 %. Αντίθετα, η παρατηρούμενη εξάλειψη της θερμιδομετρικής κορυφής μετά από διαδοχικές θερμικές σαρώσεις του διαλύματος των συμπλόκων, υποδηλώνει ότι στην περίπτωση αυτή η θερμική αποδιάταξη του πρωτεϊνικού μορίου είναι μη αντιστρεπτή διαδικασία. Επομένως, δεν είναι εφικτή η απευθείας σύγκριση της θερμοδυναμικής σταθερότητας της λυσοζύμης μεταξύ των δύο συστημάτων. Ο μη αντιστρεπτός χαρακτήρας της θερμικής αποδιάταξης του συστήματος των συμπλόκων, μπορεί να αποδοθεί στις υδρόφοβες

αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αποδιαταγμένων πρωτεϊνικών μορίων και των αλυσίδων του πολυηλεκτρολύτη.



Σχήμα 3.27: Μεταβολή της θερμοχωρητικότητας ΔC_p , συναρτήσει της θερμοκρασίας, κατά τις πρώτες θερμικές σαρώσεις ρυθμού 1.5 K/min, διαλύματος ελεύθερης HEWL και διαλύματος συμπλόκων με $[-]/[+] = 4$, του συστήματος της HEWL και του δείγματος SCPI-54K, σε pH 7 με $I = 0.01$ M.

Επιπροσθέτως, η συμπλεγμένη λυσοζύμη εμφανίζει μικρή μείωση της θερμοκρασίας μετάβασης T_m κατά περίπου 4.5 °C, καθώς και σημαντική μείωση της συνολικής μεταβολής της ενθαλπίας ΔH του συστήματος, από 95 ± 5 σε 30 ± 3 kcal mol⁻¹. Οι μεταβολές αυτές, καταδεικνύουν τη μειωμένη θερμική σταθερότητα του συμπλεγμένου πρωτεϊνικού μορίου και είναι σε συμφωνία με αντίστοιχες μεταβολές που έχουν διαπιστωθεί κατά τη μελέτη της σύμπλεξης της λυσοζύμης με διάφορους ανιοντικούς πολυηλεκτρολύτες, όπως η ηπαρίνη,^{178, 179} η πολυ(θειική βινυλική αλκοόλη),^{177, 179} το πολυ(ακρυλικό οξύ) και το πολυ(μεθακρυλικό οξύ).¹⁷⁷ Η συγκεκριμένη μείωση της θερμικής σταθερότητας της συμπλεγμένης πρωτεΐνης, πιθανότατα οφείλεται στις επαγόμενες διατακτικές δυνάμεις ή ισοδύναμα στο «τέντωμα» του πρωτεϊνικού μορίου, το οποίο προκαλείται από την ηλεκτροστατική πρόσδεση στην αλυσίδα του πολυηλεκτρολύτη.^{177, 179} Ωστόσο, σημειώνεται ότι στη συγκεκριμένη περίπτωση η τιμή της θερμοκρασίας T_m , δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί επακριβώς, λόγω του μη αντιστρεπτού χαρακτήρα της μετάβασης. Επομένως, μπορεί να επηρεαστεί από κινητικά φαινόμενα και εξαρτάται από το

ρυθμό θέρμανσης της σάρωσης. Επιπλέον, η παρατηρούμενη μείωση του εύρους της κορυφής αποδιάταξης της συμπλεγμένης λυσοζύμης, υποδηλώνει την ύπαρξη πιθανών ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων και συνεργατικότητας στο σύστημα, φαινόμενα τα οποία είναι σε συμφωνία με το γεγονός ότι αρκετά μόρια λυσοζύμης προσδένονται στην ίδια αλυσίδα πολυηλεκτρολύτη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΔΙΣΥΣΤΑΔΙΚΟΣ ΠΟΛΥΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΗΣ PS-SCPI

ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΤΟΥ ΜΕ ΛΥΣΟΖΥΜΗ

4.1. Ιδιότητες σε διάλυμα του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI

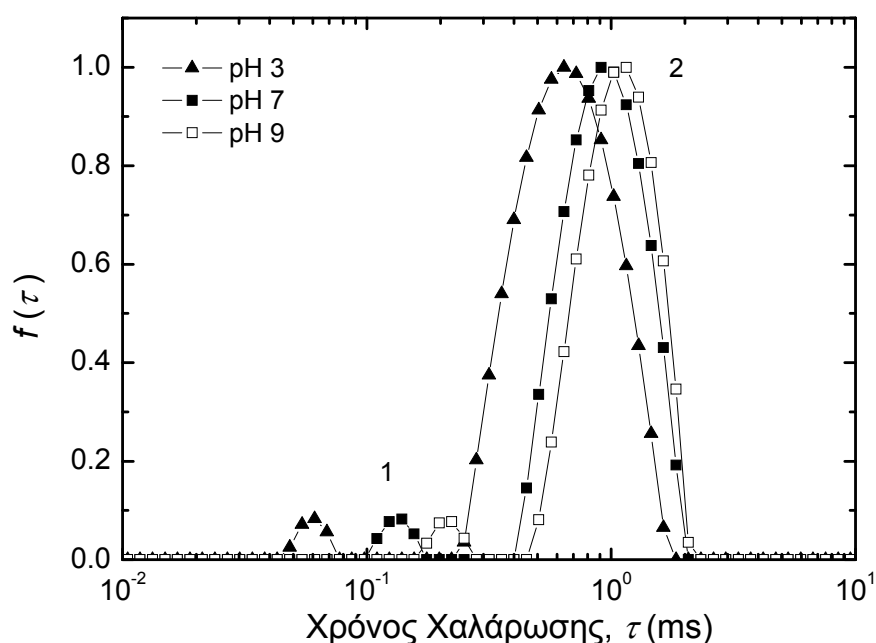
Ο δισυσταδικός αμφιφιλικός πολυηλεκτρολύτης PS-SCPI (Σχήμα 2.15β) συνδυάζει τις δομικές ιδιότητες του πολυηλεκτρολύτη SCPI με αυτές των αμφιφιλικών συμπολυμερών κατά συστάδες. Λόγω της υδροφοβικότητας της συστάδας του PS, η αυτοοργάνωση του εν λόγω δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη σε υδατικά διαλύματα οδηγεί στο σχηματισμό μικκυλίων, τα οποία αποτελούνται από πυρήνα PS και κορώνα αποτελούμενη από συστάδες SCPI. Η δομή και το μέγεθος των μικκυλίων καθορίζονται τόσο από τα μήκη των δύο συστάδων, όσο και από τη σχετική τους αναλογία. Μία από τις πλέον ενδιαφέρουσες ιδιότητες των συγκεκριμένων μικκυλίων είναι το γεγονός ότι εξαιτίας της σχετικά υψηλής θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης του PS (περί τους 100° C), τα σχηματιζόμενα μικκύλια χαρακτηρίζονται ως «παγωμένα» σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ο ορισμός αυτός έχει την έννοια ότι αντί τα μικκύλια να βρίσκονται σε κατάσταση θερμοδυναμικής ισορροπίας με τις ελεύθερες αλυσίδες στο διάλυμα, η δομή τους παραμένει σταθερή. Επομένως, τα μικκύλια αυτά μπορούν να θεωρηθούν ως ανάλογα συστημάτων σφαιρικών πολυηλεκτρολυτικών βουρτσών. Επιπρόσθετο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των ιδιοτήτων και της συμπεριφοράς των μικκυλίων συναρτήσει των συνθηκών του διαλύματος, καθώς η πολυηλεκτρολυτική φύση της κορώνας τους, σε συνδυασμό με τα ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά του πολυηλεκτρολύτη SCPI, καθιστά δυνατή την απόκριση τους σε αλλαγές του pH και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος. Η αυτοοργάνωση του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, καθώς και οι ιδιότητες και η συμπεριφορά των σχηματιζόμενων μικκυλίων σε υδατικά διαλύματα συναρτήσει του pH και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος, αποτελούν το αντικείμενο του παρόντος κεφαλαίου.

4.1.1. Ιδιότητες σε διάλυμα συναρτήσει του pH

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση του pH στις ιδιότητες των μικκυλίων που σχηματίζονται ως συνέπεια της αυτοοργάνωσης του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη

PS-SCPI σε υδατικά διαλύματα.

Στο πλαίσιο αυτό, διενεργήθηκαν μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml, του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, σε pH 3, 7 και 9, χωρίς προσθήκη άλατος. Στο Σχήμα 4.1 παρουσιάζονται οι κατανομές των χρόνων χαλάρωσης του συστήματος, για μετρήσεις σε γωνία σκέδασης $\theta = 90^\circ$. Σημειώνεται ότι η ρύθμιση του pH των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω της προσθήκης κατάλληλης ποσότητας διαλύματος HCl ή NaOH 0.1 M και η συνεισφορά τους στην ιοντική ισχύ του διαλύματος υπολογίζεται περί τα 10^{-3} M.

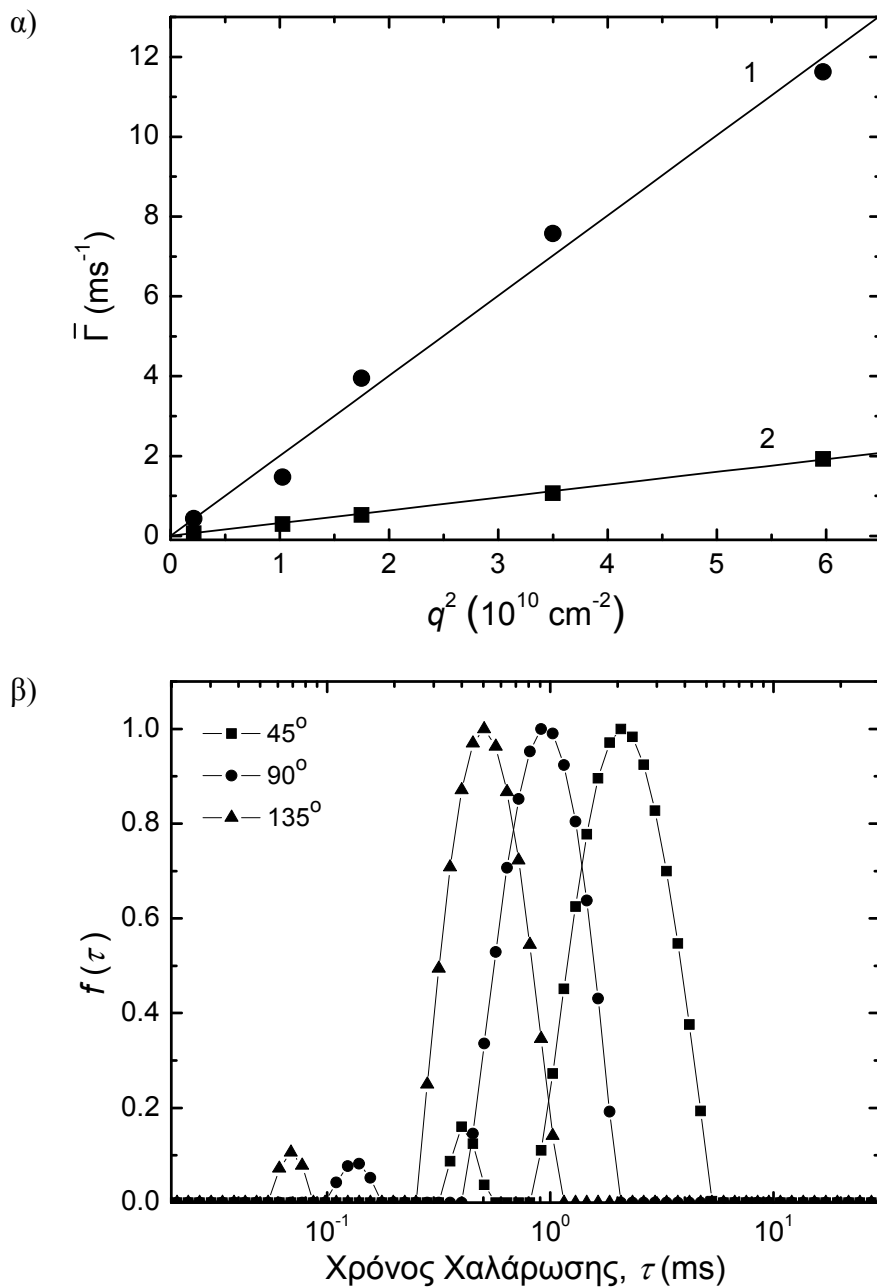


Σχήμα 4.1: Κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις 90° , για διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, σε pH 3, 7 και 9.

Σε όλες τις περιπτώσεις οι κατανομές εμφανίζουν δύο κορυφές, μία σε μικρότερους και μία σε μεγαλύτερους χρόνους χαλάρωσης και η συνεισφορά της κορυφής που αντιστοιχεί στους μεγαλύτερους χρόνους υπερισχύει σημαντικά στη συνολική κατανομή. Παράλληλα, η αύξηση του pH του διαλύματος συνεπάγεται τη μετατόπιση των δύο κορυφών σε μεγαλύτερους χρόνους χαλάρωσης. Οι κορυφές αυτές πιθανότατα αντιστοιχούν στις μεμονωμένες αλυσίδες του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη που βρίσκονται ελεύθερες στο διάλυμα (κορυφή 1) και στα σχηματιζόμενα μικκύλια (κορυφή 2).

Η γωνιακή εξάρτηση του μέσου ρυθμού χαλάρωσης $\bar{\Gamma}$ της κάθε κορυφής,

εξάγεται μέσω μετρήσεων σε διαφορετικές γωνίες σκέδασης $\theta = 25, 45, 60, 90$ και 135° . Οι τιμές του $\bar{\Gamma}$ για τις δύο κορυφές, συναρτήσει του τετραγώνου του διανύσματος σκέδασης q^2 , για το διάλυμα του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI συγκέντρωσης 1 mg/ml σε pH 7, παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.2α, ενώ στο Σχήμα 4.2β παρατίθενται οι αντίστοιχες κατανομές στις $45, 90$ και 135° .



Σχήμα 4.2: α) Γωνιακή εξάρτηση του μέσου ρυθμού χαλάρωσης των δύο κορυφών, για το διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, σε pH 7. β) Οι αντίστοιχες κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις $45, 90$, και 135° .

Η γραμμική συσχέτιση των $\bar{\Gamma}$ και q^2 αποδεικνύει ότι και οι δύο κορυφές οφείλονται σε κινήσεις λόγω διάχυσης, γεγονός που ισχύει σε όλες τις τιμές του pH. Επομένως, καθίσταται δυνατή η εφαρμογή των σχέσεων (2.11) και (2.12), οι οποίες παρέχουν τις τιμές των συντελεστών διάχυσης για κάθε κορυφή D_1 και D_2 , καθώς και των αντίστοιχων υδροδυναμικών ακτίνων R_{h1} και R_{h2} . Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 4.1, όπου επίσης παρατίθενται η τιμή της έντασης σκέδασης στις 90° I_{90} , καθώς και η τιμή της υδροδυναμικής ακτίνας R_{hc} , που εξάγεται μέσω της ανάλυσης cumulants των μετρήσεων στις 90° .

Πίνακας 4.1: Τιμές των συντελεστών διάχυσης D και των υδροδυναμικών ακτίνων R_h που αντιστοιχούν στις δύο κορυφές χαλάρωσης, της έντασης σκέδασης στις 90° I_{90} , καθώς και της υδροδυναμικής ακτίνας R_{hc} που προκύπτει μέσω ανάλυσης cumulants στις 90° , των διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, σε pH 3, 7 και 9.

pH	D_1 ($10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	D_2 ($10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	R_{h1} (nm)	R_{h2} (nm)	I_{90} (kHz)	R_{hc} (nm)
3	4.76 ± 0.18	4.51 ± 0.05	5.1	54.3	1095	49.4
7	2 ± 0.07	3.17 ± 0.05	12.3	77.3	561	72.3
9	1.27 ± 0.06	2.8 ± 0.03	19.3	87.5	613	82.1

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ρύθμιση του pH του εκάστοτε διαλύματος πραγματοποιήθηκε μετά την παρασκευή του αρχικού υδατικού διαλύματος, οπότε οι παρατηρούμενες μεταβολές συναρτήσει του pH αφορούν πιθανές αλλαγές της δομής και του μεγέθους των ήδη σχηματισμένων μικκυλίων και όχι μεταβολές του τρόπου αυτοοργάνωσης του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη. Υπενθυμίζεται ότι η μεταβολή της τιμής του pH του διαλύματος έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της πυκνότητας φορτίου της πολυηλεκτρολυτικής συστάδας SCPI, λόγω της παρουσίας στην ίδια μονομερική μονάδα ισχυρά φορτισμένων ομάδων SO_3^- και ασθενώς φορτισμένων ομάδων COO^- , οι οποίες πρωτονιώνονται ή αποπρωτονιώνονται συναρτήσει του pH.

Παράλληλα, τα συγκεκριμένα μικκύλια θεωρούνται «παγωμένα» σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, επομένως δεν αναμένεται να παρατηρηθούν σημαντικές μεταβολές της δομής τους συναρτήσει των συνθηκών του διαλύματος. Το γεγονός

αυτό έχει επιβεβαιωθεί στο πλαίσιο αντίστοιχης μελέτης του συγκεκριμένου συστήματος μέσω μετρήσεων σκέδασης νετρονίων σε μικρές γωνίες, οι οποίες κατέδειξαν ότι το μέγεθος του πυρήνα και κατ' επέκταση ο αριθμός συσσωμάτωσης των μικκυλίων παραμένουν αμετάβλητα κατά τη μεταβολή του pH του διαλύματος.²⁴⁵

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.1 και στον Πίνακα 4.1, καθώς αυξάνεται η τιμή του pH παρατηρείται μείωση των συντελεστών D_1 και D_2 , η οποία συνεπάγεται αύξηση των ακτίνων R_{h1} και R_{h2} , από 5.1 σε 19.3 nm και από 54.3 σε 87.5 nm, αντίστοιχα. Επίσης, διαπιστώνεται παρόμοια αύξηση των τιμών της υδροδυναμικής ακτίνας R_{hc} , η οποία προκύπτει μέσω της ανάλυσης cumulants των μετρήσεων στις 90° και επί της ουσίας αποτελεί έναν σταθμισμένο μέσο όρο των τιμών των αντίστοιχων ακτίνων R_{h1} και R_{h2} . Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω παρατηρήσεις, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η αύξηση της πυκνότητας φορτίου της πολυηλεκτρολυτικής συστάδας SCPI, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους τόσο των μεμονωμένων αλυσίδων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, όσο και των σχηματιζόμενων μικκυλίων. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ενίσχυση της ηλεκτροστατικής άπωσης μεταξύ των τμημάτων της ίδιας μεμονωμένης αλυσίδας, αλλά και των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας των μικκυλίων, με αποτέλεσμα την έκτασή τους. Η μεταβολή αυτή είναι ιδιαίτερος εμφανής κατά τη μετάβαση από pH 3 σε 7, καθώς η πρωτονίωση των καρβοξυλικών ομάδων σε χαμηλές τιμές του pH, οδηγεί σε μείωση της πυκνότητας φορτίου περίπου στο μισό. Ενώ κατά τη μετάβαση από pH 7 σε 9, η μεταβολή του μεγέθους τόσο των μεμονωμένων αλυσίδων, όσο και των μικκυλίων είναι μικρότερη λόγω της μικρής αύξησης του βαθμού αποπρωτονίωσης των καρβοξυλικών ομάδων.

Παρά τη μεταβολή του μεγέθους των δύο πληθυσμών σωματιδίων που συνυπάρχουν στο διάλυμα (μεμονωμένες αλυσίδες και μικκύλια), η συνεισφορά των αντίστοιχων κορυφών στη συνολική κατανομή, καθώς και η σχετική τους αναλογία παραμένει πρακτικά αμετάβλητη σε όλες τις τιμές του pH. Άλλωστε, η διατήρηση της σχετικής αναλογίας των δύο πληθυσμών καταδεικνύεται και από τις τιμές του δείκτη πολυδιασποράς PDI του συστήματος, οι οποίες εμφανίζουν μία μέση τιμή περί το 0.24 και δεν παρουσιάζουν σημαντική μεταβολή συναρτήσει του pH. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει το γεγονός ότι η δομή των μικκυλίων παραμένει σταθερή και ανεξάρτητη του pH. Επομένως, η ιδιαίτερος αυξημένη τιμή της έντασης σκέδασης I_{90} που παρατηρείται σε pH 3, δεν δύναται να οφείλεται σε αλλαγή της μάζας των

μικκυλίων, ούτε σε ενδεχόμενη συσσωμάτωσή τους, καθώς αυτό θα είχε ως συνέπεια τη μετατόπιση της αντίστοιχης κορυφής προς μεγαλύτερους χρόνους χαλάρωσης. Βέβαια, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι η διαφορετική συγκέντρωση ιόντων που εμφανίζουν τα διαλύματα σε κάθε τιμή του pH, επιφέρει μεταβολή του διαφορικού δείκτη διάθλασης $\partial n/\partial c$ του διαλύματος, γεγονός που επηρεάζει ανάλογα την ένταση σκέδασης. Παρόλα αυτά, η μεταβολή της τιμής της έντασης σκέδασης λόγω των διαφορετικών τιμών του $\partial n/\partial c$ του διαλύματος, δεν αναμένεται να είναι ιδιαίτερος σημαντική. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι καθώς μειώνεται η πυκνότητα φορτίου των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας των μικκυλίων, οι ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ των μικκυλίων εξασθενούν, με αποτέλεσμα η κινητικότητά τους να αυξάνεται, γεγονός που οδηγεί στην παρατηρούμενη αύξηση της έντασης σκέδασης σε pH 3. Ανάλογες μεταβολές της έντασης σκέδασης συναρτήσει του pH του διαλύματος διαπιστώθηκαν στην περίπτωση των μικκυλίων του δυσσταδικού συμπολυμερούς πολυ(ακρυλικού *n*-βουτυλεστέρα)-πολυ((1-αιθοξυκαρβονυλο)βινυλοδισφωφονικού οξέος) (PBuA-PECVPD).¹⁰¹

Οι συμπληρωματικές μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός (SLS) σε πολλαπλές γωνίες, παρείχαν τις τιμές του μοριακού βάρους M_w και της γυροσκοπικής ακτίνας R_g , για τα διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/ml, του δυσσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, σε pH 3, 7 και 9 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2. Επίσης συμπεριλαμβάνονται οι τιμές του αριθμού συσσωμάτωσης N_{agg} , ο οποίος υπολογίζεται κατά προσέγγιση μέσω των τιμών M_w των μικκυλίων και της μεμονωμένης αλυσίδας του δυσσταδικού πολυηλεκτρολύτη, της υδροδυναμικής ακτίνας R_h , που εξάγεται από τις ταυτόχρονες μετρήσεις δυναμικής σκέδασης σε πολλαπλές γωνίες και του χαρακτηριστικού λόγου $\rho = R_g/R_h$.

Θα πρέπει να σημειωθεί και πάλι ότι τα αποτελέσματα των μετρήσεων στατικής σκέδασης φωτός αποτελούν έναν μέσο όρο των αντίστοιχων τιμών των δύο πληθυσμών που συνυπάρχουν στο διάλυμα (μεμονωμένες αλυσίδες και μικκύλια). Παρόλα αυτά, στη συγκεκριμένη περίπτωση ο πληθυσμός των μικκυλίων φαίνεται να υπερισχύει στη συνολική ένταση σκέδασης του διαλύματος, όπως διαπιστώθηκε από τις μετρήσεις δυναμικής σκέδασης, οπότε οι προσδιοριζόμενες τιμές των M_w , R_g , και R_h αναμένεται να ανταποκρίνονται κυρίως στα αντίστοιχα μεγέθη των μικκυλίων. Επιπλέον επισημαίνεται ότι η μεταβολή τόσο του διαφορικού δείκτη διάθλασης $\partial n/\partial c$, όσο και της έντασης σκέδασης I_{90} του διαλύματος συναρτήσει του pH,

επιφέρουν σφάλμα στον υπολογισμό της τιμής του M_w και κατ' επέκταση του N_{agg} , ειδικά στην περίπτωση του διαλύματος σε pH 3, όπου παρατηρείται σημαντική αύξηση της έντασης σκέδασης.

Πίνακας 4.2: Συνοπτικά αποτελέσματα των μετρήσεων στατικής και δυναμικής σκέδασης φωτός σε πολλαπλές γωνίες, των διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml, του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, σε pH 3, 7 και 9.

pH	M_w (10^5 g mol^{-1})	N_{agg}	R_g (nm)	R_h (nm)	$\rho = R_g/R_h$
3	14	6	50	53.8	0.93
7	7	3	43.2	76.8	0.56
9	8	3	44.7	88.7	0.51

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις και τα αποτελέσματα του Πίνακα 4.2, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα μικκύλια που σχηματίζονται σε όλες τις περιπτώσεις χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα μικρό αριθμό συσσωμάτωσης, περί τις 3 αλυσίδες ανά μικκύλιο. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ιδιαίτερα υψηλή ασυμμετρία της δισυσταδικής αλυσίδας, δηλαδή στον υψηλό λόγο του αριθμού των υδρόφιλων προς τον αντίστοιχο αριθμό των υδρόφοβων μονομερικών μονάδων (Πίνακας 2.1), όπως έχει παρατηρηθεί για αντίστοιχες συστάσεις δισυσταδικών συμπολυμερών.^{246, 247}

Όσον αφορά το μέγεθος των μικκυλίων, η R_h αυξάνεται συναρτήσει του pH, σηματοδοτώντας την έκταση των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας του μικκυλίου, λόγω της ενίσχυσης των ηλεκτροστατικών απώσεων. Η έκταση αυτή ευθύνεται και για την παρατηρούμενη μικρή αύξηση της R_g κατά τη μετάβαση από pH 7 σε 9, ενώ σε pH 3 διαπιστώνεται η μεγαλύτερη τιμή της R_g , καθώς σε αυτή την περίπτωση οι πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες υιοθετούν τη λιγότερο εκτεταμένη διαμόρφωση. Τέλος, οι τιμές του χαρακτηριστικού λόγου ρ αντικατοπτρίζουν τις αλλαγές της διαμόρφωσης του μικκυλίου, εμφανίζοντας σημαντική μείωση κατά τη μετάβαση από pH 3 σε 7 και περαιτέρω μικρή μείωση κατά τη μετάβαση από pH 7 σε 9. Η υψηλή τιμή του λόγου ρ σε pH 3 ανταποκρίνεται στη συμπαγή δομή του μικκυλίου, ενώ η σχετικά μικρή τιμή που παρατηρείται σε pH 7 και 9 οφείλεται τόσο στην εκτεταμένη διαμόρφωση των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων, όσο και στο

μικρό αριθμό συσσωμάτωσης του μικκυλίου, ο συνδυασμός των οποίων έχει ως συνέπεια η ακτινική κατανομή της μάζας του μικκυλίου να είναι σχετικά μικρή.^{234, 235}

4.1.2. Ιδιότητες σε διάλυμα συναρτήσει της ιοντικής ισχύος

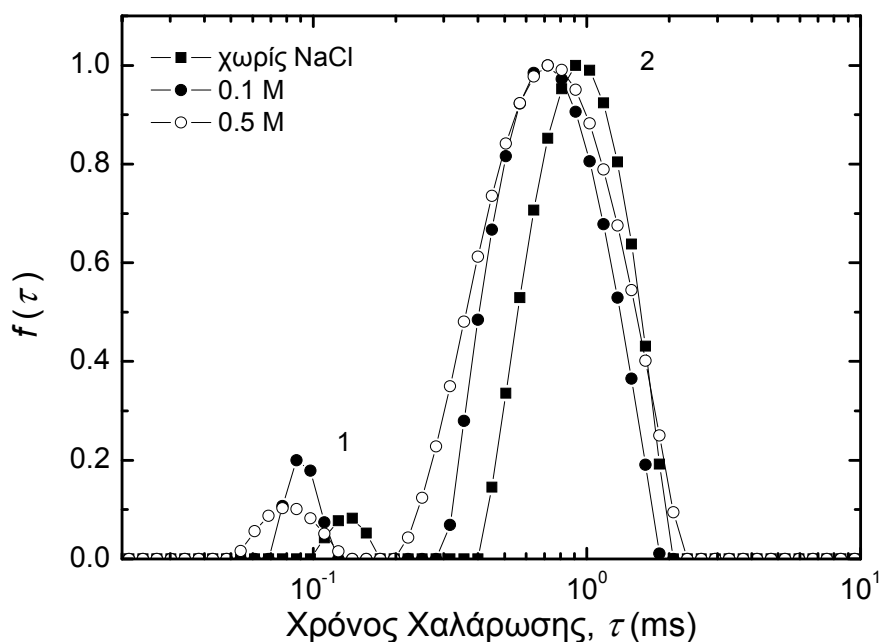
Η αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος αναμένεται να επηρεάσει σημαντικά τις ιδιότητες και τη συμπεριφορά των μικκυλίων του δυσσταδικού αμφιφιλικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, καθώς η προσθήκη άλατος στο διάλυμα έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή προάσπιση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων του SCPI.

Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν αρχικά μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός για το διάλυμα σε pH 7 του δυσσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, συναρτήσει της ιοντικής ισχύος του διαλύματος. Η αύξηση της ιοντικής ισχύος έγινε μέσω προσθήκης κατάλληλων ποσοτήτων άλατος NaCl, στα ήδη παρασκευασμένα διαλύματα του δυσσταδικού πολυηλεκτρολύτη. Επομένως και σε αυτή την περίπτωση, οι όποιες μεταβολές οφείλονται στις πιθανές αλλαγές της δομής και του μεγέθους των ήδη σχηματισμένων μικκυλίων και όχι σε μεταβολές του τρόπου αυτοοργάνωσης του δυσσταδικού πολυηλεκτρολύτη. Στο Σχήμα 4.3 παρουσιάζονται οι κατανομές των χρόνων χαλάρωσης του συστήματος, για μετρήσεις σε γωνία σκέδασης $\theta = 90^\circ$, διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml, του δυσσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, σε pH 7, χωρίς προσθήκη άλατος και με ιοντική ισχύ $I = 0.1$ και 0.5 M.

Όπως φαίνεται, η ύπαρξη των δύο κορυφών που αντιστοιχούν στις μεμονωμένες αλυσίδες (κορυφή 1) και στα μικκύλια (κορυφή 2) του δυσσταδικού πολυηλεκτρολύτη διατηρείται στα διαλύματα με αυξημένη ιοντική ισχύ. Επίσης, η συνεισφορά της κορυφής που αντιστοιχεί στα μικκύλια υπερισχύει στη συνολική κατανομή σε όλες τις περιπτώσεις, ενώ η σχετική αναλογία των δύο κορυφών δεν παρουσιάζει σημαντική μεταβολή. Τέλος, η αύξηση της ιοντικής ισχύος οδηγεί σε μία μικρή μετατόπιση των δύο κορυφών προς μικρότερους χρόνους χαλάρωσης.

Μέσω της γωνιακής εξάρτησης των κατανομών του Σχήματος 4.3 διαπιστώνεται η γραμμική συσχέτιση του μέσου ρυθμού χαλάρωσης $\bar{\Gamma}$ και του τετραγώνου του διανύσματος σκέδασης q^2 για κάθε κορυφή, αποδεικνύοντας ότι και οι δύο κορυφές οφείλονται σε κινήσεις λόγω διάχυσης σε όλες τις περιπτώσεις.

Χρήση των σχέσεων (2.11) και (2.12) οδηγεί στον υπολογισμό των τιμών των συντελεστών διάχυσης για κάθε κορυφή D_1 και D_2 , καθώς και των αντίστοιχων υδροδυναμικών ακτίνων R_{h1} και R_{h2} και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 4.3. Επίσης παρατίθενται η τιμή της έντασης σκέδασης στις 90° I_{90} , καθώς και η τιμή της υδροδυναμικής ακτίνας R_{hc} , που εξάγεται μέσω της ανάλυσης cumulants των μετρήσεων στις 90° .



Σχήμα 4.3: Κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις 90° , για διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/ml του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, σε pH 7, χωρίς προσθήκη άλατος και με ιοντική ισχύ $I = 0.1$ και 0.5 M.

Πίνακας 4.3: Τιμές των συντελεστών διάχυσης D και των υδροδυναμικών ακτίνων R_h που αντιστοιχούν στις δύο κορυφές χαλάρωσης, της έντασης σκέδασης στις 90° I_{90} , καθώς και της υδροδυναμικής ακτίνας R_{hc} που προκύπτει μέσω ανάλυσης cumulants στις 90° , των διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, σε pH 7, χωρίς προσθήκη άλατος και με ιοντική ισχύ $I = 0.1$ και 0.5 M.

Ιοντική ισχύς	D_1 ($10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	D_2 ($10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	R_{h1} (nm)	R_{h2} (nm)	I_{90} (kHz)	R_{hc} (nm)
χωρίς NaCl	2 ± 0.07	3.17 ± 0.05	12.3	77.3	561	72.3
0.1 M	2.86 ± 0.08	3.96 ± 0.02	8.6	61.9	1095	52.3
0.5 M	2.91 ± 0.11	3.92 ± 0.04	8.4	62.5	1337	52.2

Τα αποτελέσματα του Πίνακα 4.3 καταδεικνύουν την αύξηση των συντελεστών D_1 και D_2 , η οποία συνεπάγεται μείωση των ακτίνων R_{h1} και R_{h2} περίπου από τα 12 στα 8.5 nm και από τα 77 στα 62 nm, αντίστοιχα, για τα διαλύματα αυξημένης ιοντικής ισχύος. Επίσης, παρατηρείται ανάλογη μείωση της ακτίνας R_{hc} , η οποία ως γνωστόν αποτελεί ένα μέσο όρο των ακτίνων R_{h1} και R_{h2} . Η μεταβολή αυτή υποδηλώνει τη μείωση του μεγέθους τόσο των μεμονωμένων αλυσίδων, όσο και των μικκυλίων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη, που συνυπάρχουν στο διάλυμα. Προφανώς, η εξασθένηση των ηλεκτροστατικών απώσεων μεταξύ των τμημάτων της συστάδας SCPI, που προκύπτει λόγω της αύξησης της ιοντικής ισχύος, οδηγεί στη συρρίκνωση των ελεύθερων δισυσταδικών αλυσίδων και των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας των μικκυλίων. Το γεγονός ότι η παρατηρούμενη μείωση μεγεθών είναι παρόμοια και για τις δύο τιμές της ιοντικής ισχύος (0.1 και 0.5 M), πιθανότατα οφείλεται στο ότι ο μέγιστος βαθμός προάσπισης των φορτίων της πολυηλεκτρολυτικής συστάδας έχει ήδη επιτευχθεί στο 0.1 M NaCl. Αντίστοιχη συμπεριφορά της μείωσης του μεγέθους πολυηλεκτρολυτικών μικκυλίων συναρτήσει της ιοντικής ισχύος του διαλύματος, διαπιστώθηκε κατά τις πειραματικές μελέτες των Giacomelli και Borsali,¹⁰¹ καθώς και της ομάδας του Trimmel.¹⁰²

Η θεώρηση της σταθερής δομής των μικκυλίων ισχύει και στην περίπτωση των διαλυμάτων αυξημένης ιοντικής ισχύος, γεγονός που επαληθεύτηκε μέσω των μετρήσεων σκέδασης νετρονίων σε μικρές γωνίες.²⁴⁵ Άλλωστε, η διατήρηση της συνεισφοράς της κάθε κορυφής στη συνολική κατανομή, καθώς και της σχετικής τους αναλογίας, που παρατηρείται στο Σχήμα 4.3, προσφέρει περαιτέρω επιβεβαίωση στη θεώρηση αυτή. Επιπλέον, φαινόμενα συσσωμάτωσης μεταξύ των μικκυλίων κατά την προσθήκη άλατος στο διάλυμα, δεν θεωρούνται πιθανά καθώς δεν παρατηρείται ούτε μετατόπιση της αντίστοιχης κορυφής, ούτε εμφάνιση κορυφής σε μεγαλύτερους χρόνους χαλάρωσης που θα αντιστοιχούσε σε πιθανά συσσωματώματα. Παρόλα αυτά, οι τιμές της έντασης σκέδασης I_{90} εμφανίζονται αρκετά αυξημένες για τα διαλύματα με $I = 0.1$ και 0.5 M. Το γεγονός αυτό δεν δύναται να οφείλεται εξ ολοκλήρου στις όποιες μεταβολές του διαφορικού δείκτη διάθλασης dn/dc του διαλύματος, οι οποίες επέρχονται λόγω της αλλαγής της συγκέντρωσης των ιόντων στο διάλυμα, καθώς αυτές δεν αναμένονται να είναι ιδιαίτερες σημαντικές. Επομένως, η συγκεκριμένη αύξηση πιθανότατα αποδίδεται και σε αυτή την περίπτωση στην αύξηση της κινητικότητας των μικκυλίων, ως συνέπεια της

εξασθένησης των ηλεκτροστατικών απώσεων μεταξύ τους, λόγω της προάσπισης των φορτίων των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας, όπως και στην περίπτωση των μικκυλίων του PBuA-PECVPD.¹⁰¹

Εν συνεχεία διεξήχθησαν μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός (SLS) σε πολλαπλές γωνίες συναρτήσει της ιοντικής ισχύος και οι τιμές του μοριακού βάρους M_w και της γυροσκοπικής ακτίνας R_g , που προέκυψαν για τα διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/ml, του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, σε pH 7, χωρίς προσθήκη άλατος και με $I = 0.1$ και 0.5 M, παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.4. Επίσης παρατίθενται οι τιμές του αριθμού συσσωμάτωσης N_{agg} , της υδροδυναμικής ακτίνας R_h (που εξάγεται μέσω μετρήσεων σε πολλαπλές γωνίες) και του χαρακτηριστικού λόγου $\rho = R_g/R_h$.

Πίνακας 4.4: Συνοπτικά αποτελέσματα των μετρήσεων στατικής και δυναμικής σκέδασης φωτός σε πολλαπλές γωνίες, των διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml, του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, σε pH 7, χωρίς προσθήκη άλατος και με ιοντική ισχύ $I = 0.1$ και 0.5 M.

Ιοντική ισχύς	M_w (10^5 g mol^{-1})	N_{agg}	R_g (nm)	R_h (nm)	$\rho = R_g/R_h$
χωρίς NaCl	7	3	43.2	76.8	0.56
0.1 M	15.5	6	49.7	57.6	0.86
0.5 M	19	8	52.4	58.1	0.90

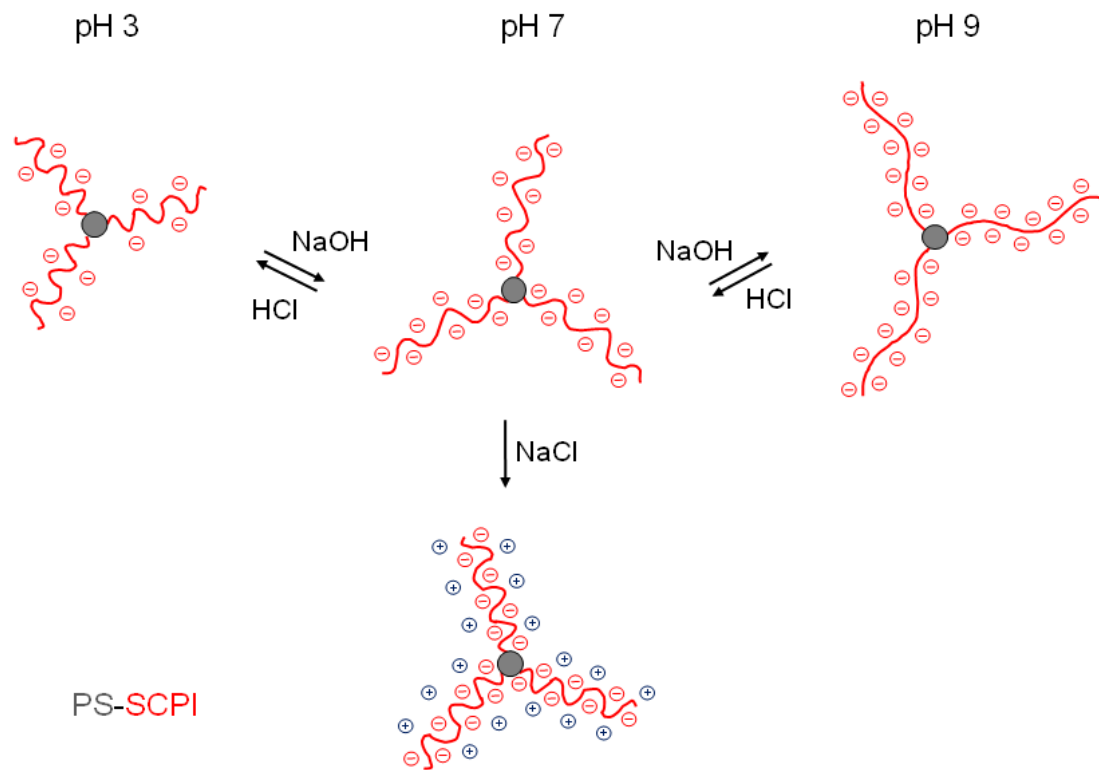
Οι παρατηρήσεις που σημειώθηκαν, αναφορικά με τα αποτελέσματα των μετρήσεων στατικής σκέδασης φωτός, στην περίπτωση της διερεύνησης της επίδρασης του pH στο μέγεθος και τις ιδιότητες των μικκυλίων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, ισχύουν και για τα αντίστοιχα αποτελέσματα των διαλυμάτων αυξημένης ιοντικής ισχύος του Πίνακα 4.4. Η μεταβολή του διαφορικού δείκτη διάθλασης dn/dc και κυρίως οι αυξημένες τιμές της έντασης σκέδασης I_{90} που εμφανίζουν τα διαλύματα μετά την προσθήκη άλατος, επιφέρουν σφάλμα στον υπολογισμό της τιμής του M_w με ανάλογη επίδραση στην τιμή του N_{agg} .

Σύμφωνα με τα παραπάνω, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της R_g και την παράλληλη

μείωση της R_h . Οι μεταβολές αυτές αποδίδονται τόσο στην αλλαγή της διαμόρφωσης, όσο και στη μείωση του μεγέθους των σχηματισμένων μικκυλίων στο διάλυμα, λόγω της συρρίκνωσης της πολυηλεκτρολυτικής συστάδας SCPI. Τη συρρίκνωση αυτή επιφέρει η προάσπιση των φορτίων της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας, γεγονός που οδηγεί στην εξασθένιση των ηλεκτροστατικών απώσεων. Η μετάβαση των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας των μικκυλίων σε λιγότερο εκτεταμένη διαμόρφωση, επηρεάζει ανάλογα την τιμή του λόγου ρ , η οποία αυξάνεται σημαντικά για τα διαλύματα υψηλής ιοντικής ισχύος.

4.1.3. Απόκριση των μικκυλίων συναρτήσει των συνθηκών του διαλύματος

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα των μετρήσεων δυναμικής και στατικής σκέδασης φωτός, προκύπτει μία περιγραφική εικόνα για τον τρόπο με τον οποίο τα μικκύλια που σχηματίζονται, ως συνέπεια της αυτοοργάνωσης του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI σε υδατικά διαλύματα, αποκρίνονται στις αλλαγές των συνθηκών του διαλύματος. Συγκεκριμένα, αύξηση του pH του διαλύματος συνεπάγεται αύξηση της πυκνότητας φορτίου της πολυηλεκτρολυτικής συστάδας του SCPI και επομένως του μεγέθους των μικκυλίων, λόγω της έκτασης των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας τους. Αντίστοιχα, αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος οδηγεί στην εξασθένιση των ηλεκτροστατικών απώσεων μεταξύ των τμημάτων της συστάδας του SCPI, εξαιτίας της προάσπισης των φορτίων, γεγονός που επιφέρει τη συρρίκνωση των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας και την ανάλογη μείωση του μεγέθους των μικκυλίων. Μία συνοπτική αναπαράσταση των μεταβολών αυτών παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.4.



Σχήμα 4.4: Σχηματική αναπαράσταση της απόκρισης των μικκυλίων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, συναρτήσει των αλλαγών του pH και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος.

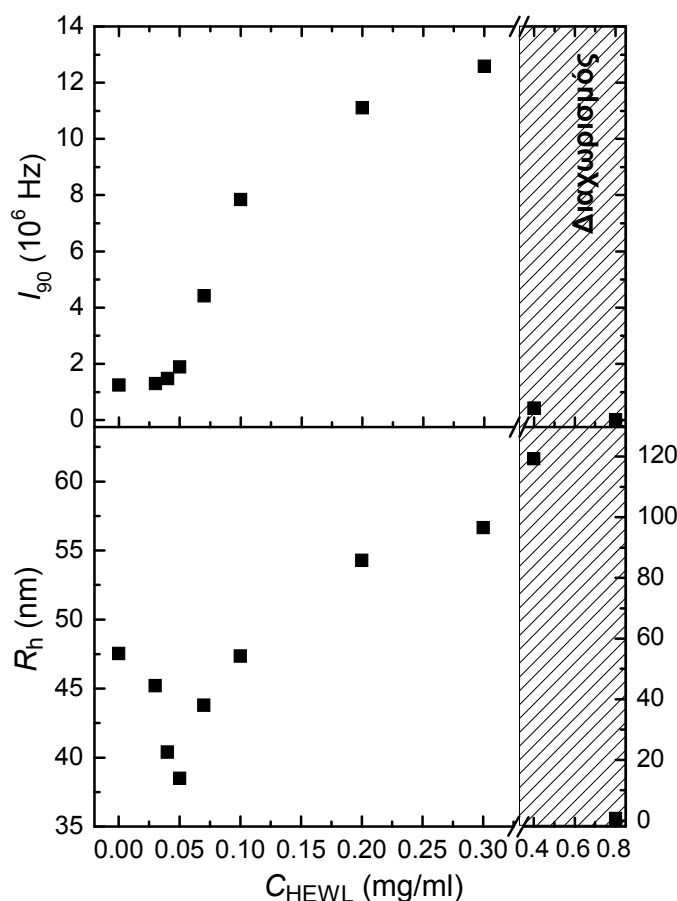
4.2. Σύμπλεξη του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI με λυσοζύμη

Η ικανότητα αυτοοργάνωσης των πολυηλεκτρολυτικών αμφιφιλικών συμπολυμερών κατά συστάδες σε μικκύλια με υδρόφοβο πυρήνα και πολυηλεκτρολυτική κορώνα, καθιστά δυνατή τη χρήση τέτοιων μακρομορίων σε πλήθος βιοϊατρικών εφαρμογών, ή τη δημιουργία νανοσυστημάτων/νανοσωματιδίων με δυνατότητα απόκρισης στις συνθήκες του περιβάλλοντός τους. Στο πλαίσιο αυτό, η αλληλεπίδραση πολυηλεκτρολυτικών μικκυλίων με πρωτεΐνες οδηγεί στο σχηματισμό βιονανοσωματιδίων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μεταφορείς φαρμάκων, βιοαισθητήρες, βιοκαταλύτες και συσκευές ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού ή ακινητοποίησης ενζύμων. Επομένως, η μελέτη τόσο της σύμπλεξης μεταξύ των μικκυλίων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της λυσοζύμης, όσο και των ιδιοτήτων και της συμπεριφοράς των σχηματιζόμενων συμπλόκων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η σύμπλεξη αναμένεται να καθοδηγείται κυρίως από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας των μικκυλίων και του πρωτεϊνικού μορίου, ενώ οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις του συστήματος διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο. Η απόκριση των μικκυλίων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη στις συνθήκες του διαλύματος, καθώς και η μεταβαλλόμενη συναρτήσε του pH κατανομή του επιφανειακού φορτίου της λυσοζύμης, προσδίδουν επιπρόσθετο ενδιαφέρον στη μελέτη της σύμπλεξης υπό διαφορετικές συνθήκες. Η διερεύνηση της διαδικασίας σύμπλεξης, καθώς και των ιδιοτήτων και της συμπεριφοράς των σχηματιζόμενων συμπλόκων μεταξύ του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της λυσοζύμης, πραγματοποιήθηκε συναρτήσε της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, του pH και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος. Επίσης, διενεργήθηκε μελέτη της δομής της πρωτεΐνης μετά τη σύμπλεξη.

4.2.1. Σύμπλεξη σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M

Η διαδικασία της σύμπλεξης μεταξύ του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της λυσοζύμης (HEWL), σε pH 7 με $I = 0.01$ M, διερευνήθηκε αρχικά μέσω μετρήσεων δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS). Υπενθυμίζεται ότι σε pH 7 η πολυηλεκτρολυτική συστάδα του SCPI χαρακτηρίζεται από υψηλή πυκνότητα φορτίου (περίπου δύο αρνητικά φορτία ανά μονομερική μονάδα), ενώ το μόριο της λυσοζύμης φέρει καθαρό θετικό φορτίο ίσο με + 8.^{133, 134}

Στο Σχήμα 4.5 παρουσιάζονται οι τιμές της έντασης σκέδασης στις 90° , I_{90} , οι οποίες έχουν διορθωθεί ως προς την αύξηση της συγκέντρωσης, καθώς και της υδροδυναμικής ακτίνας R_h , οι οποίες εξάγονται από τις μετρήσεις DLS των διαλυμάτων των συμπλόκων, συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης στο διάλυμα, C_{HEWL} . Η συγκέντρωση του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI είναι σταθερή και ίση με 0.075 mg/ml σε όλη τη σειρά των διαλυμάτων. Σημειώνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις το σημείο για $C_{HEWL} = 0$ σηματοδοτεί τις αντίστοιχες τιμές του διαλύματος του καθαρού δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη. Επίσης, οι τιμές της R_h για τα διαλύματα των συμπλόκων που παρουσίασαν διφασικό διαχωρισμό αντιστοιχούν στην κλίμακα του δεξιού άξονα y .



Σχήμα 4.5: Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01 \text{ M}$.

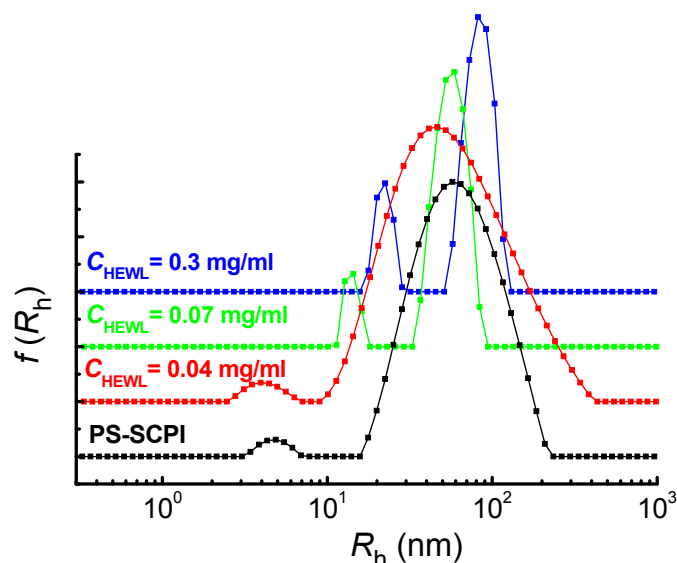
Όπως παρατηρείται, η ένταση σκέδασης I_{90} , η οποία είναι ανάλογη της μάζας των σκεδαζόντων σωματιδίων, παρουσιάζει σταδιακή αύξηση καθώς αυξάνει η συγκέντρωση της HEWL, γεγονός που αποτελεί απόδειξη της σύμπλεξης. Αντιθέτως,

η υδροδυναμική ακτίνα R_h των συμπλόκων εμφανίζει μείωση για τιμές της C_{HEWL} έως 0.05 mg/ml, ενώ για μεγαλύτερες τιμές παρατηρείται σταδιακή αύξηση. Μάλιστα, η μετάβαση από μειούμενες σε αυξανόμενες τιμές της R_h συνοδεύεται από τον σχεδόν διπλασιασμό των τιμών της έντασης I_{90} . Στην περιοχή των υψηλών συγκεντρώσεων της HEWL, τα διαλύματα των συμπλόκων εμφανίζουν διφασικό διαχωρισμό (coacervation) και οι αντίστοιχες τιμές των I_{90} και R_h λαμβάνονται μέσω μέτρησης του υπερκείμενου διαλύματος. Για $C_{HEWL} = 0.4$ mg/ml, μεγάλα σε μέγεθος σύμπλοκα ή συσσωματώματα παραμένουν στο υπερκείμενο διάλυμα, ενώ για $C_{HEWL} = 0.8$ mg/ml διαπιστώνεται η ύπαρξη μόνο ελεύθερης λυσοζύμης, οπότε συμπεραίνεται ότι όλα τα μικκύλια του δυσσταδικού πολυηλεκτρολύτη έχουν συμπλεχθεί.

Με βάση τα παραπάνω, εξάγεται το συμπέρασμα ότι κατά την προσθήκη της λυσοζύμης στο διάλυμα του δυσσταδικού πολυηλεκτρολύτη, τα μόρια της πρωτεΐνης συμπλέκονται με τις πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες της κορώνας των μικκυλίων. Η σύμπλεξη έχει ως αποτέλεσμα την εξουδετέρωση των φορτίων της συστάδας του SCPI, γεγονός που οδηγεί στη συρρίκνωση της πολυηλεκτρολυτικής κορώνας και κατ' επέκταση στη μείωση του μεγέθους των μικκυλίων. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της HEWL κάθε πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα αλληλεπιδρά με περισσότερα μόρια πρωτεΐνης, οπότε ο βαθμός εξουδετέρωσης των φορτίων της αυξάνεται με αποτέλεσμα την περαιτέρω μείωση του μεγέθους των μικκυλίων. Βέβαια, η αύξηση του βαθμού εξουδετέρωσης των φορτίων των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων συνεπάγεται μείωση της διαλυτότητας των σχηματιζόμενων συμπλόκων, με αποτέλεσμα τη συσσωμάτωσή τους. Η έναρξη της συσσωμάτωσης των συμπλόκων σηματοδοτείται από τη μετάβαση σε αυξανόμενες τιμές της R_h και τον διπλασιασμό της έντασης I_{90} . Μάλιστα, όσο περισσότερο αυξάνεται ο αριθμός πρωτεϊνικών μορίων ανά πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα και κατ' επέκταση ο βαθμός εξουδετέρωσης των φορτίων, τόσο πιο εκτεταμένη είναι η συσσωμάτωση, δηλαδή τα συσσωματώματα αποτελούνται από αυξανόμενο αριθμό συμπλόκων. Τελικά, η αύξηση της μάζας και του μεγέθους των συσσωματωμάτων είναι τέτοια ώστε να τα καθιστά μη διαλυτά και ως αποτέλεσμα επέρχεται ο διφασικός διαχωρισμός του διαλύματος.

Όπως διαπιστώθηκε κατά τη μελέτη των διαλυμάτων του δυσσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, στο διάλυμα συνυπάρχουν τόσο ελεύθερες μεμονωμένες αλυσίδες, όσο και μικκύλια και οι τιμές της R_h του Σχήματος 4.5, οι οποίες εξάγονται μέσω της ανάλυσης cumulants, αποτελούν ένα μέσο όρο του μεγέθους των δύο

πληθυσμών. Για να εξακριβωθεί η επίδραση της προσθήκης λυσοζύμης στο διάλυμα σε κάθε ένα πληθυσμό ξεχωριστά, θα πρέπει να εξεταστεί η μεταβολή των κατανομών των υδροδυναμικών ακτίνων του συστήματος, οι οποίες προκύπτουν μέσω της ανάλυσης CONTIN. Στο Σχήμα 4.6 παρουσιάζονται οι κατανομές αυτές στις 90°, για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, για αντιπροσωπευτικές τιμές της συγκέντρωσης της HEWL, καθώς και η αντίστοιχη κατανομή του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη, για λόγους σύγκρισης.

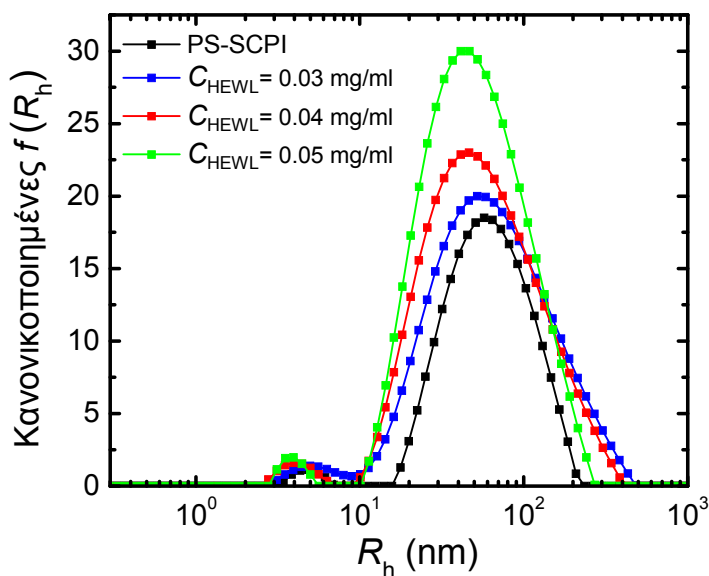


Σχήμα 4.6: Κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90°, για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, για $C_{HEWL} = 0.04, 0.07$ και 0.3 mg/ml. Η αντίστοιχη κατανομή του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη παρατίθεται επίσης, για λόγους σύγκρισης.

Οι κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων των διαλυμάτων των συμπλόκων καταδεικνύουν την ύπαρξη δύο πληθυσμών σωματιδίων διαφορετικού μεγέθους στο διάλυμα. Τα σωματίδια αυτά πιθανότατα αντιστοιχούν στα σύμπλοκα που σχηματίζουν οι ελεύθερες μεμονωμένες αλυσίδες και τα μικκύλια του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη με τη λυσοζύμη, αντίστοιχα. Για μικρές τιμές της C_{HEWL} παρατηρείται μικρή μείωση του μεγέθους και των δύο πληθυσμών, γεγονός που οφείλεται στη συρρίκνωση τόσο των μεμονωμένων αλυσίδων, όσο και της κορώνας των μικκυλίων λόγω της σύμπλεξης με την πρωτεΐνη. Περαιτέρω αύξηση της C_{HEWL} έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή αύξηση του μεγέθους και των δύο πληθυσμών, παρατήρηση που επιβεβαιώνει τη θεώρηση της συσσωμάτωσης και των δύο

διαφορετικών ειδών συμπλόκων. Οι μεταβολές αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την παρατηρούμενη μεταβολή των τιμών της μέσης υδροδυναμικής ακτίνας R_h .

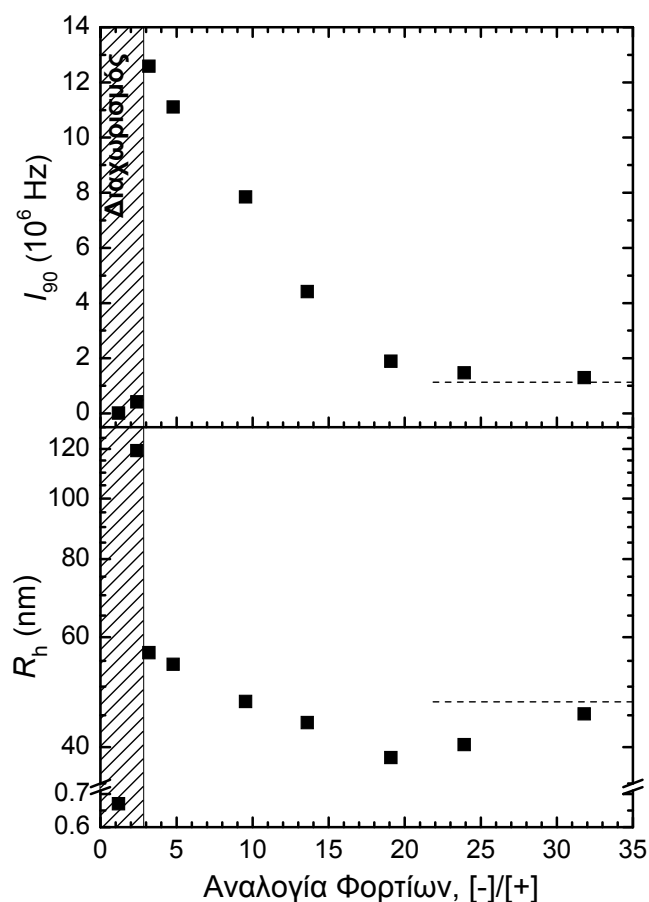
Επιπροσθέτως, οι κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων για τα διαλύματα των συμπλόκων στην περιοχή των χαμηλών τιμών της C_{HEWL} είναι παρόμοιες με αυτή του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη. Παρόλα αυτά, θεωρείται βέβαιο ότι οι συγκεκριμένες κατανομές αντιστοιχούν σε σύμπλοκα και όχι σε μεμονωμένες αλυσίδες και μικκύλια, καθώς η ένταση σκέδασης και κατ' αναλογία η μάζα των σκεδαζόντων σωματιδίων, για τα διαλύματα των συμπλόκων, είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη. Η διαφορά αυτή καθίσταται σαφέστερη μέσω των κανονικοποιημένων, ως προς τη συνολική ένταση σκέδασης του διαλύματος, κατανομών των υδροδυναμικών ακτίνων, για τα διαλύματα συμπλόκων στην περιοχή των χαμηλών συγκεντρώσεων της HEWL, οι οποίες παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.7. Σημειώνεται ότι η κανονικοποίηση των κατανομών έχει γίνει με τον τρόπο που περιγράφηκε στην αντίστοιχη περίπτωση του Σχήματος 3.12.



Σχήμα 4.7: Κανονικοποιημένες, ως προς τη συνολική ένταση του διαλύματος, κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90° , για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, για $C_{HEWL} = 0.03, 0.04$ και 0.05 mg/ml. Η αντίστοιχη κανονικοποιημένη κατανομή του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη παρατίθεται επίσης, για λόγους σύγκρισης.

Κατ' αντιστοιχία του τρόπου παρουσίασης των αποτελεσμάτων των μετρήσεων

DLS των διαλυμάτων των συμπλόκων του ομοπολυμερικού πολυηλεκτρολύτη SCPI και της λυσοζύμης (Σχήμα 3.10), οι τιμές των I_{90} και R_h για τα διαλύματα των συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, παρουσιάζονται συναρτήσει της αναλογίας φορτίων [-]/[+] του συστήματος στο Σχήμα 4.8. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν τις αντίστοιχες τιμές του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη.



Σχήμα 4.8: Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων [-]/[+], για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν τις αντίστοιχες τιμές του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη.

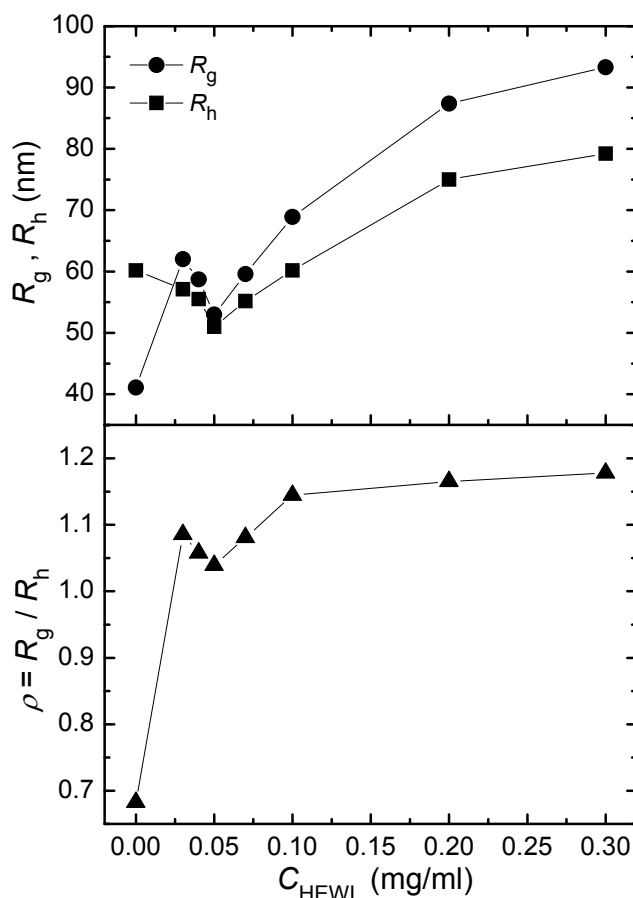
Διαπιστώνεται ότι οι μεταβολές των I_{90} και R_h συναρτήσει της αναλογίας φορτίων [-]/[+] είναι ανάλογες του συστήματος του πολυηλεκτρολύτη SCPI και της HEWL. Για [-]/[+] < 3 (πλούσια σε πρωτεΐνη περιοχή) παρατηρείται ο διαφασικός διαχωρισμός του διαλύματος, λόγω της εκτεταμένης συσσωμάτωσης των συμπλόκων. Οι μέγιστες τιμές των I_{90} και R_h παρατηρούνται για [-]/[+] \approx 3, ενώ περαιτέρω αύξηση της αναλογίας φορτίων οδηγεί στη σταδιακή μείωση τόσο της μάζας, όσο και

του μεγέθους των συμπλόκων. Η μεταβολή αυτή αντικατοπτρίζει τη μείωση του βαθμού συσσωμάτωσης των συμπλόκων, καθώς η αύξηση της αναλογίας φορτίων, η οποία ισοδυναμεί με μείωση του βαθμού εξουδετέρωσης των αρνητικών φορτίων της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας, ενισχύει τη διαλυτότητά τους. Τέλος, στην περιοχή των υψηλών τιμών της αναλογίας φορτίων (πλούσια σε δισυσταδικό πολυηλεκτρολύτη περιοχή), παρατηρείται αύξηση του μεγέθους των συμπλόκων, γεγονός το οποίο οφείλεται στην έκταση των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας των μικκυλίων, λόγω του μειούμενου αριθμού πρωτεϊνικών μορίων που αλληλεπιδρούν με κάθε πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα.

Παράλληλα με τις μετρήσεις δυναμικής σκέδασης πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός σε πολλαπλές γωνίες για τα διαλύματα των συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M και στο Σχήμα 4.9 παρουσιάζονται οι τιμές των ακτίνων R_g και R_h που εξάγονται από τις μετρήσεις αυτές, καθώς και του χαρακτηριστικού τους λόγου ρ , συναρτήσει της C_{HEWL} .

Όπως φαίνεται, οι τιμές των ακτίνων R_g και R_h εμφανίζουν αρχικά μείωση συναρτήσει της συγκέντρωσης C_{HEWL} , υποδηλώνοντας τη μείωση του μεγέθους των συμπλόκων, ενώ για $C_{HEWL} > 0.05$ mg/ml αυξάνονται σταδιακά, σηματοδοτώντας τη συσσωμάτωση των συμπλόκων. Σημειώνεται ότι για τα διαλύματα των συμπλόκων οι τιμές της R_g είναι μεγαλύτερες των αντίστοιχων της R_h , σε αντίθεση με το διάλυμα του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη. Η αντίθεση αυτή πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι η ενσωμάτωση πρωτεϊνικών μορίων στην κορώνα των μικκυλίων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη, έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της R_g , λόγω της αλλαγής της ακτινικής κατανομής της μάζας. Επίσης, υπενθυμίζεται ότι τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών ανταποκρίνονται κυρίως στα αντίστοιχα μεγέθη του πληθυσμού σωματιδίων μεγαλύτερου μεγέθους στο διάλυμα, δηλαδή στα σύμπλοκα που σχηματίζονται μεταξύ των μικκυλίων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη και της λυσοζύμης. Επομένως, οι συγκεκριμένες τιμές των R_g και R_h εμφανίζονται αυξημένες συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές της R_h που εξάγονται μέσω της ανάλυσης cumulants των μετρήσεων στατικής σκέδασης φωτός στις 90° . Τέλος, η μεταβολή των τιμών του χαρακτηριστικού λόγου ρ , βρίσκεται σε συμφωνία με τις παρατηρούμενες μεταβολές του μεγέθους και κατ' επέκταση της διαμόρφωσης των μικκυλίων. Αρχικά παρατηρείται μικρή μείωση, λόγω της συρρίκνωσης της

πολυηλεκτρολυτικής κορώνας των μικκυλίων κατά τη σύμπλεξη με τα μόρια της πρωτεΐνης. Εν συνεχεία, οι τιμές του λόγου ρ αυξάνονται ως συνέπεια της συσσωμάτωσης των συμπλόκων, η οποία προφανώς οδηγεί σε πιο χαλαρές δομές.

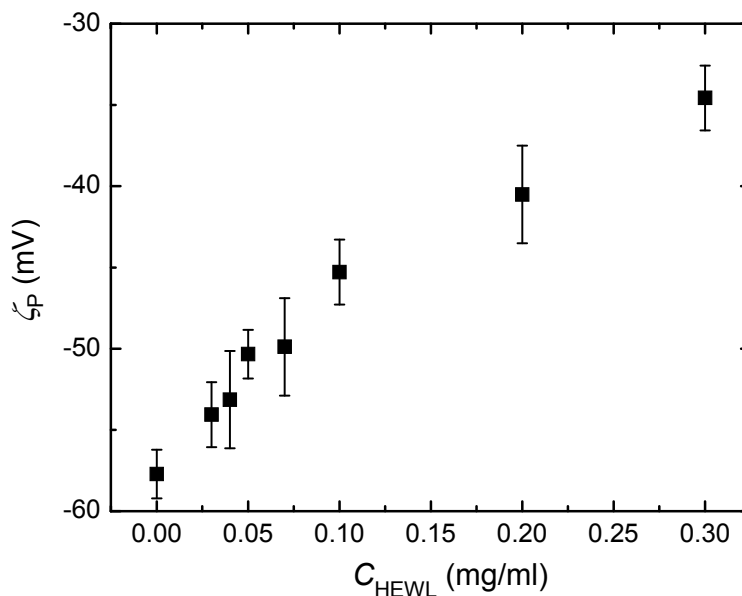


Σχήμα 4.9: Γυροσκοπική ακτίνα, R_g , υδροδυναμική ακτίνα (μέσω μετρήσεων σε πολλαπλές γωνίες), R_h , και λόγος $\rho = R_g/R_h$, συναρτήσεως της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M.

Το ενεργό φορτίο των συμπλόκων διερευνήθηκε μέσω μετρήσεων ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός (ELS). Οι μετρούμενες τιμές του δυναμικού ζήτα, ζ_p , για τα διαλύματα των συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, παρουσιάζονται ως συνάρτηση της C_{HEWL} , στο Σχήμα 4.10. Επισημαίνεται ότι τα διαλύματα που παρουσίασαν διφασικό διαχωρισμό εξαιρέθηκαν, λόγω ανεπαρκούς σήματος.

Η παρατηρούμενη σταδιακή μείωση της απόλυτης τιμής του ζ_p συναρτήσεως της αυξανόμενης συγκέντρωσης της λυσοζύμης, σηματοδοτεί τη μείωση του ενεργού φορτίου των συμπλόκων. Η μεταβολή αυτή οφείλεται στην αύξηση του αριθμού των

πρωτεϊνικών μορίων που αλληλεπιδρούν με κάθε πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα της κορώνας των μικκυλίων. Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια την αύξηση του βαθμού εξουδετέρωσης των αρνητικών φορτίων των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων και κατ' επέκταση τη μείωση της απόλυτης τιμής του ενεργού φορτίου των συμπλόκων.

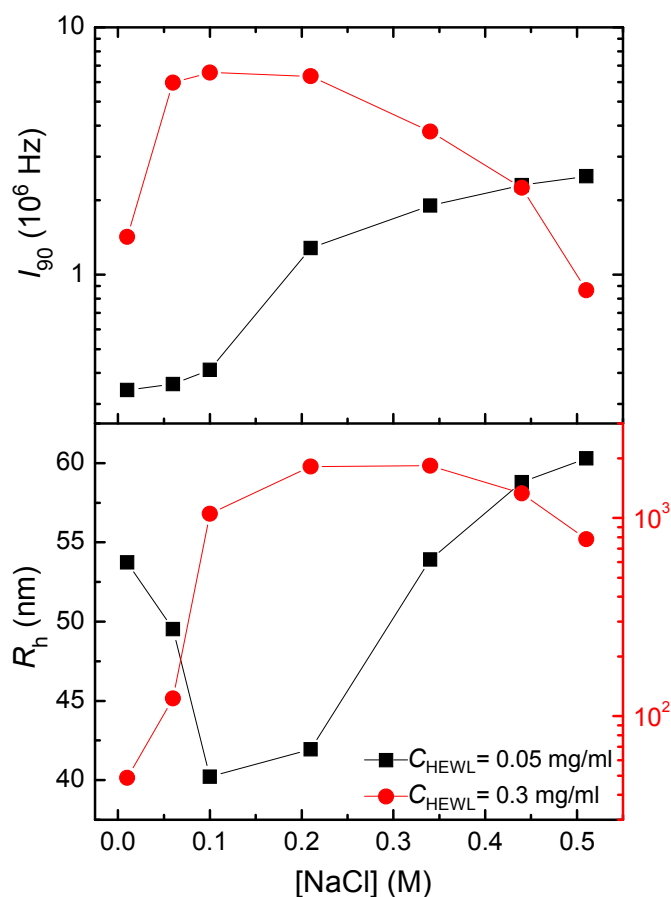


Σχήμα 4.10: Δυναμικό ζήτα, ζ_p , συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M.

Τέλος, με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης της ιοντικής ισχύος του διαλύματος στις ιδιότητες και τη συμπεριφορά των ήδη σχηματισμένων συμπλόκων, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις DLS συναρτήσει της συγκέντρωσης του άλατος NaCl. Η αύξηση της συγκέντρωσης του NaCl έγινε μέσω σταδιακής προσθήκης κατάλληλων ποσοτήτων υδατικού διαλύματος NaCl συγκέντρωσης 1 M σε pH 7, στα ήδη παρασκευασμένα διαλύματα των συμπλόκων. Στο Σχήμα 4.11 παρατίθενται οι αντίστοιχες τιμές της έντασης σκέδασης I_{90} και της υδροδυναμικής ακτίνας R_h , για δύο αντιπροσωπευτικά διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL σε pH 7, με $C_{HEWL} = 0.05$ και 0.3 mg/ml, συναρτήσει της ιοντικής ισχύος, η οποία κυμαίνεται από 0.01 έως 0.51 M. Οι τιμές της R_h για το διάλυμα συμπλόκων με $C_{HEWL} = 0.3$ mg/ml αντιστοιχούν στην κλίμακα του δεξιού άξονα y .

Είναι φανερό ότι τα δύο διαλύματα συμπλόκων εμφανίζουν διαφορετική απόκριση στην αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος. Το γεγονός αυτό

οφείλεται στη διαφορετική δομή των σκεδαζόντων σωματιδίων του κάθε διαλύματος. Υπενθυμίζεται ότι στην περιοχή των χαμηλών τιμών της C_{HEWL} , ο κύριος πληθυσμός σωματιδίων στο διάλυμα αντιστοιχεί στα σύμπλοκα που σχηματίζονται μεταξύ των μικκυλίων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη και των μορίων της λυσοζύμης, τα οποία χαρακτηρίζονται από σχετικά μικρό αριθμό πρωτεϊνικών μορίων ανά πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα της κορώνας των μικκυλίων. Αντίθετα, στην περιοχή των υψηλών τιμών της C_{HEWL} , στο διάλυμα υπάρχουν κυρίως μεγάλα συσσωματώματα μικκυλίων συμπλεγμένων με λυσοζύμη, για τα οποία ο αριθμός πρωτεϊνικών μορίων ανά πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα είναι αρκετά υψηλός.



Σχήμα 4.11: Εξάρτηση από την ιοντική ισχύ της έντασης σκέδασης στις 90° , I_{90} , και της υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , για δύο αντιπροσωπευτικά διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL σε pH 7, με $C_{HEWL} = 0.05$ και 0.3 mg/ml.

Για το διάλυμα με $C_{HEWL} = 0.05$ mg/ml παρατηρείται σταδιακή αύξηση της έντασης σκέδασης I_{90} , ενώ η υδροδυναμική ακτίνα R_h αρχικά μειώνεται και εν συνεχεία αυξάνεται, συναρτήσει της ιοντικής ισχύος. Αξίζει να σημειωθεί ότι η

μετάβαση σε αυξανόμενες τιμές της R_h συνοδεύεται από έντονη αύξηση των τιμών του I_{90} . Επομένως συμπεραίνεται ότι η προσθήκη NaCl στο διάλυμα των συμπλόκων αρχικά οδηγεί στη συρρίκνωση της κορώνας των συμπλεγμένων μικκυλίων, λόγω της προάσπισης των μη εξουδετερωμένων φορτίων των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας. Περαιτέρω αύξηση της ιοντικής ισχύος, η οποία συνοδεύεται από ανάλογη αύξηση του βαθμού προάσπισης των φορτίων, οδηγεί στη μείωση της διαλυτότητας των συμπλόκων και στη σταδιακή συσσωμάτωσή τους.

Αντίστοιχα, το διάλυμα με $C_{HEWL} = 0.3$ mg/ml εμφανίζει άμεση απότομη αύξηση τόσο της έντασης σκέδασης I_{90} , όσο και της υδροδυναμικής ακτίνας R_h , καθώς αυξάνεται η ιοντική ισχύς. Η μεταβολή αυτή υποδηλώνει την εκτεταμένη δευτερογενή συσσωμάτωση των ήδη σχηματισμένων συσσωματωμάτων συμπλόκων του διαλύματος. Η αύξηση της μάζας και του μεγέθους των συσσωματωμάτων είναι τόσο δραματική ώστε το διάλυμα να εμφανίζει καθίζηση, η οποία ευθύνεται για την παρατηρούμενη μείωση των τιμών των I_{90} και R_h για τιμές της ιοντικής ισχύος μεγαλύτερες ή ίσες του 0.2 M. Προφανώς, σε αυτή την περίπτωση τα αρχικά συσσωματώματα του διαλύματος εμφανίζουν ήδη μειωμένη διαλυτότητα, οπότε ακόμα και η προσθήκη μικρής ποσότητας NaCl επιφέρει την περαιτέρω συσσωμάτωσή τους.

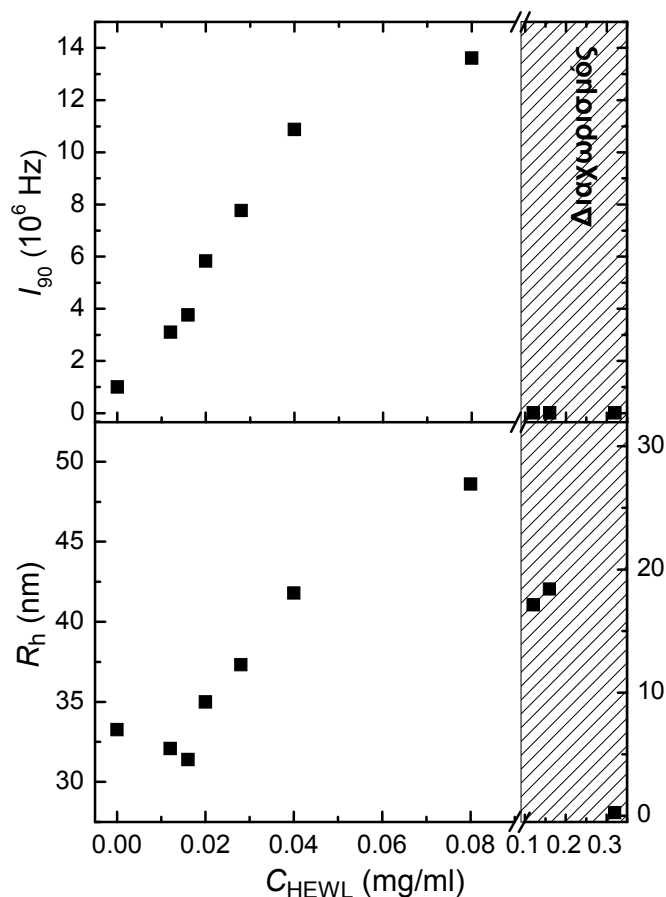
Ένα τελικό σχόλιο που ισχύει και στις δύο περιπτώσεις αφορά την ενίσχυση του ρόλου των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων του συστήματος καθώς εξασθενούν οι ηλεκτροστατικές, εξαιτίας της προάσπισης των φορτίων. Μάλιστα, ο εν μέρει υδροφοβικός χαρακτήρας της πολυηλεκτρολυτικής συστάδας του SCPI, συντελεί στην ενίσχυση αυτή. Οπότε, η παρατηρούμενη συσσωμάτωση ευνοείται σημαντικά.

4.2.2. Σύμπλεξη σε pH 3 και ιοντική ισχύ 0.01 M

Η απόκριση των μικκυλίων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη στην αλλαγή του pH του διαλύματος, καθώς και η μεταβολή της κατανομής του επιφανειακού φορτίου της λυσοζύμης προσδίδουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη μελέτη της διαδικασίας σύμπλεξης σε pH 3. Υπενθυμίζεται ότι σε pH 3 η πολυηλεκτρολυτική συστάδα του SCPI χαρακτηρίζεται από μειωμένη πυκνότητα φορτίου, ενώ το μόριο της λυσοζύμης φέρει θετικό καθαρό φορτίο ίσο με + 14.^{190, 191}

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) για τα διαλύματα των συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της

HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M και οι διορθωμένες ως προς την αύξηση της συγκέντρωσης τιμές της έντασης σκέδασης στις 90° , I_{90} , καθώς και οι αντίστοιχες τιμές της υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.12 συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} . Η συγκέντρωση του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI είναι σταθερή και ίση με 0.1 mg/ml σε όλη τη σειρά των διαλυμάτων. Σημειώνεται ότι η συγκέντρωση των δύο συστατικών έχει επιλεγεί έτσι ώστε η αναλογία φορτίων [-]/[+] του συστήματος να είναι ανάλογη των διαλυμάτων των συμπλόκων σε pH 7. Επίσης, οι τιμές της R_h για τα διαλύματα που παρουσίασαν διφασικό διαχωρισμό αντιστοιχούν στην κλίμακα του δεξιού άξονα y . Τέλος, υπενθυμίζεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη αντιστοιχούν στο σημείο για $C_{HEWL} = 0$.



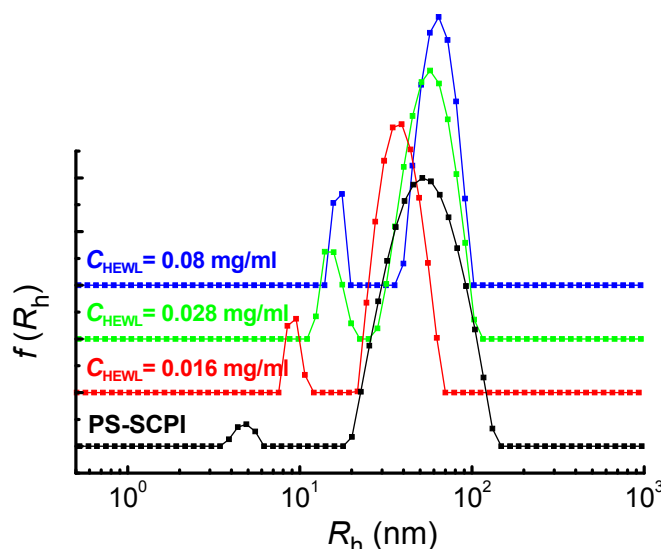
Σχήμα 4.12: Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M.

Όπως φαίνεται, οι τιμές των I_{90} και R_h εμφανίζουν παρόμοια μεταβολή συναρτήσει της C_{HEWL} με την αντίστοιχη που παρατηρήθηκε σε pH 7. Οι διαφορές

βρίσκονται στο ότι η αύξηση του I_{90} είναι περισσότερο απότομη σε αυτή την περίπτωση, η αρχική μείωση της R_h είναι μικρότερη και εμφανίζεται σε πιο στενό εύρος τιμών της C_{HEWL} , ενώ η μετάβαση σε αυξανόμενες τιμές είναι αρκετά απότομη και τέλος ο διαφασικός διαχωρισμός των διαλυμάτων παρατηρείται σε μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων της HEWL. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι τιμές της R_h , ειδικά οι αρχικές, είναι αρκετά μικρότερες από τις αντίστοιχες σε pH 7, καθώς τα μικκύλια του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη σε pH 3 είναι μικρότερα σε μέγεθος, λόγω της λιγότερο εκτεταμένης διαμόρφωσης της πολυηλεκτρολυτικής κορώνας.

Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, συμπεραίνεται ότι οι ιδιότητες και η συμπεριφορά των συμπλόκων συναρτίζεται της συγκέντρωσης της λυσοζύμης σε pH 3 είναι ανάλογες με αυτές που παρατηρήθηκαν στην περίπτωση του pH 7. Η αρχική προσθήκη της λυσοζύμης στο διάλυμα οδηγεί στη σύμπλεξη των πρωτεϊνικών μορίων με τις πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες και συνεπάγεται τη συρρίκνωση της κορώνας των μικκυλίων. Η εξουδετέρωση των φορτίων της πολυηλεκτρολυτικής συστάδας αυξάνεται συναρτίζεται της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, καθώς κάθε πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα αλληλεπιδρά με περισσότερα πρωτεϊνικά μόρια. Το γεγονός αυτό επιφέρει τη μείωση της διαλυτότητάς τους, οπότε τα σύμπλοκα αρχίζουν να συσσωματώνονται. Η συσσωμάτωση τελικά φτάνει σε τέτοιο βαθμό ώστε τα συσσωματώματα των συμπλόκων να μην είναι πλέον διαλυτά, με αποτέλεσμα το διαφασικό διαχωρισμό του διαλύματος. Επισημαίνεται ότι σε αυτή την τιμή του pH ο συνδυασμός της μειωμένης πυκνότητας φορτίου της πολυηλεκτρολυτικής συστάδας και της αυξημένης τιμής του καθαρού φορτίου της λυσοζύμης, έχει ως αποτέλεσμα η σύμπλεξη κάθε πρωτεϊνικού μορίου με την πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα να επιφέρει μεγαλύτερο βαθμό εξουδετέρωσης των φορτίων της αλυσίδας, από ότι σε pH 7. Οπότε, η συσσωμάτωση των συμπλόκων είναι πιο εκτεταμένη, γεγονός που υποδηλώνει η απότομη αύξηση τόσο της μάζας όσο και του μεγέθους, καθώς και η απουσία μεγάλων συσσωματωμάτων στο υπερκείμενο διάλυμα σε όλη την περιοχή του διαφασικού διαχωρισμού.

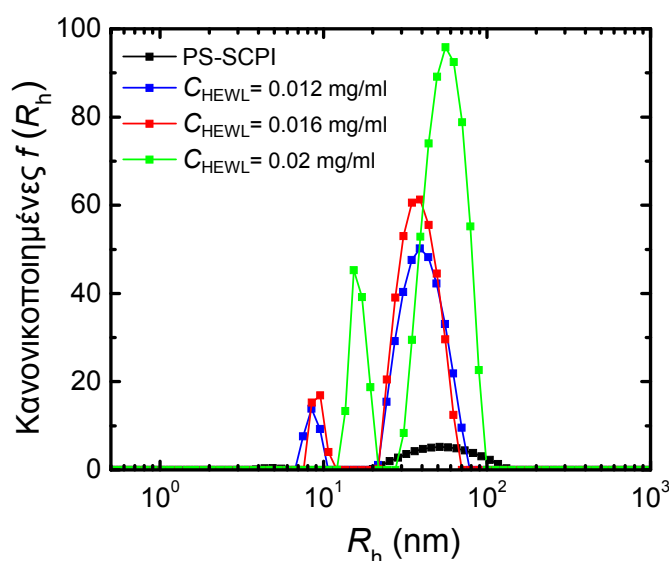
Η μεταβολή των κατανομών των υδροδυναμικών ακτίνων του συστήματος που εξάγονται μέσω της ανάλυσης CONTIN στις 90° και παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.13, για αντιπροσωπευτικές τιμές της C_{HEWL} , παρέχουν επιπρόσθετες πληροφορίες σχετικά με την επίδραση της λυσοζύμης σε κάθε πληθυσμό του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη ξεχωριστά.



Σχήμα 4.13: Κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90°, για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M, για $C_{\text{HEWL}} = 0.016, 0.028$ και 0.08 mg/ml. Η αντίστοιχη κατανομή του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη παρατίθεται επίσης, για λόγους σύγκρισης.

Οι κατανομές αυτές καταδεικνύουν την ύπαρξη δύο πληθυσμών σκεδαζόντων σωματιδίων στο διάλυμα των συμπλόκων, σε κάθε περίπτωση. Το μέγεθος των σωματιδίων του μεγαλύτερου πληθυσμού μειώνεται για μικρές τιμές της C_{HEWL} και εν συνεχεία αυξάνεται, ενώ το μέγεθος του μικρότερου πληθυσμού αυξάνεται σταδιακά, συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης. Επιπροσθέτως, η κατανομή των υδροδυναμικών ακτίνων για το διάλυμα με τη μικρότερη τιμή της C_{HEWL} , παρουσιάζει περισσότερες ομοιότητες με τις αντίστοιχες κατανομές στην περιοχή των υψηλών τιμών της C_{HEWL} , παρά με αυτή του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη. Η παρατήρηση αυτή και ειδικά το γεγονός ότι ο πληθυσμός μικρότερου μεγέθους είναι μεγαλύτερος από τις ελεύθερες μεμονωμένες αλυσίδες του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ακόμα και για μικρές τιμές της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, οι δύο πληθυσμοί των διαλυμάτων των συμπλόκων αντιστοιχούν σε συσσωματώματα συμπλεγμένων με πρωτεΐνη μεμονωμένων αλυσίδων και μικκυλίων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη, αντίστοιχα. Το σχετικά μικρό μέγεθος και των δύο ειδών συσσωματωμάτων συγκριτικά με τα αντίστοιχα μεγέθη των μεμονωμένων αλυσίδων και των μικκυλίων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη, πιθανότατα οφείλεται στην πιο συμπαγή δομή τους, καθώς σε αυτή την τιμή του pH η σύμπλεξη επιφέρει σημαντική συρρίκνωση των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων, λόγω της μειωμένης πυκνότητας φορτίου.

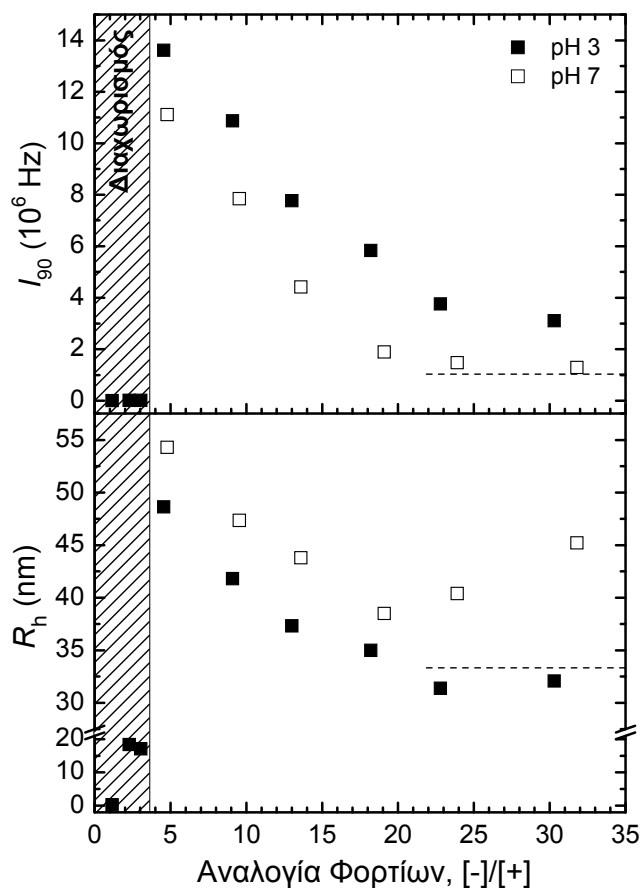
Περαιτέρω επιβεβαίωση στο παραπάνω συμπέρασμα προσδίδουν οι κανονικοποιημένες ως προς τη συνολική ένταση σκέδασης του διαλύματος κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων, για τα διαλύματα των συμπλόκων στην περιοχή των χαμηλών συγκεντρώσεων της HEWL που παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.14. Η ιδιαίτερως αυξημένη ένταση των κατανομών των διαλυμάτων των συμπλόκων, σε σχέση με την αντίστοιχη του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη, υποδηλώνει ότι η μάζα των σκεδαζόντων σωματιδίων των διαλυμάτων των συμπλόκων είναι κατά πολύ μεγαλύτερη, γεγονός που συνάδει με τη θεώρηση της συσσωμάτωσης.



Σχήμα 4.14: Κανονικοποιημένες, ως προς τη συνολική ένταση του διαλύματος, κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90° , για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M, για $C_{HEWL} = 0.012$, 0.016 και 0.02 mg/ml. Η αντίστοιχη κανονικοποιημένη κατανομή του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη παρατίθεται επίσης, για λόγους σύγκρισης.

Η απευθείας σύγκριση των ιδιοτήτων και της συμπεριφοράς των συμπλόκων σε pH 7 και σε pH 3, καθίσταται δυνατή μέσω της αναπαράστασης των αποτελεσμάτων των μετρήσεων DLS συναρτήσει της αναλογίας φορτίων του συστήματος. Στο Σχήμα 4.15 παρουσιάζονται οι τιμές των I_{90} και R_h για τα διαλύματα των συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M, συναρτήσει της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν τις τιμές των I_{90} και R_h του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη. Για λόγους σύγκρισης συμπεριλαμβάνονται οι αντίστοιχες τιμές

σε pH 7 στην περιοχή των τιμών της αναλογίας φορτίων [-]/[+] > 4.

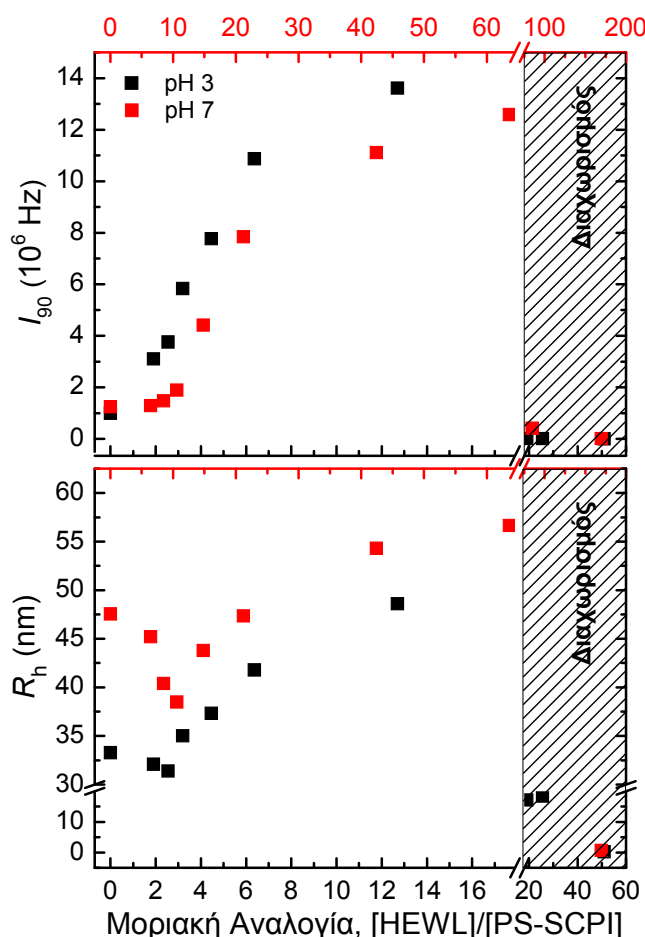


Σχήμα 4.15: Ένταση σκέδασης στις 90°, I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων [-]/[+], για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν τις αντίστοιχες τιμές του διαλύματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη, ενώ οι τιμές του ίδιου συστήματος σε pH 7, συμπεριλαμβάνονται για λόγους σύγκρισης.

Είναι εμφανές ότι οι τιμές της έντασης σκέδασης I_{90} σε pH 3 είναι συστηματικά μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες σε pH 7, ενώ για τις τιμές της ακτίνας R_h ισχύει το αντίθετο, για όλα τα διαλύματα των συμπλόκων. Οι διαφορές αυτές αντικατοπτρίζουν την αυξημένη μάζα και την πιο συμπαγή δομή των συσσωματωμάτων που σχηματίζονται σε pH 3, ακόμα και στην περιοχή των υψηλών τιμών της αναλογίας φορτίων. Η παρατηρούμενη μικρή αύξηση της τελικής τιμής της R_h σηματοδοτεί την ελαφρώς πιο εκτεταμένη διαμόρφωση που υιοθετούν οι συμπλεγμένες πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες της κορώνας των μικκυλίων, καθώς μειώνεται ο βαθμός εξουδετέρωσης των φορτίων τους.

Ανάλογο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση των αποτελεσμάτων των

μετρήσεων DLS σε pH 7 και σε pH 3, συναρτήσει της μοριακής αναλογίας των δύο συστατικών του συστήματος. Δηλαδή, της αναλογίας των συνολικών moles της λυσοζύμης, ως προς τα αντίστοιχα moles του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη στον συνολικό όγκο του διαλύματος, $[HEWL]/[PS-SCPI]$, η οποία ουσιαστικά προσδιορίζει τον αριθμό των πρωτεϊνικών μορίων που αντιστοιχούν σε κάθε μία αλυσίδα του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη. Για το λόγο αυτό, οι τιμές των I_{90} και R_h για τα διαλύματα των συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 και 3 με $I = 0.01$ M, παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.16 συναρτήσει της μοριακής αναλογίας του συστήματος. Επισημαίνεται ότι η μοριακή αναλογία των διαλυμάτων σε pH 7 αντιστοιχεί στην κλίμακα του επάνω άξονα x , ενώ το εύρος των αξόνων x έχει επιλεγεί έτσι ώστε τα κατακόρυφα σημεία να αντιστοιχούν σε διαλύματα με παρόμοια αναλογία φορτίων.



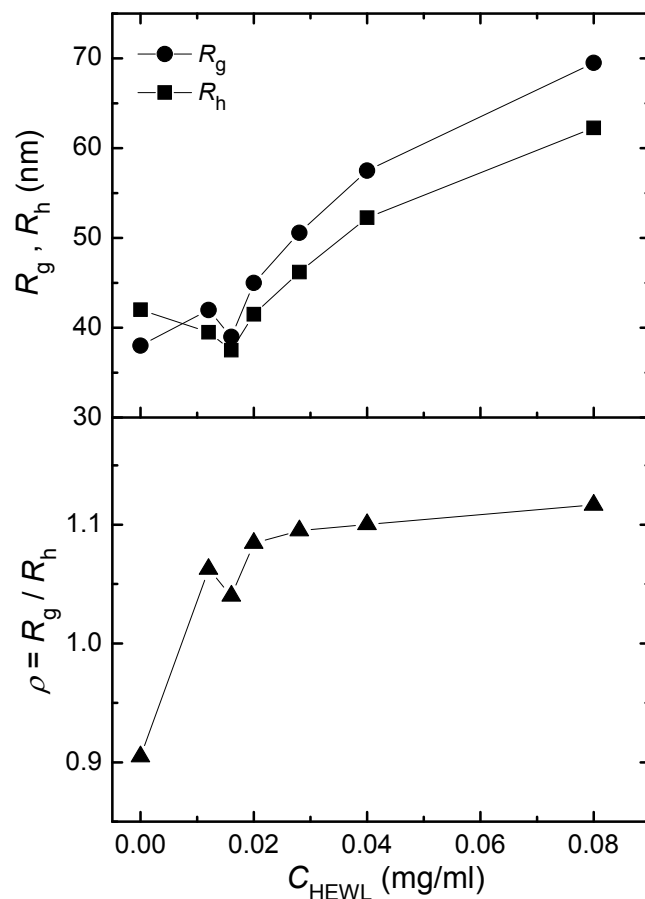
Σχήμα 4.16: Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της μοριακής αναλογίας φορτίων $[HEWL]/[PS-SCPI]$, για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 3 και 7 με $I = 0.01$ M.

Η αναπαράσταση αυτή καταδεικνύει και πάλι το γεγονός ότι τα συσσωματώματα των συμπλόκων που σχηματίζονται σε pH 3, χαρακτηρίζονται από αυξημένη μάζα και πιο συμπαγή διαμόρφωση, σε σχέση με τα αντίστοιχα σε pH 7. Το επιπρόσθετο ενδιαφέρον σε αυτή την περίπτωση έγκειται στη σύγκριση της συμπεριφοράς των συμπλόκων στις δύο τιμές του pH συναρτήσει του αριθμού των πρωτεϊνικών μορίων που αλληλεπιδρούν με κάθε αλυσίδα του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη. Όπως φαίνεται, παρόλο που ο αριθμός των μορίων της λυσοζύμης που αλληλεπιδρούν με κάθε μία πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα της κορώνας των μικκυλίων είναι σημαντικά μικρότερος σε pH 3 από ότι σε pH 7, η μειωμένη πυκνότητα φορτίου της συστάδας του SCPI και η αυξημένη τιμή του καθαρού φορτίου της λυσοζύμης έχουν ως αποτέλεσμα ο βαθμός εξουδετέρωσης των φορτίων της πολυηλεκτρολυτικής συστάδας να είναι μεγαλύτερος. Το γεγονός αυτό συνεπάγεται σημαντική μείωση της διαλυτότητας των συμπλεγμένων με πρωτεΐνη μικκυλίων και οδηγεί στη συσσωμάτωσή τους, ακόμα και για μικρές τιμές της μοριακής αναλογίας. Επίσης αξιοσημείωτη είναι η διαφορά της μέγιστης αναλογίας αλληλεπίδρασης των δύο συστατικών του συστήματος που μπορεί να επιτευχθεί, διατηρώντας παράλληλα τη διαλυτότητα των σχηματιζόμενων συσσωματωμάτων. Έτσι, σε pH 3 η αναλογία αυτή είναι περίπου ίση με 13 μόρια λυσοζύμης ανά πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα, ενώ σε pH 7 ο αντίστοιχος αριθμός είναι περί τα 64 μόρια λυσοζύμης ανά πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα.

Μέσω μετρήσεων στατικής σκέδασης φωτός σε πολλαπλές γωνίες εξάγονται οι τιμές των ακτίνων R_g και R_h , για τα διαλύματα των συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M, οι οποίες παρουσιάζονται συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης στο Σχήμα 4.17, όπου επίσης παρατίθεται η μεταβολή του χαρακτηριστικού λόγου ρ .

Η μεταβολή των R_g , R_h και ρ συναρτήσει της C_{HEWL} , για τα διαλύματα των συμπλόκων σε pH 3, είναι ανάλογη της αντίστοιχης μεταβολής σε pH 7 (Σχήμα 4.9), οπότε και σε αυτή την περίπτωση ισχύουν σε γενικές γραμμές τα ίδια συμπεράσματα. Η διαφορά έγκειται στο ότι η αρχική μείωση των τιμών σηματοδοτεί την περισσότερο συμπαγή διαμόρφωση των συσσωματωμάτων που σχηματίζονται στην περιοχή των χαμηλών συγκεντρώσεων της λυσοζύμης, ενώ η μετέπειτα αύξηση υποδηλώνει την περαιτέρω συσσωμάτωση των συμπλόκων, δηλαδή την αύξηση του αριθμού των συμπλεγμένων με πρωτεΐνη μικκυλίων που αποτελούν το κάθε συσσωμάτωμα. Εκτός

αυτού, οι τιμές του λόγου ρ είναι ελαφρώς μικρότερες από τις αντίστοιχες σε pH 7, καταδεικνύοντας και πάλι την περισσότερο συμπαγή δομή των συσσωματωμάτων που σχηματίζονται σε pH 3.

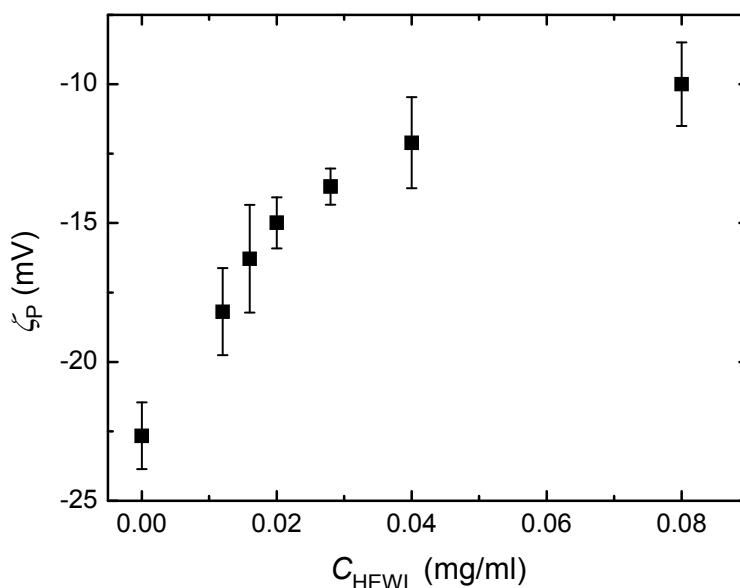


Σχήμα 4.17: Γυροσκοπική ακτίνα, R_g , υδροδυναμική ακτίνα (μέσω μετρήσεων σε πολλαπλές γωνίες), R_h , και λόγος $\rho = R_g/R_h$, συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M.

Εν συνεχεία, μετρήσεις ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός (ELS) προσέφεραν συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με το ενεργό φορτίο των συμπλόκων σε pH 3. Στο Σχήμα 4.18 παρουσιάζονται οι τιμές του ζ_p για τα διαλύματα των συμπλόκων, του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M, που δεν παρουσίασαν διφασικό διαχωρισμό, συναρτήσει της C_{HEWL} .

Η απόλυτη τιμή του ζ_p μειώνεται σταδιακά συναρτήσει της αυξανόμενης συγκέντρωσης της λυσοζύμης, γεγονός που υποδηλώνει τη μείωση του ενεργού φορτίου των συμπλόκων. Η μείωση αυτή αποδίδεται στην αύξηση του βαθμού

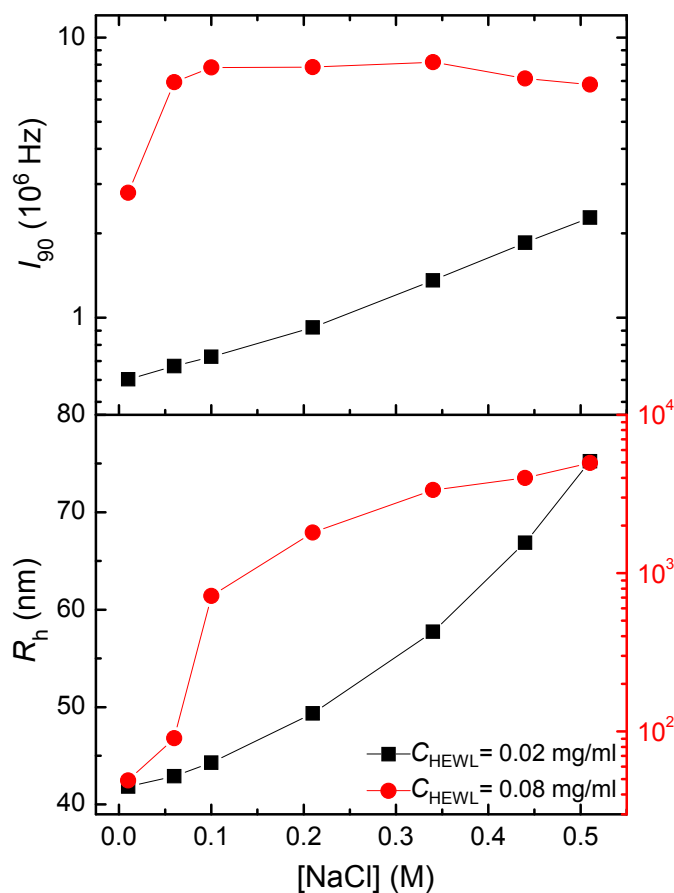
εξουδετέρωσης των αρνητικών φορτίων της πολυηλεκτρολυτικής συστάδας, καθώς μεγαλώνει ο αριθμός των πρωτεϊνικών μορίων που αλληλεπιδρούν με κάθε πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα. Οι σημαντικά μικρότερες τιμές του ζ_p , καθώς και η περισσότερο απότομη μείωση τους (κατ' απόλυτη τιμή), που παρατηρούνται για τα διαλύματα των συμπλόκων σε pH 3 συγκριτικά με τις αντίστοιχες σε pH 7 (Σχήμα 4.10), αποδίδονται στη μειωμένη πυκνότητα φορτίου της πολυηλεκτρολυτικής συστάδας σε συνδυασμό με την αυξημένη τιμή του καθαρού φορτίου της λυσοζύμης.



Σχήμα 4.18: Δυναμικό ζήτα, ζ_p , συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M.

Εν τέλει, η επίδραση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος στις ιδιότητες και τη συμπεριφορά των ήδη σχηματισμένων συμπλόκων διερευνήθηκε μέσω μετρήσεων DLS συναρτήσει της αυξανόμενης συγκέντρωσης του άλατος NaCl. Η αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος πραγματοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση μέσω σταδιακής προσθήκης κατάλληλων ποσοτήτων υδατικού διαλύματος NaCl συγκέντρωσης 1 M σε pH 3, στα ήδη παρασκευασμένα διαλύματα των συμπλόκων. Οι τιμές των I_{90} και R_h , που εξάγονται από τις μετρήσεις αυτές, για δύο αντιπροσωπευτικά διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL σε pH 3 με $C_{HEWL} = 0.02$ και 0.08 mg/ml, παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.19 συναρτήσει της ιοντικής ισχύος, η οποία κυμαίνεται από 0.01 έως 0.51 M. Σημειώνεται ότι οι τιμές της R_h για το διάλυμα συμπλόκων με $C_{HEWL} = 0.08$

mg/ml αντιστοιχούν στην κλίμακα του δεξιού άξονα y .



Σχήμα 4.19: Εξάρτηση από την ιοντική ισχύ της έντασης σκέδασης στις 90° , I_{90} , και της υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , για αντιπροσωπευτικά διαλύματα με $C_{HEWL} = 0.02$ και 0.08 mg/ml, των διαλυμάτων συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL σε pH 3.

Τα δύο διαλύματα συμπλόκων παρουσιάζουν ανάλογη συμπεριφορά συναρτήσει της αύξησης της ιοντικής ισχύος, με την έννοια ότι και για τα δύο παρατηρείται αύξηση των τιμών τόσο του I_{90} , όσο και της R_h . Η διαπίστωση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με τη θεώρηση ότι και στα δύο διαλύματα οι κύριοι πληθυσμοί των σκεδαζόντων σωματιδίων αντιστοιχούν σε συσσωματώματα συμπλόκων. Τα συσσωματώματα αυτά διαφέρουν ως προς τον αριθμό των συμπλόκων που τα αποτελούν, αλλά και ως προς τον αριθμό πρωτεϊνικών μορίων ανά σύμπλοκο, οι οποίοι αυξάνονται για μεγαλύτερες τιμές της C_{HEWL} . Η διαφορά αυτή ευθύνεται για το διαφορετικό ρυθμό αύξησης της μάζας και του μεγέθους των συσσωματωμάτων. Είναι όμως εμφανές ότι και στις δύο περιπτώσεις η προσθήκη αλατος στο διάλυμα έχει ως αποτέλεσμα την δευτερογενή συσσωμάτωση των ήδη

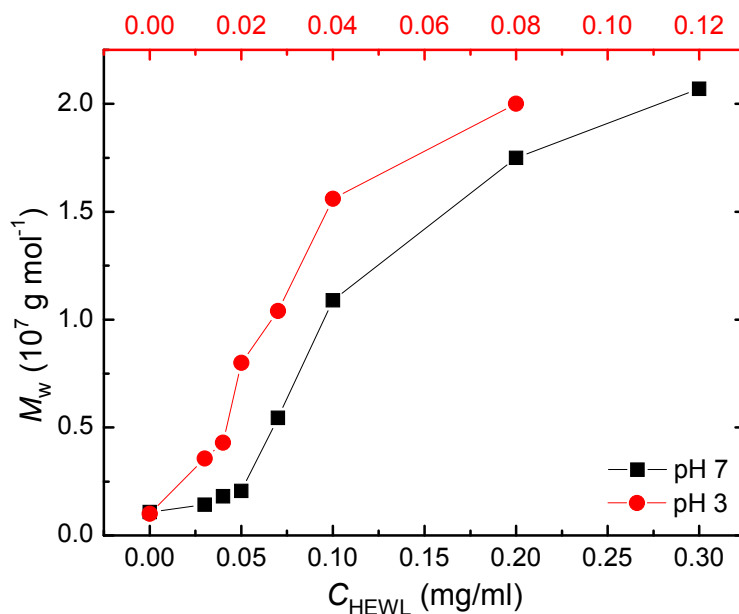
σχηματισμένων συσσωματωμάτων, λόγω της προάσπισης των φορτίων.

Για το διάλυμα με τη μεγαλύτερη τιμή της C_{HEWL} η δευτερογενής συσσωμάτωση είναι σαφώς πιο εκτεταμένη, όπως υποδηλώνει η ιδιαίτερως απότομη αύξηση των I_{90} και R_h . Το γεγονός αυτό οφείλεται στον αυξημένο βαθμό εξουδετέρωσης των φορτίων των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων που χαρακτηρίζει τα συγκεκριμένα συσσωματώματα και κατ' επέκταση στην ήδη μειωμένη διαλυτότητά τους. Μάλιστα, η έκταση της δευτερογενούς συσσωμάτωσης είναι τέτοια ώστε συνεπάγεται την καθίζηση του διαλύματος, στην οποία αποδίδεται το φαινομενικό πλατώ των τιμών της έντασης σκέδασης. Τέλος, υπενθυμίζεται ότι η ενίσχυση του ρόλου των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων του συστήματος, που προκύπτει εξαιτίας της εξασθένησης των ηλεκτροστατικών, δρα επικουρικά στη διαδικασία της δευτερογενούς συσσωμάτωσης.

4.2.3. Δομή των συμπλόκων

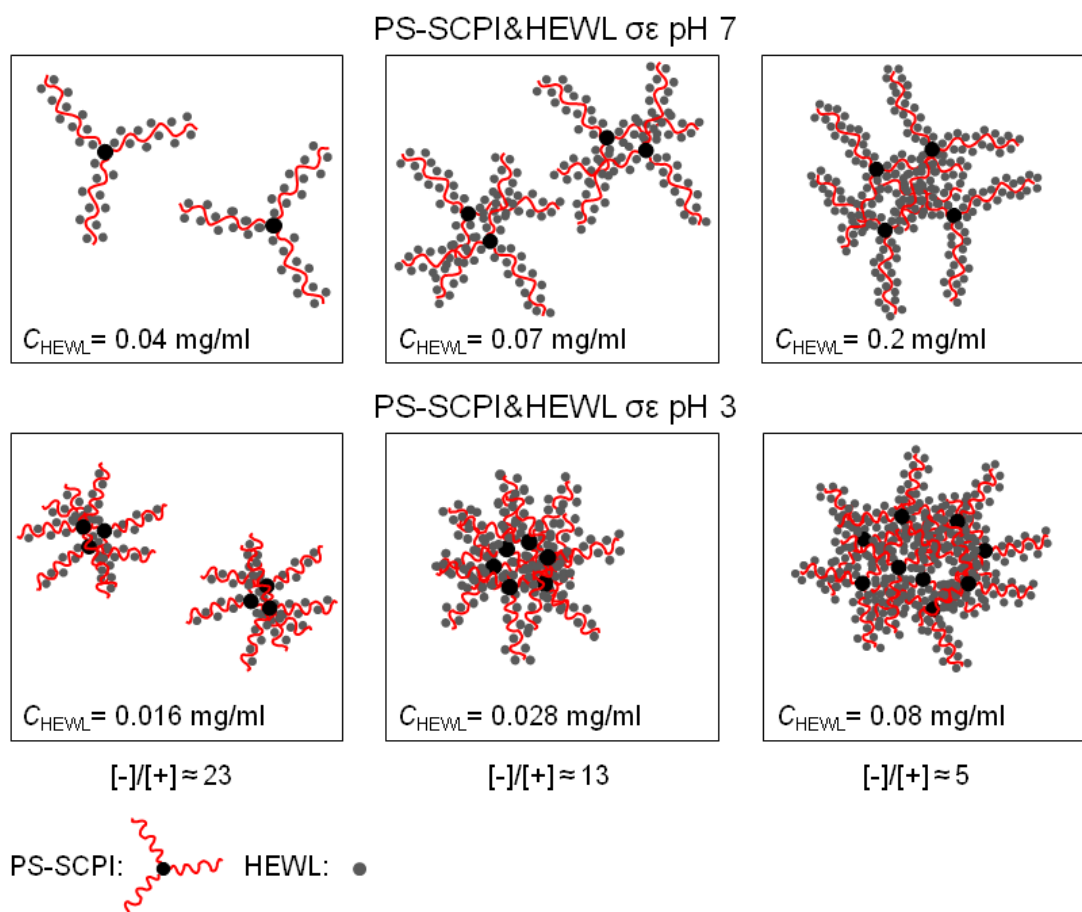
Η επιβεβαίωση των συμπερασμάτων που έχουν εξαχθεί έως τώρα αναφορικά με τη δομή των συμπλόκων, καθίσταται δυνατή μέσω της εξέτασης της μεταβολής του φαινομένου μοριακού βάρους των συμπλόκων συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης. Οι τιμές του μοριακού βάρους M_w , που εξάγονται από τις μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός (SLS), για τα σταθερά διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 και 3 με $I = 0.01$ M, παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.20 συναρτήσει της συγκέντρωσης της HEWL. Οι τιμές της C_{HEWL} για τα διαλύματα των συμπλόκων σε pH 3 αντιστοιχούν στην κλίμακα του επάνω άξονα x , του οποίου το εύρος έχει επιλεγεί έτσι ώστε τα κατακόρυφα σημεία να αντιστοιχούν σε διαλύματα με παρόμοια αναλογία φορτίων.

Η συμπεριφορά του M_w συναρτήσει της C_{HEWL} και στις δύο περιπτώσεις είναι ανάλογη αυτής που παρατηρήθηκε για την ένταση σκέδασης I_{90} , αντικατοπτρίζοντας την αύξηση της μάζας των σωματιδίων στο διάλυμα. Η σύγκριση των τιμών του M_w για τα διαλύματα των συμπλόκων, με τις αντίστοιχες τιμές για το διάλυμα του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη, η οποία θεωρείται ως η τιμή του μοριακού βάρους των μικκυλίων, καθώς και του μοριακού βάρους της λυσοζύμης, επιτρέπει τον κατά προσέγγιση υπολογισμό του αριθμού των μικκυλίων και των πρωτεϊνικών μορίων που απαρτίζουν τα σύμπλοκα. Επομένως, εξάγεται μία σχηματική αναπαράσταση της δομής των συμπλόκων, η οποία παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.21.



Σχήμα 4.20: Φαινόμενο μοριακό βάρος, M_w , συναρτήσεως της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 και 3 με $I = 0.01 \text{ M}$.

Όπως διαπιστώνεται και μέσω της σχηματικής αναπαράστασης, σε pH 7 και στην περιοχή των χαμηλών τιμών της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, τα σύμπλοκα αποτελούνται από ένα μικκύλιο του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη και μερικές δεκάδες πρωτεϊνικά μόρια. Η σύμπλεξη των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας των μικκυλίων με τα μόρια της λυσοζύμης, συνεπάγεται την εξουδετέρωση των φορτίων τους και κατ' επέκταση τη συρρίκνωση της πολυηλεκτρολυτικής κορώνας. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της λυσοζύμης, κάθε πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα της κορώνας αλληλεπιδρά με μεγαλύτερο αριθμό πρωτεϊνικών μορίων. Επομένως, ο βαθμός εξουδετέρωσης των φορτίων τους αυξάνεται και η διαλυτότητα του κάθε συμπλεγμένου με πρωτεΐνη μικκυλίου μειώνεται σημαντικά. Για να αντισταθμίσουν τη μείωση της διαλυτότητάς τους τα συμπλεγμένα μικκύλια αρχίζουν να συσσωματώνονται. Τα αρχικά συσσωματώματα που σχηματίζονται, στην περιοχή των ενδιάμεσων τιμών της C_{HEWL} , αποτελούνται από μικρό αριθμό συμπλεγμένων μικκυλίων. Όμως, όσο αυξάνεται ο αριθμός των πρωτεϊνικών μορίων ανά μικκύλιο, τόσο λιγότερο διαλυτά είναι τα σύμπλοκα, με αποτέλεσμα ο αριθμός συσσωμάτωσης να γίνεται μεγαλύτερος. Τελικά, ο αριθμός συσσωμάτωσης των συμπλόκων είναι τόσο μεγάλος ώστε οδηγεί στον διφασικό διαχωρισμό του διαλύματος.



Σχήμα 4.21: Σχηματική αναπαράσταση της δομής των συμπλόκων, συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα συστήματα του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL σε pH 7 και 3 με $I = 0.01 \text{ M}$. Οι αντίστοιχες τιμές της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$, οι οποίες είναι κοινές για τα δύο συστήματα, συμπεριλαμβάνονται για λόγους σύγκρισης.

Σε pH 3, οι πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες χαρακτηρίζονται από μειωμένη πυκνότητα φορτίου. Επομένως, η σύμπλεξη ακόμα και με μικρό αριθμό πρωτεϊνικών μορίων, ισοδυναμεί με σημαντική εξουδετέρωση των φορτίων τους κι έχει ως αποτέλεσμα την απότομη μείωση της διαλυτότητας των συμπλεγμένων μικκυλίων. Για το λόγο αυτό, η συσσωμάτωση των συμπλεγμένων με πρωτεΐνη μικκυλίων διαπιστώνεται σε όλο το εύρος των τιμών της C_{HEWL} . Βέβαια, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της λυσοζύμης, τόσο αυξάνεται ο αριθμός συσσωμάτωσης. Το τελικό αποτέλεσμα είναι το ίδιο και σε αυτή την περίπτωση, δηλαδή η εκτεταμένη συσσωμάτωση καταλήγει στο διαφασικό διαχωρισμό του διαλύματος.

Ισοδύναμη περιγραφή της συμπεριφοράς των συμπλόκων συναρτήσει της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$ του συστήματος, υποδηλώνει ότι η μείωση της αναλογίας

φορτίων, η οποία ισοδυναμεί με αύξηση του βαθμού εξουδετέρωσης των φορτίων των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων, συνεπάγεται συσσωμάτωση των συμπλόκων, εξαιτίας της μείωσης της διαλυτότητάς τους.

Ξεχωριστό ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση της δομής των συμπλόκων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη και της λυσοζύμης με τα αντίστοιχα σύμπλοκα του ομοπολυμερικού πολυηλεκτρολύτη, καθώς παρέχει πληροφορίες σχετικά με την επίδραση της αρχιτεκτονικής του μακρομορίου στη διαδικασία της σύμπλεξης.

Η συμπεριφορά που παρατηρείται σε pH 7 είναι ανάλογη και για τα δύο συστήματα, με την έννοια ότι όσο αυξάνεται ο αριθμός των πρωτεϊνικών μορίων που αλληλεπιδρούν με κάθε πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα, είτε πρόκειται για τις αλυσίδες της κορώνας των μικκυλίων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, είτε για τις αλυσίδες του πολυηλεκτρολύτη SCPI-54K, τόσο αυξάνεται ο βαθμός εξουδετέρωσης των φορτίων, με αποτέλεσμα τη συσσωμάτωση των αρχικών συμπλόκων και την υιοθέτηση περισσότερο συμπαγών δομών. Η σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο συστημάτων βρίσκεται στη μέγιστη δυνατή αναλογία αλληλεπίδρασης των δύο συστατικών, στην οποία παράλληλα διατηρείται η διαλυτότητα των συσσωματωμάτων. Για το σύστημα του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI η αναλογία αυτή διαπιστώθηκε ότι είναι περί τα 64 μόρια λυσοζύμης ανά πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα (Σχήμα 4.16), ενώ για το σύστημα του ομοπολυμερικού πολυηλεκτρολύτη SCPI-54K ο αντίστοιχος αριθμός είναι περί τα 26 (Σχήμα 3.13).

Βέβαια, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι τα δύο διαφορετικά μακρομόρια φέρουν διαφορετικό συνολικό αριθμό φορτίων, καθώς χαρακτηρίζονται τόσο από διαφορετικό αριθμό μονομερικών μονάδων PI, όσο και από διαφορετικό ποσοστό μετατροπής αυτών σε μονάδες SCPI (Πίνακας 2.1 και Σχήμα 2.15). Συγκεκριμένα, η πολυηλεκτρολυτική συστάδα του PS-SCPI φέρει 1.5 φορές περισσότερα φορτία από ότι η αλυσίδα του SCPI-54K (812 έναντι 540 φορτισμένων μονομερικών μονάδων). Παρόλα αυτά, η αύξηση του βαθμού αλληλεπίδρασης του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη με τα μόρια της λυσοζύμης είναι μεγαλύτερη από ότι αναμένεται με βάση τον διαφορετικό αριθμό φορτίων, οπότε δεν δύναται να οφείλεται εξολοκλήρου στο γεγονός αυτό. Προφανώς, η περισσότερο εκτεταμένη διαμόρφωση των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας των μικκυλίων του PS-SCPI, συγκριτικά με τις αλυσίδες του πολυηλεκτρολύτη SCPI-54K, επιτρέπει την

αλληλεπίδραση με μεγαλύτερο αριθμό μορίων λυσοζύμης. Επίσης, η στερεοχημική παρεμπόδιση που επιφέρει η διαμόρφωση του μικκυλίου αυτή καθ' αυτή, αποτρέπει σε μεγαλύτερο βαθμό τη συσσωμάτωση μεταξύ των συμπλεγμένων με λυσοζύμη πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων (αν και το ενδεχόμενο της συσσωμάτωσης γειτονικών αλυσίδων μέσα στη κορώνα δεν αποκλείεται), όπως άλλωστε καταδεικνύει και ο σχετικά μικρός βαθμός συσσωμάτωσης των συμπλεγμένων μικκυλίων, συγκριτικά με τον αντίστοιχο βαθμό συσσωμάτωσης των συμπλεγμένων αλυσίδων του ομοπολυμερικού πολυηλεκτρολύτη.

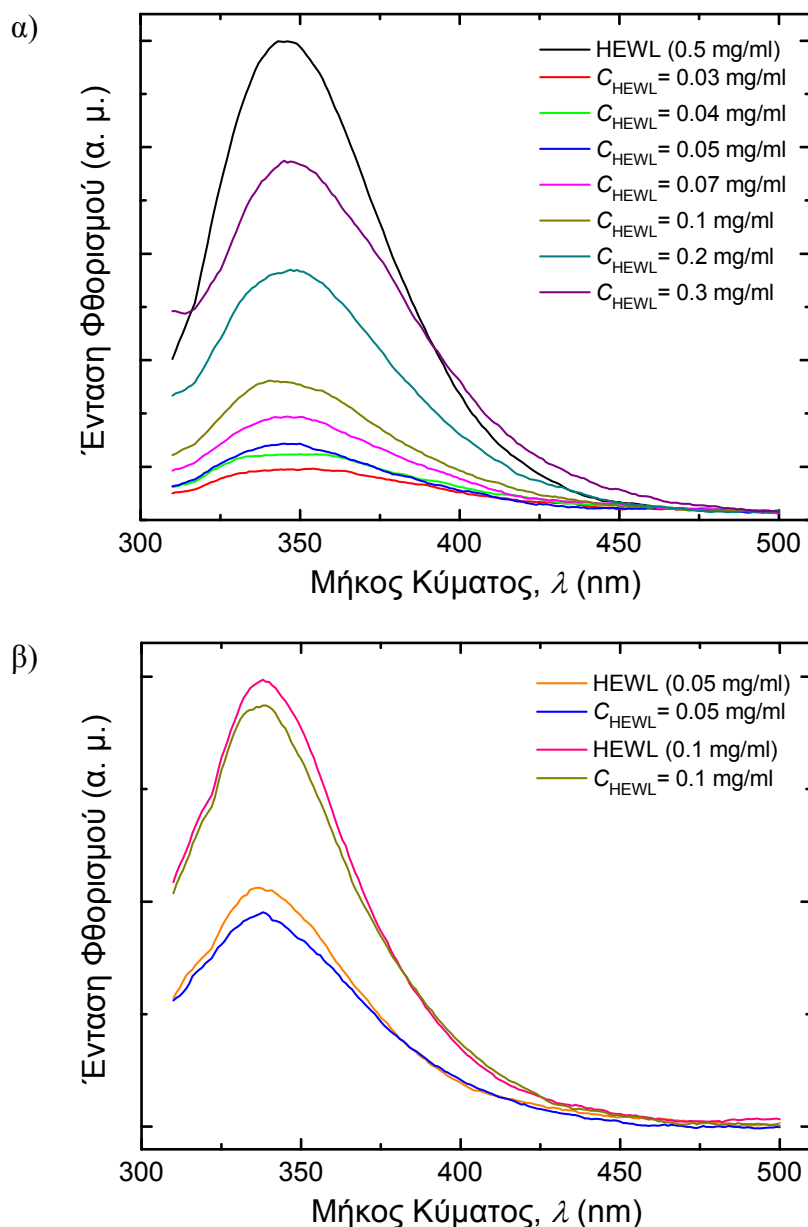
Όσον αφορά τη διαδικασία της σύμπλεξης σε pH 3, στην περιοχή των χαμηλών συγκεντρώσεων της λυσοζύμης, ο μικρός βαθμός αλληλεπίδρασης των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας των μικκυλίων του δυσσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI με τα πρωτεϊνικά μόρια, προφανώς καθιστά δυνατή την αλληλεπίδραση των μορίων της λυσοζύμης με περισσότερες από μία αλυσίδες, γεγονός που συντελεί στην παρατηρούμενη συσσωμάτωση των συμπλεγμένων μικκυλίων και το οποίο βρίσκεται σε αναλογία με την αντίστοιχη συμπεριφορά του ομοπολυμερικού πολυηλεκτρολύτη SCPI-54K. Η διαφοροποίηση έγκειται στο γεγονός ότι καθώς η συγκέντρωση της λυσοζύμης αυξάνεται παρατηρείται παράλληλη αύξηση του βαθμού συσσωμάτωσης των συμπλεγμένων μικκυλίων, ενώ στην αντίστοιχη περίπτωση ο βαθμός συσσωμάτωσης των συμπλεγμένων αλυσίδων του SCPI-54K σημείωσε μικρή μείωση. Όπως φαίνεται, σε αντίθεση με τις ελεύθερες πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες, οι τοπολογικοί περιορισμοί που επιφέρει η δομή του μικκυλίου στις πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες της κορώνας, εμποδίζουν την πιθανή αναδιάταξη της διαμόρφωσής τους, έτσι ώστε να αντισταθμίσουν τη μείωση της διαλυτότητάς τους, λόγω της σύμπλεξης με τη λυσοζύμη. Οπότε, σε αυτή την περίπτωση η συγκεκριμένη μείωση της διαλυτότητας συνεπάγεται περαιτέρω συσσωμάτωση. Βέβαια, η πιο εκτεταμένη διαμόρφωση των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας των μικκυλίων επιτρέπει και σε αυτή την τιμή του pH μεγαλύτερη αναλογία αλληλεπίδρασης μεταξύ των μορίων της λυσοζύμης και των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων. Συγκεκριμένα, κάθε πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα της κορώνας των μικκυλίων του PS-SCPI αλληλεπιδρά με περίπου 13 μόρια λυσοζύμης (Σχήμα 4.16), ενώ οι αλυσίδες του πολυηλεκτρολύτη SCPI-54K με περίπου 4 (Σχήμα 3.20), διατηρώντας παράλληλα τη διαλυτότητα των σχηματιζόμενων συσσωματωμάτων συμπλόκων.

4.2.4. Δομή της συμπλεγμένης πρωτεΐνης

Όπως έχει αναφερθεί, η διατήρηση της διαμόρφωσης και της ενζυμικής δραστηριότητας του πρωτεϊνικού μορίου κατά τη σύμπλεξή του, αποτελεί προϋπόθεση των περισσότερων πιθανών νανοβιολογικών εφαρμογών. Στο πλαίσιο αυτό, διενεργήθηκαν φασματοσκοπικές μελέτες της δομής της συμπλεγμένης λυσοζύμης και τα αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα για τα σύμπλοκα του δυσσταδικού πολυηλεκτρολύτη και της λυσοζύμης σε pH 7 παρουσιάζονται παρακάτω.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν φασματοσκοπικές μετρήσεις φθορισμού¹⁷⁰⁻¹⁷³ για τα σταθερά διαλύματα συμπλόκων του συστήματος του δυσσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Τα ληφθέντα φάσματα εκπομπής παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.22α, όπου συμπεριλαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα διαλύματος ελεύθερης HEWL συγκέντρωσης 0.5 mg/ml, για λόγους σύγκρισης.

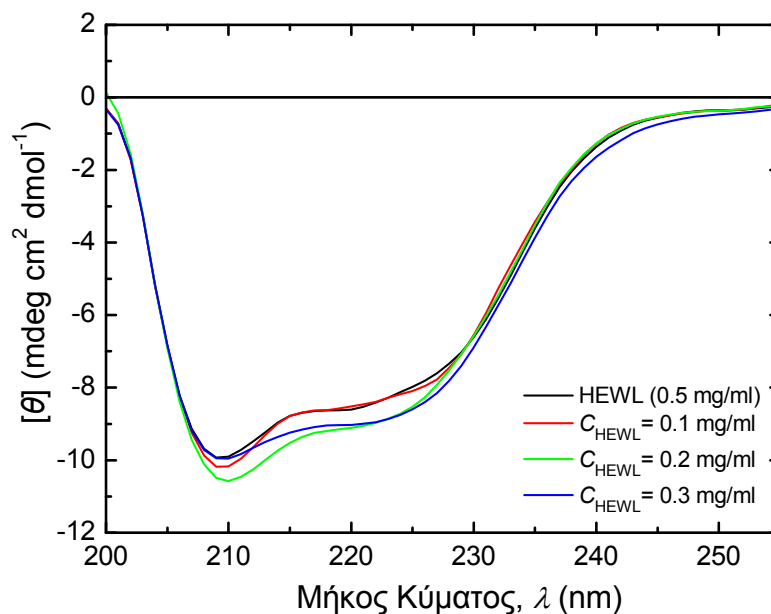
Η ένταση των φασμάτων φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της λυσοζύμης στα διαλύματα των συμπλόκων, γεγονός που καθιστά σχετικά δύσκολη την απευθείας σύγκριση με το φάσμα της ελεύθερης HEWL, ειδικά στην περιοχή των χαμηλών τιμών της C_{HEWL} . Για το λόγο αυτό, τα φάσματα των διαλυμάτων των συμπλόκων με $C_{HEWL} = 0.05$ και 0.1 mg/ml συγκρίνονται με τα αντίστοιχα φάσματα διαλυμάτων ελεύθερης HEWL συγκέντρωσης 0.05 και 0.1 mg/ml στο Σχήμα 4.22β. Επομένως, είναι εμφανές ότι παρά τις διαφοροποιήσεις της έντασης, τα γενικά φασματικά χαρακτηριστικά της ελεύθερης λυσοζύμης διατηρούνται και όλα τα φάσματα εμφανίζουν μέγιστο περί τα 345 nm. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί το φάσμα που αντιστοιχεί στο διάλυμα με $C_{HEWL} = 0.3$ mg/ml, το οποίο εμφανίζει μία μικρή μετατόπιση προς το ερυθρό, της τάξης των 3 nm, η οποία αποδίδεται στις πιθανές μικρές αλλαγές του περιβάλλοντος της τρυπτοφάνης ή στο σχηματισμό στενά συνδεδεμένων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων εντός των συμπλόκων,^{170, 171} καθώς το συγκεκριμένο διάλυμα παρουσιάζει το μεγαλύτερο βαθμό σύμπλεξης. Επομένως, συμπεραίνεται ότι η σύμπλεξη ενδέχεται να επιφέρει μικρές αλλαγές της τριτοταγούς δομής του πρωτεϊνικού μορίου, όμως δεν προκαλεί την αποδιάταξη της λυσοζύμης. Υπενθυμίζεται ότι πιθανή αποδιάταξη του πρωτεϊνικού μορίου θα σηματοδοτούσε μετατόπιση του αντίστοιχου φάσματος προς το ερυθρό κατά τουλάχιστον 10 nm.^{241,}



Σχήμα 4.22: α) Φάσματα φθορισμού, των σταθερών διαλυμάτων συμπλόκων, του συστήματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Συμπεριλαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα διαλύματος ελεύθερης HEWL συγκέντρωσης 0.5 mg/ml, β) Σύγκριση των φασμάτων φθορισμού, των διαλυμάτων συμπλόκων με $C_{\text{HEWL}} = 0.05$ και 0.1 mg/ml, με τα αντίστοιχα φάσματα διαλυμάτων ελεύθερης HEWL συγκέντρωσης 0.05 και 0.1 mg/ml.

Εν συνεχεία, αντιπροσωπευτικά διαλύματα συμπλόκων με $C_{\text{HEWL}} = 0.1, 0.2$ και 0.3 mg/ml, του συστήματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, μελετήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού (CD)¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ και στο Σχήμα 4.23 παρουσιάζονται τα μετρούμενα φάσματα,

στην περιοχή του άπω υπεριώδους. Επίσης παρατίθεται το αντίστοιχο φάσμα διαλύματος ελεύθερης HEWL συγκέντρωσης 0.5 mg/ml. Όπως φαίνεται, οι διαφορές μεταξύ των φασμάτων της ελεύθερης και της συμπλεγμένης λυσοζύμης είναι μικρές και η γενική μορφή του φάσματος δεν μεταβάλλεται σημαντικά.



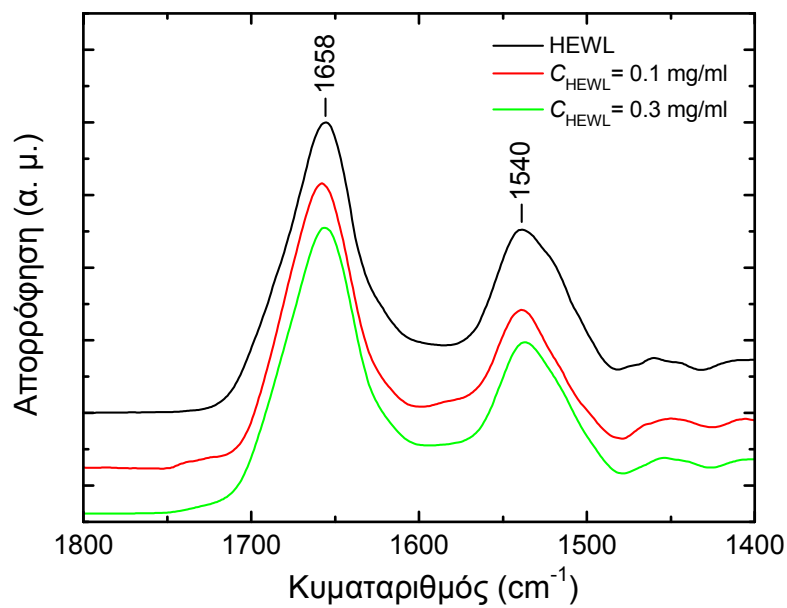
Σχήμα 4.23: Φάσματα κυκλικού διχρωισμού, στην περιοχή του άπω υπεριώδους, των αντιπροσωπευτικών διαλυμάτων συμπλόκων με $C_{\text{HEWL}} = 0.1, 0.2$ και 0.3 mg/ml, του συστήματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Συμπεριλαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα διαλύματος ελεύθερης HEWL συγκέντρωσης 0.5 mg/ml.

Τα ποσοστά των επιμέρους δευτεροταγών δομών της πρωτεΐνης προέκυψαν μέσω της ανάλυσης των φασμάτων με χρήση των προγραμμάτων SELCON3, CONTIN, CDSSTR και K2D, τα οποία παρείχαν παρόμοια αποτελέσματα. Επομένως, στον Πίνακα 4.5 παρουσιάζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων όλων των μεθόδων. Η ανάλυση των φασμάτων CD, καταδεικνύει τη διατήρηση του ποσοστού των επιμέρους δευτεροταγών δομών της πρωτεΐνης, σε όλα τα διαλύματα των συμπλόκων. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η διαδικασία της σύμπλεξης δεν επιφέρει διατάραξη της διαμόρφωσης του μορίου της λυσοζύμης.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶

Πίνακας 4.5: Συγκεντρωτικά ποσοστά των επιμέρους δευτεροταγών δομών της πρωτεΐνης, όπως εξάγονται από την ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού, των αντιπροσωπευτικών διαλυμάτων συμπλόκων, του συστήματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, καθώς και της ελεύθερης HEWL.

Δείγμα	α -έλικα (%)	β -φύλλο (%)	Τυχαία διαμόρφωση (%)
HEWL (0.5 mg/ml)	33	15	52
$C_{\text{HEWL}} = 0.1$ mg/ml	32	15	53
$C_{\text{HEWL}} = 0.2$ mg/ml	33	15	52
$C_{\text{HEWL}} = 0.3$ mg/ml	33	15	52

Τέλος, διενεργήθηκαν φασματοσκοπικές μετρήσεις μέσου υπερύθρου (IR) για αντιπροσωπευτικά διαλύματα των συμπλόκων. Στο Σχήμα 4.24 παρουσιάζονται τα φάσματα IR, στην περιοχή των κορυφών Amide I και II, των συμπλόκων με $C_{\text{HEWL}} = 0.1$ και 0.3 mg/ml, του συστήματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, καθώς και το αντίστοιχο φάσμα ελεύθερης HEWL για λόγους σύγκρισης. Τα φάσματα έχουν υποστεί κανονικοποίηση ως προς την ένταση της κορυφής Amide I, αφού προηγουμένως διορθώθηκαν ως προς τη φασματική συνεισφορά του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη, μέσω κατάλληλης αφαίρεσης του αντίστοιχου φάσματος. Όπως διαπιστώνεται, τόσο η μορφή των κορυφών Amide I και II, όσο και η συχνότητα εμφάνισης τους περί τους 1658 και 1540 cm^{-1} , αντίστοιχα, παραμένουν σταθερές στα φάσματα των συμπλόκων. Η διαπίστωση αυτή επιβεβαιώνει την απουσία σημαντικών αλλαγών της διαμόρφωσης του μορίου της λυσοζύμης κατά τη σύμπλεξη.^{243, 244}



Σχήμα 4.24: Φάσματα μέσου υπερύθρου, στην περιοχή των κορυφών Amide I και II, για αντιπροσωπευτικές τιμές της $C_{\text{HEWL}} = 0.1$ και 0.3 mg/ml, του συστήματος του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Συμπεριλαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα της ελεύθερης HEWL.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**ΤΡΙΣΥΣΤΑΔΙΚΟΙ ΠΟΛΥΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΕΣ PS-SCPI-PEO ΚΑΙ SCPI-PS-PEO ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΤΟΥΣ ΜΕ ΛΥΣΟΖΥΜΗ****5.1. Ιδιότητες σε διάλυμα των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO**

Τα τρισυσταδικά συμπολυμερή κατά συστάδες συνδυάζουν τα επιμέρους χημικά χαρακτηριστικά και τη λειτουργικότητα της κάθε συστάδας. Η συμπεριφορά τους σε διάλυμα και κατ' επέκταση ο τρόπος αυτοοργάνωσής τους καθορίζονται από τη φύση του διαλύτη και την αλληλεπίδρασή του με κάθε συστάδα. Η πολυπλοκότητα της μακρομοριακής αρχιτεκτονικής συνεπάγεται το σχηματισμό μικκυλίων ποικίλης διαμόρφωσης, όπως μικκύλια με πυρήνα ή κορώνα που αποτελούνται από διαφορετικά στρώματα ή μικκύλια με μικτή κορώνα. Στην περίπτωση υδατικών διαλυμάτων, η υδροφοβικότητα της κάθε συστάδας διαδραματίζει τον κύριο ρόλο κατά τον σχηματισμό των μικκυλίων. Εάν κάποια από τις συστάδες εμφανίζει απόκριση στις αλλαγές του υδατικού περιβάλλοντος, όπως του pH και της ιοντικής ισχύος, η μελέτη της συμπεριφοράς των μικκυλίων αποκτά επιπρόσθετο ενδιαφέρον, καθώς παρέχει τη δυνατότητα ανάπτυξης αποκρινόμενων πολυμερικών νανοσωματιδίων. Στο πλαίσιο αυτό, πραγματοποιήθηκε μελέτη των ιδιοτήτων και της συμπεριφοράς σε υδατικό διάλυμα των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO (Σχήμα 2.15γ και δ). Τα συγκεκριμένα μακρομόρια συνδυάζουν την υδροφοβικότητα της συστάδας του πολυστυρενίου, τις πολυηλεκτρολυτικές ιδιότητες της συστάδας του SCPI και την υδροφιλικότητα, καθώς και τη βιοσυμβατότητα της συστάδας του πολυαιθυλενοξειδίου. Η υδροφοβικότητα της συστάδας του PS οδηγεί στο σχηματισμό μικκυλίων αποτελούμενα από πυρήνα PS, ενώ η διαμόρφωση της κορώνας των μικκυλίων είναι απόρροια της αρχιτεκτονικής του μακρομορίου. Έτσι, στην περίπτωση του PS-SCPI-PEO η κορώνα αποτελείται από δύο στρώματα, όπου οι συστάδες του SCPI σχηματίζουν το εσωτερικό στρώμα και οι συστάδες του PEO το εξωτερικό, ενώ στην περίπτωση του SCPI-PS-PEO σχηματίζεται μικτή κορώνα αποτελούμενη από αλυσίδες SCPI και PEO. Επισημαίνεται ότι και στις δύο περιπτώσεις η δομή των σχηματιζόμενων μικκυλίων αναμένεται να είναι σταθερή σε

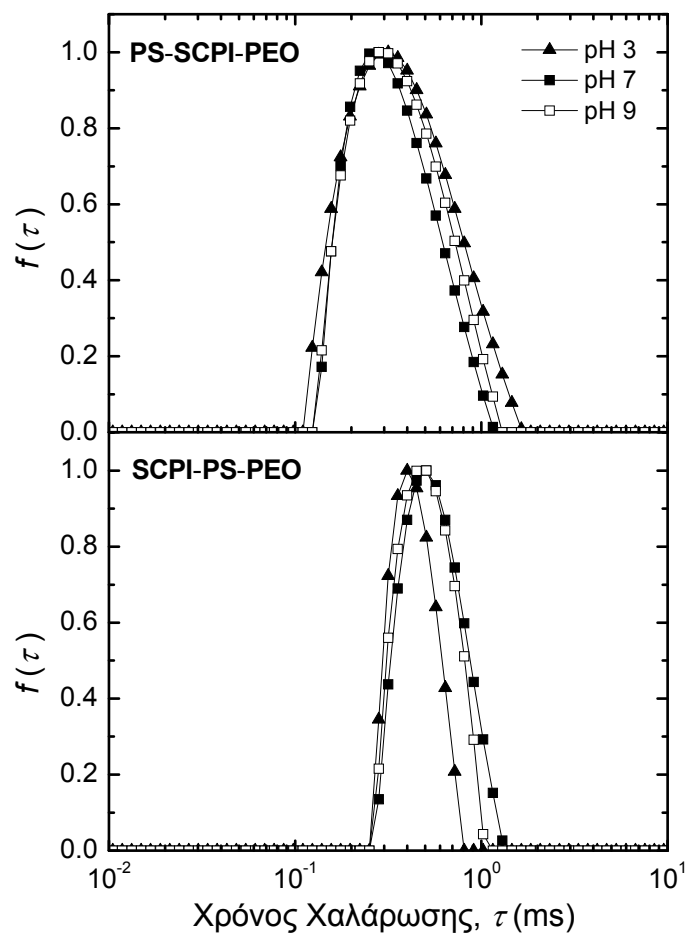
θερμοκρασία περιβάλλοντος, λόγω της υψηλής θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης του PS. Η αυτοοργάνωση των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, καθώς και οι ιδιότητες και η συμπεριφορά των σχηματιζόμενων μικκυλίων σε υδατικά διαλύματα, μελετήθηκαν συναρτήσει του pH και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος.

5.1.1. Ιδιότητες σε διάλυμα συναρτήσει του pH

Η διερεύνηση της αυτοοργάνωσης των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών, καθώς και των ιδιοτήτων των σχηματιζόμενων μικκυλίων συναρτήσει του pH, πραγματοποιήθηκε σε υδατικά διαλύματα με διαφορετικές τιμές pH χωρίς προσθήκη άλατος, μέσω μετρήσεων δυναμικής και στατικής σκέδασης φωτός (DLS και SLS).

Στο Σχήμα 5.1 παρουσιάζονται οι κατανομές των χρόνων χαλάρωσης του συστήματος, για μετρήσεις DLS σε γωνία σκέδασης $\theta = 90^\circ$, διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml, των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, σε pH 3, 7 και 9. Η συνεισφορά των κατάλληλων ποσοτήτων διαλυμάτων HCl ή NaOH 0.1 M, που προστέθηκαν στο διάλυμα με σκοπό τη ρύθμιση του pH, στην ιοντική ισχύ του διαλύματος υπολογίζεται περί τα 10^{-3} M.

Οι κατανομές των χρόνων χαλάρωσης εμφανίζουν μία κορυφή σε όλες τις περιπτώσεις, η οποία προφανώς αντιστοιχεί στα σχηματιζόμενα μικκύλια στο διάλυμα. Το εύρος των κατανομών για τα διαλύματα του τρισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI-PEO είναι μεγαλύτερο από το αντίστοιχο στην περίπτωση του SCPI-PS-PEO, γεγονός που υποδηλώνει μία περισσότερο εκτεταμένη κατανομή μεγεθών για τα μικκύλια του τρισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI-PEO. Επίσης, οι κατανομές του PS-SCPI-PEO παραμένουν πρακτικά αμετάβλητες κατά τη μεταβολή του pH του διαλύματος, ενώ οι αντίστοιχες κατανομές του SCPI-PS-PEO παρουσιάζουν μικρές μεταβολές. Τέλος, το γεγονός ότι σε όλα τα διαλύματα δεν εμφανίζεται κορυφή σε μικρότερους χρόνους χαλάρωσης, που θα αντιστοιχούσε σε ελεύθερες μεμονωμένες αλυσίδες, δεν σηματοδοτεί απαραίτητα την απουσία μεμονωμένων αλυσίδων στο διάλυμα. Υπάρχει πιθανότητα η μάζα και ο αριθμός των μικκυλίων να είναι τόσο μεγάλα, ώστε να υπερισχύουν σχεδόν ολοκληρωτικά στην ένταση σκέδασης τους διαλύματος κι έτσι να μην καθίσταται δυνατή η διάκριση των μεμονωμένων αλυσίδων.

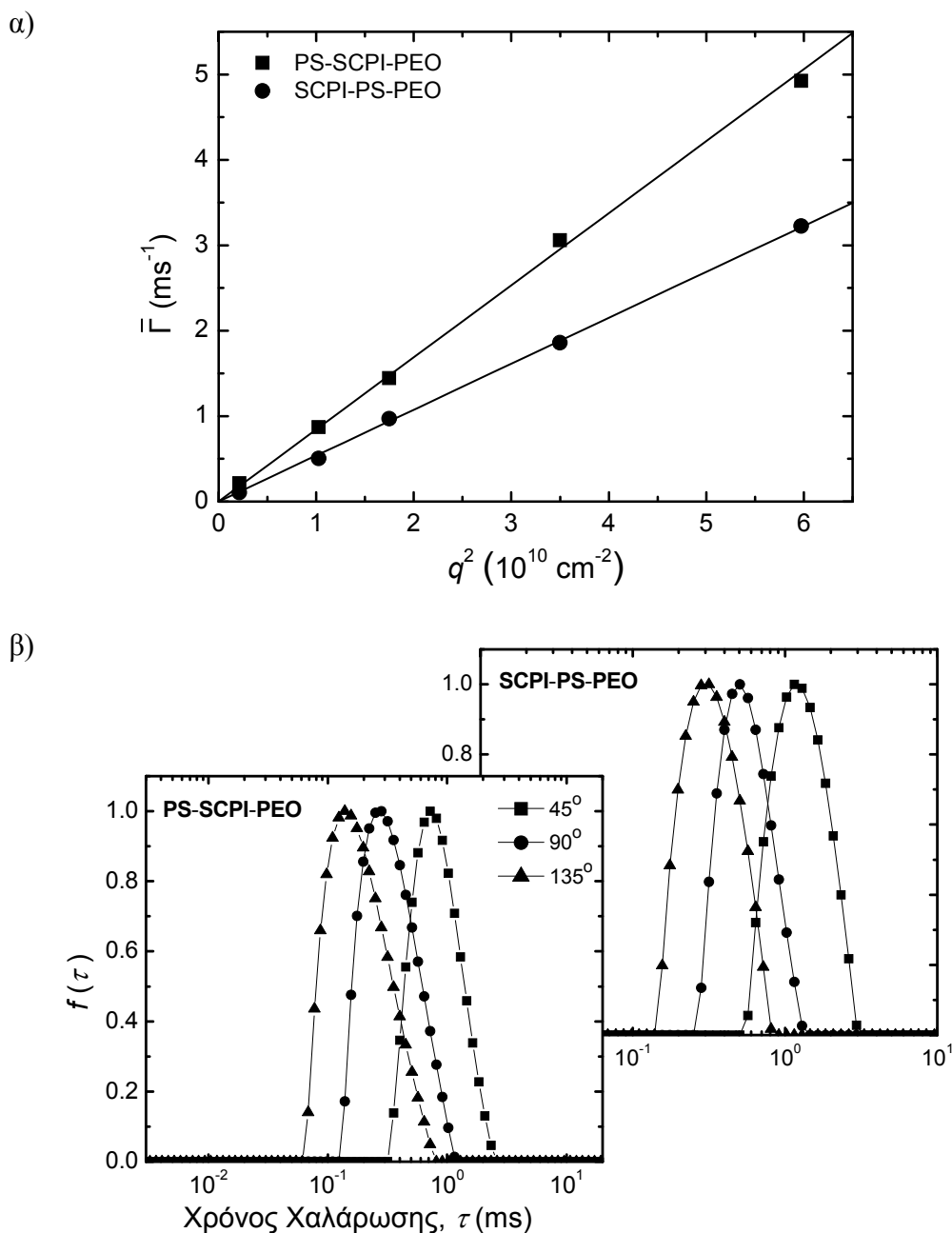


Σχήμα 5.1: Κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις 90° , για διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/ml των τριςυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, σε pH 3, 7 και 9.

Μέσω μετρήσεων σε διαφορετικές γωνίες σκέδασης $\theta = 25, 45, 60, 90$ και 135° , εξετάζεται η γωνιακή εξάρτηση του μέσου ρυθμού χαλάρωσης $\bar{\Gamma}$ των κορυφών αυτών. Για την αντιπροσωπευτική περίπτωση των διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml σε pH 7 των δύο τριςυσταδικών πολυηλεκτρολυτών, οι τιμές του $\bar{\Gamma}$ παρουσιάζονται συναρτήσει του τετραγώνου του διανύσματος σκέδασης q^2 , που αντιστοιχεί σε κάθε γωνία σκέδασης θ , στο Σχήμα 5.2α ενώ στο Σχήμα 5.2β παρατίθενται οι αντίστοιχες κατανομές στις $45, 90$ και 135° .

Η παρατηρούμενη γραμμική συσχέτιση του $\bar{\Gamma}$ και του q^2 , αποδεικνύει ότι οι αντίστοιχες κορυφές οφείλονται σε κινήσεις λόγω διάχυσης και η διαπίστωση αυτή ισχύει και για τα υπόλοιπα διαλύματα που μελετήθηκαν. Επομένως, μέσω των σχέσεων (2.11) και (2.12) υπολογίζονται οι τιμές των συντελεστών διάχυσης D , καθώς και των αντίστοιχων υδροδυναμικών ακτίνων R_h . Τα αποτελέσματα

συνοψίζονται στον Πίνακα 5.1, όπου επίσης παρατίθενται η τιμή της έντασης σκέδασης στις 90° I_{90} , καθώς και της υδροδυναμικής ακτίνας R_{hc} , που εξάγεται μέσω της ανάλυσης cumulants των μετρήσεων στις 90° .



Σχήμα 5.2: α) Γωνιακή εξάρτηση του μέσου ρυθμού χαλάρωσης των κορυφών, για τα διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/ml σε pH 7 των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, β) Οι αντίστοιχες κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις 45° , 90° , και 135° .

Πίνακας 5.1: Τιμές των συντελεστών διάχυσης D και των υδροδυναμικών ακτίνων R_h που αντιστοιχούν στις κορυφές χαλάρωσης, της έντασης σκέδασης στις $90^\circ I_{90}$, καθώς και της υδροδυναμικής ακτίνας R_{hc} που προκύπτει μέσω ανάλυσης cumulants στις 90° , των διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, σε pH 3, 7 και 9.

Δείγμα	pH	D ($10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	R_h (nm)	I_{90} (kHz)	R_{hc} (nm)
PS-SCPI-PEO	3	8.38 ± 0.02	29.2	4100	27.7
	7	8.44 ± 0.02	29	4197	27
	9	8.32 ± 0.01	29.4	4167	27.6
SCPI-PS-PEO	3	6.28 ± 0.01	39	28620	39.8
	7	5.29 ± 0.01	46.3	16714	46.8
	9	5.35 ± 0.01	45.8	14694	46.9

Επισημαίνεται ότι κατ' αντιστοιχία με την περίπτωση του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη, οι παρατηρούμενες μεταβολές συναρτήσει του pH αφορούν πιθανές αλλαγές της δομής και του μεγέθους των ήδη σχηματισμένων μικκυλίων και όχι μεταβολές του τρόπου αυτοοργάνωσης των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών, καθώς η ρύθμιση του pH του εκάστοτε διαλύματος πραγματοποιήθηκε μετά την παρασκευή του αρχικού υδατικού διαλύματος. Παρόλα αυτά, η δομή των μικκυλίων αναμένεται να παραμένει σταθερή κατά τις αλλαγές των συνθηκών του διαλύματος, αφού όπως προαναφέρθηκε τα μικκύλια θεωρούνται «παγωμένα» σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 5.1, διαπιστώνεται ότι για τα διαλύματα του τρισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI-PEO η μεταβολή της τιμής του pH δεν επιφέρει πρακτικά καμία μεταβολή στις τιμές του συντελεστή D και κατ' επέκταση της ακτίνας R_h , καθώς και της ακτίνας R_{hc} που εξάγεται μέσω της ανάλυσης cumulants. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι το μέγεθος των μικκυλίων παραμένει το ίδιο σε όλες τις τιμές του pH. Όμως, υπενθυμίζεται ότι η αύξηση της τιμής του pH συνεπάγεται αύξηση της πυκνότητας φορτίου της πολυηλεκτρολυτικής συστάδας του

SCPI και έχει ως αποτέλεσμα την έκταση των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων. Προφανώς, η συγκεκριμένη έκταση των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων της κορώνας των μικκυλίων, αντισταθμίζεται μέσω αλλαγών της διαμόρφωσης των αλυσίδων του PEO. Δηλαδή καθώς οι αλυσίδες του PEO απομακρύνονται από τον πυρήνα του μικκυλίου, ενδεχομένως υπόκεινται σε λιγότερους τοπολογικούς περιορισμούς, οπότε υιοθετούν λιγότερο εκτεταμένες διαμορφώσεις, με αποτέλεσμα το συνολικό μέγεθος των μικκυλίων να μην μεταβάλλεται σημαντικά. Παρόμοια συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί και για μικκύλια του τρισυσταδικού συμπολυμερούς PS-P2VP-PEO, όπου η εξαρτώμενη από την τιμή του pH του διαλύματος έκταση ή συρρίκνωση των συστάδων της P2VP αντισταθμίζεται κατά περιπτώσεις μέσω αλλαγών της διαμόρφωσης των συστάδων του PEO.¹¹¹

Παράλληλα, οι τιμές της έντασης σκέδασης I_{90} είναι σχεδόν ίδιες για όλα τα διαλύματα, αντικατοπτρίζοντας τη διατήρηση της μάζας των μικκυλίων κατά τη μεταβολή του pH. Επίσης, όλα τα διαλύματα εμφανίζουν παρόμοια τιμή του δείκτη πολυδιασποράς PDI , περί το 0.21, σηματοδοτώντας τη διατήρηση της κατανομής μεγεθών των μικκυλίων. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τη θεώρηση της σταθερής δομής των μικκυλίων.

Όσον αφορά τα διαλύματα του τρισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη SCPI-PS-PEO, η αύξηση της τιμής του pH από 3 σε 7 ή 9 συνοδεύεται από μείωση των τιμών του συντελεστή D και αντίστοιχη αύξηση των τιμών της R_h , καθώς και της R_{hc} . Η παρατηρούμενη αύξηση του μεγέθους των μικκυλίων αποδίδεται στην έκταση των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων του SCPI, καθώς αυξάνεται η πυκνότητα φορτίου τους. Επισημαίνεται, ότι σε αυτή την περίπτωση η μεταβολή της διαμόρφωσης των αλυσίδων του SCPI επηρεάζει σημαντικά το μέγεθος των μικκυλίων, λόγω της μικτής δομής της κορώνας. Όπως αναφέρθηκε, η κορώνα των μικκυλίων του SCPI-PS-PEO αποτελείται από αλυσίδες SCPI και PEO και το μήκος των αλυσίδων του SCPI είναι μεγαλύτερο από αυτό των αλυσίδων PEO (Πίνακας 2.1). Επομένως, το μέγεθος των μικκυλίων καθορίζεται κυρίως από το μέγεθος των συστάδων του SCPI. Το γεγονός ότι κατά τη μετάβαση από pH 7 σε 9 δεν παρατηρείται περαιτέρω αύξηση του μεγέθους των μικκυλίων (παρόλο που η πυκνότητα φορτίου των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων αυξάνεται ελαφρώς, λόγω της μικρής αύξησης του βαθμού αποπρωτονίωσης των καρβοξυλικών ομάδων) πιθανότατα υποδηλώνει ότι η διαμόρφωση των αλυσίδων του SCPI είναι ήδη αρκετά εκτεταμένη. Η υπόθεση αυτή

στηρίζεται κυρίως στον υψηλό αριθμό συσσωμάτωσης που χαρακτηρίζει τα συγκεκριμένα μικκύλια, όπως θα συζητηθεί κατά την παρουσίαση των αποτελεσμάτων στατικής σκέδασης φωτός, καθώς και στις στερεοχημικές παρεμποδίσεις που επιφέρουν οι αλυσίδες του PEO.

Εφόσον η δομή των μικκυλίων θεωρείται σταθερή, η παρατηρούμενη μείωση της τιμής του I_{90} συναρτήσει του pH, ενδεχομένως αποδίδεται στη μείωση της κινητικότητας των μικκυλίων, η οποία οφείλεται στην σταδιακή ενίσχυση των ηλεκτροστατικών απώσεων καθώς αυξάνεται η πυκνότητα φορτίου των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων, όπως και στην περίπτωση του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη.¹⁰¹ Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται μόνο για τα μικκύλια του SCPI-PS-PEO, καθώς αυτά χαρακτηρίζονται από εξωτερικό περιφερειακό φορτίο λόγω του μήκους των συστάδων του SCPI, ενώ τα αντίστοιχα μικκύλια του PS-SCPI-PEO συμπεριφέρονται ως ουδέτερα, επειδή το εξωτερικό στρώμα της κορώνας αποτελείται από συστάδες PEO. Υπενθυμίζεται βέβαια, ότι οι μεταβολές του διαφορικού δείκτη διάθλασης $\partial n/\partial c$ του διαλύματος, λόγω της διαφορετικής συγκέντρωσης των ιόντων σε κάθε τιμή του pH, αναμένεται να επηρεάζουν σε κάποιο βαθμό την ένταση σκέδασης. Παρόλα αυτά, η συγκεκριμένη επιρροή δεν ενδέχεται να είναι ιδιαίτερος σημαντική, όπως άλλωστε καταδεικνύει και το γεγονός ότι στην περίπτωση του PS-SCPI-PEO δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή της έντασης σκέδασης. Τέλος, η διατήρηση της κατανομής μεγεθών των μικκυλίων, επιβεβαιώνεται και για τα διαλύματα του SCPI-PS-PEO, μέσω της σταθερής τιμής του δείκτη πολυδιασποράς PDI , ο οποίος εμφανίζει μία μέση τιμή περί το 0.14.

Παράλληλα με τις μετρήσεις δυναμικής σκέδασης, διενεργήθηκαν μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός (SLS) σε πολλαπλές γωνίες, συναρτήσει του pH. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών αναφορικά με τις τιμές του μοριακού βάρους M_w και της γυροσκοπικής ακτίνας R_g , για τα διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/ml, των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, σε pH 3, 7 και 9, παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.2. Επίσης συμπεριλαμβάνονται οι τιμές του αριθμού συσσωμάτωσης N_{agg} , ο οποίος υπολογίζεται κατά προσέγγιση μέσω των τιμών M_w των μικκυλίων και των μεμονωμένων αλυσίδων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών, της υδροδυναμικής ακτίνας R_h , που εξάγεται από τις ταυτόχρονες μετρήσεις δυναμικής σκέδασης σε πολλαπλές γωνίες και του χαρακτηριστικού λόγου $\rho = R_g/R_h$.

Πίνακας 5.2: Συνοπτικά αποτελέσματα των μετρήσεων στατικής και δυναμικής σκέδασης φωτός σε πολλαπλές γωνίες, των διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml, των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, σε pH 3, 7 και 9.

Δείγμα	pH	M_w (10^6 g mol^{-1})	N_{agg}	R_g (nm)	R_h (nm)	$\rho = R_g/R_h$
PS-SCPI-PEO	3	5.47	48	31.6	30.3	1.04
	7	5.57	49	31.7	30.7	1.03
	9	5.55	49	32.3	30.4	1.06
SCPI-PS-PEO	3	23.2	388	35.4	39.7	0.89
	7	16.1	269	45.8	47.4	0.97
	9	15.8	264	45.6	46.5	0.98

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 5.2, στην περίπτωση του τρισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI-PEO, συμπεραίνεται ότι σε όλες τις τιμές του pH τα σχηματιζόμενα μικκύλια εμφανίζουν αριθμό συσσωμάτωσης περί τις 50 αλυσίδες ανά μικκύλιο, επιβεβαιώνοντας τη θεώρηση της σταθερής δομής. Συγκριτικά με τον δισυσταδικό πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, ο αριθμός συσσωμάτωσης των μικκυλίων του PS-SCPI-PEO είναι αρκετά μεγαλύτερος, παρόλο που ο λόγος του συνολικού αριθμού των υδρόφιλων προς τον αντίστοιχο αριθμό των υδρόφοβων μονομερικών μονάδων είναι μεγαλύτερος για τον τρισυσταδικό πολυηλεκτρολύτη (24 έναντι 11.3, Πίνακας 2.1). Προφανώς, σε αυτή την περίπτωση το σημαντικά μικρότερο μήκος της συστάδας του SCPI επιφέρει μείωση των ηλεκτροστατικών απώσεων μεταξύ των αλυσίδων, επιτρέποντας την αυξημένη συσσωμάτωσή τους.

Αναφορικά με το μέγεθος των μικκυλίων, τόσο η R_g όσο και η R_h παραμένουν πρακτικά αμετάβλητες σε όλες τις τιμές του pH, υποδηλώνοντας τη διατήρηση τόσο του μεγέθους, όσο και της συνολικής διαμόρφωσης των μικκυλίων, μέσω της εξισορρόπησης μεταξύ των αντίθετων αλλαγών της επιμέρους διαμόρφωσης των συστάδων του SCPI και του PEO. Αντίστοιχα, οι τιμές του χαρακτηριστικού λόγου ρ δεν εμφανίζουν σημαντική μεταβολή συναρτήσει του pH, επιβεβαιώνοντας τη

διατήρηση της συνολικής διαμόρφωσης των μικκυλίων. Επιπροσθέτως, οι τιμές του λόγου ρ βρίσκονται κοντά στην τιμή του 1.08, που έχει παρατηρηθεί στην περίπτωση αστεροειδών πολυμερών με μεγάλο αριθμό κλάδων,²⁴⁸ αντικατοπτρίζοντας την ανάλογη διαμόρφωση των συγκεκριμένων μικκυλίων.

Για τα διαλύματα του τρισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη SCPI-PS-PEO, διαπιστώνεται ότι η μεταβολή του διαφορικού δείκτη διάθλασης dn/dc και κυρίως της έντασης σκέδασης I_{90} του διαλύματος συναρτηθεί του pH, επιφέρουν σφάλμα στον υπολογισμό της τιμής του M_w και κατ' επέκταση του N_{agg} , ειδικά στην περίπτωση του pH 3. Παρόλα αυτά, τα μικκύλια χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα αυξημένο αριθμό συσσωμάτωσης, περί τις 270 αλυσίδες ανά μικκύλιο, αν και η συγκεκριμένη διάταξη των συστάδων, δηλαδή το γεγονός ότι η υδρόφοβη συστάδα του PS βρίσκεται στο κέντρο της αλυσίδας, αναμένεται να δυσχεραίνει τη συσσωμάτωση. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη σημαντική μείωση του λόγου του συνολικού αριθμού των υδρόφιλων προς τον αντίστοιχο αριθμό των υδρόφοβων μονομερικών μονάδων, σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή του PS-SCPI-PEO (7.4 έναντι 24), καθώς και στο μικρότερο μήκος της συστάδας του SCPI.

Εκτός αυτού, το μέγεθος των μικκυλίων αυξάνεται κατά τη μετάβαση στις υψηλές τιμές του pH, όπως υποδηλώνει η αύξηση των R_g και R_h , αντικατοπτρίζοντας την έκταση των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων του SCPI, ως συνέπεια της αύξησης της πυκνότητας φορτίου τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αύξηση της R_g είναι αισθητά μικρότερη από την αντίστοιχη αύξηση της R_h , λόγω της συμπαγούς δομής που επιφέρει ο υψηλός αριθμός συσσωμάτωσης του μικκυλίου σε όλες τις τιμές του pH. Επιπροσθέτως, η συμπαγής δομή των μικκυλίων συνεπάγεται ότι η διαμόρφωση των αλυσίδων της κορώνας είναι όσο το δυνατόν πιο εκτεταμένη σε κάθε περίπτωση και για το λόγο αυτό δεν διαπιστώνεται περαιτέρω έκταση των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων κατά τη μετάβαση από pH 7 σε 9, παρόλο που η πυκνότητα φορτίου της συστάδας του SCPI αυξάνεται ελαφρώς. Τέλος, η παρατηρούμενη αύξηση του χαρακτηριστικού λόγου ρ στις υψηλές τιμές του pH, απεικονίζει τη μετάβαση των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας των μικκυλίων σε περισσότερο εκτεταμένες διαμορφώσεις.

Ένα τελικό σχόλιο αφορά τη σύγκριση των μεγεθών των δύο διαφορετικών μικκυλίων. Οι μετρήσεις δυναμικής και στατικής σκέδασης φωτός υποδηλώνουν ότι τα μικκύλια του τρισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη SCPI-PS-PEO είναι μεγαλύτερα

από τα αντίστοιχα του PS-SCPI-PEO, σε όλες τις περιπτώσεις. Το γεγονός αυτό φαίνεται να βρίσκεται σε αντίθεση με τη δομή της κορώνας του κάθε μικκυλίου, καθώς και τα μήκη των επιμέρους συστάδων (Πίνακας 2.1). Όπως φαίνεται, ο ιδιαίτερα αυξημένος αριθμός συσσωμάτωσης των μικκυλίων του SCPI-PS-PEO, έχει ως αποτέλεσμα το μέγεθος τους να είναι μεγαλύτερο, για διάφορους λόγους. Καταρχήν, ο πυρήνας του PS αναμένεται να είναι μεγαλύτερος στην περίπτωση των μικκυλίων του SCPI-PS-PEO από ότι του PS-SCPI-PEO. Επίσης, η διαμόρφωση των αλυσίδων του SCPI και του PEO στην κορώνα των μικκυλίων του SCPI-PS-PEO είναι όσο το δυνατόν περισσότερο εκτεταμένη, λόγω της υψηλής συσσωμάτωσης. Αντίθετα, στην περίπτωση των μικκυλίων του PS-SCPI-PEO, ο μικρότερος αριθμός συσσωμάτωσης επιτρέπει στις συστάδες του SCPI να υιοθετούν λιγότερο εκτεταμένη διαμόρφωση. Επιπροσθέτως, η διάταξη των συστάδων του PEO στο εξωτερικό στρώμα της κορώνας, συνεπάγεται ότι η διαμόρφωση τους είναι ελάχιστα εκτεταμένη, καθώς δεν υπόκεινται σε ισχυρούς τοπολογικούς περιορισμούς. Ο συνδυασμός των δύο αυτών φαινομένων, οδηγεί στο συγκριτικά μικρότερο μέγεθος των μικκυλίων.

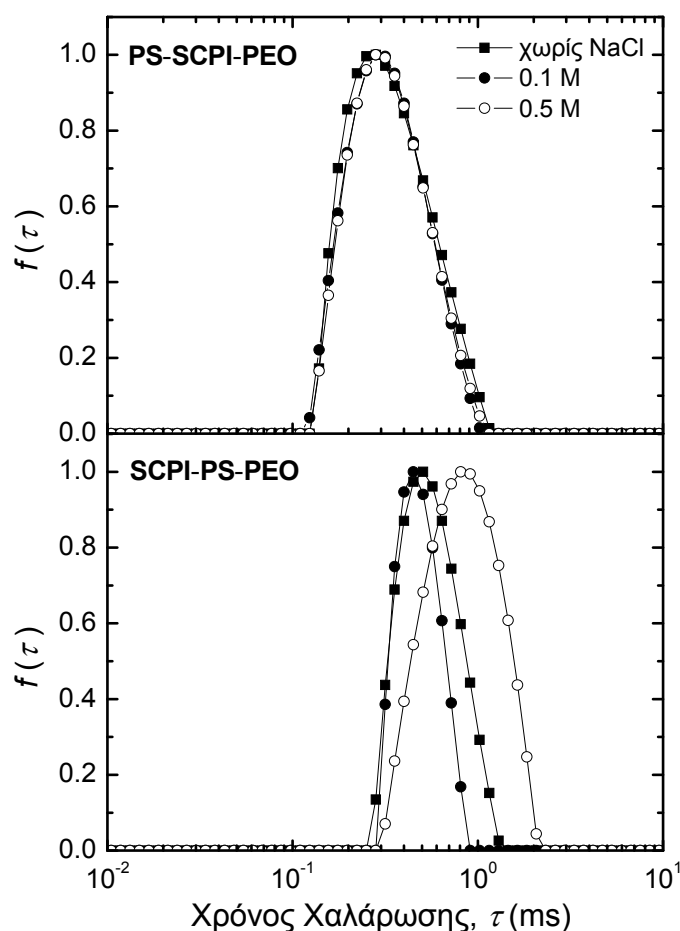
Επίσης, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η πρωτονίωση των καρβοξυλικών ομάδων της πολυηλεκτρολυτικής συστάδας σε pH 3, αναμένεται να οδηγήσει στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συστάδων του SCPI και του PEO. Όμως, το γεγονός αυτό δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τη συμπεριφορά των μικκυλίων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών, προφανώς λόγω της επικράτησης των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες οφείλονται στην παρουσία των ισχυρά φορτισμένων θειικών ομάδων της συστάδας του SCPI.

5.1.2. Ιδιότητες σε διάλυμα συναρτήσει της ιοντικής ισχύος

Λόγω της πολυηλεκτρολυτικής φύσης της συστάδας του SCPI, οι ιδιότητες και η συμπεριφορά των μικκυλίων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών αναμένεται να επηρεάζονται σημαντικά από την αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος, καθώς αυτή επιφέρει τη σταδιακή προάσπιση των φορτίων και κατ' επέκταση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων.

Προκειμένου να εξακριβωθεί η συγκεκριμένη επίδραση, διενεργήθηκαν μετρήσεις DLS συναρτήσει της ιοντικής ισχύος, για τα διαλύματα σε pH 7 των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO. Κατ'

αντιστοιχία με την περίπτωση του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη, η αύξηση της ιοντικής ισχύος έγινε μέσω προσθήκης κατάλληλων ποσοτήτων άλατος NaCl, στα ήδη παρασκευασμένα διαλύματα του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη, με σκοπό τη διερεύνηση των πιθανών αλλαγών της δομής και του μεγέθους των ήδη σχηματισμένων μικκυλίων και όχι του τρόπου αυτοοργάνωσης των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών. Οι κατανομές των χρόνων χαλάρωσης του συστήματος, για μετρήσεις σε γωνία σκέδασης $\theta = 90^\circ$, διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml, των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, σε pH 7, χωρίς προσθήκη άλατος και με ιοντική ισχύ $I = 0.1$ και 0.5 M, παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.3.



Σχήμα 5.3: Κατανομές των χρόνων χαλάρωσης στις 90° , για διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/ml των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, σε pH 7, χωρίς προσθήκη άλατος και με ιοντική ισχύ $I = 0.1$ και 0.5 M.

Διαπιστώνεται ότι τα διαλύματα αυξημένης ιοντικής ισχύος εμφανίζουν και πάλι μία κορυφή, η οποία αντιστοιχεί στα μικκύλια των τρισυσταδικών

πολυηλεκτρολυτών. Οι κατανομές των διαλυμάτων του PS-SCPI-PEO παραμένουν ανεπηρέαστες κατά την αύξηση της ιοντικής ισχύος, ενώ οι αντίστοιχες κατανομές του SCPI-PS-PEO εμφανίζουν μεταβολές, ειδικά στην περίπτωση του διαλύματος με ιοντική ισχύ $I = 0.5 \text{ M}$, όπου παρατηρείται μικρή μετατόπιση της κορυφής προς μεγαλύτερους χρόνους χαλάρωσης, καθώς και σχετική αύξηση του εύρους της.

Οι κορυφές των κατανομών του Σχήματος 5.3 οφείλονται σε κινήσεις λόγω διάχυσης σε όλες τις περιπτώσεις. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε μέσω της γραμμικής συσχέτισης του μέσου ρυθμού χαλάρωσης $\bar{\Gamma}$ και του τετραγώνου του διανύσματος σκέδασης q^2 , που εξήχθη από την γωνιακή εξάρτηση της κάθε κορυφής. Επομένως, η χρήση των σχέσεων (2.11) και (2.12) οδηγεί στον υπολογισμό των τιμών των συντελεστών διάχυσης D , καθώς και των αντίστοιχων υδροδυναμικών ακτίνων R_h και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 4.1. Επίσης παρατίθενται η τιμή της έντασης σκέδασης στις 90° I_{90} , καθώς και της υδροδυναμικής ακτίνας R_{hc} , που εξάγεται μέσω της ανάλυσης cumulants των μετρήσεων στις 90° .

Πίνακας 5.3: Τιμές των συντελεστών διάχυσης D και των υδροδυναμικών ακτίνων R_h που αντιστοιχούν στις κορυφές χαλάρωσης, της έντασης σκέδασης στις 90° I_{90} , καθώς και της υδροδυναμικής ακτίνας R_{hc} που προκύπτει μέσω ανάλυσης cumulants στις 90° , των διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, σε pH 7, χωρίς προσθήκη άλατος και με ιοντική ισχύ $I = 0.1$ και 0.5 M .

Δείγμα	Ιοντική ισχύς	D ($10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	R_h (nm)	I_{90} (kHz)	R_{hc} (nm)
PS-SCPI-PEO	χωρίς NaCl	8.44 ± 0.02	29	4197	27
	0.1 M	8.59 ± 0.01	28.5	4000	28
	0.5 M	8.55 ± 0.02	28.7	4094	28.2
SCPI-PS-PEO	χωρίς NaCl	5.29 ± 0.01	46.3	16714	46.8
	0.1 M	5.78 ± 0.01	42.4	35008	42.1
	0.5 M	4.2 ± 0.01	58.3	42577	56.7

Για τα διαλύματα του τρισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI-PEO, οι τιμές του συντελεστή D και κατ' επέκταση της ακτίνας R_h , καθώς και της ακτίνας R_{hc} ,

παραμένουν πρακτικά σταθερές κατά την αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος. Επομένως, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η προσθήκη άλατος στο διάλυμα δεν επιφέρει μεταβολή του μεγέθους των μικκυλίων. Παρόλα αυτά, οι πολυηλεκτρολυτικές συστάδες του SCPI της κορώνας των μικκυλίων, αναμένεται να συρρικνώνονται καθώς αυξάνεται η ιοντική ισχύς, λόγω της προάσπισης των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Όπως φαίνεται, η συρρίκνωση των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων του SCPI αντισταθμίζεται και σε αυτή την περίπτωση, μέσω αλλαγών της διαμόρφωσης των συστάδων του PEO. Δηλαδή, καθώς το εσωτερικό στρώμα της κορώνας των μικκυλίων συρρικνώνεται, οι αλυσίδες του PEO πλησιάζουν στον πυρήνα του μικκυλίου, με αποτέλεσμα να δέχονται περισσότερους τοπολογικούς περιορισμούς και να υιοθετούν πιο εκτεταμένες διαμορφώσεις. Η εξισορρόπηση μεταξύ των αλλαγών της διαμόρφωσης των δύο διαφορετικών συστάδων της κορώνας, έχει ως αποτέλεσμα το συνολικό μέγεθος των μικκυλίων να παραμένει το ίδιο.

Η διατήρηση της μάζας των μικκυλίων και κατ' επέκταση η θεώρηση της σταθερής δομής τους, επιβεβαιώνονται μέσω των τιμών της έντασης σκέδασης I_{90} , οι οποίες δεν μεταβάλλονται σημαντικά κατά την προσθήκη άλατος στο διάλυμα. Οι παρατηρούμενες μικρές διαφοροποιήσεις πιθανότατα οφείλονται στη μεταβολή του διαφορικού δείκτη διάθλασης dn/dc του διαλύματος.

Στην περίπτωση του τρισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη SCPI-PS-PEO, η αύξηση της ιοντικής ισχύος σε 0.1 M συνεπάγεται αύξηση της τιμής του συντελεστή D και αντίστοιχη μείωση της τιμής των ακτίνων R_h και R_{hc} . Η συγκεκριμένη μεταβολή υποδηλώνει τη μείωση του μεγέθους των μικκυλίων, η οποία είναι συνέπεια της συρρίκνωσης των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας τους. Υπενθυμίζεται ότι οι αλλαγές της διαμόρφωσης των αλυσίδων του SCPI, επηρεάζουν σημαντικά το μέγεθος των μικκυλίων, λόγω της συγκεκριμένης δομής της κορώνας. Αντίθετα, κατά την περαιτέρω αύξηση της ιοντικής ισχύος σε 0.5 M, διαπιστώνεται ότι η τιμή του συντελεστή D μειώνεται, ενώ η τιμή των ακτίνων R_h και R_{hc} αυξάνεται. Σε συνδυασμό με την παρατηρούμενη μεταβολή της κατανομής των χρόνων χαλάρωσης, συμπεραίνεται ότι η αυξημένη τιμή της ιοντικής ισχύος οδηγεί στη μερική συσσωμάτωση των μικκυλίων. Προφανώς, ο υψηλός βαθμός της προάσπισης των φορτίων των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων, μειώνει σημαντικά τη διαλυτότητα των μικκυλίων, καθώς αυτή εξαρτάται κυρίως από τη διαλυτότητα των αλυσίδων του

SCPI, μιας και το μήκος τους είναι μεγαλύτερο από αυτό των αλυσίδων του PEO, με αποτέλεσμα τη συσσωμάτωσή τους. Ένας επιπρόσθετος παράγοντας που συντελεί στη σημαντική μείωση της διαλυτότητας των μικκυλίων, είναι το γεγονός ότι τα συγκεκριμένα μικκύλια χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα υψηλό αριθμό συσσωμάτωσης. Οπότε, η αντιστάθμιση της μείωσης της διαλυτότητας των αλυσίδων του SCPI μέσω αλλαγών της διαμόρφωσής τους, καθίσταται εξαιρετικά δύσκολη. Παρόλα αυτά, η διαδικασία της συσσωμάτωσης των μικκυλίων δε φαίνεται να είναι ιδιαίτερος εκτεταμένη, ούτε να συνεπάγεται υψηλό βαθμό δευτερογενούς συσσωμάτωσης, καθώς η παρατηρούμενη αύξηση της τιμής των ακτίνων R_h και R_{hc} και η αντίστοιχη μετατόπιση της κορυφής είναι σχετικά μικρές.

Όσον αφορά τις τιμές της έντασης σκέδασης I_{90} , η παρατηρούμενη σημαντική αύξηση κατά την προσθήκη άλατος στο διάλυμα, οφείλεται σε μικρό βαθμό στις μεταβολές του διαφορικού δείκτη διάθλασης dn/dc και κυρίως στην πιθανή αύξηση της κινητικότητας των μικκυλίων, λόγω της εξασθένισης των μεταξύ τους ηλεκτροστατικών απώσεων.¹⁰¹ Ειδικά στην περίπτωση του διαλύματος με $I = 0.5$ M, η μερική συσσωμάτωση των μικκυλίων, που λαμβάνει χώρα στο διάλυμα, συντελεί καθοριστικά στη μεταβολή της έντασης σκέδασης.

Οι επιπρόσθετες μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός σε πολλαπλές γωνίες, επιτρέπουν τον υπολογισμό των τιμών του μοριακού βάρους M_w και της γυροσκοπικής ακτίνας R_g , για τα διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/ml, των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, σε pH 7, χωρίς προσθήκη άλατος και με ιοντική ισχύ $I = 0.1$ και 0.5 M. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.4, όπου επίσης συμπεριλαμβάνονται οι τιμές του αριθμού συσσωμάτωσης N_{agg} , της υδροδυναμικής ακτίνας R_h (που εξάγεται μέσω μετρήσεων σε πολλαπλές γωνίες) και του χαρακτηριστικού λόγου $\rho = R_g/R_h$.

Όπως διαπιστώνεται με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 5.4, για τον τρισυσταδικό πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI-PEO, η αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος δεν επιφέρει ουσιαστικά καμία μεταβολή, ούτε της δομής των μικκυλίων (η τιμή του M_w και κατ' επέκταση του N_{agg} παραμένουν σχεδόν σταθερές), ούτε του συνολικού μεγέθους και της διαμόρφωσής τους (όπως υποδηλώνουν οι παρόμοιες τιμές των R_g , R_h και ρ , σε όλες τις περιπτώσεις). Η διαπίστωση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα αποτελέσματα των μετρήσεων δυναμικής σκέδασης

φωτός και καταδεικνύει για ακόμα μία φορά ότι η συρρίκνωση των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων του SCPI, την οποία προκαλεί η εξασθένιση των ηλεκτροστατικών απώσεων, έχει ως συνέπεια οι συστάδες του PEO να υιοθετούν περισσότερο εκτεταμένες διαμορφώσεις. Το αποτέλεσμα της συγκεκριμένης εξισορρόπησης είναι το συνολικό μέγεθος των μικκυλίων να παραμένει πρακτικά αμετάβλητο.

Πίνακας 5.4: Συνοπτικά αποτελέσματα των μετρήσεων στατικής και δυναμικής σκέδασης φωτός σε πολλαπλές γωνίες, των διαλυμάτων συγκέντρωσης 1 mg/ml, των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, σε pH 7, χωρίς προσθήκη άλατος και με ιοντική ισχύ $I = 0.1$ και 0.5 M.

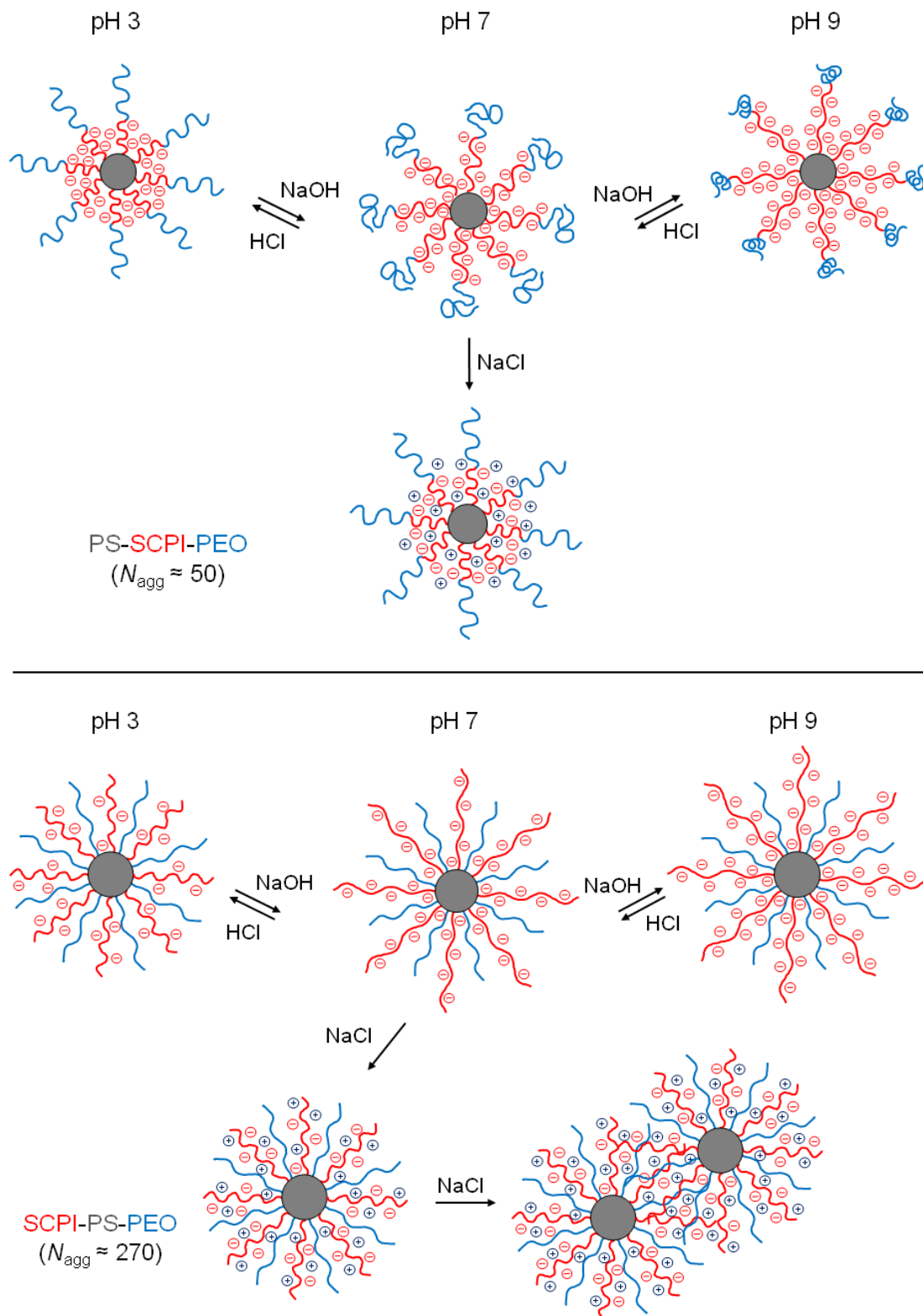
Δείγμα	Ιοντική ισχύς	M_w (10^6 g mol $^{-1}$)	N_{agg}	R_g (nm)	R_h (nm)	$\rho = R_g/R_h$
PS-SCPI-PEO	χωρίς NaCl	5.57	49	31.7	30.7	1.03
	0.1 M	5.43	48	32.6	31.1	1.05
	0.5 M	5.5	49	31.5	30.3	1.04
SCPI-PS-PEO	χωρίς NaCl	16.1	269	45.8	47.4	0.97
	0.1 M	29.5	493	38.6	43.4	0.89
	0.5 M	43.1	720	58.2	58.6	0.99

Αντιθέτως, στην περίπτωση του τρισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη SCPI-PS-PEO, παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές κατά την αύξηση της ιοντικής ισχύος. Καταρχήν, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι αυξημένες τιμές της έντασης σκέδασης που εμφανίζουν τα διαλύματα μετά την προσθήκη του άλατος και οι οποίες, όπως προαναφέρθηκε, οφείλονται στις μεταβολές του διαφορικού δείκτη διάθλασης $\partial n/\partial c$ του διαλύματος και κυρίως στην αύξηση της κινητικότητας των μικκυλίων, καθώς και στη μερική συσσωμάτωσή τους στην περίπτωση του διαλύματος με $I = 0.5$ M, επηρεάζουν ανάλογα τις υπολογιζόμενες τιμές του M_w και του N_{agg} . Επιπροσθέτως, η παρατηρούμενη μείωση των R_g , R_h και ρ για το διάλυμα με ιοντική ισχύ $I = 0.1$ M, αντικατοπτρίζει τη μείωση του μεγέθους των μικκυλίων και τη μετάβαση των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων σε λιγότερο εκτεταμένες διαμορφώσεις, λόγω της

συρρίκνωσης των συστάδων του SCPI. Αντίστοιχα, περαιτέρω αύξηση της ιοντικής ισχύος σε 0.5 M, συνεπάγεται τόσο αύξηση των ακτίνων R_g και R_h , όσο και του χαρακτηριστικού λόγου ρ , μεταβολές που οφείλονται στη συσσωμάτωση των μικκυλίων και καταδεικνύουν το αυξημένο μέγεθος των συσσωματωμάτων, καθώς και την πιο χαλαρή δομή τους.

5.1.3. Απόκριση των μικκυλίων συναρτήσει των συνθηκών του διαλύματος

Οι μετρήσεις δυναμικής και στατικής σκέδασης φωτός κατέδειξαν τον διαφορετικό τρόπο απόκρισης στις αλλαγές των συνθηκών του διαλύματος, των μικκυλίων που σχηματίζουν οι τρισυσταδικοί πολυηλεκτρολύτες PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO σε υδατικά διαλύματα. Τα μικκύλια του PS-SCPI-PEO ανταποκρίνονται στις αλλαγές του pH ή της ιοντικής ισχύος του διαλύματος, μέσω αντίθετων μεταβολών της διαμόρφωσης των συστάδων του SCPI και δευτερογενώς του PEO. Συγκεκριμένα, η έκταση των συστάδων του SCPI κατά την αύξηση του pH, λόγω της αύξησης της πυκνότητας του φορτίου τους, αντισταθμίζεται μέσω της υιοθέτησης λιγότερο εκτεταμένων διαμορφώσεων από τις συστάδες του PEO. Η αντίθετη μετάβαση παρατηρείται για τις συστάδες του PEO κατά τη συρρίκνωση των συστάδων του SCPI, καθώς αυξάνεται η ιοντική ισχύς του διαλύματος, η οποία οδηγεί σε εξασθένηση των ηλεκτροστατικών απώσεων. Το αποτέλεσμα και στις δύο περιπτώσεις είναι η διατήρηση του συνολικού μεγέθους των μικκυλίων. Αντίθετα, το μέγεθος των μικκυλίων του SCPI-PS-PEO αυξάνεται στις υψηλές τιμές του pH, λόγω της έκτασης των αλυσίδων του SCPI, ενώ η μικρή αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος συνεπάγεται μείωση του μεγέθους τους, εξαιτίας της συρρίκνωσης των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας. Περαιτέρω αύξηση της ιοντικής ισχύος επιδεινώνει αισθητά τη διαλυτότητα των μικκυλίων, μέσω της προάσπισης των φορτίων των συστάδων του SCPI, καταλήγοντας στη μικρού βαθμού συσσωμάτωσή τους. Μία συνοπτική αναπαράσταση των συγκεκριμένων μεταβολών παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.4.



Σχήμα 5.4: Σχηματική αναπαράσταση της απόκρισης των μικκυλίων των τρισταδιακών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, συναρτήσει των αλλαγών του pH και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος.

5.2. Σύμπλεξη των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO με λυσοζύμη

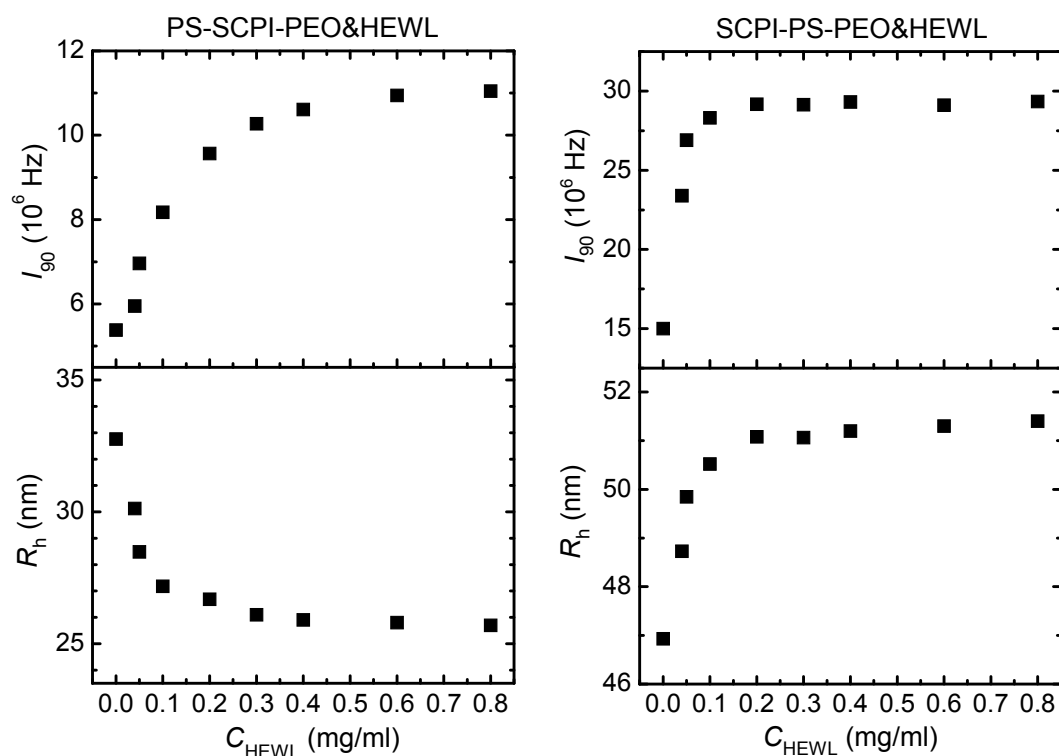
Η διαδικασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ μικκυλίων που φέρουν πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες στην κορώνα τους και πρωτεϊνών καθιστά δυνατή την ανάπτυξη νανοσυστημάτων με πιθανή χρήση σε πλήθος βιοϊατρικών εφαρμογών. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η επίδραση της διαφορετικής δομής της κορώνας των μικκυλίων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, προσδίδει επιπρόσθετο ενδιαφέρον στη διερεύνηση της διαδικασίας της σύμπλεξης με λυσοζύμη. Οι ιδιότητες και η συμπεριφορά των σχηματιζόμενων συμπλόκων αναμένεται να επηρεάζονται σημαντικά από την αρχιτεκτονική του τρισυσταδικού μακρομορίου. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τον διαφορετικό τρόπο απόκρισης στις αλλαγές των συνθηκών του διαλύματος, που εμφανίζουν τα μικκύλια των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO. Η παρουσία των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων του SCPI στην κορώνα των μικκυλίων, καθοδηγεί την ηλεκτροστατική σύμπλεξη με τα πρωτεϊνικά μόρια, ενώ οι συστάδες του PEO αναμένεται να αυξάνουν τη διαλυτότητα των σχηματιζόμενων συμπλόκων, καθώς και να προσδίδουν επιπρόσθετη βιοσυμβατότητα στο σύστημα. Ως εκ τούτου, η διαδικασία της σύμπλεξης, καθώς και οι ιδιότητες και η συμπεριφορά των συμπλόκων που προκύπτουν, μεταξύ των μικκυλίων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της λυσοζύμης, διερευνήθηκαν συναρτήσει τόσο της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, όσο και των συνθηκών του διαλύματος, δηλαδή του pH και της ιοντικής ισχύος. Η δομή της συμπλεγμένης λυσοζύμης μελετήθηκε επίσης.

5.2.1. Σύμπλεξη σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS), ώστε να διερευνηθεί η διαδικασία της σύμπλεξης μεταξύ των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της λυσοζύμης, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, όπου η πολυηλεκτρολυτική συστάδα του SCPI χαρακτηρίζεται από υψηλή πυκνότητα φορτίου και το μόριο της λυσοζύμης φέρει καθαρό θετικό φορτίο ίσο με + 8,^{133, 134} όπως έχει αναφερθεί.

Οι εξαγόμενες, μέσω των μετρήσεων DLS των διαλυμάτων των συμπλόκων, τιμές της διορθωμένης ως προς τη συγκέντρωση έντασης σκέδασης στις 90° I_{90} ,

καθώς και της υδροδυναμικής ακτίνας R_h , παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.5 συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης στο διάλυμα, C_{HEWL} . Σημειώνεται ότι η συγκέντρωση των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO είναι σταθερή και ίση με 0.075 mg/ml και στις δύο σειρές διαλυμάτων. Επίσης επισημαίνεται ότι το σημείο για $C_{HEWL} = 0$ σε κάθε περίπτωση αντιστοιχεί στις τιμές των καθαρών τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών.



Σχήμα 5.5: Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M.

Η ένταση σκέδασης I_{90} παρουσιάζει σταδιακή αύξηση συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης και για τις δύο σειρές διαλυμάτων, υποδηλώνοντας την αύξηση της μάζας των σκεδαζόντων σωματιδίων του διαλύματος και κατ' επέκταση αποδεικνύοντας τη σύμπλεξη μεταξύ των μικκυλίων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL. Αξίζει να σημειωθεί ότι στη συγκεκριμένη περίπτωση η αύξηση των τιμών του I_{90} , είναι αρκετά μικρότερη συγκριτικά με τις αντίστοιχες μεταβολές που παρατηρήθηκαν για τα συστήματα του ομοπολυμερικού (Σχήμα 3.10) και του δισυσταδικού (Σχήμα 4.5) πολυηλεκτρολύτη. Επίσης αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα διαλύματα των συμπλόκων και για τα δύο διαφορετικά συστήματα των PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-

PEO και της HEWL, δεν εμφανίζουν διαφασικό διαχωρισμό σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων C_{HEWL} που μελετήθηκε και παραμένουν σταθερά για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι για τα συστήματα των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών και της λυσοζύμης, η σύμπλεξη δεν επιφέρει τη συσσωμάτωση των σχηματιζόμενων συμπλόκων. Επομένως, η συμβολή των συστάδων του PEO στη διαλυτότητα των συμπλόκων, αποδεικνύεται καθοριστικής σημασίας. Όσον αφορά το μέγεθος των συμπλόκων, οι τιμές της R_h εμφανίζουν μικρή σταδιακή μείωση για το σύστημα του PS-SCPI-PEO και της λυσοζύμης, ενώ αντίθετα για το αντίστοιχο σύστημα του SCPI-PS-PEO παρατηρείται μικρή αύξηση.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, εξάγεται το συμπέρασμα ότι στην περίπτωση του τρισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI-PEO, η προσθήκη της λυσοζύμης στο διάλυμα συνεπάγεται τη σύμπλεξη των πρωτεϊνικών μορίων με τις πολυηλεκτρολυτικές συστάδες του SCPI της κορώνας των μικκυλίων. Η σύμπλεξη έχει ως αποτέλεσμα την εξουδετέρωση των φορτίων του SCPI, γεγονός που επιφέρει τη συρρίκνωση των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων, δηλαδή του εσωτερικού στρώματος της κορώνας, με αποτέλεσμα το μέγεθος των συμπλεγμένων με λυσοζύμη μικκυλίων να μειώνεται. Σε αντίθεση με ότι διαπιστώθηκε για τα μικκύλια του PS-SCPI-PEO, αναφορικά με τον τρόπο απόκρισής τους στις αλλαγές της πυκνότητας φορτίου της πολυηλεκτρολυτικής συστάδας, τα συμπλεγμένα με πρωτεΐνη μικκύλια φαίνεται να μην είναι σε θέση να αντισταθμίσουν πλήρως τη συρρίκνωση της συστάδας του SCPI, μέσω αλλαγών της διαμόρφωσης των συστάδων του PEO.

Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι η ενσωμάτωση των μορίων της λυσοζύμης στην κορώνα των μικκυλίων, αυξάνει τους τοπολογικούς περιορισμούς στους οποίους υπόκεινται οι αλυσίδες της κορώνας και κατ' επέκταση παρεμποδίζει την αναδιάταξη των συστάδων του PEO, ειδικά αν συνυπολογιστεί και η πιθανότητα τα μόρια της λυσοζύμης να συμπλέκονται με γειτονικές πολυηλεκτρολυτικές συστάδες της κορώνας. Επίσης, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι η εξουδετέρωση των φορτίων της συστάδας του SCPI λόγω της σύμπλεξης, αναμένεται να οδηγεί σε μεγαλύτερη μείωση της πυκνότητας φορτίου από ότι η αντίστοιχη μείωση του pH, ειδικά στην περιοχή των υψηλών τιμών της C_{HEWL} , οπότε η συρρίκνωση των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων ενδέχεται να είναι εντονότερη σε αυτή την περίπτωση. Επομένως, είναι εξίσου πιθανό οι συστάδες του PEO να υιοθετούν περισσότερο εκτεταμένες διαμορφώσεις, καθώς οι συστάδες του SCPI

συρρικνώνονται, αλλά παρόλα αυτά το συνολικό μέγεθος των μικκυλίων να μειώνεται.

Καθώς η συγκέντρωση της λυσοζύμης αυξάνεται, κάθε πολυηλεκτρολυτική συστάδα αλληλεπιδρά με περισσότερα πρωτεϊνικά μόρια, ως εκ τούτου ο βαθμός εξουδετέρωσης των φορτίων τους αυξάνεται, γεγονός που συνεπάγεται περαιτέρω συρρίκνωση των συστάδων του SCPI και αντίστοιχη μείωση του μεγέθους των συμπλόκων. Βέβαια, τόσο η μάζα όσο και το μέγεθος των συμπλόκων φαίνεται να μην παρουσιάζουν σημαντική μεταβολή για τιμές της $C_{HEWL} > 0.2$, παρόλο που η συγκέντρωση της λυσοζύμης στο διάλυμα αυξάνεται σημαντικά. Η διαπίστωση αυτή συνεπάγεται ότι η δυνατότητα ενσωμάτωσης πρωτεϊνικών μορίων στη δομή των συμπλόκων είναι περιορισμένη (επέρχεται, κατά κάποιο τρόπο, κορεσμός του μικκυλίου). Δηλαδή όσο αυξάνεται ο αριθμός των μορίων λυσοζύμης που αλληλεπιδρούν με κάθε μικκύλιο, τόσο πιο δύσκολη είναι η εισχώρηση περαιτέρω πρωτεϊνικών μορίων στην κορώνα των μικκυλίων, λόγω των αυξανόμενων τοπολογικών περιορισμών.

Στην αντίστοιχη περίπτωση του τρισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη SCPI-PS-PEO, εκτός από την αύξηση της μάζας παρατηρείται και μικρή αύξηση του μεγέθους των συμπλόκων, συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, παρόλο που η σύμπλεξη των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων του SCPI της κορώνας των μικκυλίων με τα μόρια της λυσοζύμης, αναμένεται να οδηγήσει στη συρρίκνωσή τους. Ενδεχομένως, η εισχώρηση των πρωτεϊνικών μορίων στην κορώνα των μικκυλίων καθίσταται εξαιρετικά δύσκολη έως αδύνατη, λόγω του ιδιαίτερα υψηλού αριθμού συσσωμάτωσης των συγκεκριμένων μικκυλίων και της συμπαγούς δομής τους, με αποτέλεσμα η σύμπλεξη με τα μόρια της λυσοζύμης να περιορίζεται στην εξωτερική περιφέρεια του μικκυλίου. Άλλωστε, υπενθυμίζεται ότι το μήκος των αλυσίδων του SCPI είναι μεγαλύτερο από το αντίστοιχο των αλυσίδων του PEO, γεγονός που αυξάνει σημαντικά την προσβασιμότητα των περιφερειακών θέσεων πρόσδεσης. Επομένως, η παρατηρούμενη αύξηση των τιμών της R_h ουσιαστικά σηματοδοτεί τη μεταβολή της ακτινικής κατανομής της μάζας των συμπλόκων, λόγω της ενσωμάτωσης των πρωτεϊνικών μορίων στην περιφέρεια των μικκυλίων.

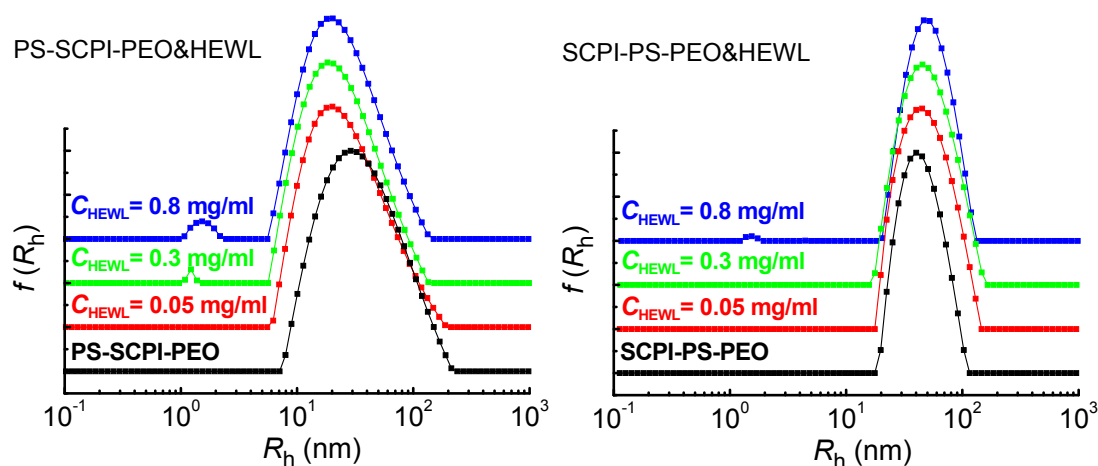
Αναμφίβολα, ο περιορισμός των μορίων της λυσοζύμης στην περιφέρεια του μικκυλίου δυσχεραίνει την αλληλεπίδραση της κάθε πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας της κορώνας με μεγάλο αριθμό μορίων, καθώς ο αριθμός των διαθέσιμων θέσεων

πρόσδεσης είναι ήδη περιορισμένος και μειώνεται ακόμα περισσότερο όσο αυξάνεται ο αριθμός των πρωτεϊνικών μορίων που αλληλεπιδρούν με κάθε αλυσίδα. Για το λόγο αυτό, τόσο η μάζα όσο και το μέγεθος των συμπλόκων δεν εμφανίζουν σημαντική μεταβολή για τιμές της $C_{HEWL} > 0.1$, καταδεικνύοντας την επίτευξη του μέγιστου δυνατού βαθμού αλληλεπίδρασης μεταξύ των μικκυλίων του SCPI-PS-PEO και της HEWL (ή ισοδύναμα τον κορεσμό των μικκυλίων), ο οποίος φαίνεται να είναι μικρότερος από τον αντίστοιχο για το σύστημα του PS-SCPI-PEO και της HEWL. Παρόλα αυτά, ο υψηλός αριθμός συσσωμάτωσης των μικκυλίων του SCPI-PS-PEO, επιτρέπει τη σύμπλεξη μεγαλύτερου αριθμού μορίων λυσοζύμης ανά μικκύλιο, συγκριτικά με τα αντίστοιχα μικκύλια του PS-SCPI-PEO. Το γεγονός αυτό σηματοδοτεί η απότομη αύξηση των τιμών του I_{90} , η οποία υποδηλώνει ότι η μάζα των συμπλόκων του SCPI-PS-PEO και της HEWL είναι αρκετά μεγαλύτερη από αυτή των μικκυλίων του SCPI-PS-PEO.

Επιπρόσθετες πληροφορίες για τα συστήματα των συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών και της λυσοζύμης, εξάγονται μέσω της μεταβολής των κατανομών των υδροδυναμικών ακτίνων του συστήματος, οι οποίες προκύπτουν με χρήση της ανάλυσης CONTIN. Οι κατανομές αυτές στις 90° , για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, παρουσιάζονται για αντιπροσωπευτικές τιμές της συγκέντρωσης της HEWL στο Σχήμα 5.6. Επίσης περιλαμβάνονται οι αντίστοιχες κατανομές των διαλυμάτων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών, για λόγους σύγκρισης.

Μέσω των κατανομών των υδροδυναμικών ακτίνων των διαλυμάτων των συμπλόκων για τα δύο διαφορετικά συστήματα, διαπιστώνεται η ύπαρξη μίας κύριας κορυφής, η οποία αντιστοιχεί στα συμπλεγμένα με λυσοζύμη μικκύλια των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών. Για το σύστημα του PS-SCPI-PEO και της HEWL, η κορυφή αυτή μετατοπίζεται προς μικρότερες ακτίνες καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της λυσοζύμης, αντικατοπτρίζοντας τη μείωση του μεγέθους των συμπλόκων. Είναι εμφανές όμως, ότι για τις μεγαλύτερες τιμές της C_{HEWL} οι κατανομές παραμένουν πρακτικά αμετάβλητες, δηλαδή δεν παρατηρείται περαιτέρω μείωση του μεγέθους των συμπλόκων. Αντίστοιχα, για το σύστημα του SCPI-PS-PEO και της HEWL, η κύρια κορυφή των κατανομών παρουσιάζει αρχικά μία μικρή μετατόπιση προς μεγαλύτερες ακτίνες, υποδηλώνοντας την μικρή αύξηση του

μεγέθους των συμπλόκων, αλλά και πάλι δεν παρατηρείται περαιτέρω αύξηση στην περιοχή των υψηλών τιμών της C_{HEWL} . Επομένως, οι παρατηρούμενες μεταβολές των κατανομών βρίσκονται σε συμφωνία με τις αντίστοιχες μεταβολές των τιμών των υδροδυναμικών ακτίνων που εξάγονται μέσω της ανάλυσης cumulants (Σχήμα 5.5).

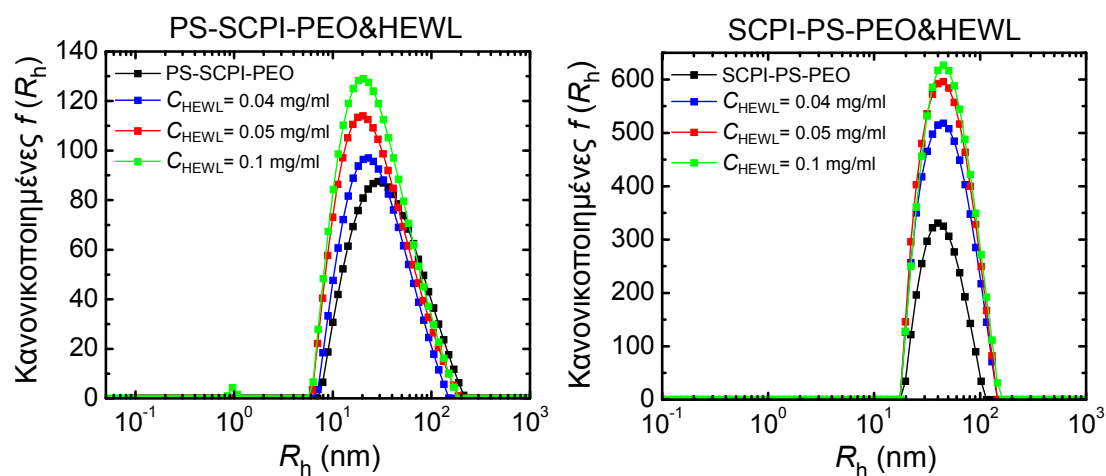


Σχήμα 5.6: Κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90° , για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, για $C_{HEWL} = 0.05, 0.3$ και 0.8 mg/ml. Οι αντίστοιχες κατανομές των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών παρατίθενται επίσης, για λόγους σύγκρισης.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι για τα διαλύματα των συμπλόκων με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις λυσοζύμης, οι κατανομές εμφανίζουν μία κορυφή σε μικρότερες ακτίνες, η οποία αντιστοιχεί στην ελεύθερη πρωτεΐνη στο διάλυμα. Η παρατήρηση αυτή συνάδει με τη θεώρηση ότι η δυνατότητα ενσωμάτωσης των μορίων της λυσοζύμης στα μικκύλια των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών είναι περιορισμένη. Επομένως, όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της λυσοζύμης στο διάλυμα, τόσο μεγαλύτερος είναι και ο αριθμός των μη συμπλεγμένων πρωτεϊνικών μορίων. Μάλιστα, η ύπαρξη, έστω και μικρής ποσότητας, ελεύθερης πρωτεΐνης στα διαλύματα των συμπλόκων του PS-SCPI-PEO και της HEWL διαπιστώνεται για τιμές της C_{HEWL} μεγαλύτερες ή ίσες του 0.1 mg/ml, ενώ για το αντίστοιχο σύστημα του SCPI-PS-PEO και της HEWL, για τιμές μεγαλύτερες ή ίσες του 0.6 mg/ml. Η διαφορά αυτή οφείλεται σε δύο λόγους. Αφενός, ο συνολικός αριθμός των συμπλεγμένων πρωτεϊνικών μορίων ανά μικκύλιο είναι μεγαλύτερος για το σύστημα του SCPI-PS-PEO, λόγω του υψηλού αριθμού συσσωμάτωσης των μικκυλίων. Αφετέρου, η αυξημένη μάζα των μικκυλίων του SCPI-PS-PEO και κατ' επέκταση των συμπλόκων που σχηματίζουν με τα μόρια της

λυσοζύμης, συνεπάγεται ότι τα σύμπλοκα υπερισχύουν στην ένταση σκέδασης του διαλύματος και η διάκριση της ελεύθερης πρωτεΐνης καθίσταται πιο δύσκολη από ότι στην περίπτωση των συμπλόκων του PS-SCPI-PEO.

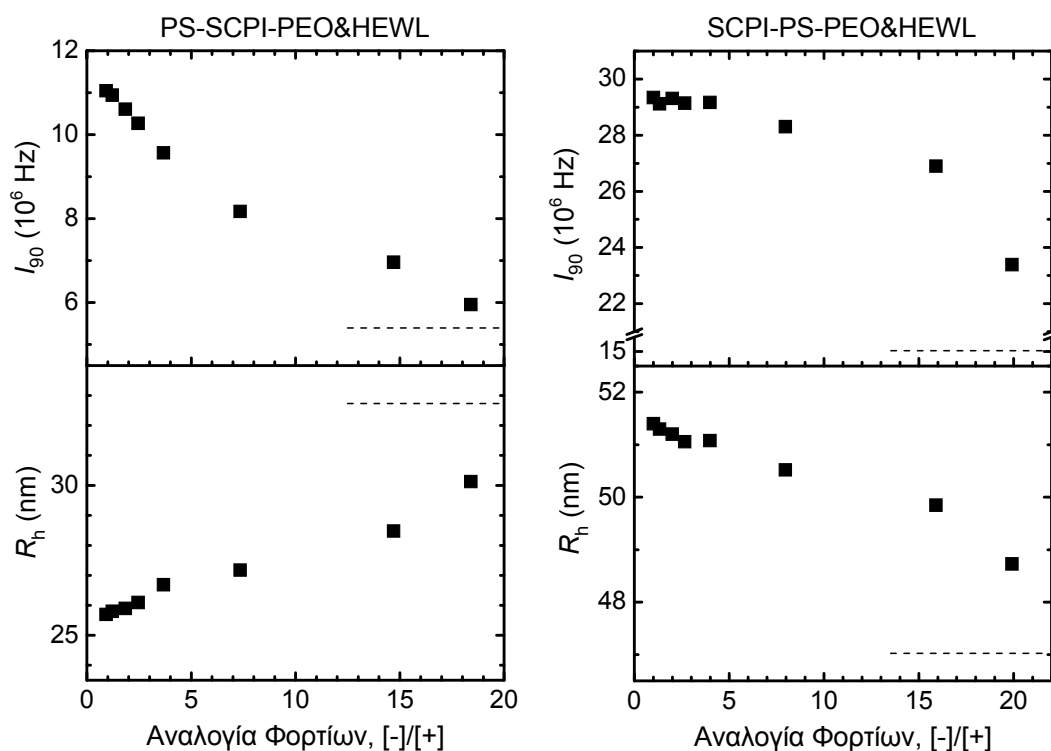
Παρόλο που οι κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων για τα διαλύματα των συμπλόκων και των δύο συστημάτων εμφανίζουν σημαντικές ομοιότητες με τις αντίστοιχες κατανομές των διαλυμάτων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών, είναι σχεδόν βέβαιο ότι αντιστοιχούν σε σύμπλοκα και όχι σε μικκύλια. Στο συμπέρασμα αυτό οδηγεί η διαπίστωση ότι η μάζα των σκεδαζόντων σωματιδίων στα διαλύματα των συμπλόκων, η οποία είναι ανάλογη της έντασης σκέδασης, είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των διαλυμάτων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών. Περαιτέρω επιβεβαίωση παρέχουν οι διαφοροποιήσεις της έντασης των κανονικοποιημένων, ως προς τη συνολική ένταση σκέδασης του διαλύματος, κατανομών των υδροδυναμικών ακτίνων, για τα διαλύματα των συμπλόκων στην περιοχή των χαμηλών συγκεντρώσεων της HEWL, οι οποίες παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.7. Σημειώνεται ότι η κανονικοποίηση των κατανομών έχει γίνει με τον τρόπο που περιγράφηκε στην αντίστοιχη περίπτωση του Σχήματος 3.12.



Σχήμα 5.7: Κανονικοποιημένες, ως προς τη συνολική ένταση του διαλύματος, κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90°, για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, για $C_{HEWL} = 0.04, 0.05$ και 0.1 mg/ml. Οι αντίστοιχες κανονικοποιημένες κατανομές των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών παρατίθεται επίσης, για λόγους σύγκρισης.

Εναλλακτικά, τα αποτελέσματα των μετρήσεων DLS μπορούν να παρουσιαστούν συναρτήσει της αναλογίας φορτίων του συστήματος, έτσι ώστε να αναλογούν στον τρόπο παρουσίασης των αντίστοιχων αποτελεσμάτων του

συστήματος του ομοπολυμερικού πολυηλεκτρολύτη (Σχήμα 3.10). Στο Σχήμα 5.8 παρουσιάζονται οι τιμές των I_{90} και R_h για τα διαλύματα των συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, συναρτήσει της αναλογίας φορτίων [-]/[+] του συστήματος. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν τις αντίστοιχες τιμές των διαλυμάτων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών.

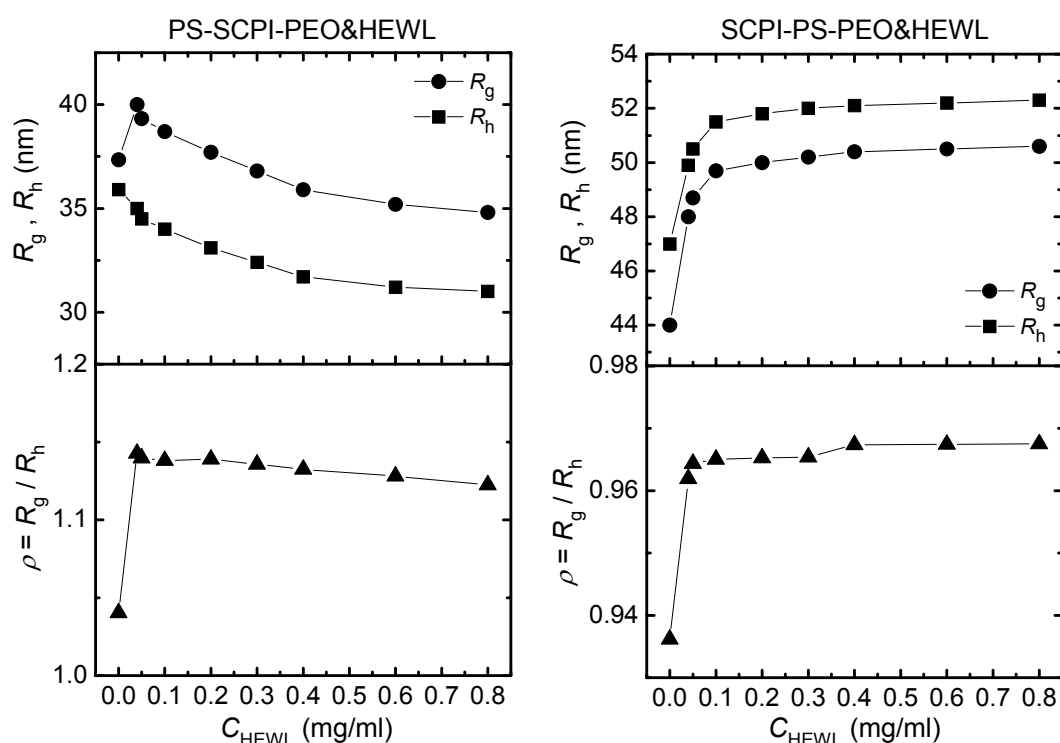


Σχήμα 5.8: Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων [-]/[+], για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν τις αντίστοιχες τιμές των διαλυμάτων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών.

Οι τιμές του I_{90} μειώνονται καθώς αυξάνεται η αναλογία φορτίων [-]/[+] και για τα δύο συστήματα, γεγονός που υποδηλώνει τη μείωση της μάζας των συμπλόκων, καθώς κάθε πολυηλεκτρολυτική συστάδα της κορώνας των μικκυλίων αλληλεπιδρά με λιγότερα μόρια λυσοζύμης. Όσον αφορά το μέγεθος των σχηματιζόμενων συμπλόκων, για το σύστημα του PS-SCPI-PEO και της HEWL, παρατηρείται σταδιακή αύξηση των τιμών της R_h συναρτήσει της αναλογίας φορτίων, καταδεικνύοντας την έκταση των συστάδων του SCPI, όσο μειώνεται ο βαθμός εξουδετέρωσης των φορτίων τους. Αντίθετα, το μέγεθος των συμπλόκων του

συστήματος του SCPI-PS-PEO και της HEWL, μειώνεται ελαφρώς εξαιτίας της μείωσης του αριθμού των μορίων της λυσοζύμης που συμπλέκονται στην περιφέρεια του μικκυλίου.

Συμπληρωματικές μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός σε πολλαπλές γωνίες πραγματοποιήθηκαν για τα διαλύματα των συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, με σκοπό τη διερεύνηση των μεταβολών των ακτίνων R_g και R_h , καθώς και του χαρακτηριστικού τους λόγου ρ . Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών, παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.9 ως συνάρτηση της C_{HEWL} .



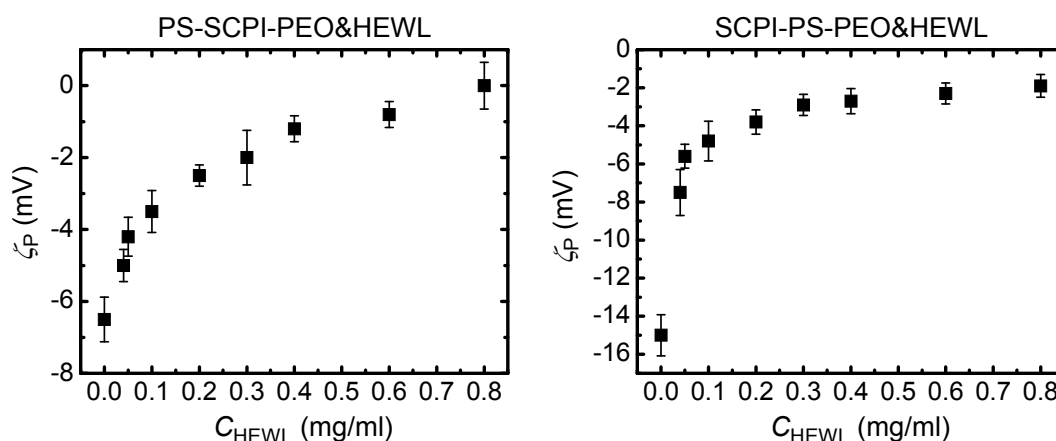
Σχήμα 5.9: Γυροσκοπική ακτίνα, R_g , υδροδυναμική ακτίνα (μέσω μετρήσεων σε πολλαπλές γωνίες), R_h , και λόγος $\rho = R_g/R_h$, συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M.

Για το σύστημα του τρισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI-PEO και της HEWL, οι τιμές των ακτίνων R_g και R_h παρουσιάζουν σταδιακή μικρή μείωση συναρτήσει της συγκέντρωσης C_{HEWL} , αντικατοπτρίζοντας τη συρρίκνωση των συστάδων του SCPI της κορώνας των μικκυλίων, καθώς αυξάνεται ο αριθμός των συμπλεγμένων πρωτεϊνικών μορίων. Οι τιμές της R_g για τα διαλύματα των συμπλόκων εμφανίζονται αυξημένες σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή του διαλύματος

του τρισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη, καθώς η ενσωμάτωση των μορίων της λυσοζύμης στην κορώνα των μικκυλίων, συνεπάγεται τη μεταβολή της ακτινικής κατανομής της μάζας των συμπλόκων. Παράλληλα, οι τιμές του χαρακτηριστικού λόγου ρ των διαλυμάτων των συμπλόκων μειώνονται ελαφρώς καθώς αυξάνεται η C_{HEWL} , λόγω της λιγότερο εκτεταμένης διαμόρφωσης που υιοθετούν οι πολυηλεκτρολυτικές συστάδες κατά τη σύμπλεξή τους με τα πρωτεϊνικά μόρια.

Στην αντίστοιχη περίπτωση των διαλυμάτων των συμπλόκων του συστήματος του SCPI-PS-PEO και της HEWL, η αύξηση της C_{HEWL} συνεπάγεται μικρή αύξηση των ακτίνων R_g και R_h . Το γεγονός αυτό οφείλεται στην αύξηση της περιφερειακής μάζας των συμπλόκων, καθώς μεγαλώνει ο αριθμός μορίων λυσοζύμης που συμπλέκονται στην περιφέρεια των μικκυλίων. Η συγκεκριμένη μεταβολή της κατανομής της μάζας των συμπλόκων καταδεικνύεται επίσης και από την παρατηρούμενη μικρή αυξητική τάση των τιμών του λόγου ρ .

Η διερεύνηση του ενεργού φορτίου των συμπλόκων πραγματοποιήθηκε μέσω μετρήσεων ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός (ELS) και στο Σχήμα 5.10 παρουσιάζονται οι μετρούμενες τιμές του δυναμικού ζήτα, ζ_p , για τα διαλύματα των συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, συναρτήσει της C_{HEWL} .



Σχήμα 5.10: Δυναμικό ζήτα, ζ_p , συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M.

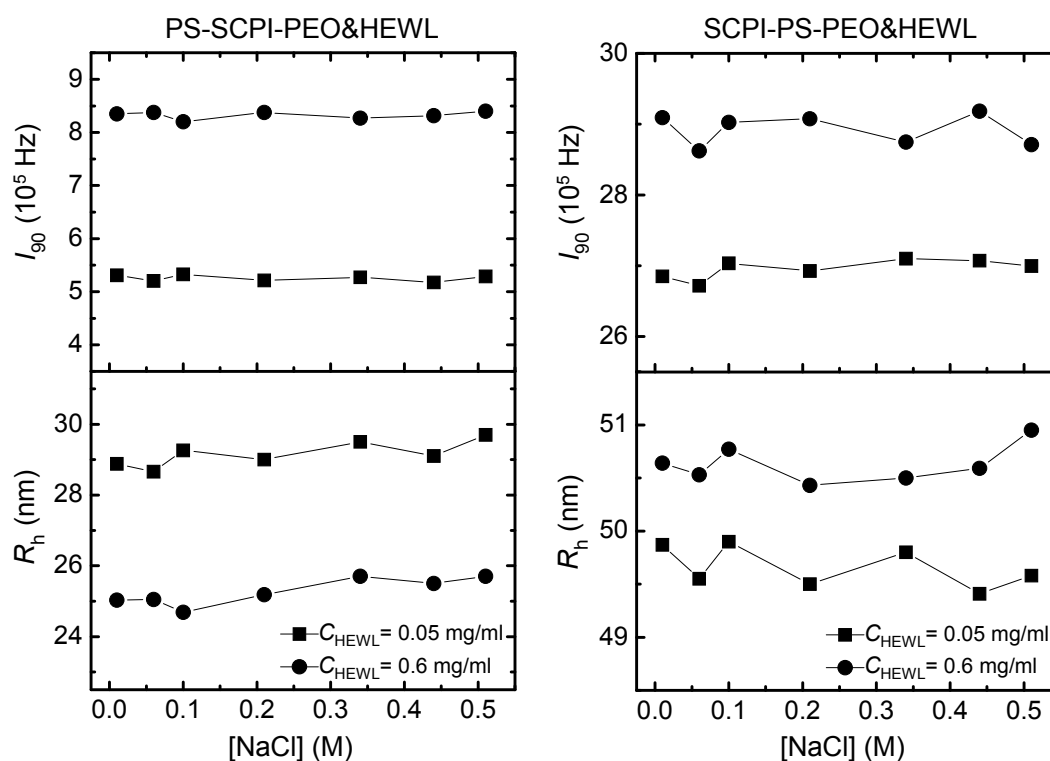
Η απόλυτη τιμή του ενεργού φορτίου των συμπλόκων μειώνεται συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης και για τα δύο συστήματα, εξαιτίας του αυξανόμενου βαθμού εξουδετέρωσης των φορτίων των πολυηλεκτρολυτικών

συστάδων του SCPI, κατά τη σύμπλεξή τους με τα πρωτεϊνικά μόρια. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι τιμές του ζ εμφανίζονται αρκετά μειωμένες, ειδικά στην περίπτωση του τρισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI-PEO, καθώς το μεγαλύτερο μέρος των φορτίων βρίσκεται στο εσωτερικό της κορώνας των μικκυλίων. Στο ίδιο πλαίσιο, τα μικκύλια του SCPI-PS-PEO χαρακτηρίζονται από αυξημένο κατ' απόλυτη τιμή ενεργό φορτίο συγκριτικά με τα αντίστοιχα μικκύλια του PS-SCPI-PEO, καθώς η περιφερειακή κατανομή των φορτίων της κορώνας τους είναι αυξημένη, ως συνέπεια του μεγαλύτερου μήκους των αλυσίδων του SCPI σε σχέση με το αντίστοιχο των αλυσίδων του PEO. Βέβαια, το γεγονός αυτό συνεπάγεται και την παρατηρούμενη απότομη μείωση του ενεργού φορτίου των συμπλόκων, καθώς τα μόρια της λυσοζύμης συμπλέκονται στην περιφέρεια των μικκυλίων.

Εν τέλει, μελετήθηκε η επίδραση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος στις ιδιότητες και τη συμπεριφορά των ήδη σχηματισμένων συμπλόκων, μέσω μετρήσεων DLS συναρτήσει της συγκέντρωσης του άλατος NaCl. Η αύξηση της συγκέντρωσης του NaCl έγινε και σε αυτή την περίπτωση μέσω σταδιακής προσθήκης κατάλληλων ποσοτήτων υδατικού διαλύματος NaCl συγκέντρωσης 1 M σε pH 7, στα ήδη παρασκευασμένα διαλύματα των συμπλόκων. Οι αντίστοιχες τιμές της έντασης σκέδασης I_{90} και της υδροδυναμικής ακτίνας R_h , για δύο αντιπροσωπευτικά διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL σε pH 7, με $C_{HEWL} = 0.05$ και 0.6 mg/ml, παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.11 συναρτήσει της ιοντικής ισχύος, η οποία κυμαίνεται από 0.01 έως 0.51 M.

Σε όλες τις περιπτώσεις, δεν παρατηρούνται ουσιαστικές μεταβολές της μάζας και του μεγέθους των συμπλόκων συναρτήσει της αυξανόμενης ιοντικής ισχύος του διαλύματος. Οπότε, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η προσθήκη άλατος στο διάλυμα δεν επηρεάζει τις ιδιότητες και την συμπεριφορά των συμπλόκων και για τα δύο συστήματα των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL. Προφανώς, οι συστάδες του PEO της κορώνας των μικκυλίων ενισχύουν σημαντικά τη διαλυτότητα των σχηματιζόμενων συμπλόκων και αποτρέπουν την μεταξύ τους συσσωμάτωση, καθώς επέρχεται η προάσπιση των φορτίων του συστήματος. Ειδικά στην περίπτωση του PS-SCPI-PEO, όπου οι συστάδες του PEO αποτελούν το εξωτερικό στρώμα της κορώνας των σχηματιζόμενων συμπλόκων. Για το σύστημα του SCPI-PS-PEO και της HEWL,

εκτός από τη διαλυτότητα που προσφέρουν οι αλυσίδες του PEO της κορώνας των μικκυλίων, η περιφερειακή κατανομή των μορίων της λυσοζύμης που χαρακτηρίζει τα σύμπλοκα, φαίνεται να ενισχύει περαιτέρω τη διαλυτότητά τους. Άλλωστε, η διαλυτότητα της λυσοζύμης είναι αρκετά υψηλή (μεγαλύτερη των 5 mg/ml) σε αυτή την τιμή του pH και στο συγκεκριμένο εύρος τιμών της ιοντικής ισχύος του διαλύματος, ακόμα και αν συνυπολογιστεί η μερική εξουδετέρωση του επιφανειακού φορτίου του πρωτεϊνικού μορίου, που λαμβάνει χώρα κατά τη σύμπλεξη.²⁴⁹



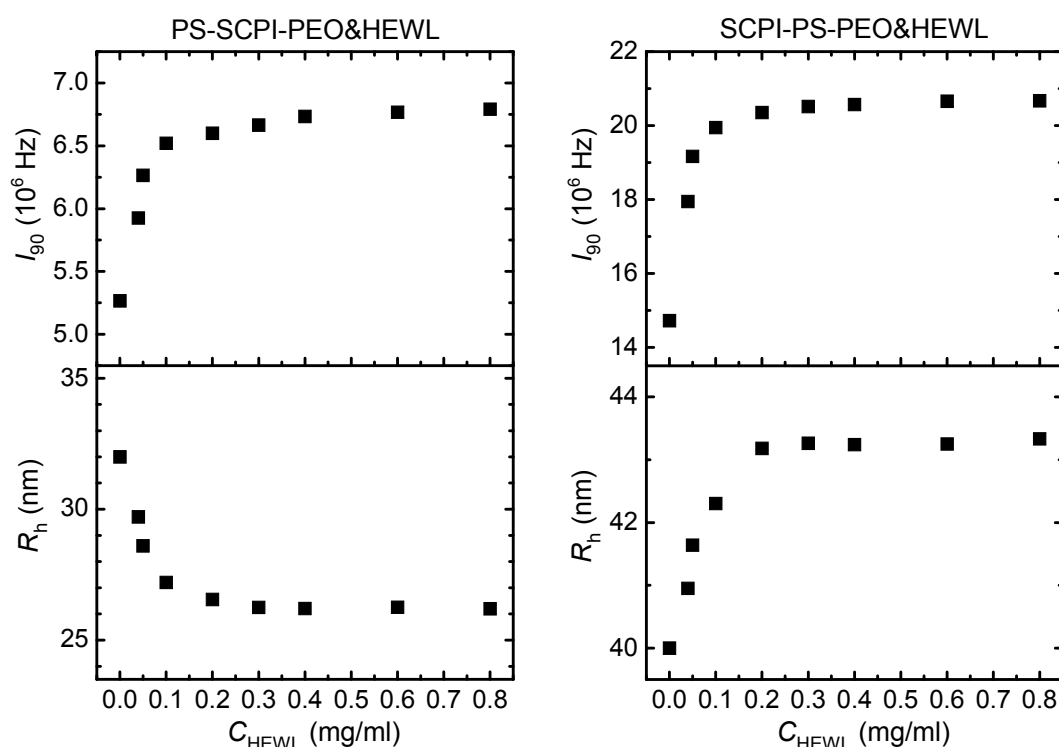
Σχήμα 5.11: Εξάρτηση από την ιοντική ισχύ της έντασης σκέδασης στις 90°, I_{90} , και της υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , για αντιπροσωπευτικά διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL σε pH 7, με $C_{HEWL} = 0.05$ και 0.6 mg/ml.

5.2.2. Σύμπλεξη σε pH 3 και ιοντική ισχύ 0.01 M

Η μελέτη της σύμπλεξης σε pH 3 αποκτά ξεχωριστό ενδιαφέρον, λόγω του διαφορετικού τρόπου απόκρισης των μικκυλίων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών στη μείωση της πυκνότητας φορτίου των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων, καθώς και του αυξημένου επιφανειακού φορτίου της λυσοζύμης.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων DLS των διαλυμάτων συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL

σε pH 3 με $I = 0.01$ M, παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.12, όπου παρατίθενται οι διορθωμένες ως προς τη συγκέντρωση τιμές της έντασης σκέδασης στις 90° , I_{90} , και οι αντίστοιχες τιμές της υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης στο διάλυμα, C_{HEWL} . Η συγκέντρωση των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO είναι σταθερή και ίση με 0.075 mg/ml και στις δύο σειρές διαλυμάτων. Υπενθυμίζεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις το πρώτο σημείο αντιστοιχεί στα διαλύματα των καθαρών τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών.



Σχήμα 5.12: Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M.

Μέσω του Σχήματος 5.12 διαπιστώνεται ότι οι τιμές των I_{90} και R_h εμφανίζουν παρόμοια μεταβολή, συναρτήσει της C_{HEWL} , με την αντίστοιχη που παρατηρήθηκε σε pH 7. Βέβαια, οι παρατηρούμενες μεταβολές είναι μικρότερες σε όλες τις περιπτώσεις, καθώς η μειωμένη πυκνότητα φορτίου των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων του SCPI, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των μορίων λυσοζύμης που συμπλέκονται με αυτές. Επομένως, η αύξηση της μάζας των συμπλόκων και για τα δύο συστήματα των PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, είναι μικρότερη από ότι σε pH 7. Αντίστοιχα, η μείωση του μεγέθους των

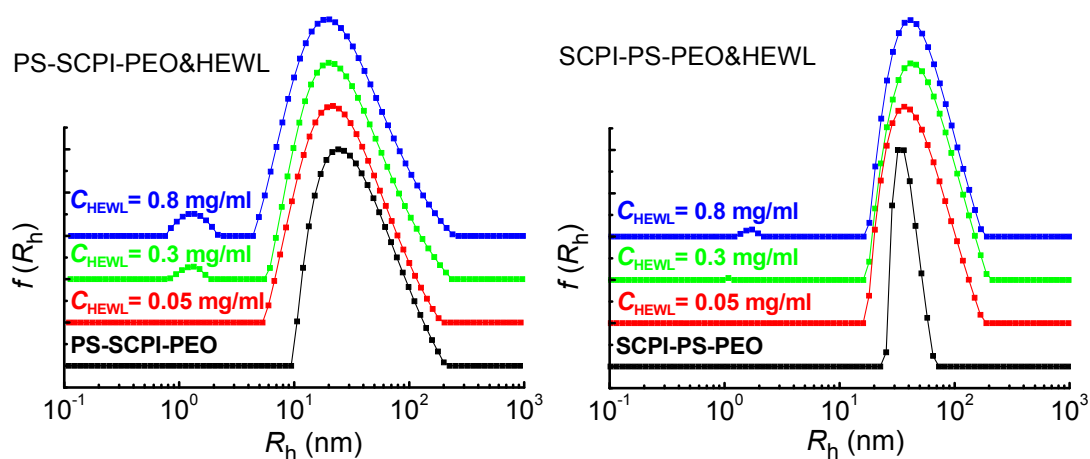
συμπλεγμένων με λυσοζύμη μικκυλίων του PS-SCPI-PEO είναι ασθενέστερη, καθώς η εξουδετέρωση των φορτίων της πολυηλεκτρολυτικής συστάδας και η κατ' επέκταση συρρίκνωσή τους πραγματοποιούνται σε μικρότερο βαθμό. Ενώ, στην περίπτωση των συμπλόκων του SCPI-PS-PEO και της HEWL, το μέγεθος των συμπλόκων εμφανίζει μικρότερη αύξηση, μιας και ο αριθμός των πρωτεϊνικών μορίων που συμπλέκονται στην περιφέρεια των μικκυλίων είναι μειωμένος.

Επιπροσθέτως, η δυνατότητα ενσωμάτωσης μορίων λυσοζύμης στην κορώνα των μικκυλίων, φαίνεται να είναι περιορισμένη και σε αυτή την τιμή του pH. Στο συμπέρασμα αυτό οδηγεί το γεγονός ότι η μάζα και το μέγεθος των συμπλόκων δεν μεταβάλλονται σημαντικά για τιμές της $C_{HEWL} > 0.2$ και 0.1 , για τα δύο συστήματα των PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, αντίστοιχα. Παρόλα αυτά, ο συνολικός αριθμός των συμπλεγμένων πρωτεϊνικών μορίων ανά μικκύλιο, αναμένεται και σε αυτή την περίπτωση να είναι μεγαλύτερος για το σύστημα του SCPI-PS-PEO, λόγω του αυξημένου αριθμού συσσωμάτωσης των συγκεκριμένων μικκυλίων. Τέλος, η διατήρηση της διαλυτότητας των σχηματιζόμενων συμπλόκων, σε όλο το εύρος των τιμών της C_{HEWL} , παρατηρείται και σε αυτή την τιμή του pH του διαλύματος, εξαιτίας της παρουσίας των συστάδων του PEO, οι οποίες αποτρέπουν τη συσσωμάτωση των συμπλόκων και τον επακόλουθο διαφασικό διαχωρισμό του διαλύματος.

Η ανάλυση CONTIN των μετρήσεων DLS στις 90° , παρέχει τις κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων του συστήματος, μέσω της μεταβολής των οποίων εξάγονται συμπληρωματικές πληροφορίες για τα συστήματα των συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M. Οι κατανομές αυτές, για αντιπροσωπευτικές τιμές της συγκέντρωσης της HEWL, παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.13, όπου επίσης παρατίθενται για λόγους σύγκρισης, οι αντίστοιχες κατανομές των διαλυμάτων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών.

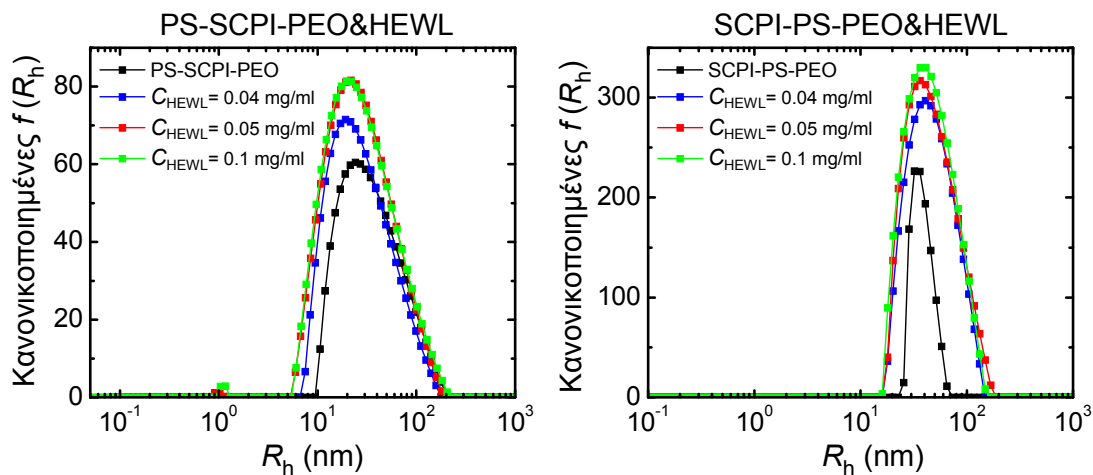
Οι μεταβολές των κατανομών των υδροδυναμικών ακτίνων είναι αντίστοιχες με αυτές που παρατηρήθηκαν σε pH 7. Για το σύστημα του PS-SCPI-PEO και της HEWL, η αύξηση της συγκέντρωσης της λυσοζύμης συνεπάγεται μικρή μετατόπιση της κύριας κορυφής των κατανομών, η οποία αντιστοιχεί στα συμπλεγμένα με λυσοζύμη μικκύλια, προς μικρότερες ακτίνες. Η μεταβολή αυτή καταδεικνύει τη μικρή μείωση του μεγέθους των συμπλόκων, εξαιτίας της συρρίκνωσης των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων της κορώνας των μικκυλίων κατά τη σύμπλεξη.

Αντίθετα, για το σύστημα του SCPI-PS-PEO και της HEWL, η κύρια κορυφή μετατοπίζεται ελαφρώς προς μεγαλύτερες ακτίνες, υποδηλώνοντας τη μικρή αύξηση του μεγέθους των συμπλόκων, λόγω της σύμπλεξης των πρωτεϊνικών μορίων στην περιφέρεια των μικκυλίων. Παρόλα αυτά, οι κατανομές δεν μεταβάλλονται περαιτέρω για τις μεγαλύτερες τιμές της C_{HEWL} και στις δύο περιπτώσεις, λόγω της περιορισμένης δυνατότητας ενσωμάτωσης μορίων λυσοζύμης στην κορώνα των μικκυλίων. Για τον ίδιο λόγο, ο αριθμός των μη συμπλεγμένων πρωτεϊνικών μορίων στο διάλυμα, αυξάνεται συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης και η διάκρισή τους καθίσταται δυνατή, όπως υποδηλώνει η εμφάνιση της αντίστοιχης κορυφής για τα διαλύματα των συμπλόκων με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις λυσοζύμης.



Σχήμα 5.13: Κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90°, για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M, για $C_{HEWL} = 0.05, 0.3$ και 0.8 mg/ml. Οι αντίστοιχες κατανομές των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών παρατίθενται επίσης, για λόγους σύγκρισης.

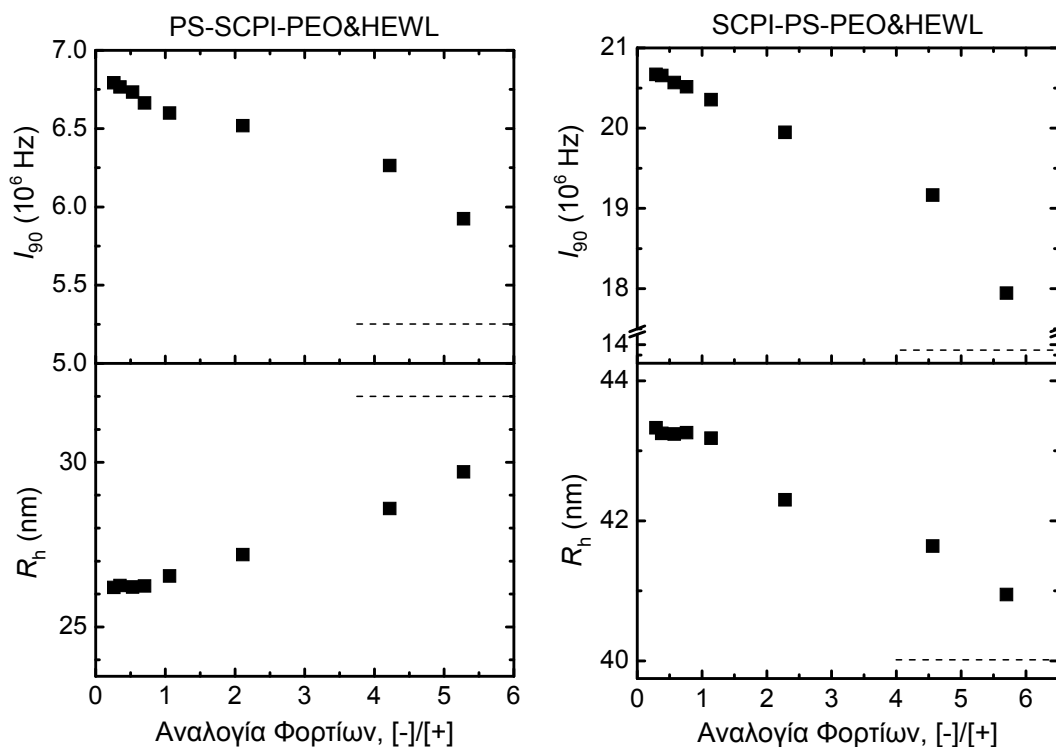
Οι διαφοροποιήσεις της έντασης που εμφανίζουν οι κανονικοποιημένες, ως προς τη συνολική ένταση σκέδασης του διαλύματος, κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων, για τα διαλύματα των συμπλόκων στην περιοχή των χαμηλών συγκεντρώσεων της HEWL, οι οποίες παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.14, αποτελούν επιπρόσθετη επιβεβαίωση της διαδικασίας της σύμπλεξης. Καθώς η μάζα των σκεδαζόντων σωματιδίων στα διαλύματα των συμπλόκων είναι μεγαλύτερη από αυτή των διαλυμάτων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών, παρά την ομοιότητα των κατανομών των υδροδυναμικών ακτίνων μεταξύ των διαφορετικών διαλυμάτων. Υπενθυμίζεται ότι η κανονικοποίηση των κατανομών έχει γίνει με τον τρόπο που περιγράφηκε στην αντίστοιχη περίπτωση του Σχήματος 3.12.



Σχήμα 5.14: Κανονικοποιημένες, ως προς τη συνολική ένταση του διαλύματος, κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90° , για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M, για $C_{\text{HEWL}} = 0.04, 0.05$ και 0.1 mg/ml. Οι αντίστοιχες κανονικοποιημένες κατανομές των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών παρατίθεται επίσης, για λόγους σύγκρισης.

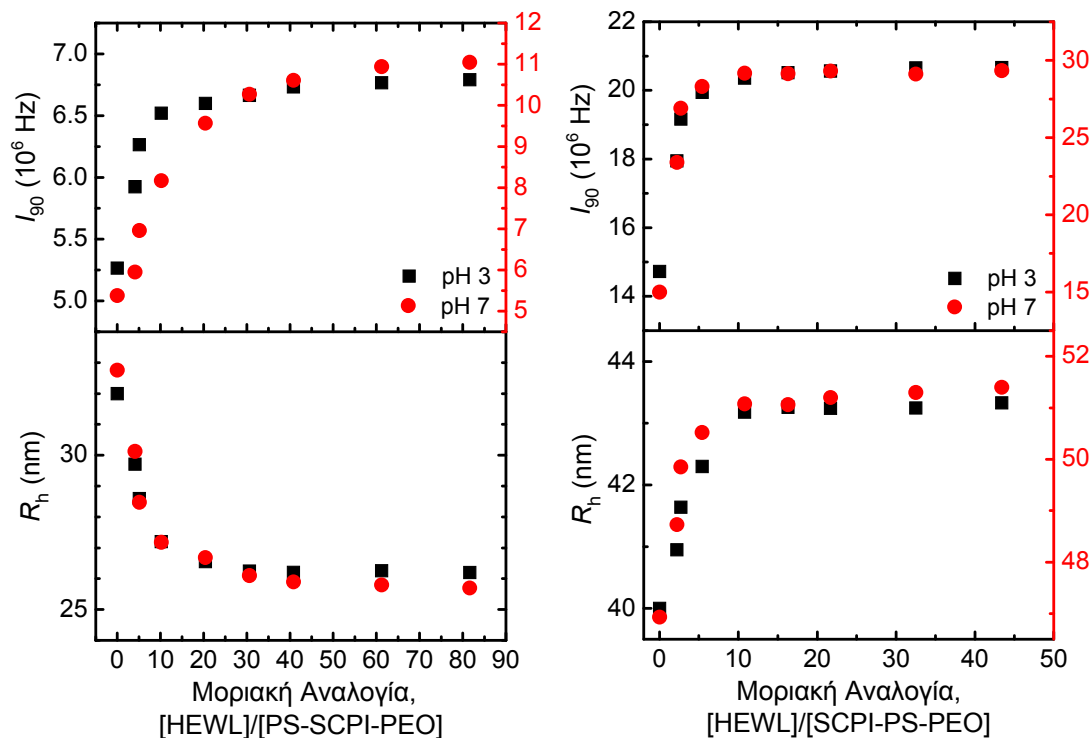
Όσον αφορά την εξάρτηση της μάζας και του μεγέθους των συμπλόκων από την αναλογία των φορτίων του συστήματος, στο Σχήμα 5.15 παρουσιάζονται οι τιμές της έντασης σκέδασης στις 90° , I_{90} , και της υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$, για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M, όπου οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν τις αντίστοιχες τιμές των διαλυμάτων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών.

Οι παρατηρούμενες μεταβολές αντικατοπτρίζουν τη μείωση της μάζας των συμπλόκων και των δύο συστημάτων, ως συνέπεια της μείωσης του αριθμού των μορίων λυσοζύμης που αλληλεπιδρούν με κάθε πολυηλεκτρολυτική συστάδα. Επίσης, σηματοδοτούν την αύξηση του μεγέθους των συμπλόκων του PS-SCPI-PEO και της HEWL, λόγω της έκτασης των συστάδων του SCPI καθώς μειώνεται ο βαθμός εξουδετέρωσης των φορτίων τους. Αλλά και τη μείωση του μεγέθους των συμπλόκων του SCPI-PS-PEO και της HEWL, λόγω του μειούμενου αριθμού συμπλεγμένων πρωτεϊνικών μορίων στην περιφέρεια των μικκυλίων.



Σχήμα 5.15: Ένταση σκέδασης στις 90°, I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της αναλογίας φορτίων [-]/[+], για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M. Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν τις αντίστοιχες τιμές των διαλυμάτων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών.

Επιπρόσθετο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων DLS σε pH 7 και σε pH 3, συναρτήσει της μοριακής αναλογίας των δύο συστατικών του εκάστοτε συστήματος. Δηλαδή, της αναλογίας των συνολικών moles της λυσοζύμης, ως προς τα αντίστοιχα moles των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών στον συνολικό όγκο του διαλύματος, $[HEWL]/[PS-SCPI-PEO]$ και $[HEWL]/[SCPI-PS-PEO]$, η οποία προσδιορίζει τον αριθμό των πρωτεϊνικών μορίων που αντιστοιχούν σε κάθε μία αλυσίδα των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών και κατ' επέκταση σε κάθε συστάδα του SCPI. Ως εκ τούτου, στο Σχήμα 5.16 παρουσιάζονται οι τιμές των I_{90} και R_h για τα διαλύματα των συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 και 3 με $I = 0.01$ M, συναρτήσει της μοριακής αναλογίας του κάθε συστήματος. Επισημαίνεται ότι οι τιμές του I_{90} των διαλυμάτων σε pH 7 αντιστοιχούν στην κλίμακα του δεξιού άξονα y , όπως επίσης και οι τιμές της R_h για το σύστημα του SCPI-PS-PEO και της HEWL.

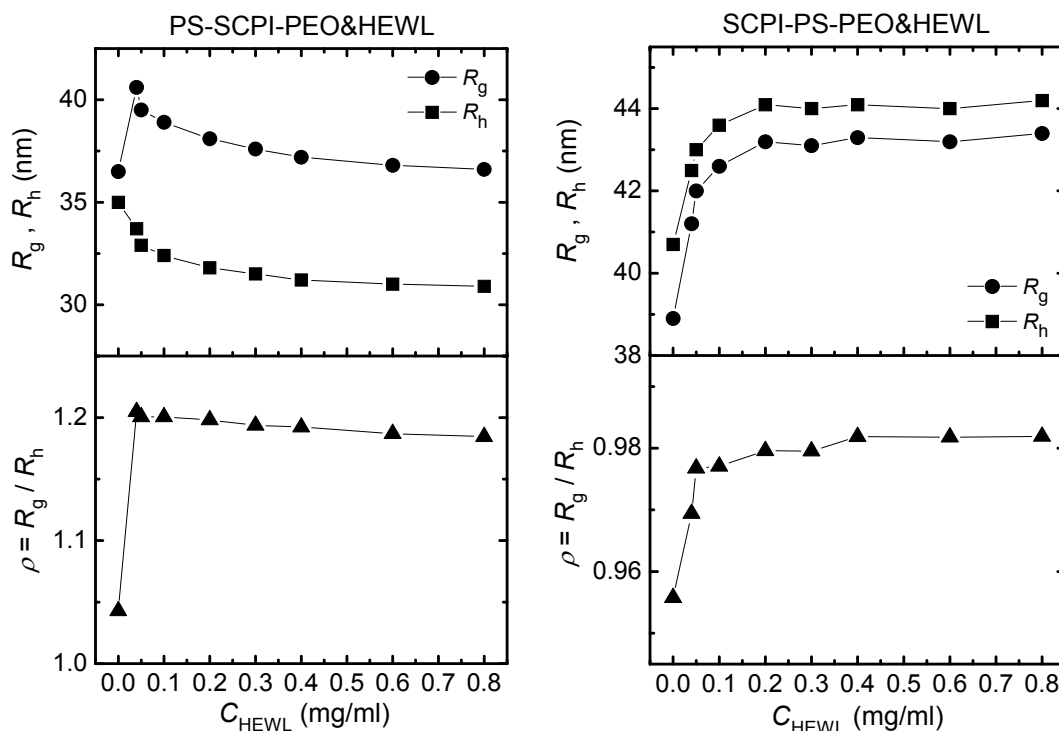


Σχήμα 5.16: Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , συναρτήσει της μοριακής αναλογίας $[\text{HEWL}]/[\text{PS-SCPI-PEO}]$ και $[\text{HEWL}]/[\text{SCPI-PS-PEO}]$, για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 3 και 7 με $I = 0.01 \text{ M}$.

Η σημαντικότερη διαφορά μεταξύ των διαλυμάτων σε pH 7 και 3 και για τα δύο συστήματα, έγκειται στις τιμές του I_{90} , οι οποίες εμφανίζονται αρκετά μειωμένες σε pH 3, καταδεικνύοντας τη μειωμένη μάζα των συμπλόκων, καθώς για την ίδια μοριακή αναλογία ο αριθμός των συμπλεγμένων μορίων λυσοζύμης ανά πολυηλεκτρολυτική συστάδα είναι αρκετά μικρότερος σε pH 3 από ότι σε pH 7. Στο γεγονός αυτό οφείλονται και οι διαφοροποιήσεις των μεταβολών των τιμών της R_h . Συγκεκριμένα, η παρατηρούμενη μείωση για το σύστημα του PS-SCPI-PEO και της HEWL, είναι ελαφρώς εντονότερη σε pH 7, ως αποτέλεσμα του αυξημένου βαθμού εξουδετέρωσης των φορτίων της συστάδας του SCPI. Αντίστοιχα, η αύξηση των τιμών της R_h που παρατηρείται στην περίπτωση του συστήματος του SCPI-PS-PEO και της HEWL, είναι και πάλι εντονότερη σε pH 7, καθώς τα συμπλεγμένα στην περιφέρεια των μικκυλίων πρωτεϊνικά μόρια είναι περισσότερα από ότι σε pH 3.

Παράλληλα με τις μετρήσεις δυναμικής σκέδασης πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός (SLS) σε πολλαπλές γωνίες, για τα διαλύματα των συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-

PEO και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M, ώστε να εξαχθούν οι τιμές των ακτίνων R_g και R_h , καθώς και του χαρακτηριστικού τους λόγου ρ , οι οποίες παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.17 ως συνάρτηση της C_{HEWL} .

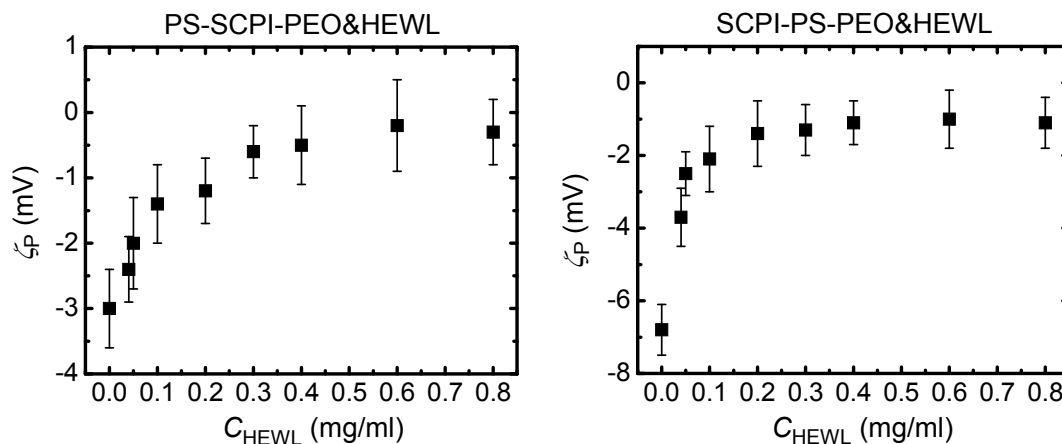


Σχήμα 5.17: Γυροσκοπική ακτίνα, R_g , υδροδυναμική ακτίνα (μέσω μετρήσεων σε πολλαπλές γωνίες), R_h , και λόγος $\rho = R_g/R_h$, συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M.

Οι τιμές των ακτίνων R_g και R_h , καθώς και του λόγου ρ μεταβάλλονται συναρτήσει της C_{HEWL} με τρόπο ανάλογο των όσων έχουν παρατηρηθεί μέχρι τώρα, αναφορικά με τις μεταβολές του μεγέθους και της διαμόρφωσης των συμπλόκων των δύο συστημάτων. Για το σύστημα του PS-SCPI-PEO και της HEWL, παρατηρείται μικρή μείωση των R_g , R_h και ρ , λόγω της μείωσης του μεγέθους των συμπλόκων και της λιγότερο εκτεταμένης διαμόρφωσης των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων του SCPI. Ενώ, στην περίπτωση του SCPI-PS-PEO και της HEWL, καταγράφεται μικρή αύξηση, η οποία οφείλεται στη μεταβολή της κατανομής της μάζας των συμπλόκων, λόγω της σύμπλεξης των μορίων της λυσοζύμης στην περιφέρεια των μικκυλίων.

Μετρήσεις ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός (ELS), προσέφεραν περαιτέρω πληροφορίες αναφορικά με το ενεργό φορτίο των συμπλόκων σε pH 3. Στο Σχήμα 5.18 παρουσιάζονται οι τιμές του ζ_p για τα διαλύματα των συμπλόκων των

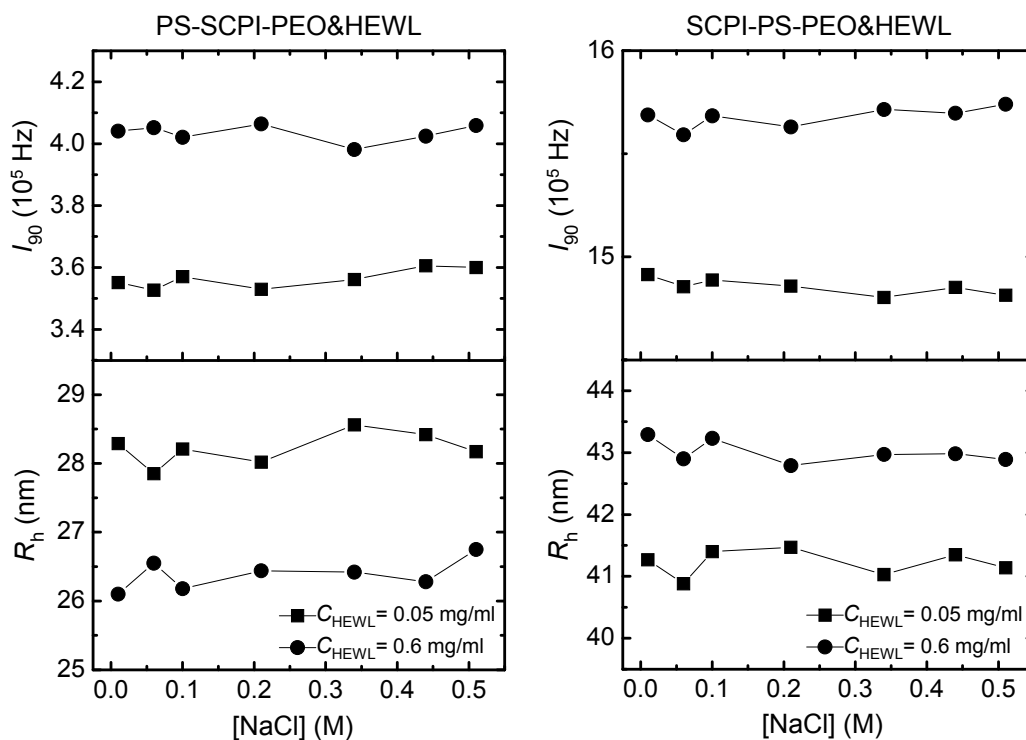
τρισταδιακών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M, συναρτήσει της C_{HEWL} .



Σχήμα 5.18: Δυναμικό ζήτα, ζ_p , συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων των τρισταδιακών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 3 με $I = 0.01$ M.

Μέσω της παρατηρούμενης μείωσης της απόλυτης τιμής του ζ_p , διαπιστώνεται ότι το ενεργό φορτίο των συμπλόκων μειώνεται συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης και για τα δύο συστήματα. Η μεταβολή αυτή αποδίδεται στην αύξηση του βαθμού εξουδετέρωσης των φορτίων των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων του SCPI, κατά τη σύμπλεξη τους με τα μόρια της λυσοζύμης. Επισημαίνεται, ότι και σε αυτή την τιμή του pH, οι τιμές του ζ_p είναι αρκετά μειωμένες κατ' απόλυτη τιμή, λόγω τόσο της μειωμένης πυκνότητας φορτίου των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων, όσο και της δομής των μικκυλίων, η οποία συνεπάγεται το μεγαλύτερο μέρος των φορτίων να βρίσκεται στο εσωτερικό της κορώνας τους.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις DLS συναρτήσει της αυξανόμενης συγκέντρωσης του άλατος NaCl, ώστε να διερευνηθεί η επίδραση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος στις ιδιότητες και τη συμπεριφορά των ήδη σχηματισμένων συμπλόκων. Σταδιακή προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων υδατικού διαλύματος NaCl συγκέντρωσης 1 M σε pH 3, στα ήδη παρασκευασμένα διαλύματα των συμπλόκων, οδήγησε στην επιθυμητή αύξηση της συγκέντρωσης του NaCl. Οι τιμές των I_{90} και R_h , που προκύπτουν από τις μετρήσεις αυτές, για δύο αντιπροσωπευτικά διαλύματα συμπλόκων των τρισταδιακών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL σε pH 3, με $C_{\text{HEWL}} = 0.05$ και 0.6 mg/ml, παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.19 συναρτήσει της ιοντικής ισχύος, η οποία κυμαίνεται από 0.01 έως 0.51 M.



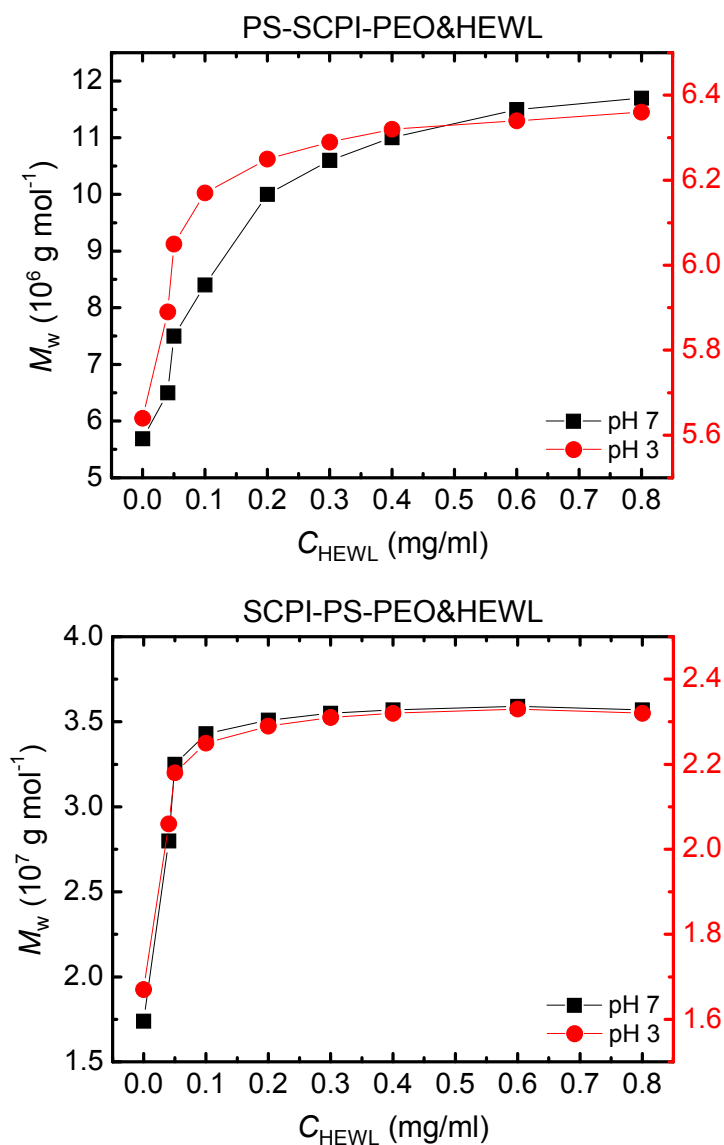
Σχήμα 5.19: Εξάρτηση από την ιοντική ισχύ της έντασης σκέδασης στις 90°, I_{90} , και της υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , για αντιπροσωπευτικά διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL σε pH 3, με $C_{HEWL} = 0.05$ και 0.6 mg/ml.

Τόσο η μάζα, όσο και το μέγεθος των συμπλόκων και των δύο συστημάτων παραμένουν πρακτικά αμετάβλητα κατά την προσθήκη άλατος στο διάλυμα, όπως παρατηρήθηκε και στην αντίστοιχη περίπτωση των διαλυμάτων συμπλόκων σε pH 7. Επομένως, η αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος δεν επηρεάζει τις ιδιότητες και τη συμπεριφορά των συμπλόκων και σε αυτή την τιμή του pH. Η συμβολή των συστάδων του PEO στη διαλυτότητα των συμπλόκων, αποδεικνύεται για ακόμα μία φορά καθοριστικής σημασίας, καθώς αποτρέπει τη συσσωμάτωσή τους, παρά την προάσπιση των φορτίων του συστήματος. Εκτός αυτού, στην περίπτωση των συμπλόκων του SCPI-PS-PEO και της HEWL, πρέπει να συνυπολογιστεί και η περιφερειακή κατανομή των μορίων της λυσοζύμης, η οποία ευνοεί περαιτέρω τη διαλυτότητα των συμπλόκων.²⁴⁹

5.2.3. Δομή των συμπλόκων

Η μεταβολή του φαινόμενου μοριακού βάρους των συμπλόκων συναρτῆσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, παρέχει επιπρόσθετη επιβεβαίωση των

συμπερασμάτων που έχουν εξαχθεί έως τώρα, αναφορικά με τη δομή των συμπλόκων. Ως εκ τούτου, στο Σχήμα 5.20 παρουσιάζονται οι τιμές του μοριακού βάρους M_w , που εξάγονται από τις μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός (SLS), για τα διαλύματα συμπλόκων των τριςυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 και 3 με $I = 0.01$ M, συναρτήσει της συγκέντρωσης της HEWL. Επισημαίνεται ότι οι τιμές του M_w για τα διαλύματα συμπλόκων σε pH 3 αντιστοιχούν στην κλίμακα του δεξιού άξονα y .



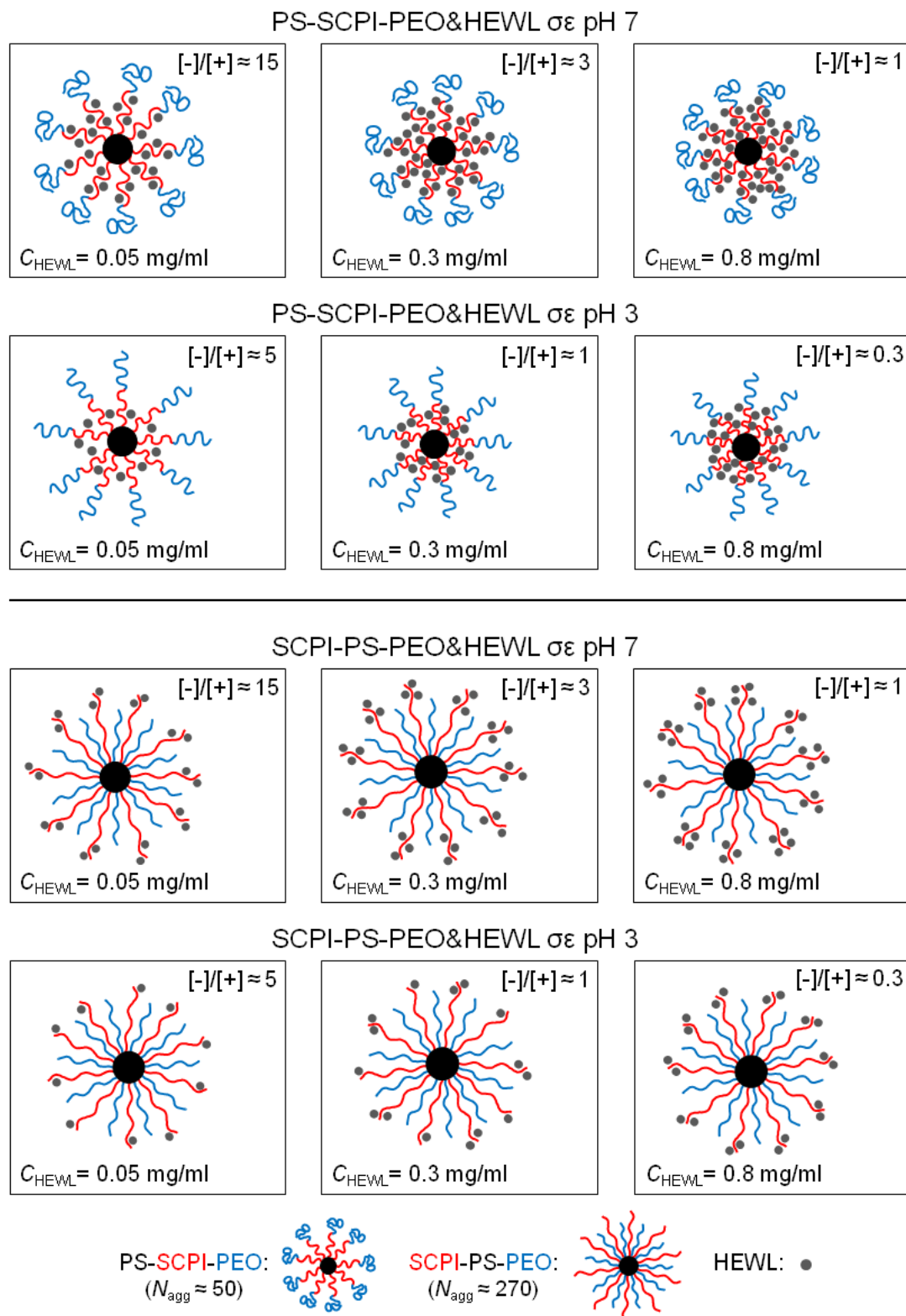
Σχήμα 5.20: Φαινόμενο μοριακό βάρος, M_w , συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα διαλύματα συμπλόκων των τριςυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 και 3 με $I = 0.01$ M.

Σε κάθε περίπτωση, η μεταβολή των τιμών του M_w συναρτήσει της C_{HEWL} είναι ανάλογη της αντίστοιχης συμπεριφοράς των τιμών της έντασης σκέδασης I_{90} . Η

παρατηρούμενη αύξηση του φαινομένου μοριακού βάρους, αντικατοπτρίζει την αύξηση της μάζας των συμπλόκων και των δύο συστημάτων, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της λυσοζύμης στο διάλυμα. Ο κατά προσέγγιση υπολογισμός του αριθμού των μικκυλίων και των πρωτεϊνικών μορίων που απαρτίζουν τα σύμπλοκα, καθίσταται δυνατός, μέσω της σύγκρισης των τιμών του M_w των διαλυμάτων των συμπλόκων, με τις αντίστοιχες τιμές για τα διαλύματα των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών, οι οποίες θεωρούνται ως οι τιμές του μοριακού βάρους των μικκυλίων, καθώς και του μοριακού βάρους της λυσοζύμης. Με τον τρόπο αυτό, εξάγεται η σχηματική αναπαράσταση της δομής των συμπλόκων του Σχήματος 5.21.

Μέσω της σχηματικής αναπαράστασης διαπιστώνεται ότι και για τα δύο συστήματα των PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, τόσο σε pH 7, όσο και σε pH 3 και σε όλο το εύρος των τιμών της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα αποτελούνται από ένα μικκύλιο των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών και μεταβαλλόμενο αριθμό πρωτεϊνικών μορίων. Η παρουσία των συστάδων του PEO στην κορώνα των μικκυλίων ενισχύει σημαντικά τη διαλυτότητα των συμπλόκων, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η μεταξύ τους συσσωμάτωση και ο συνεπαγόμενος διφασικός διαχωρισμός του διαλύματος.

Επιπροσθέτως, για το σύστημα του PS-SCPI-PEO και της HEWL, η σύμπλεξη με τα μόρια της λυσοζύμης και στις δύο τιμές του pH, συνεπάγεται την εξουδετέρωση των φορτίων των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων του SCPI. Το γεγονός αυτό οδηγεί στη συρρίκνωσή τους και κατ' επέκταση στη μείωση του μεγέθους των συμπλόκων, καθώς αυξάνεται η C_{HEWL} . Άλλωστε, ο αριθμός των συμπλεγμένων πρωτεϊνικών μορίων ανά πολυηλεκτρολυτική συστάδα, αυξάνεται συναρτήσει της αυξανόμενης συγκέντρωσης της λυσοζύμης. Παρόλα αυτά, η συγκεκριμένη αύξηση είναι σχετικά μικρή, ειδικά στην περιοχή των υψηλών τιμών της C_{HEWL} , καθώς η ενσωμάτωση των μορίων της λυσοζύμης στην κορώνα των μικκυλίων αυξάνει σημαντικά τους τοπολογικούς περιορισμούς του συστήματος και δυσχεραίνει την αλληλεπίδραση των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων με μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών μορίων. Βέβαια, η σύμπλεξη είναι εντονότερη σε pH 7 από ότι σε 3, εξαιτίας της αυξημένης πυκνότητας φορτίου των συστάδων του SCPI, η οποία επιτρέπει την αλληλεπίδραση των μικκυλίων με μεγαλύτερο αριθμό μορίων λυσοζύμης.



Σχήμα 5.21: Σχηματική αναπαράσταση της δομής των συμπλόκων, συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, C_{HEWL} , για τα συστήματα των τριυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL σε pH 7 και 3 με $I = 0.01 \text{ M}$. Οι αντίστοιχες τιμές της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$, συμπεριλαμβάνονται για λόγους σύγκρισης.

Αντίστοιχα, στην περίπτωση του SCPI-PS-PEO και της HEWL, ο υψηλός αριθμός συσσωμάτωσης των μικκυλίων, καθιστά τη δομή της κορώνας ιδιαίτερα συμπαγή, με αποτέλεσμα η εισχώρηση των μορίων της λυσοζύμης στο εσωτερικό της να μην είναι δυνατή και η σύμπλεξη να περιορίζεται στην εξωτερική περιφέρεια των μικκυλίων. Τόσο σε pH 7, όσο και σε 3, η αύξηση της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των περιφερειακά συμπλεγμένων πρωτεϊνικών μορίων. Όμως και πάλι, η αύξηση αυτή δεν είναι ιδιαίτερος σημαντική, καθώς οι διαθέσιμες θέσεις πρόσδεσης των μορίων της λυσοζύμης είναι περιορισμένες και η σύμπλεξη κάθε μορίου εμποδίζει την περαιτέρω αλληλεπίδραση των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας των μικκυλίων με την πρωτεΐνη. Τέλος, η αυξημένη πυκνότητα φορτίου των συστάδων του SCPI σε pH 7, συνεπάγεται εντονότερη σύμπλεξη σε σχέση με την αντίστοιχη διαδικασία σε pH 3.

Ισοδύναμα, η συμπεριφορά των συμπλόκων συναρτήσει της αναλογίας φορτίων [-]/[+] του συστήματος, υποδηλώνει τη μείωση του μεγέθους των συμπλόκων του PS-SCPI-PEO και της HEWL καθώς μειώνεται η αναλογία φορτίων, γεγονός που αντιστοιχεί σε αύξηση του βαθμού εξουδετέρωσης των φορτίων των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων και επιφέρει την περαιτέρω συρρίκνωσή τους. Για τα σύμπλοκα του SCPI-PS-PEO και της HEWL, η μείωση της αναλογίας φορτίων συνεπάγεται μικρή αύξηση του μεγέθους των συμπλόκων, λόγω της σύμπλεξης αυξανόμενου αριθμού πρωτεϊνικών μορίων στην περιφέρεια των μικκυλίων.

Η σύγκριση των δύο διαφορετικών συστημάτων επισημαίνει ότι τα μικκύλια του SCPI-PS-PEO αλληλεπιδρούν με μεγαλύτερο συνολικό αριθμό μορίων λυσοζύμης, από τα αντίστοιχα μικκύλια του PS-SCPI-PEO, εξαιτίας κυρίως του μεγαλύτερου αριθμού συσσωμάτωσης που τα χαρακτηρίζει. Υπενθυμίζεται, ότι ο αριθμός συσσωμάτωσης είναι περί τις 50 αλυσίδες ανά μικκύλιο για τον τρισυσταδικό πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI-PEO, ενώ περί τις 270 αλυσίδες ανά μικκύλιο για τον τρισυσταδικό πολυηλεκτρολύτη SCPI-PS-PEO. Επιπλέον, είναι εμφανές ότι η διαφορετική δομή της κορώνας των δύο μικκυλίων, η οποία είναι απόρροια της αρχιτεκτονικής του μακρομορίου, επιτάσσει τη διαφορετική διάταξη των μορίων της λυσοζύμης. Με την έννοια ότι, τα μικκύλια του PS-SCPI-PEO, ενσωματώνουν τα πρωτεϊνικά μόρια στο εσωτερικό στρώμα της κορώνας τους, ενώ στην περίπτωση του SCPI-PS-PEO, τα μόρια της λυσοζύμης κατανέμονται στην εξωτερική περιφέρεια των μικκυλίων.

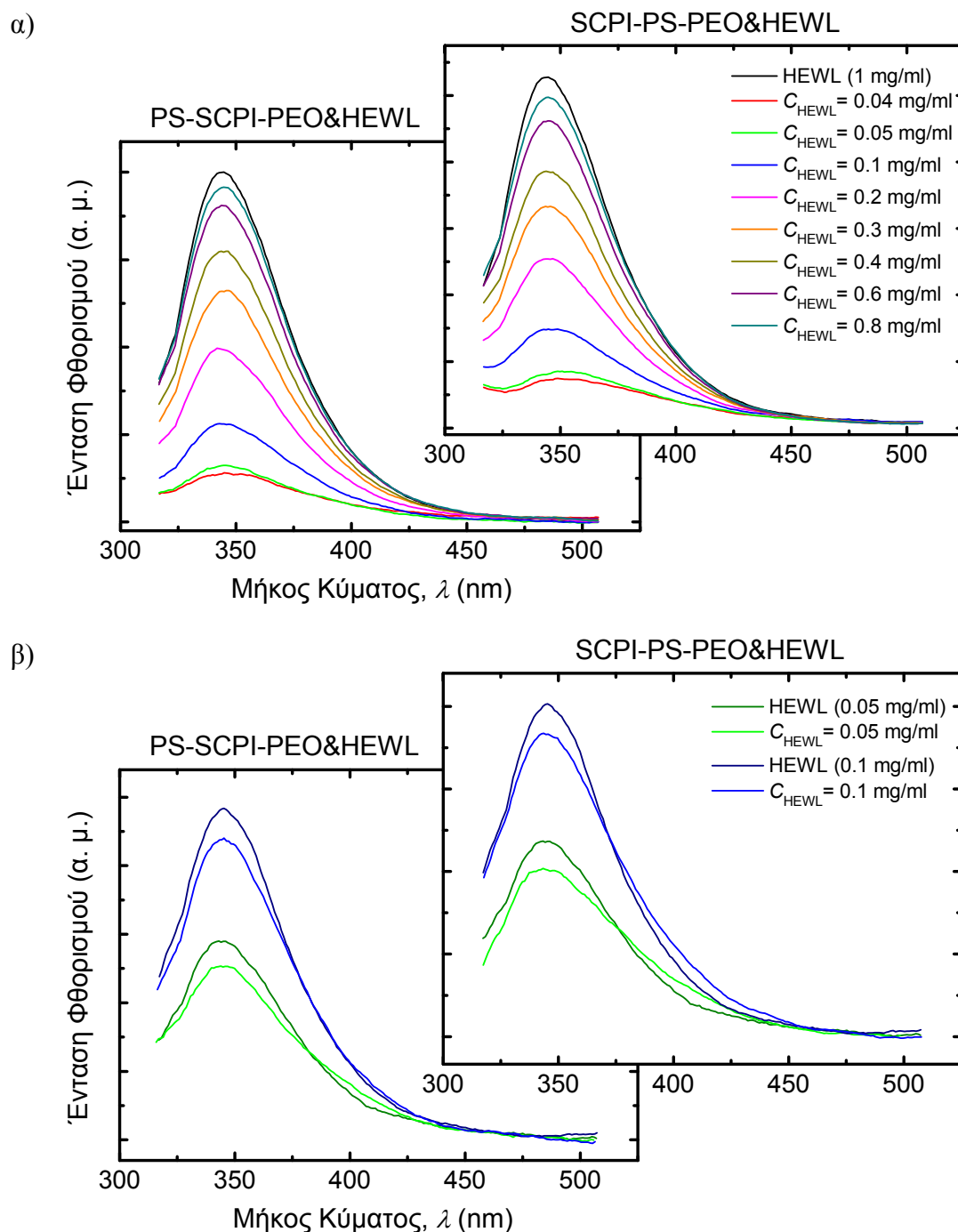
Τέλος, συγκριτικά με τα αντίστοιχα συστήματα συμπλόκων του ομοπολυμερικού (Σχήμα 3.23) και του δισυσταδικού (Σχήμα 4.21) πολυηλεκτρολύτη, τα συστήματα των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών, εμφανίζουν μειωμένο βαθμό αλληλεπίδρασης με τα μόρια της λυσοζύμης, δηλαδή ο αριθμός των συμπλεγμένων πρωτεϊνικών μορίων ανά πολυηλεκτρολυτική συστάδα είναι σημαντικά μικρότερος. Παράλληλα όμως, εμφανίζουν την ιδιότητα της διατήρησης της διαλυτότητας των σχηματιζόμενων συμπλόκων και την αποφυγή της συσσωμάτωσής τους, λόγω της παρουσίας των συστάδων του PEO, καθώς και την περιφερειακή διάταξη των μορίων της λυσοζύμης στην περίπτωση των συμπλόκων του SCPI-PS-PEO.

5.2.4. Δομή της συμπλεγμένης πρωτεΐνης

Η διερεύνηση της δομής της συμπλεγμένης πρωτεΐνης αποτελεί ζήτημα πρακτικού ενδιαφέροντος, καθώς η διατήρηση της διαμόρφωσης του μορίου της λυσοζύμης κατά τη σύμπλεξη, καθιστά δυνατή τη χρήση των συμπλόκων σε πιθανές νανοβιοϊατρικές εφαρμογές. Ως εκ τούτου, εφαρμόστηκαν διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές, ώστε να εξακριβωθεί η δομή της λυσοζύμης που περιέχεται στα σύμπλοκα των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών και παρακάτω παρουσιάζονται τα αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα για τα διαλύματα των συμπλόκων σε pH 7.

Αρχικά, τα διαλύματα συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7, με $I = 0.01$ M, μελετήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού¹⁷⁰⁻¹⁷³ και τα ληφθέντα φάσματα εκπομπής παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.22α. Το αντίστοιχο φάσμα διαλύματος ελεύθερης HEWL συγκέντρωσης 1 mg/ml περιλαμβάνεται επίσης για λόγους σύγκρισης.

Οι παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις της έντασης των φασμάτων φθορισμού των διαλυμάτων των συμπλόκων, οφείλονται στη διαφορετική συγκέντρωση της λυσοζύμης στο διάλυμα. Το γεγονός αυτό, δυσχεραίνει την απευθείας σύγκριση με το φάσμα της ελεύθερης λυσοζύμης, ειδικά στην περιοχή των χαμηλών τιμών της C_{HEWL} . Επομένως, στο Σχήμα 5.22β συγκρίνονται τα φάσματα των διαλυμάτων συμπλόκων των δύο συστημάτων με $C_{HEWL} = 0.05$ και 0.1 mg/ml, με τα αντίστοιχα φάσματα διαλυμάτων ελεύθερης HEWL συγκέντρωσης 0.05 και 0.1 mg/ml.

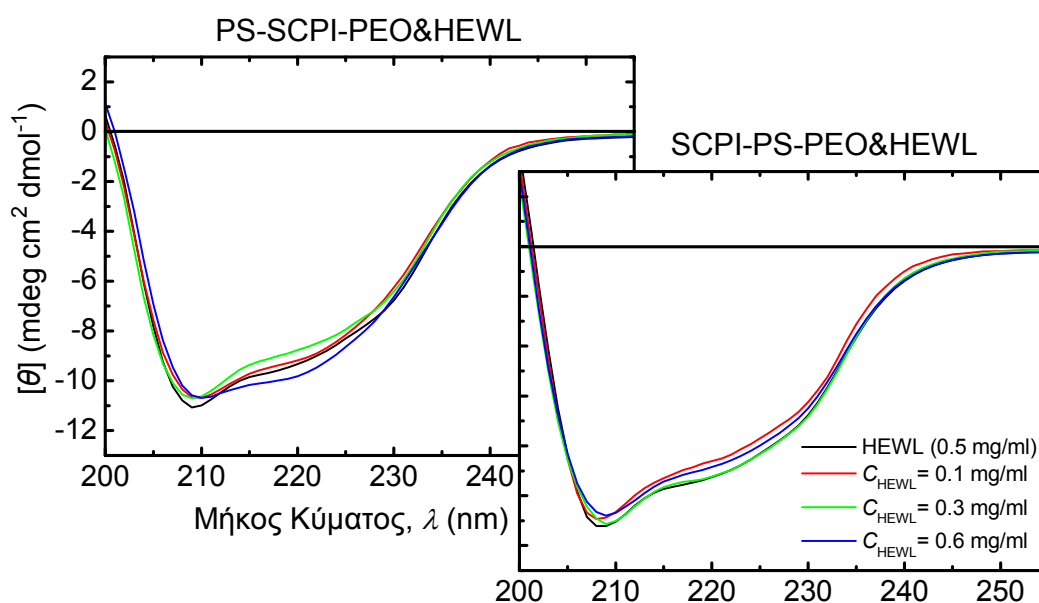


Σχήμα 5.22: α) Φάσματα φθορισμού των διαλυμάτων συμπλόκων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Συμπεριλαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα διαλύματος ελεύθερης HEWL συγκέντρωσης 1 mg/ml, β) Σύγκριση των φασμάτων φθορισμού, των διαλυμάτων συμπλόκων των δύο συστημάτων με $C_{\text{HEWL}} = 0.05$ και 0.1 mg/ml, με τα αντίστοιχα φάσματα διαλυμάτων ελεύθερης HEWL συγκέντρωσης 0.05 και 0.1 mg/ml.

Μέσω της σύγκρισης αυτής, καθίσταται εμφανές ότι τα γενικά φασματικά χαρακτηριστικά της ελεύθερης λυσοζύμης διατηρούνται στα διαλύματα των

συμπλόκων και των δύο συστημάτων, παρά τις διαφοροποιήσεις της έντασης. Όλα τα φάσματα εμφανίζουν μέγιστο περί τα 345 nm, χωρίς να παρατηρείται μετατόπιση σε όλο το εύρος των τιμών της C_{HEWL} . Υπενθυμίζεται, ότι ο βαθμός αλληλεπίδρασης των μικκυλίων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών με τα πρωτεϊνικά μόρια, είναι μειωμένος σε σχέση με τα αντίστοιχα συστήματα του ομοπολυμερικού και του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη, οπότε σε αυτή την περίπτωση ο σχηματισμός πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων εντός των συμπλόκων, που θα οδηγούσε σε μετατόπιση του φάσματος, είναι μάλλον απίθανος. Επομένως, συμπεραίνεται ότι η δομή της πρωτεΐνης παραμένει αμετάβλητη κατά τη σύμπλεξη.

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκαν φασματοσκοπικές μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού (CD),¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ για αντιπροσωπευτικά διαλύματα συμπλόκων με $C_{HEWL} = 0.1, 0.3$ και 0.6 mg/ml, των συστημάτων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Τα φάσματα CD των διαλυμάτων των συμπλόκων, καθώς και το αντίστοιχο φάσμα διαλύματος ελεύθερης HEWL συγκέντρωσης 0.5 mg/ml, παρουσιάζονται, στην περιοχή του άπω υπεριώδους, στο Σχήμα 5.23. Είναι εμφανές ότι τα φάσματα της ελεύθερης και της συμπλεγμένης λυσοζύμης δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές και η γενική μορφή του φάσματος διατηρείται και για τα δύο συστήματα.



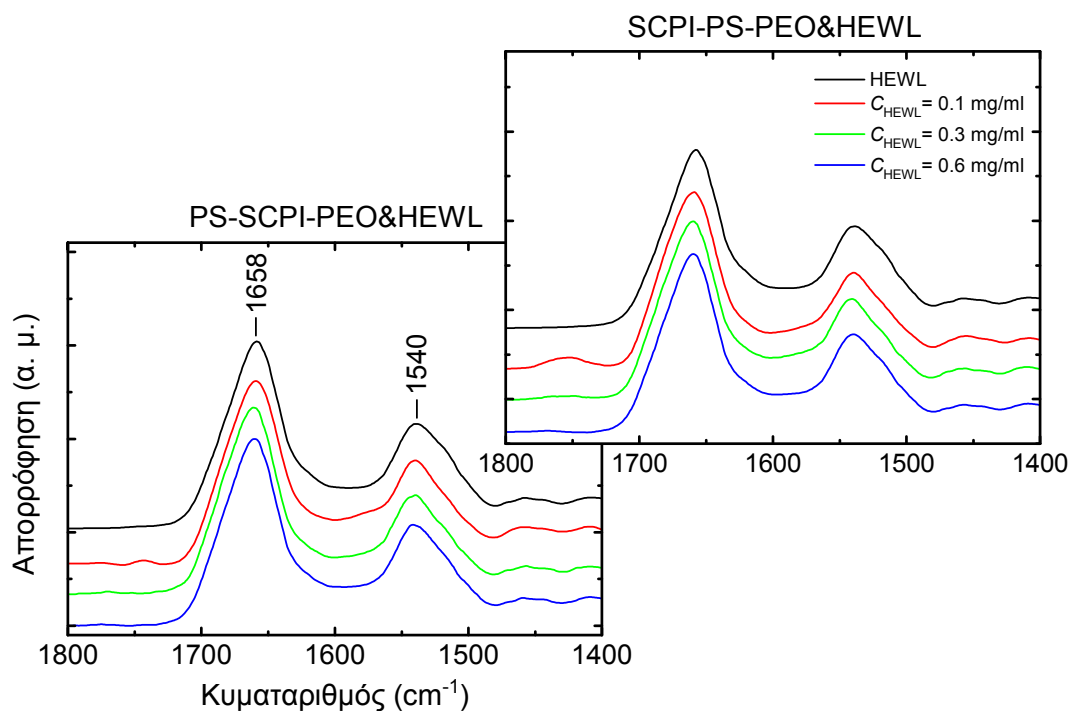
Σχήμα 5.23: Φάσματα κυκλικού διχρωισμού, στην περιοχή του άπω υπεριώδους, των διαλυμάτων συμπλόκων με $C_{HEWL} = 0.1, 0.3$ και 0.6 mg/ml, των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M. Συμπεριλαμβάνεται το φάσμα διαλύματος ελεύθερης HEWL συγκέντρωσης 0.5 mg/ml.

Τα φάσματα του Σχήματος 5.23 αναλύθηκαν μέσω των προγραμμάτων SELCON3, CONTIN, CDSSTR και K2D, ώστε να εξαχθούν τα ποσοστά των επιμέρους δευτεροταγών δομών της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα που παρείχαν οι διάφορες μέθοδοι ήταν παρόμοια, επομένως στον Πίνακα 5.5 παρουσιάζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων όλων των μεθόδων. Όπως καταδεικνύει η ανάλυση των φασμάτων, η δευτεροταγής δομή της λυσοζύμης διατηρείται σε όλα τα διαλύματα των συμπλόκων και των δύο συστημάτων, καθώς τα επιμέρους ποσοστά παραμένουν πρακτικά αμετάβλητα. Η διαπίστωση αυτή υποδηλώνει ότι η διαδικασία της σύμπλεξης δεν επιφέρει διατάραξη της διαμόρφωσης του πρωτεϊνικού μορίου.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶

Πίνακας 5.5: Συγκεντρωτικά ποσοστά των επιμέρους δευτεροταγών δομών της πρωτεΐνης, όπως εξάγονται από την ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού, των αντιπροσωπευτικών διαλυμάτων συμπλόκων, των συστημάτων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01$ M, καθώς και της ελεύθερης HEWL.

Δείγμα		α-έλικα (%)	β-φύλλο (%)	Τυχαία διαμόρφωση (%)
HEWL (0.5 mg/ml)		33	17	50
PS-SCPI-PEO&HEWL	$C_{\text{HEWL}} = 0.1$ mg/ml	32	18	50
	$C_{\text{HEWL}} = 0.3$ mg/ml	32	18	50
	$C_{\text{HEWL}} = 0.6$ mg/ml	32	18	50
SCPI-PS-PEO&HEWL	$C_{\text{HEWL}} = 0.1$ mg/ml	33	18	49
	$C_{\text{HEWL}} = 0.3$ mg/ml	31	16	53
	$C_{\text{HEWL}} = 0.6$ mg/ml	32	18	50

Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της φασματοσκοπίας μέσου υπερόυθρου (IR) για τη μελέτη αντιπροσωπευτικών διαλυμάτων συμπλόκων, με $C_{HEWL} = 0.1, 0.3$ και 0.6 mg/ml , των συστημάτων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01 \text{ M}$. Επομένως, στο Σχήμα 5.24 παρουσιάζονται τα φάσματα IR, στην περιοχή των κορυφών Amide I και II, των αντιπροσωπευτικών συμπλόκων των δύο συστημάτων, καθώς και το αντίστοιχο φάσμα ελεύθερης HEWL, για λόγους σύγκρισης. Επισημαίνεται ότι τα φάσματα έχουν υποστεί κανονικοποίηση ως προς την ένταση της κορυφής Amide I, αφού προηγουμένως διορθώθηκε η φασματική συνεισφορά των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών, μέσω κατάλληλης αφαίρεσης του αντίστοιχου φάσματος. Η παρατηρούμενη σταθερότητα της μορφής των κορυφών Amide I και II, καθώς και της συχνότητας εμφάνισης του μεγίστου περί τους 1658 και 1540 cm^{-1} , αντίστοιχα, στα διαλύματα των συμπλόκων και των δύο συστημάτων, καταδεικνύει την απουσία σημαντικών αλλαγών της διαμόρφωσης του μορίου της λυσοζύμης κατά τη σύμπλεξη.^{243, 244}



Σχήμα 5.24: Φάσματα μέσου υπερόυθρου, στην περιοχή των κορυφών Amide I και II, για αντιπροσωπευτικές τιμές της $C_{HEWL} = 0.1, 0.3$ και 0.6 mg/ml , των συστημάτων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 με $I = 0.01 \text{ M}$. Συμπεριλαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα της ελεύθερης HEWL.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε κατ' αρχήν μελέτη των ιδιοτήτων και της συμπεριφοράς σε υδατικό διάλυμα του συνθετικού πολυηλεκτρολύτη μετά νατρίου άλας του πολυ ((σουλφαμινοκαρβοξυλο)ισοπρενίου) (SCPI). Επίσης, διερευνήθηκε η αυτοοργάνωση, οι ιδιότητες και η συμπεριφορά σε διάλυμα των συμπολυμερών κατά συστάδες του πολυηλεκτρολύτη SCPI με πολυστυρένιο (PS), δισυσταδικός πολυηλεκτρολύτης PS-SCPI, αλλά και με πολυστυρένιο και πολυαιθυλοαινοξείδιο (PEO), τρισυσταδικοί πολυηλεκτρολύτες PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO. Τέλος, μελετήθηκε η διαδικασία της σύμπλεξης, καθώς και η δομή, οι ιδιότητες και η συμπεριφορά των σχηματιζόμενων συμπλόκων μεταξύ των συγκεκριμένων συνθετικών πολυηλεκτρολυτών και της λυσοζύμης (HEWL).

Ξεχωριστό ενδιαφέρον στη μελέτη αυτή προσέδωσαν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της μοριακής δομής του πολυηλεκτρολύτη SCPI, καθώς η παρουσία των ισχυρά φορτισμένων ομάδων SO_3^- και των ασθενώς φορτισμένων ομάδων COO^- στην ίδια τροποποιημένη μονομερική μονάδα, επιτρέπει τη μεταβολή της πυκνότητας φορτίου της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας συναρτήσει του pH του διαλύματος. Επιπροσθέτως, η αλυσίδα του SCPI έχει εν μέρει υδροφοβικό χαρακτήρα, επειδή φέρει μικρό ποσοστό μη τροποποιημένων μονάδων ισοπρενίου, γεγονός που ενισχύει της υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις του συστήματος. Όπως διαπιστώθηκε, οι ιδιότητες και η συμπεριφορά σε διάλυμα του πολυηλεκτρολύτη SCPI επηρεάζονται σημαντικά τόσο από την ιδιαίτερη μακρομοριακή δομή, όσο και από τις συνθήκες του διαλύματος, όπως η τιμή του pH και της ιοντικής ισχύος.

Αντίστοιχα, η αυτοοργάνωση, οι ιδιότητες και η συμπεριφορά των αμφιφιλικών πολυσυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI, PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO σε διάλυμα, παρουσίασε ανάλογο ενδιαφέρον, καθώς οι συγκεκριμένοι πολυηλεκτρολύτες συνδυάζουν τα χημικά χαρακτηριστικά και τη λειτουργικότητα των επιμέρους συστάδων τους. Συγκεκριμένα, η υδροφοβικότητα της συστάδας του πολυστυρενίου έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μικκυλίων σε υδατικά διαλύματα εξαιτίας της αυτοοργάνωσης των μακρομορίων. Τα μικκύλια αυτά αποτελούνται από

πυρήνα PS, ενώ η κορώνα τους απαρτίζεται από συστάδες SCPI, στην περίπτωση του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη, ή συστάδες SCPI και PEO, στην περίπτωση των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών, όπου η δομή της κορώνας είναι απόρροια της αρχιτεκτονικής του μακρομορίου. Επομένως, για το PS-SCPI-PEO η κορώνα αποτελείται από ένα εσωτερικό στρώμα των συστάδων του SCPI και ένα εξωτερικό στρώμα των συστάδων του PEO, ενώ στην περίπτωση του SCPI-PS-PEO σχηματίζεται μικτή κορώνα αποτελούμενη από αλυσίδες SCPI και PEO. Επιπλέον, λόγω της σχετικά υψηλής θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης του PS, η δομή των συγκεκριμένων μικκυλίων αποδείχθηκε ότι είναι «παγωμένη» σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, με την έννοια ότι ο αριθμός συσσωμάτωσης τους (N_{agg}) παραμένει σταθερός. Παράλληλα, η πολυηλεκτρολυτική φύση και τα ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά των συστάδων SCPI της κορώνας των μικκυλίων, καθιστά δυνατή την απόκριση των μικκυλίων στις αλλαγές των συνθηκών του διαλύματος, ενώ η παρουσία των υδρόφιλων συστάδων του PEO, παρέχει επιπρόσθετη διαλυτότητα στα μικκύλια των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών.

Η διερεύνηση της διαδικασίας της σύμπλεξης των συνθετικών πολυηλεκτρολυτών και της λυσοζύμης, παρείχε πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τις ηλεκτροστατικές, αλλά και τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των δύο ειδών μακρομορίων. Η μεταβαλλόμενη πυκνότητα φορτίου των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων του SCPI, καθώς και η τιμή του καθαρού φορτίου του πρωτεϊνικού μορίου συναρτήσκει του pH του διαλύματος, αποτέλεσαν εφελκυστήρια για τη μελέτη της σύμπλεξης τόσο σε pH 7, όπου οι πολυηλεκτρολυτικές συστάδες χαρακτηρίζονται από υψηλή πυκνότητα φορτίου (περί τα δύο αρνητικά φορτία ανά τροποποιημένη μονομερική μονάδα) και το μόριο της λυσοζύμης έχει θετικό φορτίο ίσο με + 8, όσο και σε pH 3, όπου η πυκνότητα φορτίου των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων μειώνεται περίπου στο μισό (λόγω της πρωτονίωσης των καρβοξυλικών ομάδων) και η λυσοζύμη φέρει θετικό φορτίο ίσο με + 14. Οι ιδιότητες, η συμπεριφορά και η δομή των σχηματιζόμενων συμπλόκων καθορίζονται από πλήθος παραγόντων, όπως η σχετική αναλογία των δύο συστατικών του συστήματος, η τιμή του pH και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος, καθώς και η μακρομοριακή αρχιτεκτονική του εκάστοτε πολυηλεκτρολύτη.

Η μελέτη των ιδιοτήτων σε διάλυμα των πολυηλεκτρολυτών και των συμπλόκων τους με λυσοζύμη, στηρίχθηκε κυρίως σε τεχνικές δυναμικής, στατικής

και ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός, ενώ φασματοσκοπικές μέθοδοι φθορισμού, κυκλικού διχρωισμού και μέσου υπερύθρου χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση της δομής της συμπλεγμένης πρωτεΐνης. Επιπρόσθετη θερμοδομετρική ανάλυση ισόθερμης τιτλοδότησης και διαφορικής σάρωσης, πραγματοποιήθηκε για το σύστημα του ομοπολυμερικού πολυηλεκτρολύτη SCPI και της HEWL. Τα βασικότερα συμπεράσματα που εξήχθησαν για τα υπό μελέτη συστήματα παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω.

6.1. Πολυηλεκτρολύτης SCPI και σύμπλοκά του με λυσοζύμη

Οι ιδιότητες του ομοπολυμερικού πολυηλεκτρολύτη SCPI, μελετήθηκαν σε υδατικά διαλύματα με pH 7 και 3 και ιοντική ισχύ $I = 0.01$ M, για δύο δείγματα διαφορετικού μοριακού βάρους, SCPI-54K και SCPI-21K.

Οι μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός κατέδειξαν την ύπαρξη μίας γρήγορης και μίας αργής διαδικασίας χαλάρωσης του συστήματος, σε κάθε περίπτωση, οι οποίες αντιστοιχούν στη συζευγμένη διάχυση των μεμονωμένων αλυσίδων του πολυηλεκτρολύτη και των αντισταθμιστικών ιόντων του διαλύματος και στο σχηματισμό περιοχών πολλαπλών αλυσίδων, εξαιτίας των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αλυσίδων του πολυηλεκτρολύτη, αντίστοιχα. Μέσω συμπληρωματικών μετρήσεων στατικής σκέδασης φωτός, διαπιστώθηκε ότι η μάζα και η πυκνότητα των περιοχών πολλαπλών αλυσίδων είναι σχετικά μικρές (αποτελούνται από λίγες αλυσίδες), ότι είναι λίγες σε αριθμό και ότι χαρακτηρίζονται από σχετικά χαλαρή δομή.

Η μείωση της πυκνότητας φορτίου της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας σε pH 3, οδήγησε σε εξασθένηση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων του συστήματος, γεγονός που είχε ως συνέπεια τη μείωση τόσο των αλληλεπιδράσεων της αλυσίδας με τα αντισταθμιστικά ιόντα, όσο και του σχηματισμού περιοχών πολλαπλών αλυσίδων. Μέσω της σύγκρισης των δύο δειγμάτων διαφορετικού μοριακού βάρους, διαπιστώθηκε ότι σε pH 7 οι μεγαλύτερου μήκους αλυσίδες σχηματίζουν περισσότερες ή/και πυκνότερες περιοχές πολλαπλών αλυσίδων. Αντίστοιχα, σε pH 3, οι αλλαγές που επιφέρει η μείωση της πυκνότητας φορτίου είναι περισσότερο έντονες στην περίπτωση του δείγματος μικρότερου μοριακού βάρους, προκαλώντας σημαντική μείωση της διαλυτότητας των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων, η οποία επιφέρει τη συσσωμάτωσή τους και τελικά καταλήγει στην καθίζηση του

πολυμερούς. Η συμπεριφορά αυτή αποδίδεται στη σχετική αδυναμία των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων μικρότερου μήκους, συγκριτικά με τις αντίστοιχες μεγαλύτερου, να αντισταθμίσουν τη μείωση της πυκνότητας του φορτίου τους μέσω αναδιάταξης της διαμόρφωσής τους.

Το ενεργό φορτίο των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων διερευνήθηκε μέσω μετρήσεων ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός, οι οποίες υπέδειξαν τη συσχέτιση του ενεργού αρνητικού φορτίου με τη διαμόρφωση των αλυσίδων. Συγκεκριμένα, η περιφερειακή κατανομή των φορτίων της αλυσίδας δεν μεταβάλλεται σημαντικά συναρτήσει του pH του διαλύματος, καθώς οι αλυσίδες ανταποκρίνονται στη μείωση της πυκνότητας των φορτίων τους σε pH 3, μέσω κατάλληλων αναδιατάξεων της διαμόρφωσής τους, οι οποίες εκθέτουν περισσότερα φορτία στην περιφέρεια με σκοπό τη διατήρηση της διαλυτότητάς τους. Συγχρόνως, οι μικρότερου μήκους πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες εμφανίζουν αυξημένο κατ' απόλυτη τιμή ενεργό φορτίο, καθώς υπόκεινται σε περιορισμένο αριθμό επιτρεπών διαμορφώσεων, γεγονός που συνεπάγεται μεγαλύτερη έκθεση των φορτίων τους.

Μετρήσεις φασματοσκοπίας φθορισμού με χρήση ιχνηθέτη πυρενίου, έδειξαν ότι στην πολύ τοπική κλίμακα του μικροπεριβάλλοντος του πυρενίου, ο αριθμός ή/και το μέγεθος των υδρόφοβων μικροπεριοχών που υπάρχουν στο διάλυμα είναι ανεξάρτητα της πυκνότητας φορτίου της αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη. Αντίθετα, οι υδρόφοβες μικροπεριοχές επηρεάζονται από το μήκος της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας και εμφανίζουν αυξημένο αριθμό ή/και μέγεθος για το δείγμα μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Το φαινόμενο αυτό, αποδίδεται στο μεγαλύτερο αριθμό υδρόφοβων τμημάτων της μεγαλύτερης σε μήκος αλυσίδας, αλλά και στην αυξημένη πιθανότητα ενδομοριακής σύνδεσης των τμημάτων αυτών, καθώς οι μακρύτερες αλυσίδες είναι σε θέση να υιοθετήσουν μεγαλύτερο αριθμό διαμορφώσεων.

Εν συνεχεία, διερευνήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στις ιδιότητες του πολυηλεκτρολύτη SCPI και προέκυψε ότι η ενίσχυση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των τμημάτων της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας, λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας του διαλύματος, έχει ως αποτέλεσμα την υιοθέτηση περισσότερο συμπαγών διαμορφώσεων και κατ' επέκταση τη μείωση του μεγέθους τόσο των μεμονωμένων αλυσίδων, όσο και των περιοχών πολλαπλών αλυσίδων, χωρίς όμως να επηρεάζει τη σχετική τους αναλογία στο διάλυμα.

Τέλος, η επίδραση της ιοντικής ισχύος στη δυναμική του συστήματος αποδείχθηκε ιδιαίτερα σημαντική, καθώς και στις δύο τιμές του pH η εξασθένηση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων του συστήματος, που λαμβάνει χώρα κατά την προσθήκη άλατος στο διάλυμα, προκάλεσε την αναδιοργάνωση των αλυσίδων του πολυηλεκτρολύτη, η οποία οδήγησε στο διαχωρισμό ή ακόμα και στην εξάλειψη των περιοχών πολλαπλών αλυσίδων. Η επίδραση αυτή ήταν εντονότερη σε pH 3, επειδή οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είναι ασθενέστερες των αντίστοιχων σε pH 7, λόγω της μειωμένης πυκνότητας φορτίου της αλυσίδας. Μάλιστα, για τις υψηλότερες τιμές της ιοντικής ισχύος, η αναδιάταξη των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων σε pH 3, είχε ως συνέπεια τη δευτερογενή συσσωμάτωσή τους, η οποία με την πάροδο του χρόνου κατέληξε στην καθίζηση του δείγματος.

Η διαδικασία της σύμπλεξης του πολυηλεκτρολύτη SCPI και της λυσοζύμης, διερευνήθηκε σε pH 7 για τα δύο πολυηλεκτρολυτικά δείγματα διαφορετικού μοριακού βάρους (SCPI-54K και SCPI-21K) και σε pH 3 για το δείγμα μεγαλύτερου μοριακού βάρους (SCPI-54K), ως συνάρτηση της αναλογίας φορτίων [-]/[+] του συστήματος.

Σε pH 7 και στην περιοχή των χαμηλών τιμών της αναλογίας φορτίων (πλούσια σε πρωτεΐνη περιοχή συστάσεων), λαμβάνει χώρα ο διφασικός διαχωρισμός των διαλυμάτων των συμπλόκων, εξαιτίας της μειωμένης διαλυτότητας των συμπλόκων, η οποία οφείλεται στον υψηλό βαθμό εξουδετέρωσης των φορτίων της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας, καθώς σε αυτή την περιοχή κάθε αλυσίδα του SCPI αλληλεπιδρά με μεγάλο αριθμό μορίων λυσοζύμης. Ο αυξημένος βαθμός εξουδετέρωσης των φορτίων της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας ισοδυναμεί με μειωμένη διαλυτότητα των συμπλεγμένων με πρωτεΐνη αλυσίδων, γεγονός που επιφέρει τη συσσωμάτωσή τους και το σχηματισμό συμπλόκων συμπαγούς δομής, αποτελούμενων από ιδιαίτερα υψηλό αριθμό πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων και μορίων λυσοζύμης.

Όσο αυξάνεται η αναλογία φορτίων ή ισοδύναμα η συγκέντρωση του πολυηλεκτρολύτη, ο αριθμός συμπλεγμένων πρωτεϊνικών μορίων ανά αλυσίδα μειώνεται, όπως επίσης και ο βαθμός εξουδετέρωσης των φορτίων της αλυσίδας. Επομένως, η διαλυτότητα των συμπλεγμένων αλυσίδων αυξάνεται, με αποτέλεσμα ο αριθμός των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων και πρωτεϊνικών μορίων που απαρτίζουν τα σύμπλοκα να μειώνεται σταδιακά. Όσον αφορά την επίδραση του μοριακού

βάρους του πολυηλεκτρολύτη στις ιδιότητες των συμπλόκων, διαπιστώθηκε ότι οι μικρότερες σε μήκος πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες αλληλεπιδρούν με αυξημένο αριθμό μορίων λυσοζύμης, λόγω της περισσότερο εκτεταμένης διαμόρφωσής τους. Με αποτέλεσμα, τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα να αποτελούνται από μεγαλύτερο αριθμό πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων και πρωτεϊνικών μορίων, καθώς και να χαρακτηρίζονται από πιο συμπαγή δομή, σε σχέση με τα αντίστοιχα σύμπλοκα των αλυσίδων μεγαλύτερου μήκους.

Η μειωμένη πυκνότητα φορτίου της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας σε pH 3 συνεπάγεται την εξασθένηση της σύμπλεξης και ως εκ τούτου κάθε αλυσίδα αλληλεπιδρά με μικρό αριθμό μορίων λυσοζύμης. Συνεπώς, ο βαθμός εξουδετέρωσης των φορτίων της αλυσίδας είναι αρκετά μικρός, ώστε να παρεμποδίζεται η εκτεταμένη συσσωμάτωση των συμπλεγμένων με πρωτεΐνη αλυσίδων. Για το λόγο αυτό, τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα αποτελούνται από σημαντικά μικρότερο αριθμό πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων και πρωτεϊνικών μορίων, σε σχέση με τα αντίστοιχα σύμπλοκα σε pH 7. Επιπροσθέτως, λόγω της εξασθένησης της σύμπλεξης, ο αριθμός των μη αλληλεπιδρώντων τμημάτων της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας είναι αρκετά σημαντικός και γίνεται μεγαλύτερος όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυηλεκτρολύτη, γεγονός που συνεπάγεται περαιτέρω μείωση των συμπλεγμένων πρωτεϊνικών μορίων ανά αλυσίδα. Επομένως, κάθε μόριο της λυσοζύμης δύναται να αλληλεπιδράσει με περισσότερες από μία πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες, αυξάνοντας έτσι τον αριθμό των αλυσίδων που περιέχουν τα σύμπλοκα, στην περιοχή των υψηλών τιμών της αναλογίας φορτίων.

Παρά τις διαφορές των ιδιοτήτων και της δομής των συμπλόκων σε pH 7 και 3, το αρνητικό ενεργό τους φορτίο αυξάνεται κατ' απόλυτη τιμή συναρτήσει της αυξανόμενης αναλογίας φορτίων του συστήματος και στις δύο περιπτώσεις, αντικατοπτρίζοντας τη μείωση του βαθμού εξουδετέρωσης των φορτίων της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας. Συμπληρωματική θερμοδομετρική ανάλυση ισόθερμης τιτλοδότησης για το σύστημα του πολυηλεκτρολυτικού δείγματος SCPI-54K και της HEWL σε pH 7, επιβεβαίωσε την ηλεκτροστατική φύση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο ειδών μακρομορίων, καθώς και υπέδειξε ότι κάθε πρωτεϊνικό μόριο αλληλεπιδρά με περίπου 11 φορτία της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας. Επίσης, η επίδραση της αυξανόμενης ιοντικής ισχύος στις ιδιότητες των ήδη σχηματισμένων συμπλόκων του ίδιου συστήματος, είχε ως αποτέλεσμα την

εκτεταμένη δευτερογενή συσσωμάτωση και την επακόλουθη καθίζηση των συμπλόκων, λόγω της εξασθένησης των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και της συνεπαγόμενης ενίσχυσης του ρόλου των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων του συστήματος.

Τέλος, η δομή της συμπλεγμένης λυσοζύμης διερευνήθηκε μέσω φασματοσκοπικών μετρήσεων φθορισμού, κυκλικού διχρωισμού και μέσου υπερύθρου, τα αποτελέσματα των οποίων έδειξαν ότι παρόλο που κάποια μικρή διατάραξη της διαμόρφωσης του πρωτεϊνικού μορίου επέρχεται ενδεχομένως στην περιοχή των χαμηλών τιμών της αναλογίας φορτίων, όπου παρατηρείται ο μέγιστος βαθμός σύμπλεξης, η σύμπλεξη δεν συνεπάγεται την αποδιάταξη του μορίου, δηλαδή η δομή της λυσοζύμης διατηρείται. Παράλληλα, η μελέτη διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης επισήμανε τη μειωμένη θερμική σταθερότητα του συμπλεγμένου πρωτεϊνικού μορίου, ως συνέπεια των διατακτικών δυνάμεων που δέχεται κατά την ηλεκτροστατική πρόσδεση στην αλυσίδα του πολυηλεκτρολύτη.

6.2. Δισυσταδικός πολυηλεκτρολύτης PS-SCPI και σύμπλοκά του με λυσοζύμη

Η διερεύνηση της αυτοοργάνωσης και των ιδιοτήτων των μικκυλίων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, πραγματοποιήθηκε συναρτήσει του pH σε υδατικά διαλύματα με pH 3, 7 και 9, καθώς και συναρτήσει της ιοντικής ισχύος σε pH 7, μέσω μετρήσεων δυναμικής και στατικής σκέδασης φωτός.

Σε όλες τις περιπτώσεις, διαπιστώθηκε ότι στα διαλύματα του PS-SCPI συνυπάρχουν ελεύθερες μεμονωμένες αλυσίδες και μικκύλια, με τον πληθυσμό των μικκυλίων να υπερισχύει στη συνολική ένταση σκέδασης. Η δομή των μικκυλίων αποδείχθηκε σταθερή κατά τις αλλαγές των συνθηκών του διαλύματος, δηλαδή ο αριθμός συσσωμάτωσης τους δεν μεταβάλλεται. Μάλιστα, τα συγκεκριμένα μικκύλια χαρακτηρίζονται από αρκετά μικρό αριθμό συσσωμάτωσης, περί τις 3 αλυσίδες ανά μικκύλιο, λόγω της ιδιαίτερα υψηλής ασυμμετρίας της δισυσταδικής αλυσίδας. Η αύξηση της τιμής του pH του διαλύματος, επέφερε την έκταση τόσο των μεμονωμένων αλυσίδων, όσο και των αλυσίδων του SCPI της κορώνας των μικκυλίων και την ανάλογη αύξηση των μεγεθών τους, εξαιτίας της ενίσχυσης των ηλεκτροστατικών απώσεων, καθώς αυξάνεται η πυκνότητα του φορτίου των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων. Η αντίθετη επίδραση παρατηρήθηκε κατά την αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος, με την έννοια ότι η προάσπιση των

φορτίων των συστάδων του SCPI και η αντίστοιχη εξασθένηση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, οδήγησε στη συρρίκνωση των μεμονωμένων δισυσταδικών αλυσίδων και των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας των μικκυλίων, με ανάλογα αποτελέσματα στο μέγεθος των δύο πληθυσμών.

Η σύμπλεξη μεταξύ του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI και της λυσοζύμης μελετήθηκε τόσο σε pH 7, όσο και σε pH 3, συναρτήσει της συγκέντρωσης της HEWL.

Κατά την προσθήκη της λυσοζύμης στο διάλυμα του PS-SCPI σε pH 7, τα πρωτεϊνικά μόρια συμπλέκονται με τις πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες της κορώνας των μικκυλίων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη, προκαλώντας την εξουδετέρωση των φορτίων των συστάδων του SCPI, γεγονός που συνεπάγεται τη συρρίκνωση της πολυηλεκτρολυτικής κορώνας και την αντίστοιχη μείωση του μεγέθους των συμπλεγμένων με λυσοζύμη μικκυλίων. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της λυσοζύμης, κάθε πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα αλληλεπιδρά με μεγαλύτερο αριθμό πρωτεϊνικών μορίων, οπότε ο βαθμός εξουδετέρωσης των φορτίων τους αυξάνεται και το μέγεθος των συμπλόκων μειώνεται περαιτέρω. Παράλληλα, η αύξηση του βαθμού εξουδετέρωσης των φορτίων συνεπάγεται μείωση της διαλυτότητας των συμπλεγμένων μικκυλίων και επιφέρει τη συσσωμάτωσή τους. Η συσσωμάτωση αυτή γίνεται σταδιακά εντονότερη, με αποτέλεσμα στην περιοχή των υψηλών τιμών της συγκέντρωσης της λυσοζύμης να επέρχεται ο διφασικός διαχωρισμός του διαλύματος.

Ανάλογη συμπεριφορά παρατηρήθηκε και σε pH 3, με τη διαφοροποίηση ότι η μειωμένη πυκνότητα φορτίου των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων και η αυξημένη τιμή του φορτίου της λυσοζύμης, συνεπάγονται μεγαλύτερη μείωση της διαλυτότητας των συμπλεγμένων μικκυλίων, γεγονός που οδηγεί στη συσσωμάτωσή τους ακόμα και για μικρές τιμές της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Επομένως, τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα χαρακτηρίζονται από αυξημένη μάζα και πιο συμπαγή δομή, σε σχέση με τα αντίστοιχα σε pH 7. Βέβαια, και σε αυτή την περίπτωση, η εκτεταμένη συσσωμάτωση των συμπλεγμένων με λυσοζύμη μικκυλίων κατέληξε στο διφασικό διαχωρισμό του διαλύματος, για μεγάλες τιμές της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης.

Συγκριτικά με τα αντίστοιχα σύμπλοκα του ομοπολυμερικού πολυηλεκτρολύτη, τα μικκύλια του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη εμφανίζουν αυξημένο βαθμό αλληλεπίδρασης με τα μόρια της λυσοζύμης, τόσο σε pH 7, όσο και σε 3, λόγω της

περισσότερο εκτεταμένης διαμόρφωσης των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων που επιφέρει η δομή της κορώνας.

Η μείωση της απόλυτης τιμής του αρνητικού ενεργού φορτίου των συμπλόκων, συναρτήσει της αυξανόμενης συγκέντρωσης της λυσοζύμης που παρατηρείται ανεξαρτήτως της τιμής του pH, καταδεικνύει τον αυξανόμενο βαθμό εξουδετέρωσης των φορτίων των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας των μικκυλίων κατά τη σύμπλεξη. Επιπροσθέτως, η αύξηση της ιοντικής ισχύος των διαλυμάτων των συμπλόκων επέφερε την εξασθένηση των ηλεκτροστατικών και την παράλληλη ενίσχυση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων του συστήματος, γεγονός που είχε ως συνέπεια τη δευτερογενή συσσωμάτωση τόσο των συμπλεγμένων με λυσοζύμη μικκυλίων, όσο και των συσσωματωμάτων τους και τελικά οδήγησε στην καθίζηση των συμπλόκων.

Τέλος, τα αποτελέσματα της φασματοσκοπικής μελέτης φθορισμού, κυκλικού διχρωισμού και μέσου υπερύθρου της δομής της συμπλεγμένης λυσοζύμης, κατέδειξαν τη διατήρηση της δομής του πρωτεϊνικού μορίου κατά τη σύμπλεξη.

6.3. Τρισυσταδικοί πολυηλεκτρολύτες PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και σύμπλοκά τους με λυσοζύμη

Η αυτοοργάνωση και οι ιδιότητες των μικκυλίων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, διερευνήθηκαν συναρτήσει του pH σε υδατικά διαλύματα με pH 3, 7 και 9, καθώς και συναρτήσει της ιοντικής ισχύος σε pH 7, μέσω μετρήσεων δυναμικής και στατικής σκέδασης φωτός.

Τα μικκύλια των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών υπερίσχυαν ολοκληρωτικά στη συνολική ένταση σκέδασης του διαλύματος, σε όλες τις περιπτώσεις, ενώ η δομή τους διαπιστώθηκε σταθερή και ανεξάρτητη των συνθηκών του διαλύματος. Στην περίπτωση του PS-SCPI-PEO, τα σχηματιζόμενα μικκύλια εμφανίζουν αριθμό συσσωμάτωσης περί τις 50 αλυσίδες ανά μικκύλιο, ενώ ο αντίστοιχος αριθμός για τα μικκύλια του SCPI-PS-PEO είναι περί τις 270 αλυσίδες. Οι διαφορές του αριθμού συσσωμάτωσης μεταξύ των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, καθώς και του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη PS-SCPI, είναι απόρροια της μακρομοριακής αρχιτεκτονικής, δηλαδή του μήκους των επιμέρους συστάδων και κυρίως της σχετικής αναλογίας των υδρόφοβων και υδρόφιλων μονομερικών μονάδων.

Η διαφορετική δομή της κορώνας των μικκυλίων των PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, είχε ως αποτέλεσμα τον διαφορετικό τρόπο απόκρισης των μικκυλίων στις αλλαγές των συνθηκών του διαλύματος. Συγκεκριμένα, τα μικκύλια του PS-SCPI-PEO εμφάνισαν τη δυνατότητα αντιστάθμισης των αλλαγών της διαμόρφωσης των συστάδων του SCPI, οι οποίες αποτελούν το εσωτερικό στρώμα της κορώνας, μέσω αντίθετων αλλαγών της διαμόρφωσης των συστάδων του PEO του εξωτερικού στρώματος της κορώνας. Δηλαδή, η αύξηση του pH του διαλύματος προκάλεσε την αύξηση της πυκνότητας φορτίου των συστάδων του SCPI και κατ' επέκταση την έκτασή τους. Το γεγονός αυτό, είχε ως αποτέλεσμα οι συστάδες του PEO να υιοθετούν λιγότερο εκτεταμένες διαμορφώσεις. Η αντίθετη μεταβολή της διαμόρφωσης των συστάδων του PEO, παρατηρήθηκε ως συνέπεια της συρρίκνωσης των συστάδων του SCPI, η οποία επέρχεται λόγω της αύξησης της ιοντικής ισχύος του διαλύματος και της συνεπαγόμενης εξασθένησης των ηλεκτροστατικών απώσεων. Το αποτέλεσμα και στις δύο περιπτώσεις ήταν η διατήρηση του συνολικού μεγέθους των μικκυλίων.

Αντιθέτως, το μέγεθος των μικκυλίων του SCPI-PS-PEO μεταβάλλεται κατά τις αλλαγές των συνθηκών του διαλύματος, καθώς επηρεάζεται σημαντικά από τις αλλαγές της διαμόρφωσης των αλυσίδων του SCPI της κορώνας, μιας και το μήκος τους είναι μεγαλύτερο από αυτό των αλυσίδων του PEO. Ως εκ τούτου, η αύξηση του pH οδήγησε σε αύξηση του μεγέθους των μικκυλίων, η οποία οφείλεται στην έκταση των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων της κορώνας. Αντίστοιχα, η συρρίκνωση των αλυσίδων του SCPI και η ανάλογη μείωση του μεγέθους των μικκυλίων, διαπιστώθηκε ως αποτέλεσμα της αρχικής αύξησης της ιοντικής ισχύος, ενώ περαιτέρω προσθήκη άλατος στο διάλυμα, είχε ως συνέπεια τη μείωση της διαλυτότητας των μικκυλίων και τη συσσωμάτωσή τους (αν και σε μικρό βαθμό). Τα μικκύλια του SCPI-PS-PEO χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο μέγεθος σε σχέση με τα μικκύλια του PS-SCPI-PEO, καθώς ο αυξημένος αριθμός συσσωμάτωσης προκαλεί ιδιαίτερα συμπαγή δομή της κορώνας και κατ' επέκταση όσο το δυνατόν περισσότερο εκτεταμένη διαμόρφωση των αλυσίδων που την απαρτίζουν.

Η μελέτη της διαδικασίας της σύμπλεξης των μικκυλίων των τρισυσταδικών πολυηλεκτρολυτών PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της λυσοζύμης, πραγματοποιήθηκε σε pH 7 και 3, συναρτήσκει της συγκέντρωσης της HEWL.

Όπως διαπιστώθηκε, και για τα δύο συστήματα των τρισυσταδικών

πολυηλεκτρολυτών, τόσο σε pH 7, όσο και σε pH 3 και σε όλο το εύρος των τιμών της συγκέντρωσης της λυσοζύμης, τα συμπλεγμένα με πρωτεΐνη μικκύλια εμφανίζουν αυξημένη διαλυτότητα, λόγω της παρουσίας των συστάδων του PEO της κορώνας, γεγονός που αποτρέπει τη μεταξύ τους συσσωμάτωση και τον συνεπακόλουθο διφασικό διαχωρισμό του διαλύματος των συμπλόκων.

Για το σύστημα του PS-SCPI-PEO και της HEWL, η σύμπλεξη με τα μόρια της λυσοζύμης και στις δύο τιμές του pH, συνεπάγεται την εξουδετέρωση των φορτίων των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων του SCPI του εσωτερικού στρώματος της κορώνας. Επομένως, επιφέρει τη συρρίκνωσή τους και κατ' επέκταση τη σταδιακή μείωση του μεγέθους των συμπλεγμένων μικκυλίων, καθώς αυξάνεται ο αριθμός των συμπλεγμένων πρωτεϊνικών μορίων συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης. Στην αντίστοιχη περίπτωση του συστήματος του SCPI-PS-PEO και της HEWL, ο ιδιαίτερα υψηλός αριθμός συσσωμάτωσης των μικκυλίων, καθιστά αδύνατη την εισχώρηση των πρωτεϊνικών μορίων στο εσωτερικό της κορώνας, λόγω της συμπαγούς δομής της, οπότε η σύμπλεξη περιορίζεται στην εξωτερική περιφέρεια των μικκυλίων. Άλλωστε, το μεγαλύτερο μήκος των αλυσίδων του SCPI ενισχύει την περιφερειακή σύμπλεξη των μορίων της λυσοζύμης, ο αριθμός των οποίων και σε αυτή την περίπτωση αυξάνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της HEWL. Η σύμπλεξη αποδείχθηκε εντονότερη σε pH 7 και για τα δύο συστήματα, εξαιτίας της μεγαλύτερης πυκνότητας φορτίου των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων του SCPI.

Τα μικκύλια των PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO εμφάνισαν περιορισμένη δυνατότητα ενσωμάτωσης μορίων λυσοζύμης στην κορώνα τους, λόγω των αυξημένων τοπολογικών περιορισμών που επιβάλλει η δομή της κορώνας. Ως εκ τούτου, ο βαθμός αλληλεπίδρασης των συγκεκριμένων μικκυλίων με τα πρωτεϊνικά μόρια, είναι μικρότερος από τον αντίστοιχο των συστημάτων του ομοπολυμερικού και του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη. Επίσης, ο συνολικός αριθμός συμπλεγμένων μορίων λυσοζύμης ανά μικκύλιο είναι μεγαλύτερος για το σύστημα του SCPI-PS-PEO, παρόλο που κάθε πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα αλληλεπιδρά με λιγότερα πρωτεϊνικά μόρια, καθώς τα συγκεκριμένα μικκύλια χαρακτηρίζονται από υψηλότερο αριθμό συσσωμάτωσης.

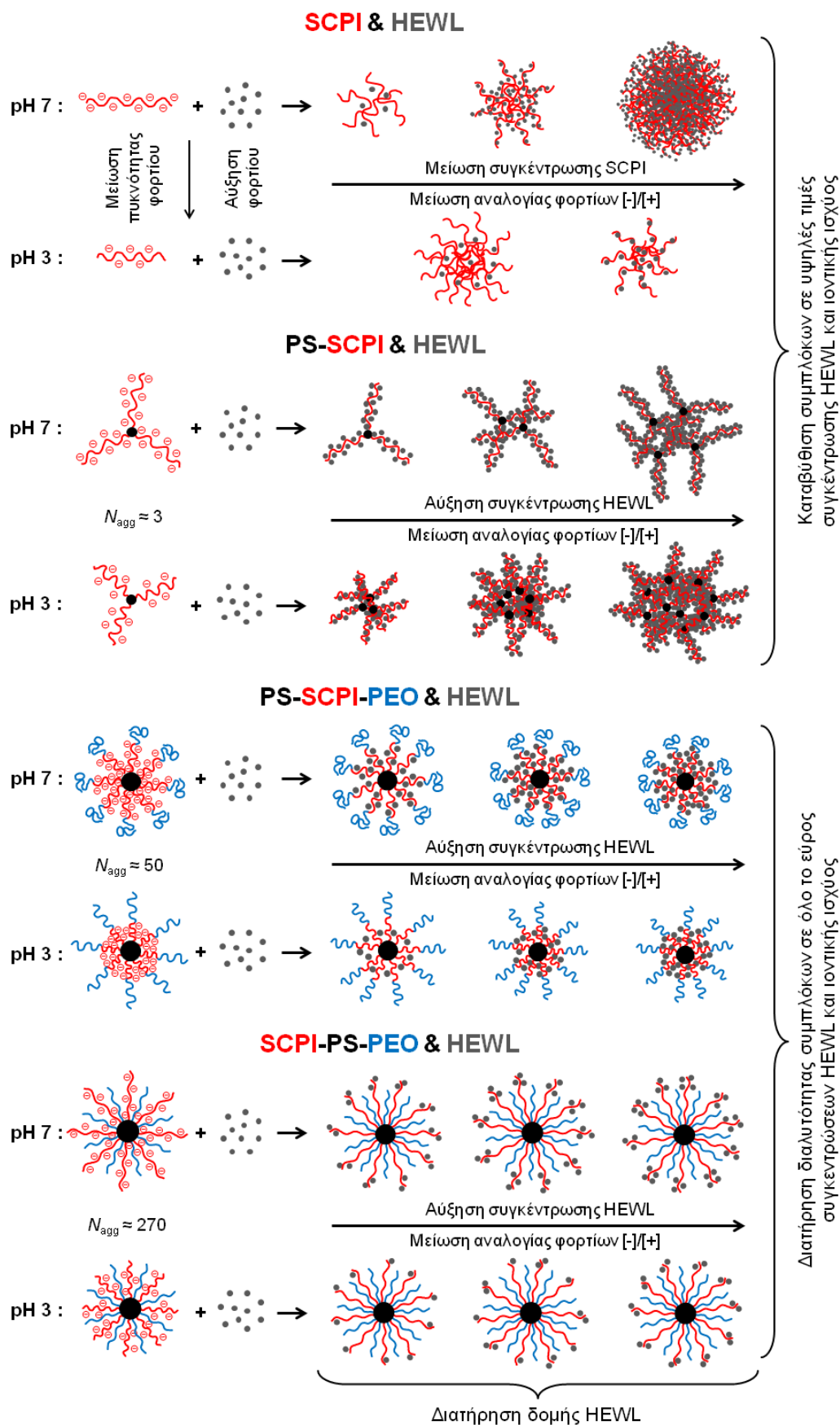
Το αρνητικό ενεργό φορτίο των συμπλόκων, σε όλες τις περιπτώσεις, μειώνεται κατ' απόλυτη τιμή καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της λυσοζύμης, λόγω της αύξησης του βαθμού εξουδετέρωσης των φορτίων των πολυηλεκτρολυτικών

συστάδων. Όσον αφορά την επίδραση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος στις ιδιότητες και τη συμπεριφορά των συμπλόκων των δύο συστημάτων, αποδείχθηκε ότι η σημαντική ενίσχυση της διαλυτότητας των συμπλόκων, τόσο από την παρουσία των συστάδων του PEO της κορώνας των μικκυλίων, όσο και από την περιφερειακή διάταξη των μορίων της λυσοζύμης στην περίπτωση του συστήματος του SCPI-PS-PEO, αποτρέπει τη συσσωμάτωσή τους, καθώς επέρχεται η εξασθένηση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων του συστήματος, και ουσιαστικά καθιστά τα σύμπλοκα ανεπηρέαστα στην αύξηση της ιοντικής ισχύος.

Τέλος, η φασματοσκοπική μελέτη της δομής της συμπλεγμένης λυσοζύμης, μέσω μετρήσεων φθορισμού, κυκλικού διχρωισμού και μέσου υπερύθρου, κατέδειξε τη διατήρηση της δομής της πρωτεΐνης κατά τη σύμπλεξη και για τα δύο συστήματα συμπλόκων.

6.4. Σύγκριση της δομής των συμπλόκων των διαφορετικών συστημάτων

Η ποικιλομορφία της αρχιτεκτονικής των συνθετικών ομοπολυμερικών και πολυσυσταδικών πολυηλεκτρολυτών SCPI, PS-SCPI, PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, οδήγησε στο σχηματισμό συμπλόκων διαφορετικής δομής, ιδιοτήτων και συμπεριφοράς. Επιπλέον, προκάλεσε διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης μεταξύ των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων του SCPI και της λυσοζύμης, ενώ παράλληλα καθόρισε τη διάταξη των πρωτεϊνικών μορίων εντός των συμπλόκων. Σε κάθε σύστημα, η σχετική αναλογία των δύο συστατικών ήταν ένας από τους κυριότερους παράγοντες που προσδιόρισαν τη δομή και τις ιδιότητες των συμπλόκων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προσέδωσε η μεταβολή της πυκνότητας φορτίου των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων του SCPI, καθώς και της τιμής του καθαρού φορτίου του μορίου της λυσοζύμης, συναρτήσει του pH του διαλύματος, ο συνδυασμός των οποίων επηρέασε σημαντικά την ηλεκτροστατικά καθοδηγούμενη σύμπλεξη, με αποτέλεσμα το σχηματισμό συμπλόκων διαφορετικής δομής σε pH 7 και σε pH 3. Μία συνοπτική σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της σύμπλεξης και κυρίως της δομής και των ιδιοτήτων των σχηματιζόμενων συμπλόκων, μεταξύ των συνθετικών πολυηλεκτρολυτών SCPI, PS-SCPI, PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 και 3, συναρτήσει της σχετικής αναλογίας των δύο συστατικών, παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.1.



Σχήμα 6.1: Συνοπτική σχηματική αναπαράσταση της σύμπλεξης μεταξύ των πολυηλεκτρολυτών SCPI, PS-SCPI, PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της HEWL, σε pH 7 και 3.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός όρος
Sodium poly((sulfamate-carboxylate)isoprene)	Μετά νατρίου άλας του πολυ((σουλφαμινο-καρβοξυλο)ισοπρενίου)
Polystyrene	Πολυστυρένιο
Poly(ethylene oxide)	Πολυαιθυλενοξείδιο
Hen egg white lysozyme	Λυσοζύμη από ασπράδι αυγού κότας
Sodium poly(styrene sulfonate)	Μετά νατρίου άλας του πολυ(σουλφονομένου στυρενίου)
Poly(methacrylic acid)	Πολυ(μεθακρυλικό οξύ)
Tobacco mosaic virus	Ιός του μωσαϊκού του καπνού
Unentangled dynamics	Δυναμική μη-εμπλοκής
Chain overlap concentration	Συγκέντρωση αλληλοεπικάλυψης αλυσίδων
Chain backbone	Κύριος κορμός αλυσίδας
Fast and slow mode	Γρήγορη και αργή διαδικασία χαλάρωσης
Multichain domains	Περιοχές πολλαπλών αλυσίδων
Cluster	Σύμπλεγμα
Dynamic light scattering	Δυναμική σκέδαση φωτός
Static light scattering	Στατική σκέδαση φωτός
Small angle neutron scattering	Σκέδαση νετρονίων σε μικρές γωνίες
Small angle X-ray scattering	Σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες
Electrophoretic light scattering	Ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός

Fluorescence spectroscopy	Φασματοσκοπία φθορισμού
(Frontal analysis continuous) capillary electrophoresis	(Συνεχής) ηλεκτροφόρηση μέσω τριχοειδούς (ανάλυσης μετώπου)
Critical micelle concentration	Κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση
Unimer chain	Μεμονωμένη αλυσίδα
Stripping	Αναδιάλυση
Dialysis	Διαπίδυση μέσω ημιπερατής μεμβράνης
“Frozen” micelles	«Παγωμένα» μικκύλια
“Star-like” micelles	Αστεροειδή μικκύλια
“Crew-cut” micelles	Μικκύλια με μεγάλο πυρήνα και κοντή κορώνα
“Rod-like” micelles	Ραβδοειδή μικκύλια
Vesicles	Κυστίδια
“Onion-like” micelles	Μικκύλια τύπου «κρεμμυδιού»
“Three-layer” micelles	Μικκύλια «τριών στρωμάτων»
“Core-shell-corona” micelles	Μικκύλια «πυρήνα-κελύφους-κορώνας»
“Janus” micelles	«Διπρόσωπα» μικκύλια
(Cryogenic) transmission electron microscopy	(Κρυογονική) ηλεκτρονική μικροσκοπία διαπερατότητας
Atomic force microscopy	Μικροσκοπία ατομικής δύναμης
Nuclear magnetic resonance	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
Ultracentrifugation	Υπερφυγοκέντρωση
Size exclusion chromatography	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
Custom design	Εξειδικευμένος σχεδιασμός
Spherical polyelectrolyte brushes	Σφαιρικές πολυηλεκτρολυτικές βούρτσες

Poly(acrylic acid)	Πολυ(ακρυλικό οξύ)
Poly(isobutylene)	Πολυ(ισοβουτυλένιο)
Poly(<i>n</i> -butyl acrylate)	Πολυ(ακρυλικός <i>n</i> -βουτυλεστέρας)
Poly(<i>tert</i> -butylstyrene)	Πολυ(<i>tert</i> -βουτυλοστυρένιο)
Poly(methyl methacrylate)	Πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας)
Poly((1-ethoxycarbonyl vinylphosphonic diacid)	Πολυ((1-αιθοξυκαρβονυλο) βινυλοδισφωφονικό οξύ)
Poly(2-ethylhexyl acrylate)	Πολυ(ακρυλικός 2-αιθυλοεξυλεστέρας)
Poly(2-vinyl pyridine)	Πολυ(2-βινυλοπυριδίνη)
Polyisoprene	Πολυισοπρένιο
“Flower-like” micelles	Μικκύλια τύπου «λουλουδιού»
Poly(<i>n</i> -butyl methacrylate)	Πολυ(μεθακρυλικός <i>n</i> -βουτυλεστέρας)
Poly(4-vinyl pyridine)	Πολυ(4-βινυλοπυριδίνη)
Poly(ethylene glycol)	Πολυ(αιθυλενογλυκόλη)
Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)	Πολυ(μεθακρυλικός 2-(διμεθυλαμινο)αιθυλεστέρας)
Coacervation	Διαχωρισμός διαλύματος συμπλόκων σε δύο υγρές φάσεις
Intrapolymer complex	Ενδοπολυμερικό σύμπλοκο
Turbidimetry	Θολωσιμετρία
Isothermal titration calorimetry	Θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης
Infrared spectroscopy	Φασματοσκοπία υπερύθρου
Circular dichroism spectroscopy	Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού
Differential scanning calorimetry	Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης
Poly(dimethyldiallylammonium	Πολυ(χλωριούχο διμεθυλοδιαλλυλαμμώνιο)

chloride)	
Bovine serum albumin	Αλβουμίνη βοδινού ορού
Potassium poly(vinyl alcohol) sulfate	Μετά καλίου άλας της πολυ(θειικής βινυλικής αλκοόλης)
Ribonuclease	Ριβονουκλεάση
Poly(allylamine) hydrochloride	Υδροχλωρική πολυ(αλλυλαμίνη)
Poly(vinylsulfonic acid)	Πολυ(βινυλοσουλφονικό οξύ)
Sodium poly(2-(acrylamido)-2-methylpropanesulfonate)	Πολυ(2-(ακρυλαμιδο)-2-μεθυλοπροπανοσουλφονικό) νάτριο
Poly(isobutylene- <i>alt</i> -maleic acid)	Πολυ(ισοβουτυλένιο- <i>alt</i> -μηλεϊνικό οξύ)
Poly(1-tetradecene- <i>alt</i> -maleic acid)	Πολυ(1-δεκατετρακένιο- <i>alt</i> -μηλεϊνικό οξύ)
Poly(<i>N</i> -ethyl-4-vinylpyridinium bromide)	Πολυ(βρωμιούχο τεταρτοταγές άλας <i>N</i> -αιθυλο-4-βυνιλοπυριδίνης)
Poly(sodium methacrylate)	Πολυ(μεθακρυλικό νάτριο)
Sodium dodecyl sulfate	Δωδεκυλοθειικό νάτριο
Isoelectric point	Ισοηλεκτρικό σημείο
X-ray crystallography	Κρυσταλλογραφία ακτίνων X
Cumulants method	Μέθοδος αθροισμάτων
Regularization methods	Τεχνικές κανονικοποίησης
Polydispersity index	Δείκτης πολυδιασποράς
Electrical double layer	Ηλεκτρική διπλοστιβάδα
Self-consistent method	Μέθοδος αυτο-συνέπειας
Ridge regression method	Μέθοδος ψευδο-ορθογώνιας παλινδρόμησης
Singular value decomposition method	Μέθοδος ανάλυσης ιδιαζουσών τιμών

Variable selection	Μεταβλητή επιλογή
Neural network analysis	Ανάλυση μέσω νευρωνικών δικτύων
Attenuated total reflectance	Αποσβεννύμενη ολική ανάκλαση
Internal reflection element	Στοιχείο εσωτερικής ανάκλασης
Penetration depth	Βάθος διείσδυσης
Effective depth	Ενεργό πάχος
Chlorosulfonyl isocyanate	Χλωροσουλφονικός ισοκυανικός εστέρας
Rotor evaporator	Περιστροφικός αποστακτήρας

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

EKΠΑ	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
ΙΘΦΧ	Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας
EIE	Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
EKEΦΕ	Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών
SCPI	Sodium poly((sulfamate-carboxylate)isoprene)
PS	Polystyrene
PEO	Poly(ethylene oxide)
HEWL	Hen egg white lysozyme
NaPSS	Sodium poly(styrene sulfonate)
PMAA	Poly(methacrylic acid)
TMV	Tobacco mosaic virus
DLS	Dynamic Light Scattering
SLS	Static Light Scattering
SANS	Small Angle Neutron Scattering
SAXS	Small Angle X-ray Scattering
ELS	Electrophoretic Light Scattering
(FAC)CE	(Frontal Analysis Continuous) Capillary Electrophoresis
cmc	Critical micelle concentration
(cryo-)TEM	(Cryogenic) Transmission Electron Microscopy
AFM	Atomic Force Microscopy

NMR	Nuclear Magnetic Resonance
SEC	Size Exclusion Chromatography
PAA και PAAc	Poly(acrylic acid)
PIB	Poly(isobutylene)
PnBA και PBuA	Poly(<i>n</i> -butyl acrylate)
PtBS	Poly(<i>tert</i> -butylstyrene)
PMMA	Poly(methyl methacrylate)
PECVPD	Poly((1-ethoxycarbonyl)vinylphosphonic diacid)
PEHA	Poly(2-ethylhexyl acrylate)
P2VP	Poly(2-vinyl pyridine)
PI	Polyisoprene
PnBMA	Poly(<i>n</i> -butyl methacrylate)
P4VP	Poly(4-vinyl pyridine)
PEG	Poly(ethylene glycol)
PDMAEMA	Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
IR	Infrared
CD	Circular Dichroism
DSC	Differential Scanning Calorimetry
PDMDAAC	Poly(dimethyldiallylammonium chloride)
BSA	Bovine serum albumin
KPVS	Potassium poly(vinyl alcohol sulfatate)
RNase	Ribonuclease

PAH	Poly(allylamine) hydrochloride
PVS	Poly(vinylsulfonic acid)
PAMPS	Sodium poly(2-(acrylamido)-2-methylpropanesulfonate)
PIMA	Poly(isobutylene- <i>alt</i> -maleic acid)
PTMA	Poly(1-tetradecene- <i>alt</i> -maleic acid)
PEVP	Poly(<i>N</i> -ethyl-4-vinylpyridinium bromide)
PMANa	Poly(sodium methacrylate)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
DNA	Deoxyribonucleic acid
mRNA	Messenger ribonucleic acid
pI	Isoelectric point
PTFE	Poly(tetrafluoroethylene)
EDL	Electrical double layer
ATR	Attenuated Total Reflectance
IRE	Internal Reflection Element
CSI	Chlorosulfonyl isocyanate

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχουν παρουσιαστεί ως δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά ή ως ανακοινώσεις στα παρακάτω εθνικά και διεθνή συνέδρια.

Δημοσιεύσεις σε περιοδικά:

1. A. Paragiannopoulos, M. Karayianni, G. Mountrichas, S. Pispas, A. Radulescu, Self-Assembled Nanoparticles from a Block Polyelectrolyte in Aqueous Media: Structural Characterization by SANS, *J. Phys. Chem. B*, **2010**, *114* (22), 7482-7488.
2. M. Karayianni, G. Mountrichas, S. Pispas, Solution Behavior of Poly(sodium(sulfamate-carboxylate)isoprene), a pH Sensitive and Intrinsically Hydrophobic Polyelectrolyte, *J. Phys. Chem. B*, **2010**, *114* (33), 10748-10755.
3. M. Karayianni, S. Pispas, G. D. Chryssikos, V. Gionis, S. Giatrellis, G. Nounesis, Complexation of Lysozyme with Poly(sodium(sulfamate-carboxylate)isoprene), *Biomacromolecules*, **2011**, *12* (5), 1697-1706.

Παρουσιάσεις σε συνέδρια:

1. M. Karayianni, G. Mountrichas, S. Pispas, G. D. Chryssikos, V. Gionis, Complexation of hen egg white lysozyme with sodium (sulfamate-carboxylate) isoprene polyelectrolytes, “7th Hellenic Polymer Conference”, Ioannina, Greece, 28/09 - 1/10/2008 (poster).
2. M. Karayianni, G. Mountrichas, S. Pispas, G. D. Chryssikos, V. Gionis, Bio-Organic Protein/Polyelectrolyte Hybrids: Hen Egg White Lysozyme Complexes with Sodium (Sulfamate-Carboxylate) Isoprene Polyelectrolytes, “First International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials”, Tour, France, 15 - 19/03/2009 (poster).
3. M. Karayianni, G. Mountrichas, S. Pispas, G. D. Chryssikos, V. Gionis, Complexation of lysozyme with sodium (sulfamate-carboxylate) isoprene/styrene/ethylene oxide block copolymer polyelectrolytes, “8th Hellenic Polymer Society Symposium”, Hersonissos, Crete, Greece, 24 - 29/10/2010 (poster).

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. F. Oosawa, *Polyelectrolytes*, Marcel & Dekker, **1971**.
2. S. Förster, M. Schmidt, Polyelectrolytes in Solution, *Adv. Polym. Sci.*, **1995**, *120*, 51-133.
3. M. Sedláč, Polyelectrolytes in solution: W. Brown, *Light Scattering: Principles and Development*, Clarendon Press, **1996**.
4. T. Radeva, *Physical Chemistry of Polyelectrolytes*, Marcel & Dekker, **2001**.
5. T. Odijk, Possible scaling relations for semidilute polyelectrolyte solutions, *Macromolecules*, **1979**, *12* (4), 688-693.
6. I. Sogami, N. Ise, On the electrostatic interaction in macroionic solutions, *J. Chem. Phys.*, **1984**, *81* (12), 6320-6332.
7. S. Förster, M. Schmidt, M. Antonietti, Experimental and theoretical investigation of the electrostatic persistence length of flexible polyelectrolytes at various ionic strengths, *J. Phys. Chem.*, **1992**, *96* (10), 4008-4014.
8. M. Muthukumar, Dynamics of polyelectrolyte solutions, *J. Chem. Phys.*, **1997**, *107* (7), 2619-2635.
9. J.-L. Barrat, J.-F. Joanny, Theory of Polyelectrolyte Solutions, *Adv. Chem. Phys.*, **1996**, *94*, 1-66.
10. C. Holm, J.-F. Joanny, K. Kremer, R. R. Netz, P. Reineker, C. Seidel, T. A. Vilgis, R. G. Winkler, Polyelectrolyte Theory, *Adv. Polym. Sci.*, **2004**, *166*, 67-111.
11. M. Muthukumar, Polyelectrolyte Dynamics, *Adv. Chem. Phys.*, **2005**, *131*, 1-60.
12. A. V. Dobrynin, M. Rubinstein, Theory of Polyelectrolytes in solutions and at surfaces, *Prog. Polym. Sci.*, **2005**, *30* (11), 1049-1118.
13. A. V. Dobrynin, Theory and simulations of charged polymers: From solution properties to polymeric nanomaterials, *Curr. Opin. Coll. Interface Sci.*, **2008**, *13* (6), 376-388.
14. M. Sedláč, Structure and Dynamics of Polyelectrolyte Solutions by Light Scattering: T. Radeva, *Physical Chemistry of Polyelectrolytes*, Marcel & Dekker,

2001.

15. M. Sedláč, What Can Be Seen by Static and Dynamic Light Scattering in Polyelectrolyte Solutions and Mixtures, *Langmuir*, **1999**, *15* (12), 4045-4051.
16. R. S. Koene, M. Mandel, Quasi-elastic light scattering by polyelectrolyte solutions without added salt, *Macromolecules*, **1983**, *16* (6), 973-978.
17. M. Schmidt, Static and dynamic light scattering by an aqueous polyelectrolyte solution without added salt: Quaternized poly(2-vinylpyridine), *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, **1989**, *10* (2), 89-96.
18. J. Xia, P. L. Dubin, S. Edwards, H. Havel, Dilute solution properties of poly(dimethyldiallylammonium chloride) in aqueous sodium chloride solutions, *J. Polym. Sci., Part B, Polym. Phys.*, **1995**, *33* (7), 1117-1122.
19. J. J. Tanahatoe, M. E. Kuil, Light Scattering on Semidilute Polyelectrolyte Solutions: Molar Mass and Polyelectrolyte Concentration Dependence, *J. Phys. Chem. B*, **1997**, *101* (45), 9233-9239.
20. S. Chisaka, T. Norisuye, Chain dimensions and transport coefficients of sodium poly(isoprenesulfonate) in aqueous sodium chloride, *J. Polym. Sci., Part B, Polym. Phys.*, **2001**, *39* (17), 2071-2080.
21. A. Pohlmeier, S. Haber-Pohlmeier, Ionization of short polymethacrylic acid: titration, DLS, and model calculations, *J. Colloid Interface Sci.*, **2004**, *273* (2), 369-380.
22. K. Zhou, J. Li, Y. Lu, G. Zhang, Z. Xie, C. Wu, Re-examination of Dynamics of Polyelectrolytes in Salt-Free Dilute Solutions by Designing and Using a Novel Neutral-Charged-Neutral Reversible Polymer, *Macromolecules*, **2009**, *42* (18), 7146-7154.
23. M. Drifford, J.-P. Dalbiez, Effect of salt on sodium polystyrene sulfonate measured by light scattering, *Biopolymers*, **1985**, *24* (8), 1501-1514.
24. K. S. Schmitz, J.-W. Yu, On the electrostatic contribution to the persistence length of flexible polyelectrolytes, *Macromolecules*, **1988**, *21* (2), 484-489.
25. 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*, **1990**, *31* (5), 781-792.
26. W. Nierling, E. Nordmeier, Studies on Polyelectrolyte Solutions VII. Fast, Heterogeneous, and Slow Diffusion Modes of Poly(diallyl-N,N-dimethylammonium chloride) in Aqueous Alcoholic Salt Solvents, *Polymer J.*,

- 1997**, *29* (10), 795-806.
27. J. J. Tanahatoc, M. E. Kuil, Light Scattering on Semidilute Polyelectrolyte Solutions: Ionic Strength and Polyelectrolyte Concentration Dependence, *J. Phys. Chem. B*, **1997**, *101* (50), 10839-10844.
 28. M. Beer, M. Schmidt, M. Muthukumar, The Electrostatic Expansion of Linear Polyelectrolytes: Effects of Gegenions, Co-ions, and Hydrophobicity, *Macromolecules*, **1997**, *30* (26), 8375-8385.
 29. E. Buhler, M. Rinaudo, Structural and Dynamical Properties of Semirigid Polyelectrolyte Solutions: A Light-Scattering Study, *Macromolecules*, **2000**, *33* (6), 2098-2106.
 30. R. Schweins, J. Hollmann, K. Huber, Dilute solution behaviour of sodium polyacrylate chains in aqueous NaCl solutions, *Polymer*, **2003**, *44* (23), 7131-7141.
 31. R. Cong, E. Temyanko, P. S. Russo, N. Edwin, R. M. Uppu, Dynamics of Poly(styrenesulfonate) Sodium Salt in Aqueous Solution, *Macromolecules*, **2006**, *39* (2), 731-739.
 32. S. Haber-Pohlmeier, A. Pohlmeier, Hydrodynamic Properties of Short NaPMA in Excess Salt: a Dynamic Light Scattering Study, *Croat. Chem. Acta*, **2007**, *80* (3-4), 439-444.
 33. B. D. Ermi, E. J. Amis, Model Solutions for Studies of Salt-Free Polyelectrolytes, *Macromolecules*, **1996**, *29* (7), 2701-2703.
 34. B. D. Ermi, E. J. Amis, Domain Structures in Low Ionic Strength Polyelectrolyte Solutions, *Macromolecules*, **1998**, *31* (21), 7378-7384.
 35. M. Sedlák, Domain structure of polyelectrolyte solutions: is it real, *Macromolecules*, **1993**, *26* (5), 1158-1162.
 36. M. Sedlák, On the possible role of nonelectrostatic interactions in the mechanism of the slow polyelectrolyte mode observed by dynamic light scattering, *J. Chem. Phys.*, **1994**, *101* (11), 10140-10144.
 37. M. Sedlák, Mechanical properties and stability of multimacroion domains in polyelectrolyte solutions, *J. Chem. Phys.*, **2002**, *116* (12), 5236-5245.
 38. M. Sedlák, Long-time stability of multimacroion domains in polyelectrolyte solutions, *J. Chem. Phys.*, **2002**, *116* (12), 5246-5255.
 39. M. Sedlák, Generation of multimacroion domains in polyelectrolyte solutions by change of ionic strength or pH (macroion charge), *J. Chem. Phys.*, **2002**, *116*

- (12), 5256-5262.
40. M. Sedláč, Real-time monitoring of the origination of multimacroion domains in a polyelectrolyte solution, *J. Chem. Phys.*, **2005**, *122* (15), 151102-15114.
 41. R. C. Michel, W. F. Reed, New evidence of the nonequilibrium nature of the “slow modes” of diffusion in polyelectrolyte solutions, *Biopolymers*, **2000**, *53* (1), 19-39.
 42. R. G. Smits, M. E. Kuil, M. Mandel, Quasi Elastic Light Scattering Study on Solutions of Linear Flexible Polyelectrolytes at Low Ionic Strengths, *Macromolecules*, **1994**, *27* (20), 5599-5608.
 43. S. Ghosh, R. M. Peitzsch, W. F. Reed, Aggregates and other particles as the origin of the “extraordinary” diffusional phase in polyelectrolyte solutions, *Biopolymers*, **1992**, *32* (8), 1105-1122.
 44. M. Nierlich, F. Boué, A. Lapp, R. Oberthur, Characteristic lengths and the structure of salt free polyelectrolyte solutions. A small angle neutron scattering study, *Colloid Polymer Sci.*, **1985**, *263* (12), 955-964.
 45. K. Kassapidou, W. Jesse, M. E. Kuil, A. Lapp, S. Egelhaaf, J. R. C. van der Maarel, Structure and charge distribution in DNA and poly(styrenesulfonate) aqueous solutions, *Macromolecules*, **1997**, *30* (9), 2671-2684.
 46. B. D. Ermi, E. J. Amis, Influence of Backbone Solvation on Small Angle Neutron Scattering from Polyelectrolyte Solutions, *Macromolecules*, **1997**, *30* (22), 6937-6942.
 47. M. N. Spiteri, C. E. Williams, F. Boué, Pearl-Necklace-Like Chain Conformation of Hydrophobic Polyelectrolyte: a SANS Study of Partially Sulfonated Polystyrene in Water, *Macromolecules*, **2007**, *40* (18), 6679-6691.
 48. W. Essafi, N. Haboubi, C. Williams, F. Boué, Weak Temperature Dependence of Structure in Hydrophobic Polyelectrolyte Aqueous Solution (PSSNa): Correlation between Scattering and Viscosity, *J. Phys. Chem. B*, **2011**, *115* (29), 8951-8960.
 49. N. Ise, T. Okubo, S. Kunugi, H. Matsuoka, K. Yamamoto, Y. Ishii, “Ordered” structure in dilute solutions of sodium polystyrenesulfonates as studied by small-angle x-ray scattering, *J. Chem. Phys.*, **1984**, *81* (7), 3294-3306.
 50. K. Kaji, H. Urakawa, T. Kanaya, R. Kitamaru, Phase diagram of polyelectrolyte

- solutions, *J. Phys. France*, **1988**, 49, 993-1000.
51. D. Baigl, R. Ober, D. Qu, A. Fery, C. E. Williams, Correlation length of hydrophobic polyelectrolyte solutions, *Europhys. Lett.*, **2003**, 62 (4), 588-594.
52. D. Qu, D. Baigl, C. E. Williams, H. Möhwald, A. Fery, Dependence of Structural Forces in Polyelectrolyte Solutions on Charge Density: A Combined AFM/SAXS Study, *Macromolecules*, **2003**, 36 (18), 6878-6883.
53. J. Sukpisan, J. Kanatharana, A. Sirivat, S. Q. Wang, The specific viscosity of partially hydrolyzed polyacrylamide solutions: Effects of degree of hydrolysis, molecular weight, solvent quality and temperature, *J. Polym. Sci., Part B, Polym. Phys.*, **1998**, 36 (5), 743-753.
54. J. Park, Y.-W. Choi, K. Kim, H. Chung, D. Sohn, Aggregation Processes of a Weak Polyelectrolyte, Poly(allylamine) Hydrochloride, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2008**, 29 (1), 104-110.
55. D. A. Hoagland, E. Arvanitidou, C. Welch, Capillary Electrophoresis Measurements of the Free Solution Mobility for Several Model Polyelectrolyte Systems, *Macromolecules*, **1999**, 32 (19), 6180-6190.
56. P. Kujawa, J. M. Rosiak, J. Selb, F. Candau, Micellar Synthesis and Properties of Hydrophobically Associating Polyampholytes, *Macromol. Chem. Phys.*, **2001**, 202 (8), 1384-1397.
57. H. Zhou, G.-Q. Song, Y.-X. Zhang, J. Chen, M. Jiang, T. E. Hogen-Esch, R. Dieing, L. Ma, L. Haeussling, Hydrophobically Modified Polyelectrolytes, 4. Synthesis and Solution Properties of Fluorocarbon-Containing Poly(acrylic acid), *Macromol. Chem. Phys.*, **2001**, 202 (15), 3057-3064.
58. N. Hadjichristidis, S. Pispas, G. Floudas, *Block Copolymers: Synthetic Strategies, Physical Properties, and Applications*, Wiley-Interscience, **2003**.
59. I. W. Hamley, *Block Copolymers in Solution: Fundamentals and Applications*, Wiley, **2005**.
60. G. Reiss, Micellization of block copolymers, *Prog. Polym. Sci.*, **2003**, 28 (7), 1107-1170.
61. J.-F. Gohy, Block Copolymer Micelles, *Adv. Polym. Sci.*, **2005**, 190, 65-136.

62. K. Nakashima, P. Bahadur, Aggregation of water-soluble block copolymers in aqueous solutions: Recent trends, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2006**, 123-126, 75-96.
63. A. Harada, K. Kataoka, Supramolecular assemblies of block copolymers in aqueous media as nanocontainers relevant to biological applications, *Prog. Polym. Sci.*, **2006**, 31 (11), 949-982.
64. C.-A. Fustin, V. Abetz, J.-F. Gohy, Triblock terpolymer micelles: A personal outlook, *Eur. Phys. J. E*, **2005**, 16, 291-302.
65. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, M. Pitsikalis, S. Pispas, A. Avgeropoulos, Linear and non-linear triblock terpolymers. Synthesis, self-assembly in selective solvents and in bulk, *Prog. Polym. Sci.*, **2005**, 30 (7), 689-812.
66. M. Moffitt, K. Khougaz, A. Eisenberg, Micellization of Ionic Block Copolymers, *Acc. Chem. Res.*, **1996**, 29 (2), 95-102.
67. J. Kötzt, S. Kosmella, T. Beitz, Self-assembled polyelectrolyte systems, *Prog. Polym. Sci.*, **2001**, 26 (8), 1199-1232.
68. S. Förster, V. Abetz, A. H. E. Müller, Polyelectrolyte Block Copolymer Micelles, *Adv. Polym. Sci.*, **2004**, 166, 173-210.
69. M. A. Cohen Stuart, B. Hofs, I. K. Voets, A. de Keizer, Assembly of polyelectrolyte-containing block copolymers in aqueous media, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **2005**, 10 (1-2), 30-36.
70. K. Hales, D. J. Pochan, Using polyelectrolyte block copolymers to tune nanostructure assembly, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **2006**, 11 (6), 330-336.
71. N. Dan, M. Tirrell, Self-assembly of block copolymers with a strongly charged and a hydrophobic block in a selective, polar solvent. Micelles and adsorbed layers, *Macromolecules*, **1993**, 26 (16), 4310-4315.
72. N. P. Shusharina, I. A. Nyrkova, A. R. Khokhlov, Diblock Copolymers with a Charged Block in a Selective Solvent: Micellar Structure, *Macromolecules*, **1996**, 29 (9), 3167-3174.
73. O. V. Borisov, E. B. Zhulina, Morphology of Micelles Formed by Diblock

- Copolymer with a Polyelectrolyte Block, *Macromolecules*, **2003**, *36* (26), 10029-10036.
74. S. V. Venev, P. Reineker, I. I. Potemkin, Direct and Inverse Micelles of Diblock Copolymers with a Polyelectrolyte Block: Effect of Equilibrium Distribution of Counterions, *Macromolecules*, **2010**, *43* (24), 10735-10742.
75. P. Pincus, Colloid stabilization with grafted polyelectrolytes, *Macromolecules*, **1991**, *24* (10), 2912-2919.
76. S. Misra, W. L. Mattice, D. H. Napper, Structure of Polyelectrolyte Stars and Convex Polyelectrolyte Brushes, *Macromolecules*, **1994**, *27* (24), 7090-7098.
77. E. B. Zhulina, O. V. Borisov, Polyelectrolytes Grafted to Curved Surfaces, *Macromolecules*, **1996**, *29* (7), 2618-2626.
78. L. Zhang, R. J. Barlow, A. Eisenberg, Scaling Relations and Coronal Dimensions in Aqueous Block Polyelectrolyte Micelles, *Macromolecules*, **1995**, *28* (18), 6055-6066.
79. K. Khougaz, I. Astafieva, A. Eisenberg, Micellization in Block Polyelectrolyte Solutions. 3. Static Light Scattering Characterization, *Macromolecules*, **1995**, *28* (21), 7135-7147.
80. W. Groenewegen, S. U. Egelhaaf, A. Lapp, J. R. C. van der Maarel, Neutron Scattering Estimates of the Effect of Charge on the Micelle Structure in Aqueous Polyelectrolyte Diblock Copolymer Solutions, *Macromolecules*, **2000**, *33* (9), 3283-3293.
81. W. Groenewegen, A. Lapp, S. U. Egelhaaf, J. R. C. van der Maarel, Counterion Distribution in the Coronal Layer of Polyelectrolyte Diblock Copolymer Micelles, *Macromolecules*, **2000**, *33* (11), 4080-4086.
82. J. R. C. van der Maarel, W. Groenewegen, S. U. Egelhaaf, A. Lapp, Salt-Induced Contraction of Polyelectrolyte Diblock Copolymer Micelles, *Langmuir*, **2000**, *16* (19), 7510-7519.
83. I. C. Riegel, D. Samios, C. L. Petzhold, A. Eisenberg, Self-assembly of amphiphilic di and triblock copolymers of styrene and quaternized 5-(*N,N*-diethylamino) isoprene in selective solvents, *Polymer*, **2003**, *44* (7), 2117-2128.

84. H. Schuch, J. Klingler, P. Rossmanith, T. Frechen, M. Gerst, J. Feldthusen, A. H. E. Müller, Characterization of Micelles of Polyisobutylene-*block*-poly(methacrylic acid) in Aqueous Medium, *Macromolecules*, **2000**, *33* (5), 1734-1740.
85. E. Eghbali, O. Colombani, M. Drechsler, A. H. E. Müller, H. Hoffmann, Rheology and Phase Behavior of Poly(*n*-butyl acrylate)-*block*-poly(acrylic acid) in Aqueous Solution, *Langmuir*, **2006**, *22* (10), 4766-4776.
86. M. Burkhardt, N. Martinez-Castro, S. Tea, M. Drechsler, I. Babin, I. Grishagin, R. Schweins, D. V. Pergushov, M. Gradzielski, A. B. Zezin, A. H. E. Müller, Polyisobutylene-*block*-poly(methacrylic acid) Diblock Copolymers: Self-Assembly in Aqueous Media, *Langmuir*, **2007**, *23* (26), 12864-12874.
87. O. Colombani, M. Ruppel, M. Burkhardt, M. Drechsler, M. Schumacher, M. Gradzielski, R. Schweins, A. H. E. Müller, Structure of Micelles of Poly(*n*-butyl acrylate)-*block*-poly(acrylic acid) Diblock Copolymers in Aqueous Solution, *Macromolecules*, **2007**, *40* (12), 4351-4362.
88. M. Štěpánek, K. Procházka, W. Brown, Time-Dependent Behavior of Block Polyelectrolyte Micelles in Aqueous Media Studied by Potentiometric Titrations, QELS and Fluorometry, *Langmuir*, **2000**, *16* (6), 2502-2507.
89. P. Matějček, K. Podhájecká, J. Humpolíčková, F. Uhlík, K. Jelínek, Z. Limpouchová, K. Procházka, M. Špírková, Polyelectrolyte Behavior of Polystyrene-*block*-poly(methacrylic acid) Micelles in Aqueous Solutions at Low Ionic Strength, *Macromolecules*, **2004**, *37* (26), 10141-10154.
90. M. Milnera, M. Štěpánek, I. Zusková, K. Procházka, Experimental Study of the Electrophoretic Mobility and Effective Electric Charge of Polystyrene-Block-Poly(Methacrylic Acid) Micelles in Aqueous Media, *Int. J. Polym. Anal. Charact.*, **2007**, *12* (1), 23-33.
91. K. Procházka, P. Matějček, M. Uchman, M. Štěpánek, J. Humpolíčková, M. Hof, M. Špírková, pH-Dependent Behavior of Hydrophobically Modified Polyelectrolyte Shells of Polymeric Nanoparticles, *Macromol. Symp.*, **2008**, *273* (1), 95-102.
92. P. Guenoun, H. Ted Davis, M. Tirrell, J. W. Mays, Aqueous Micellar Solutions

- of Hydrophobically Modified Polyelectrolytes, *Macromolecules*, **1996**, 29 (11), 3965-3969.
93. P. Guenoun, H. T. Davis, H. A. Doumaux, A. Maldonado, J. W. Mays, Y. Talmon, N. Taulier, M. Tirrell, W. Urbach, Y. Zheng, Polyelectrolyte Micelles: Self-Diffusion and Electron Microscopy Studies, *Langmuir*, **2000**, 16 (10), 4436-4440.
94. K. Szczubiałka, K. Ishikawa, Y. Morishima, Micelle Formation of Diblock Copolymers of Styrene and Sulfonated Isoprene in Aqueous Solution, *Langmuir*, **1999**, 15 (2), 454-462.
95. S. Förster, M. Zisenis, E. Wenz, M. Antonietti, Micellization of strongly segregated block copolymers, *J. Chem. Phys.*, **1996**, 104 (24), 9956-9970.
96. S. Förster, N. Hermsdorf, C. Böttcher, P. Lindner, Structure of Polyelectrolyte Block Copolymer Micelles, *Macromolecules*, **2002**, 35 (10), 4096-4105.
97. A. S. Lee, V. Bütün, M. Vamvakaki, S. P. Armes, J. A. Pople, A. P. Gast, Structure of pH-Dependent Block Copolymer Micelles: Charge and Ionic Strength Dependence, *Macromolecules*, **2002**, 35 (22), 8540-8551.
98. P. Ravi, C. Wang, K. C. Tam, L. H. Gan, Association Behavior of Poly(methacrylic acid)-*block*-poly(methyl methacrylate) in Aqueous Medium: Potentiometric and Laser Light Scattering Studies, *Macromolecules*, **2003**, 36 (1), 173-179.
99. J. Yao, P. Ravi, K. C. Tam, L. H. Gan, Association Behavior of Poly(methyl methacrylate)-*block*-methacrylic acid) in Aqueous Medium, *Langmuir*, **2004**, 20 (6), 2157-2163.
100. M. Jacquin, P. Muller, R. Talingting-Pabalan, H. Cottet, J. F. Berret, T. Fütterer, O. Théodoly, Chemical analysis and aqueous solution properties of charged amphiphilic block copolymers PBA-*b*-PAA synthesized by MADIX[®], *J. Colloid Interface Sci.*, **2007**, 316 (2), 897-911.
101. V. Schmidt, E. Di Cola, C. Giacomelli, A. R. Brisson, T. Narayanan, R. Borsali, Polyelectrolyte Behavior of Diblock Copolymer Micelles Having Phosphonic Diacid Groups at the Corona, *Macromolecules*, **2008**, 41 (6), 2195-2202.
102. K. Stubenrauch, I. Voets, G. Fritz-Popovski, G. Trimmel, pH and ionic strength

- responsive polyelectrolyte block copolymer micelles prepared by ring opening metathesis polymerization, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **2009**, *47* (4), 1178-1191.
103. M. V. Motyakin, E. A. Lysenko, P. S. Chelushkin, L. L. Yasina, A. M. Vasserman, Local mobility and structure of cationic amphiphilic diblock copolymer micelles in aqueous solutions, *Polym. Sci., Ser. A*, **2010**, *52* (3), 235-242.
104. X. Guo, M. Ballauff, Spatial Dimensions of Colloidal Polyelectrolyte Brushes As Determined by Dynamic Light Scattering, *Langmuir*, **2000**, *16* (23), 8719-8726.
105. X. Guo, M. Ballauff, Spherical polyelectrolyte brushes: Comparison between annealed and quenched brushes, *Phys. Rev. E*, **2001**, *64* (5), 051406.
106. M. Ballauff, Spherical polyelectrolyte brushes, *Prog. Polym. Sci.*, **2007**, *32* (10), 1135-1151.
107. W.-Y. Chen, P. Alexandridis, C.-K. Su, C. S. Patrickios, W. R. Hertler, T. Alan Hatton, Effect of Block Size and Sequence on the Micellization of ABC Triblock Methacrylic Polyampholytes, *Macromolecules*, **1995**, *28* (25), 8604-8611.
108. J. Kříž, B. Masař, J. Pleštil, Z. Tuzar, H. Pospíšil, D. Doskočilová, Three-Layer Micelles of an ABC Block Copolymer: NMR, SANS, and LS Study of a Poly(2-ethylhexyl acrylate)-*block*-poly(methyl methacrylate)-*block*-poly(acrylic acid) Copolymer in D₂O, *Macromolecules*, **1998**, *31* (1), 41-51.
109. G. Yu, A. Eisenberg, Multiple Morphologies Formed from an Amphiphilic ABC Triblock Copolymer in Solution, *Macromolecules*, **1998**, *31* (16), 5546-5549.
110. J.-F. Gohy, N. Willet, S. Varshney, J.-X. Zhang, R. Jérôme, Core-Shell-Corona Micelles with a Responsive Shell, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40* (17), 3214-3216.
111. J.-F. Gohy, N. Willet, S. K. Varshney, J.-X. Zhang, R. Jérôme, pH Dependence of the morphology of aqueous micelles formed by polystyrene-*block*-poly(2-vinylpyridine)-*block*-poly(ethylene oxide) copolymers, *e-Polymers*, **2002**, no. 035.
112. L. Lei, J.-F. Gohy, N. Willet, J.-X. Zhang, S. Varshney, R. Jérôme, Morphology

- of core-shell-corona aqueous micelles: II. Addition of core-forming homopolymer, *Polymer*, **2004**, *45* (13), 4375-4381.
113. M. Štěpánek, P. Matějček, J. Humpolíčková, K. Procházka, Reversible Aggregation of Polystyrene-*block*-poly(2-vinylpyridine)-*block*-poly(ethylene oxide) Block Copolymer Micelles in Acidic Aqueous Solutions, *Langmuir*, **2005**, *21* (23), 10783-10790.
114. G. Koutalas, S. Pispas, N. Hadjichristidis, Micelles of poly(isoprene-*b*-2-vinylpyridine-*b*-ethylene oxide) terpolymers in aqueous media and their interaction with surfactants, *Eur. Phys. J. E*, **2004**, *15*, 457-464.
115. J. Liu, D. Liu, Y. Yokoyama, S. Yusa, K. Nakashima, Physicochemical Properties of Micelles of Poly(styrene-*b*-[3-(methacryloylamino)propyl] trimethylammonium chloride-*b*-ethylene oxide) in Aqueous Solutions, *Langmuir*, **2009**, *25* (2), 739-743.
116. R. Bieringer, V. Abetz, A.H.E. Müller, Triblock copolyampholytes from 5-(N,N-dimethyl amino)isoprene, styrene, and methacrylic acid: Synthesis and solution properties, *Eur. Phys. J. E*, **2001**, *5*, 5-12.
117. J. Yao, P. Ravi, K. C. Tam, L. H. Gan, Association behavior of poly(methyl methacrylate-*b*-methacrylic acid-*b*-methyl methacrylate) in aqueous medium, *Polymer*, **2004**, *45* (8), 2781-2791.
118. I. Katsampas, C. Tsitsilianis, Hierarchical Self-Organization of ABC Terpolymer Constituted of a Long Polyelectrolyte End-Capped by Different Hydrophobic Blocks, *Macromolecules*, **2005**, *38* (4), 1307-1314.
119. C. Tsitsilianis, Y. Roiter, I. Katsampas, S. Minko, Diversity of Nanostructured Self-Assemblies from a pH-Responsive ABC Terpolymer in Aqueous Media, *Macromolecules*, **2008**, *41* (3), 925-934.
120. X. Chen, Y. An, D. Zhao, Z. He, Y. Zhang, J. Cheng, L. Shi, Core-Shell-Corona Au-Micelle Composites with a Tunable Smart Hybrid Shell, *Langmuir*, **2008**, *24* (15), 8198-8204.
121. R. Sharma, J.-S. Lee, R. C. Bettencourt, C. Xiao, S. F. Konieczny, Y.-Y. Won, Effects of the Incorporation of a Hydrophobic Middle Block into a PEG-Polycation Diblock Copolymer on the Physicochemical and Cell

- Interaction Properties of the Polymer–DNA Complexes, *Biomacromolecules*, **2008**, *9* (11), 3294-3307.
122. M. Štěpánek, K. Podhájek, E. Tesařová, K. Procházka, Z. Tuzar, W. Brown, Hybrid Polymeric Micelles with Hydrophobic Cores and Mixed Polyelectrolyte/Nonelectrolyte Shells in Aqueous Media. 1. Preparation and Basic Characterization, *Langmuir*, **2001**, *17* (14), 4240-4244.
123. K. Podhájek, M. Štěpánek, K. Procházka, W. Brown, Hybrid Polymeric Micelles with Hydrophobic Cores and Mixed Polyelectrolyte/Nonelectrolyte Shells in Aqueous Media. 2. Studies of the Shell Behavior, *Langmuir*, **2001**, *17* (14), 4245-4250.
124. C. Branden, J. Tooze, *Introduction to Protein Structure*, Garland Science, **1999**.
125. D. Whitford, *Proteins: Structure and Function*, Wiley, **2005**.
126. R. K. Murray, D. Bender, V. W. Rodwell, K. M. Botham, P. J. Kennelly, P. A. Weil, *Harper's Illustrated Biochemistry*, McGraw-Hill Medical, **2009**.
127. <http://www ww pdb.org/>
128. R. E. Canfield, The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme, *J. Biol. Chem.*, **1963**, *238* (8), 2698-2707.
129. C. C. F. Blake, D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, V. R. Sarma, Structure of Hen Egg-White Lysozyme: A Three-dimensional Fourier Synthesis at 2 Å Resolution, *Nature*, **1965**, *206* (4986), 757-761.
130. L. N. Johnson, The early history of lysozyme, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **1998**, *5* (11), 942-944.
131. <http://lysozyme.co.uk/>
132. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
133. C. Tanford, R. Roxby, Interpretation of Protein Titration Curves. Application to Lysozyme, *Biochemistry*, **1972**, *11* (11), 2192-2198.
134. D. E. Kuehner, J. Engmann, F. Fergg, M. Wernick, H. W. Blanch, J. M. Prausnitz, Lysozyme Net Charge and Ion Binding in Concentrated Aqueous Electrolyte Solutions, *J. Phys. Chem. B*, **1999**, *103* (8), 1368-1374.

135. C. Tribet, Complexation Between Amphiphilic Polyelectrolytes and Proteins: From Necklaces to Gels: T. Radeva, *Physical Chemistry of Polyelectrolytes*, Marcel & Dekker, **2001**.
136. C. L. Cooper, P. L. Dubin, A. B. Kayitmazer, S. Turksen, Polyelectrolyte-protein complexes, *Curr. Opin. Coll. Interface Sci.* **2005**, *10* (1-2), 52-78.
137. A. Tsuboi, T. Izumi, M. Hirata, J. Xia, P. L. Dubin, E. Kokufuta, Complexation of Proteins with a Strong Polyanion in an Aqueous Salt-free System, *Langmuir*, **1996**, *12* (26), 6295-6303.
138. F. Carlsson, P. Linse, M. Malmsten, Monte Carlo Simulations of Polyelectrolyte-Protein Complexation, *J. Phys. Chem. B*, **2001**, *105* (38), 9040-9049.
139. F. Carlsson, M. Malmsten, P. Linse, Protein-Polyelectrolyte Cluster Formation and Redissolution: A Monte Carlo Study, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125* (10), 3140-3149.
140. R. de Vries, M. Cohen Stuart, Theory and simulations of macroion complexation, *Curr. Opin. Coll. Interface Sci.* **2006**, *11* (5), 295-301.
141. F. L. B. da Silva, B. Jönsson, Polyelectrolyte-protein complexation driven by charge regulation, *Soft Matter*, **2009**, *5* (15), 2862-2868.
142. J. M. Park, B. B. Muhoberac, P. L. Dubin, J. Xia, Effects of Protein Charge Heterogeneity in Protein-Polyelectrolyte Complexation, *Macromolecules*, **1992**, *25* (1), 290-295.
143. J. Xia, P. L. Dubin, Y. Kim, B. B. Muhoberac, V. J. Klimkowski, Electrophoretic and Quasi-Elastic Light Scattering of Soluble Protein-Polyelectrolyte Complexes, *J. Phys. Chem.*, **1993**, *97* (17), 4528-4534.
144. J. Xia, P. L. Dubin, H. Dautzenberg, Light Scattering, Electrophoresis, and Turbidimetry Studies of Bovine Serum Albumin-Poly(dimethyldiallylammonium chloride) Complex, *Langmuir*, **1993**, *9* (8), 2015-2019.
145. L. S. Ahmed, J. Xia, P. L. Dubin, E. Kokufuta, Stoichiometry and the Mechanism of Complex Formation in Protein-Polyelectrolyte Coacervation, *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.*, **1994**, *A31* (1), 17-29.

146. K. W. Mattison, I. J. Brittain, P. L. Dubin, Protein–Polyelectrolyte Phase Boundaries, *Biotechnol. Prog.*, **1995**, *11* (6), 632-637.
147. Y. Li, K. W. Mattison, P. L. Dubin, H. A. Havel, S. L. Edwards, Light Scattering Studies of the Binding of Bovine Serum Albumin to a Cationic Polyelectrolyte, *Biopolymers*, **1996**, *38* (4), 527-533.
148. K. W. Mattison, P. L. Dubin, I. J. Brittain, Complex Formation between Bovine Serum Albumin and Strong Polyelectrolytes: Effect of Polymer Charge Density, *J. Phys. Chem. B*, **1998**, *102* (19), 3830-3836.
149. K. Kaibara, T. Okazaki, H. B. Bohidar, P. L. Dubin, pH-Induced Coacervation in Complexes of Bovine Serum Albumin and Cationic Polyelectrolytes, *Biomacromolecules*, **2000**, *1* (1), 100-107.
150. M. Antonov, M. Mazzawi, P. L. Dubin, Entering and Exiting the Protein–Polyelectrolyte Coacervate Phase via Nonmonotonic Salt Dependence of Critical Conditions, *Biomacromolecules*, **2010**, *11* (1), 51-59.
151. C. L. Cooper, A. Goulding, A. B. Kayitmazer, S. Ulrich, S. Stoll, S. Turksen, S. Yusa, A. Kumar, P. L. Dubin, Effects of Polyelectrolyte Chain Stiffness, Charge Mobility, and Charge Sequences on Binding to Proteins and Micelles, *Biomacromolecules*, **2006**, *7* (4), 1025-1035.
152. T. Hattori, K. Kimura, E. Seyrek, P. L. Dubin, Binding of Bovine Serum Albumin to Heparin Determined by Turbidimetric Titration and Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis, *Anal. Biochem.*, **2001**, *295* (2), 158-167.
153. E. Seyrek, P. L. Dubin, C. Tribet, E. A. Gamble, Ionic Strength Dependence of Protein-Polyelectrolyte Interactions, *Biomacromolecules*, **2003**, *4* (2), 273-282.
154. H. Bohidar, P. L. Dubin, P. R. Majhi, C. Tribet, W. Jaeger, Effects of Protein-Polyelectrolyte Affinity and Polyelectrolyte Molecular Weight on Dynamic Properties of Bovine Serum Albumin-Poly(diallyldimethylammonium chloride) Coacervates, *Biomacromolecules*, **2005**, *6* (3), 1573-1585.
155. A. B. Kayitmazer, S. P. Strand, C. Tribet, W. Jaeger, P. L. Dubin, Effect of Polyelectrolyte Structure on Protein–Polyelectrolyte Coacervates: Coacervates of Bovine Serum Albumin with Poly(diallyldimethylammonium chloride) versus Chitosan, *Biomacromolecules*, **2007**, *8* (11), 3568-3577.

156. E. Kizilay, A. B. Kayitmazer, P. L. Dubin, Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2011**, *167* (1-2), 24-37.
157. D. Takahashi, Y. Kubota, K. Kokai, T. Izumi, M. Hirata, E. Kokufuta, Effects of Surface Charge Distribution of Proteins in Their Complexation with Polyelectrolytes in an Aqueous Salt-Free System, *Langmuir*, **2000**, *16* (7), 3133-3140.
158. H. Matsunami, R. Kikuchi, K. Ogawa, E. Kokufuta, Light scattering study of complex formation between protein and polyelectrolyte at various ionic strengths, *Colloids Surf., B*, **2007**, *56* (1-2), 142-148.
159. S. Mao, U. Bakowsky, A. Jintapattanakit, T. Kissel, Self-Assembled Polyelectrolyte Nanocomplexes between Chitosan Derivatives and Insulin, *J. Pharm. Sci.*, **2006**, *95* (5), 1035-1048.
160. M. Topuzoğullari, N. S. Çimen, Z. Mustafaeva, M. Mustafaev, Molecular-weight distribution and structural transformation in water-soluble complexes of poly(acrylic acid) and bovine serum albumin, *Eur. Polym. J.*, **2007**, *43* (7), 2935-2946.
161. V. Boeris, D. Spelzini, J. P. Salgado, G. Picó, D. Romanini, B. Farruggia, Chymotrypsin–poly vinyl sulfonate interaction studied by dynamic light scattering and turbidimetric approaches, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, **2008**, *1780* (9), 1032-1037.
162. F. Cousin, J. Gummel, D. Ung, F. Boué, Polyelectrolyte–Protein Complexes: Structure and Conformation of Each Species Revealed by SANS, *Langmuir*, **2005**, *21* (21), 9675-9688.
163. J. Gummel, F. Boué, B. Demé, F. Cousin, Charge Stoichiometry Inside Polyelectrolyte–Protein Complexes: A Direct SANS Measurement for the PSSNa–Lysozyme System, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, *110* (49), 24837-24846.
164. J. Gummel, F. Cousin, F. Boué, Counterions Release from Electrostatic Complexes of Polyelectrolytes and Proteins of Opposite Charge: A Direct Measurement, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129* (18), 5806-5807.
165. F. Cousin, J. Gummel, D. Clemens, I. Grillo, F. Boué, Multiple Scale

- Reorganization of Electrostatic Complexes of Poly(styrenesulfonate) and Lysozyme, *Langmuir*, **2010**, *26* (10), 7078-7085.
166. F. Cousin, J. Gummel, S. Combet, F. Boué, The model Lysozyme–PSSNa system for electrostatic complexation: Similarities and differences with complex coacervation, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2011**, *167* (1-2), 71-84.
167. S. Chodankar, V. K. Aswal, J. Kohlbrecher, R. Vavrin, A. G. Wagh, Structural study of coacervation in protein-polyelectrolyte complexes, *Phys. Rev. E*, **2008**, *78*, 031913.
168. V. Ball, M. Winterhalter, P. Schwinte, Ph. Lavalle, J.-C. Voegel, P. Schaaf, Complexation Mechanism of Bovine Serum Albumin and Poly(allylamine hydrochloride), *J. Phys. Chem. B*, **2002**, *106* (9), 2357-2364.
169. D. Romanini, M. Braia, R. G. Angarten, W. Loh, G. Picó, Interaction of lysozyme with negatively charged flexible chain polymers, *J. Chromatogr., B*, **2007**, *857* (1), 25-31.
170. T. Izumi, M. Hirata, E. Kokufuta, H.-J. Cha, C. W. Frank, Spectroscopic Studies on the Complexation of Papain with Potassium Poly(Vinyl Alcohol Sulfate), *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.*, **1994**, *A31* (1), 31-37.
171. A. Teramoto, M. Watanabe, E. Iizuka, K. Abe, Interaction of Polyelectrolytes with Albumin Using Fluorescence Measurement, *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.*, **1994**, *A31* (1), 53-64.
172. J. Xia, P. L. Dubin, Y. Morishima, T. Sato, B. B. Muhoberac, Quasielastic Light Scattering, Electrophoresis, and Fluorescence Studies of Lysozyme-Poly(2-Acrylamido-Methylpropylsulfate) Complexes, *Biopolymers*, **1995**, *35* (4), 411-418.
173. T. Sato, K. W. Mattison, P. L. Dubin, M. Kamachi, Y. Morishima, Effect of Protein Aggregation on the Binding of Lysozyme to Pyrene-Labeled Polyanions, *Langmuir*, **1998**, *14* (19), 5430-5437.
174. J. Xia, P. L. Dubin, E. Kokufuta, H. Havel, B. B. Muhoberac, Light Scattering, CD, and Ligand Binding Studies of Ferrihemoglobin–Polyelectrolyte Complexes, *Biopolymers*, **1999**, *50* (2), 153-161.
175. V. Boeris, B. Farruggia, B. Nerli, D. Romanini, G. Picó, Protein-flexible chain

- polymer interactions to explain protein partition in aqueous two-phase systems and the protein-polyelectrolyte complex formation, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2007**, *41* (3), 286-294.
176. G. Gao, P. Yao, Structure and Activity Transition of Lysozyme on Interacting with and Releasing from Polyelectrolyte with Different Hydrophobicity, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **2008**, *46* (14), 4681-4690.
177. O. N. Ivinova, V. A. Izumrudov, V. I. Muronetz, I. Yu. Galaev, B. Mattiasson, Influence of Complexing Polyanions on the Thermostability of Basic Proteins, *Macromol. Biosci.*, **2003**, *3* (3-4), 210-215.
178. M. van de Weert, M. Bendix Andersen, S. Frokjaer, Complex Coacervation of Lysozyme and Heparin: Complex Characterization and Protein Stability, *Pharm. Res.*, **2004**, *21* (12), 2354-2359.
179. E. Sedlák, D. Fedunová, V. Veselá, D. Sedláková, M. Antalík, Polyanion Hydrophobicity and Protein Basicity Affect Protein Stability in Protein–Polyanion Complexes, *Biomacromolecules*, **2009**, *10* (9), 2533-2538.
180. E. A. Lysenko, P. S. Chelushkin, T. K. Bronich, A. Eisenberg, V. A. Kabanov, A. V. Kabanov, Formation of Multilayer Polyelectrolyte Complexes by Using Block Ionomer Micelles as Nucleating Particles, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *108* (33), 12352-12359.
181. D. V. Pergushov, E. V. Remizova, M. Gradzielski, P. Lindner, J. Feldthusen, A. B. Zezin, A. H. E. Müller, V. A. Kabanov, Micelles of polyisobutylene-*block*-poly(methacrylic acid) diblock copolymers and their water-soluble interpolyelectrolyte complexes formed with quaternized poly(4-vinylpyridine), *Polymer*, **2004**, *45* (2), 367-378.
182. P. Matějček, M. Uchman, J. Lokajová, M. Štěpánek, K. Procházka, M. Špírková, Interpolymer Complexes Based on the Core/Shell Micelles. Interaction of Polystyrene-*block*-poly(methacrylic acid) Micelles with Linear Poly(2-vinylpyridine) in 1,4-Dioxane Water Mixtures and in Aqueous Media, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, *111* (29), 8394-8401.
183. A. I. Kulebyakina, E. A. Lysenko, P. S. Chelushkin, A. V. Kabanov, A. B. Zezin, Self-assembly of an amphiphilic diblock copolymer in aqueous solutions:

- Effect of linear charge density of an ionogenic block, *Polym. Sci., Ser. A*, **2010**, 52 (6), 574-585.
184. A. Khanal, Y. Li, N. Takisawa, N. Kawasaki, Y. Oishi, K. Nakashima, Morphological Change of the Micelle of Poly(styrene)-*b*-poly(2-vinylpyridine)-*b*-poly(ethylene oxide) Induced by Binding of Sodium Dodecyl Sulfate, *Langmuir*, **2004**, 20 (12), 4809-4812.
185. V. Schmidt, C. Giacomelli, F. Lecolley, J. Lai-Kee-Him, A. R. Brisson, R. Borsali, Diblock Copolymer Micellar Nanoparticles Decorated with Annexin-A5 Proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128 (28), 9010-9011.
186. V. Schmidt, C. Giacomelli, A. R. Brisson, R. Borsali, Towards an easy access to Annexin-A5 protein binding block copolymer micelles, *Mater. Sci. Eng., C*, **2008**, 28 (4), 479-488.
187. V. Schmidt, C. Giacomelli, C. Gounou, J. Lai-Kee-Him, A. R. Brisson R. Borsali, Formation of Annexin-A5 Protein/Block Copolymer Micelle Complexes: QCM-D and PAGE Experiments, *Langmuir*, **2008**, 24 (21), 12189-12195.
188. A. Wittemann, B. Haupt, M. Ballauff, Polyelectrolyte-mediated Protein Adsorption, *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **2006**, 133, 58-64.
189. A. Wittemann, M. Ballauff, Interaction of proteins with linear polyelectrolytes and spherical polyelectrolyte brushes in aqueous solution, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2006**, 8 (45), 5269-5275.
190. K. Henzler, A. Wittemann, E. Breininger, M. Ballauff, S. Rosenfeldt, Adsorption of Bovine Hemoglobin onto Spherical Polyelectrolyte Brushes Monitored by Small-Angle X-ray Scattering and Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Biomacromolecules*, **2007**, 8 (11), 3674-3681.
191. K. Henzler, S. Rosenfeldt, A. Wittemann, L. Harnau, S. Finet, T. Narayanan, M. Ballauff, Directed Motion of Proteins along Tethered Polyelectrolytes, *Phys. Rev. Lett.*, **2008**, 100 (15), 158301.
192. K. Henzler, B. Haupt, K. Lauterbach, A. Wittemann, O. Borisov, M. Ballauff, Adsorption of β -Lactoglobulin on Spherical Polyelectrolyte Brushes: Direct Proof of Counterion Release by Isothermal Titration Calorimetry, *J. Am. Chem.*

- Soc.*, **2010**, *132* (9), 3159-3163.
193. N. Lefèvre, C.-A. Fustin, J.-F. Gohy, Polymeric Micelles Induced by Interpolymer Complexation, *Macromol. Rapid Commun.*, **2009**, *30* (22), 1871-1888.
194. I. K. Voets, A. de Keizer, M. A. Cohen Stuart, Complex coacervate core micelles, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2009**, *147-148*, 300-318.
195. B. J. Berne, R. Pecora, *Dynamic Light Scattering*, John Wiley & Sons, **1976**.
196. P. Kratochvil, *Classical Light Scattering from Polymer Solutions*, Elsevier, **1987**.
197. B. Chu, *Laser Light Scattering: Basic Principles and Practice*, 2nd ed., Academic Press, **1991**.
198. Ν. Χατζηχρηστίδης, Κ. Βύρας, Ε. Ιατρού, Σ. Πίσπας, Μ. Πιτσικάλης, Π. Πίσσης, *Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Πολυμερών*, Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών “Επιστήμη Πολυμερών και Εφαρμογές της”, **1998**.
199. D. E. Koppel, Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants, *J. Chem. Phys.*, **1972**, *57* (11), 4814-4820.
200. S. W. Provencher, Inverse problems in polymer characterization: Direct analysis of polydispersity with photon correlation spectroscopy, *Macromol. Chem. Phys.*, **1979**, *180* (1), 201-209.
201. R. J. Hunter, *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*, Academic Press, **1981**.
202. R. Xu, *Particle Characterization: Light Scattering Methods*, Chap. 6: *Electrophoretic Light Scattering*, Springer, **2001**.
203. A. V. Delgado, F. Gonzalez-Caballero, R. J. Hunter, L. K. Koopal, J. Lyklema, Measurement and Interpretation of Electrokinetic Phenomena, *Pure Appl. Chem.*, **2005**, *77* (10), 1753–1850.
204. A. Sharma, S. G. Schulman, *Introduction to Fluorescence Spectroscopy*, Wiley-Interscience, **1999**.
205. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer, **2006**.

206. J. R. Lakowicz, *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol. 6: Protein Fluorescence*, Springer, **2000**.
207. M. Hof, R. Hutterer, V. Fidler, *Fluorescence Spectroscopy in Biology: Advanced Methods and their Applications to Membranes, Proteins, DNA, and Cells*, Springer, **2005**.
208. S. M. Kelly, N. C. Price, The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **2000**, 1 (4), 349-384.
209. S. R. Martin, M. J. Schilstra, Circular Dichroism and Its Application to the Study of Biomolecules, *Methods Cell Biol.*, **2008**, 84, 263-293.
210. N. J. Greenfield, Methods to Estimate the Conformation of Proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data, *Anal. Biochem.*, **1996**, 235 (1), 1-10.
211. N. Sreerama, R. W. Woody, Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set, *Anal. Biochem.*, **2000**, 287 (2), 252-260.
212. <http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/main.html>
213. <http://www.embl.de/~andrade/k2d.html>
214. Ε. Ι. Καμίτσος, *Σημειώσεις Φασματοσκοπίας Υπερύθρου*, Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών “Επιστήμη Πολυμερών και Εφαρμογές της”, **2002**.
215. N. J. Harrick, *Internal Reflection Spectroscopy*, John Wiley & Sons, **1967**.
216. D. M. Byler, H. Susi, Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra, *Biopolymers*, **1986**, 25 (3), 469-487.
217. S. Seshadri, R. Khurana, A. L. Fink, Fourier transform infrared spectroscopy in analysis of protein deposits, *Methods Enzymol.*, **1999**, 309, 559-576.
218. S. E. Harding, B. Z. Chowdhry, *Protein-Ligand Interactions: Hydrodynamics and Calorimetry*, Oxford University Press, **2001**.
219. J. E. Ladbury, B. Z. Chowdhry, *Biocalorimetry: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*, John Wiley & Sons, **1998**.

220. I. Jelesarov, H. R. Bosshard, Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition, *J. Mol. Recognit.*, **1999**, *12* (1), 3-18.
221. Microcal Documentation, <http://microcal.com/default.asp>
222. Σ.-Χ. Γιατρέλλης, *Μελέτη της δομής των συμπλεγμάτων λιπιδικών μεμβρανών με L-αργινίνη, βινβλαστίνη και pDNA. Μοριακή οργάνωση - μεταπτώσεις φάσης των λιπιδικών διπλοστιβάδων*, Διδακτορική Διατριβή, Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, Τομέας Φυσικής, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, **2006**.
223. Α. Θανασούλας, *Μελέτη δομικών μεταβολών σε πρωτεϊνικά μόρια με τη χρήση της τεχνικής της αδιαβατικής θερμιδομετρίας διαφορικής σάρωσης: θερμοδυναμική με βάση τη δομή σταθερότητα της λειτουργικής περιοχής brc1 των πρωτεϊνών brca1, bard1 και 53bp1*, Διδακτορική Διατριβή, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, **2009**.
224. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, S. Pispas, M. Pitsikalis, Anionic polymerization: High vacuum techniques, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **2000**, *38* (18), 3211-3234.
225. D. Uhrig, J. W. Mays, Experimental techniques in high-vacuum anionic polymerization, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **2005**, *43* (24), 6179-6222.
226. L. van der Does, T. Beugeling, P. E. Froehling, A. Bantjes, Synthetic polymers with anticoagulant activity, *J. Polym. Sci., Polym. Symp.*, **1979**, *66* (1), 337-348.
227. C. G. Gebelein, D. Murphy, *The synthesis of some potentially blood compatible heparin - like polymeric biomaterials*: C. G. Gebelein, *Advances in Biomedical Polymers*, Plenum Press, **1987**, 277-284.
228. S. Pispas, Double hydrophilic block copolymers of sodium(2-sulfamate-3-carboxylate)isoprene and ethylene oxide, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2006**, *44* (1), 606-613.
229. M. Uchman, K. Procházka, M. Štěpánek, G. Mountrichas, S. Pispas, M. Špírková, A. Walther, pH-Dependent Self-Assembly of Polystyrene-*block*-Poly((sulfamate-carboxylate)isoprene) Copolymer in Aqueous Media, *Langmuir*,

- 2008**, 24 (20), 12017-12025.
230. M. Uchman, M. Štěpánek, K. Procházka, G. Mountrichas, S. Pispas, I. K. Voets, A. Walther, Multicompartment Nanoparticles Formed by a Heparin-Mimicking Block Terpolymer in Aqueous Solutions, *Macromolecules*, **2009**, 42 (15), 5605-5613.
231. M Sedláč, The ionic strength dependence of the structure and dynamics of polyelectrolyte solutions as seen by light scattering: The slow mode dilemma, *J. Chem. Phys.*, **1996**, 105 (22), 10123-10133.
232. W. J. Spillana, T. J. Hannigan, K. P. Shelly, Basicity of nitrogen-sulphur(VI) compounds. Part 3. Protonation equilibria of sulphamates using potentiometric and ¹³C nuclear magnetic resonance methods, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1982**, 19-24.
233. M. Sedláč, Č. Koňák, P. Štěpánek, J. Jakeš, Semidilute solutions of poly(methacrylic acid) in the absence of salt: Dynamic light-scattering study, *Polymer*, **1987**, 28 (6), 873-880.
234. W. Burchard, Combined static and dynamic light scattering: W. Brown, *Light Scattering: Principles and Development*, Claderon Press, **1996**.
235. W. Schärtl, *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*, Springer, **2007**.
236. M. Sedláč, Č. Koňák, P. Štěpánek, J. Jakeš, Influence of temperature on polyelectrolyte dynamics: partially neutralized solutions of poly(methacrylic acid), *Polymer*, **1990**, 31 (2), 253-257.
237. W. Peiqiang, M. Siddiq, C. Huiying, Q. Di, C. Wu, Laser Light-Scattering Study of Poly(sulfoalkyl methacrylate)s in 0.1 M NaCl Aqueous Solution, *Macromolecules*, **1996**, 29 (1), 277-281.
238. A. Niu, D.-J. Liaw, H.-C. Sang, C. Wu, Light-Scattering Study of a Zwitterionic Polycarboxybetaine in Aqueous Solution, *Macromolecules*, **2000**, 33 (9), 3492-3494.
239. H. Ahrens, K. Büscher, D. Eck, S. Förster, C. Luap, G. Papastavrou, J. Schmitt, R. Steitz, C. A. Helm, Poly(styrene sulfonate) self-organization: electrostatic and secondary interactions, *Macromol. Symp.*, **2004**, 211 (1), 93-106.

240. S. Kanai, M. Muthukumar, Phase separation kinetics of polyelectrolyte solutions, *J. Chem. Phys.*, **2007**, *127* (24), 244908-244921.
241. R. McGuire, I. Feldman, Static and dynamic quenching of protein fluorescence. II. Lysozyme, *Biopolymers*, **1975**, *14* (5), 1095-1102.
242. J.-L. Lin, R.-C. Ruaan, H.-J. Hsieh, Refolding of partially and fully denatured lysozymes, *Biotechnol. Lett.*, **2007**, *29*, 723-729.
243. M. D. Lad, V. M. Ledger, B. Briggs, R. J. Green, R. A. Frazier, Analysis of the SDS–Lysozyme Binding Isotherm, *Langmuir*, **2003**, *19* (12), 5098-5103.
244. L. Smeller, F. Meersman, K. Heremans, Refolding studies using pressure: The folding landscape of lysozyme in the pressure–temperature plane, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, **2006**, *1764* (3), 497-505.
245. A. Papagiannopoulos, M. Karayianni, G. Mountrichas, S. Pispas, A. Radulescu, Self-Assembled Nanoparticles from a Block Polyelectrolyte in Aqueous Media: Structural Characterization by SANS, *J. Phys. Chem. B*, **2010**, *114* (22), 7482-7488.
246. S. Förster, M. Zisenis, E. Wenz, M. Antonietti, Micellization of strongly segregated block copolymers, *J. Chem. Phys.*, **1996**, *104* (24), 9956-9970.
247. A. Qin, M. Tian, C. Ramireddy, S. E. Webber, P. Munk, Z. Tuzar, Polystyrene-poly(methacrylic acid) block copolymer micelles, *Macromolecules*, **1994**, *27* (1), 120-126.
248. W. Burchard, Solution Properties of Branched Macromolecules, *Adv. Polym. Sci.*, **1999**, *143*, 113-194.
249. P. Retailleau, M. Riès-Kautt, A. Ducruix, No salting-in of lysozyme chloride observed at low ionic strength over a large range of pH, *Biophys. J.*, **1997**, *73* (4), 2156-2163.