



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΝΟΣ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ
ΑΠΟΚΡΙΝΟΜΕΝΟΥ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΕΡΕΘΙΣΜΑΤΑ
ΣΤΗΝ ΘΕΡΜΟΤΡΟΠΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΛΙΠΙΔΙΚΩΝ
ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΕΣΟΥ
ΕΝΥΔΑΤΩΣΗΣ»**

Κόλμαν Ιωάννης

Φαρμακοποιός

Αθήνα 2016

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιομηχανική Φαρμακευτική», υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Κωνσταντίνου Δεμέτζου. Το πειραματικό κομμάτι της εργασίας διεξήχθη στο εργαστήριο Φαρμακευτικής Νανοτεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Ευχαριστώ εκ βαθέων τον Καθηγητή κ. Κ. Δεμέτζο για την ανάθεση του θέματος, την πολύτιμη αρωγή του καθόλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών, τις συμβουλές και την καθοδήγηση τόσο σε επιστημονικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο.

Ευχαριστώ επίσης θερμά:

Τον Δρ. Στέργιο Πίππα, διευθυντή Ερευνών του Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και μέλος της εξεταστικής επιτροπής, για την χορήγηση του συμπολυμερούς που μελετήθηκε, αλλά και την ουσιαστική βοήθειά του.

Την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Μαριλένα Βλάχου, μέλος της εξεταστικής επιτροπής, για τις εποικοδομητικές συμβουλές της.

Την Δρ. Νατάσσα Πίππα για την πολύτιμη συμβολή της στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Τη Δήμητρα Κυρανούδη για την γλωσσική επιμέλεια της εργασίας

Τη φίλη μου Φιλία για την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Και τέλος την οικογένεια μου για όλα.

Γιάννης Κόλμαν

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι επιδράσεις που δύναται να επιφέρει η εισαγωγή ενός συμπολυμερούς δύο συστάδων του τύπου πολυ(*N*-ισοπροπυλακρυλαμιδίου)-*b*-πολυ(ακρυλικού οξέος) (PNIPAM-*b*-PAA) στη θερμοτροπική συμπεριφορά πλήρως ενυδατωμένων διπλοστοιβάδων διπαλμιτόϋλοφωσφατιδυλοχολίνης (DPPC), καθώς και την ικανότητά του να μεταβάλλει την οργάνωση και τη ρευστότητα της μεμβράνης. Επίσης, εξετάστηκε ο ρόλος που μπορεί να διαδραματίσει η φύση του μέσου ενυδάτωσης (pH και ιοντική ισχύς), αλλά και η σημασία της σύστασης του συμπολυμερούς. Για τους σκοπούς αυτούς εξετάστηκαν με τη χρήση της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC), φωσφολιπιδικές (DPPC) διπλοστοιβάδες και μεικτά (DPPC/PNIPAM-*b*-PAA) συστήματα, τα οποία ενυδατώθηκαν σε τρία διαφορετικά μέσα διασποράς: σε νερό καθαρότητας HPLC, σε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέως pH 4.5. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές ως προς την αναλογία μεταξύ των δύο συστάδων συνθέσεις του πολυμερούς.

Το PNIPAM-*b*-PAA παρουσιάζει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω του συνδυασμού των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών των δύο ομοπολυμερών του, που το καθιστούν ικανό να ανταποκρίνεται σε δύο διαφορετικά ερεθίσματα και συγκεκριμένα σε μεταβολές της θερμοκρασίας αλλά και του pH.

Η ενσωμάτωση του PNIPAM-*b*-PAA στις DPPC διπλοστοιβάδες προκαλεί ιδιαίτερα σημαντικές διαταραχές στη θερμοτροπική τους συμπεριφορά, οι οποίες διαφοροποιούνται μερικώς αναλόγως του μέσου ενυδάτωσης. Τα πειραματικά αποτελέσματα υπέδειξαν ότι το PNIPAM-*b*-PAA διευθετείται πλησίον της πολικής επιφάνειας των διπλοστοιβάδων, πιθανότατα εξαιτίας της PAA συστάδας, ενώ παράλληλα έχει την ικανότητα να διεισδύει στο υδρόφοβο εσωτερικό της μεμβράνης μέσω του PNIPAM τμήματός του, διαρρηγνύοντάς την κατά ένα θερμοκρασιακά εξαρτώμενο τρόπο. Συμπερασματικά, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φωσφολιπιδίων και του συμπολυμερούς φαίνεται πως επηρεάζονται από το pH και την ιοντική ισχύ του μέσου ενυδάτωσης, όπως επίσης και από την ποσότητα του PNIPAM-*b*-PAA, που ενσωματώνεται στην DPPC διπλοστοιβάδα. Η μελέτη αυτή θα μπορούσε να αποτελέσει έναν οδηγό για τον ορθολογικό σχεδιασμό και την ανάπτυξη μεικτών-χιμائيικών συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων.

Abstract

In this study we investigate the thermotropic effects of diblock copolymer poly(*N*-isopropylacrylamide)-block-poly(acrylic acid) (PNIPAM-*b*-PAA) on fully hydrated 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) lipid bilayers and its ability to alter the membranes' organization, fluidity and phase behavior. The composition of the diblock copolymer and the nature of dispersion medium (pH and ionic strength) were also examined. For these purposes, pure DPPC lipid and polymer–lipid mixed systems, hydrated in three different dispersion media (i.e., HPLC-grade water, phosphate buffer saline and hydrochloric acid solution of pH4.5), were investigated by Differential Scanning Calorimetry (DSC). Two compositions of PNIPAM-*b*-PAA with different molar ratios of the polymeric blocks were used. PNIPAM-*b*-PAA presents great scientific interest due to the combination of the special characteristics of its homopolymer components; it is responsive both in temperature and in pH changes. The incorporation of the PNIPAM-*b*-PAA into the DPPC bilayers causes particularly significant perturbations in their thermotropic behavior, which is slightly different in each dispersion medium. The results indicated the ordering of the polymer guest near the polar head group surface probably by its PAA block and, on the other hand, the penetration of the PNIPAM block into the hydrophobic bilayer core, causing membrane disruption in a temperature-dependent manner. It is thus concluded that the lipid–polymer interactions seem to be affected by the pH and the ionic strength of the hydration medium, as well as the polymer content incorporated in the DPPC bilayer. These studies could serve as a roadmap in rationally designing and developing mixed-chimeric drug delivery systems.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
1 ΑΥΤΟ-ΣΥΝΑΡΜΟΛΟΓΗΣΗ (SELF-ASSEMBLY).....	6
1.1 Η σημασία του μηχανισμού της αυτό-συναρμολόγησης	6
1.2 Υγροί Κρύσταλλοι	7
1.2.1 Θερμοτροπικοί υγροί κρύσταλλοι	8
1.2.2 Λυοτροπικοί υγροί κρύσταλλοι και αυτο-συναρμολόγηση αμφίφιλων μορίων	10
1.3 Τα πέντε βασικά χαρακτηριστικά της αυτό-συναρμολόγησης	19
2 ΠΟΛΥΜΕΡΗ.....	21
2.1 Γενικά περί πολυμερών	21
2.2 Κατάταξη πολυμερών	21
2.3 Συμπολυμερή κατά συστάδες συμπολυμερή (Block Copolymers).....	24
2.4 Αποκρινόμενα Πολυμερή –Συστήματα μεταφοράς φαρμάκων.....	25
2.4.1 Χρήσεις και παραδείγματα των αποκρινόμενων πολυμερών στα Συστήματα μεταφοράς φαρμάκων.....	27
2.4.2 Πολυμερή Αποκρινόμενα σε μεταβολές της Θερμοκρασίας.....	28
2.4.3 Πολυμερή Αποκρινόμενα σε μεταβολές του pH	32
3 ΛΙΠΙΔΙΑ	35
3.1 Ονοματολογία Λιπιδικών Φάσεων.....	36
3.2 Μεταβάσεις φάσεων Λιπιδικών Συστημάτων.....	37
3.2.1 Η κύρια μετάβαση φάσης των λιπιδίων	39
3.3 Φωσφολιπίδια.....	40
3.3.1 Παράγοντες που επηρεάζουν τον πολυμορφισμό των φωσφολιπιδίων.....	42
3.3.2 Θερμοκρασία μετάβασης Φάσης Στοιβαδικών Φωσφολιπιδίων.....	43
3.3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μετάβαση φάσης των φωσφολιπιδίων που σχηματίζουν διπλοστοιβάδες.....	43
3.4 Διπαλμιτούλο-φωσφατιδυλοχολίνη (DPPC).....	44

3.5	Λυοτροπικές μεταβάσεις φάσεων σε διπλοστοιβάδες DPPC	45
3.5.1	Προσθήκη υδατικού μέσου στην μάζα αφυδατωμένων κρυσταλλικών φωσφολιπιδίων.....	45
3.5.2	Μετάβαση φάσης και ποσοστό ενυδάτωσης	46
3.6	Θερμοτροπικές μεταβάσεις φάσεων πλήρως ενυδατωμένων διπλοστοιβάδων DPPC	47
3.6.1	Υπομετάπτωση $L_c \rightarrow L_{\beta'}$	49
3.6.2	Προμετάπτωση $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$	51
3.6.3	Κύρια μετάπτωση $P_{\beta'} \rightarrow L_a$	52
3.6.4	Το Φαινόμενο Ενδοεισχώρησης. Μετάβαση $L_{\beta 1} \rightarrow L_a$	53
4	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΘΕΡΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	57
4.1	Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της Θερμικής Ανάλυσης έναντι άλλων τεχνικών	57
4.2	Κατηγορίες Θερμικής Ανάλυσης	58
4.3	Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry- DSC).	59
4.4	Αρχή Λειτουργίας.....	59
4.5	Γραφήματα DSC	61
4.6	Παράγοντες που επηρεάζουν τα αποτελέσματα της Θερμικής Ανάλυσης	63
	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:	64
B.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	66
5	Υλικά και Μέθοδοι	67
5.1	Υλικά.....	67
5.2	Όργανα	69
5.3	Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC).....	69
5.3.1	Μέθοδοι παρασκευής των διπλοστοιβάδων	69
5.3.2	Μέσα ενυδάτωσης.....	71
5.3.3	Παράμετροι Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC).....	71
6	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	73

6.1	Εισαγωγή.....	73
6.2	Θερμοτροπική Συμπεριφορά των διπλοστοιβάδων DPPC	74
6.3	Θερμοτροπική Συμπεριφορά του συστήματος DPPC/PNIPAM-b-PAA _{50:50}	78
6.3.1	Νερό καθαρότητας HPLC ως μέσο ενυδάτωσης.....	78
6.3.2	Αλατούχο διάλυμα Φωσφορικών (PBS) ως μέσο ενυδάτωσης.....	84
6.3.3	Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5 ως μέσο ενυδάτωσης.....	89
6.4	Θερμοτροπική Συμπεριφορά του συστήματος DPPC/PNIPAM-b-PAA _{70:30}	96
6.4.1	Νερό καθαρότητας HPLC ως μέσο ενυδάτωσης.....	96
6.4.2	Αλατούχο διάλυμα Φωσφορικών (PBS) ως μέσο ενυδάτωσης.....	102
6.4.3	Διάλυμα υδροχλωρικού οξέως ως μέσο ενυδάτωσης.....	108
6.5	Συνολική Εκτίμηση της επίδρασης των συμπολυμερών τύπου PNIPAM-b-PAA, στις θερμοτροπικές ιδιότητες DPPC διπλοστοιβάδων, και ο ρόλος του μέσου ενυδάτωσης. ..	114
7	ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	119
	Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	121
	Κατάλογος σχημάτων	127
	Κατάλογος πινάκων	131

Συντομογραφίες

DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	διπαλμιτόϋλο-φωσφατιδυλοχολίνης
PNIPAM	poly(N-isopropylacrylamide)	πολύ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο)
PAA	poly(acrylic acid)	πολύ(ακρυλικό οξύ)
PNIPAM-b-PAA	poly(N-isopropylacrylamide)-block-poly(acrylic acid)	πολύ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο)-b-πολύ(ακρυλικό οξύ)
DSC	Differential Scanning Calorimetry	Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης
PBS	Phosphate-buffered saline	αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
LCST	Lower critical solution temperature	χαμηλότερη κρίσιμη θερμοκρασία διάλυσης
UCST	Upper critical solution temperature	υψηλότερη κρίσιμη θερμοκρασία διάλυσης

Α.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια η επιστημονική κοινότητα έχει επιδείξει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη μεικτών νανοσυστημάτων μέσω του συνδυασμού βιοϋλικών με διαφορετικά χαρακτηριστικά. Έχει προταθεί ο διαχωρισμός τους σε υβριδικά και σε χημικά. Στην πρώτη περίπτωση το σύστημα απαρτίζεται από διαφορετικά υλικά της ίδιας όμως φύσης, όπως για παράδειγμα ένας συνδυασμός διαφορετικών φωσφολιπιδίων. Στην δεύτερη περίπτωση το σύστημα προκύπτει από το συνδυασμό υλικών διαφορετικής χημικής κατηγορίας, όπως λιπιδίων, πολυμερών, δενδριμερών, ακόμα και ανόργανων υλικών. Απώτερος στόχος είναι ο συνδυασμός των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών των βιοϋλικών για το σχεδιασμό προηγμένων λειτουργικών νανοσυστημάτων για τη μεταφορά φαρμάκων και την διαγνωστική (drug delivery and diagnostics). Η λογική για τη χρήση τέτοιου είδους συστημάτων είναι πάντα η βελτίωση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της φαρμακοθεραπείας. Στην ίδια κατεύθυνση εντάσσεται και η προσπάθεια για την ανάπτυξη συστημάτων που θα έχουν εγγενώς τη δυνατότητα να αποκρίνονται σε ένα, δύο ή και περισσότερα ερεθίσματα που λαμβάνουν από το περιβάλλον τους προκειμένου να «ενεργοποιηθούν» και να εκδηλώσουν τη δράση τους (Demetzos & Pippa, 2014).

Ιστορικά, τα λιπίδια έχουν χρησιμοποιηθεί για δεκαετίες σε διάφορα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, όπως για παράδειγμα τα λιποσώματα (liposomes), στερεά λιπιδικά νανοσωματίδια (solid lipid nanoparticles), συζεύγματα λιπιδίου φαρμάκου (lipid-drug conjugates) κτλ. Τα πιο δημοφιλή λιπιδικής φύσης συστήματα είναι τα λιποσώματα εξαιτίας της εξαιρετικής βιοσυμβατότητας που παρουσιάζουν και της ικανότητας για μεταφορά τόσο ευδιάλυτων όσο και δυσδιάλυτων φαρμάκων (Shrestha, et al., 2014).

Με την πρόοδο της τεχνολογίας και των τεχνικών πολυμερισμού κατέστη δυνατή η σύνθεση πολυμερών μεγαλομορίων με συγκεκριμένες ιδιότητες που χρησιμοποιούνται στην ανάπτυξη μίας ευρείας ποικιλίας νανοδομών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα πολυμερικά νανοσωματίδια (polymeric nanoparticles), τα πολυμεροσώματα (polymerosomes), τα πολυμερικά μικύλλια (polymeric micelles), νανογέλες (nanogels) κτλ. (Liechty, et al., 2010) Εκτός της ποικιλίας των δομών που μπορούν να ληφθούν με τη χρήση τους, έχουν αναπτυχθεί πολυμερή υλικά ικανά να αποκρίνονται σε ερεθίσματα μεταβάλλοντας κάποια ιδιότητά τους, στα πλαίσια του βιομιμητισμού. Μπορούν να προσδώσουν στις δομές που σχηματίζουν λειτουργικότητα και μπορούν έτσι να αξιοποιηθούν στην ανάπτυξη συστημάτων

ενεργοποιούμενης (είτε παθητικά είτε ενεργητικά) απελευθέρωσης φαρμάκων. Τα συμπολυμερή δύο συστάδων είναι από τα περισσότερο συχνά χρησιμοποιούμενα πολυμερή σε τέτοιου είδους συστήματα καθώς μπορούν να δομηθούν με τρόπο ώστε να υφίστανται διαμορφωτικές και χημικές μεταβολές ως απάντηση σε διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Οι μηχανισμοί των μεταβάσεων (transition mechanisms) που επάγονται λόγω μεταβολής στη θερμοκρασία ή στο pH, έχουν μελετηθεί λεπτομερώς ως τα πλέον χρήσιμα και αποτελεσματικά ερεθίσματα (Bastakoti, et al., 2015; Strandman & Zhu, 2015).

Ο συνδυασμός πολυμερών με λιπίδια μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία υπερμοριακών νανοδομών, οι οποίες θα συνδυάζουν τις ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά και των δύο αυτών τάξεων βιοϋλικών και θα ξεπερνούν τα εγγενή μειονεκτήματα που παρουσιάζουν τα απλά συστήματα. Ως παράδειγμα αναφέρεται η χαμηλή σταθερότητα των λιποσωμάτων και η συγκριτικά χαμηλότερη βιοσυμβατότητα των πολυμεροσωμάτων που μπορούν να αντιμετωπιστούν με το συνδυασμό φωσφολιπιδίων και αμφίφιλων δισυσταδικών συμπολυμερών προς με τον σχηματισμό μεικτών μεμβρανικών κυστιδίων (polymer-lipid hybrid vesicles). Αλλά παράδειγμα μεικτών συστημάτων αποτελούν τα υβριδικά νανοσωματίδια λιπιδίων πολυμερούς ή λιποσώματα επισημασμένα με πολυμερή (Lee & Nguyen, 2013; Le Meins, et al., 2013; Hadinoto, et al., 2013).

Οι δομές που μπορεί να σχηματιστούν κάθε φορά από τον συνδυασμό διαφορετικών υλικών και εν τέλει η λειτουργικότητά τους, ορίζονται από της αρχές της αυτό-συναρμολόγησης και εξαρτώνται από τον τρόπο με τον οποίο αυτά αλληλεπιδρούν. Αναλόγως της δομής των βιοϋλικών, της περιεκτικότητας τους, των συνθηκών του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται, μπορεί να προκύψει αυθόρμητα μία σειρά διαφορετικών μορφολογιών-συστημάτων. Η αυτό-συναρμολόγηση αποτελεί, λοιπόν, μία από τις πιο ενδιαφέρουσες πτυχές κατά την ανάπτυξη τόσο των απλών όσο και των πιο σύνθετων-μεικτών δομών (Pirra, et al., 2013b; Pirra, et al., 2013a; Lombardo, et al., 2015).

Ο κύριος στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη ενός μεικτού συστήματος αποτελούμενο από φωσφολιπίδια χολίνης και ενός συμπολυμερούς δύο συστάδων. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκαν οι επιπτώσεις που μπορεί να επιφέρει η εισαγωγή του πολύ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο)-b-πολύ(ακρυλικό οξύ) (PNIPAM-b-PAA) στις θερμοτροπικές ιδιότητες διπλοστοιβάδων διπαλμιτόυλο-φωσφατιδυλοχολίνης (DPPC).

Οι διπλοστοιβάδες DPPC και γενικότερα οι διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων είναι από τα πλέον μελετημένα συστήματα. Από τη μία πλευρά αποτελούν τη βασική δομή των λιποσωμάτων ενώ από την άλλη πλευρά προσεγγίζουν τη σύσταση των κυτταρικών

μεμβρανών και χρησιμοποιούνται ως μοντέλα για τη διερεύνηση της συμπεριφοράς τους και της αλληλεπίδρασής τους με βιοδραστικά μόρια.

Το PNIPAM-b-PAA είναι ένα συμπολυμερές δύο συστάδων που λόγω της δομής του εμφανίζει εξαιρετικά ενδιαφέρουσες ιδιότητες. Έχει την ικανότητα να αποκρίνεται εξίσου σε μεταβολές της θερμοκρασίας αλλά και του pH. Αποτελείται από μία συστάδα πολυ(N-ισοπροπυλακρυλαμιδίου) (PNIPAM), ένα από τα σημαντικότερα θερμοαποκρινόμενα πολυμερή της τάξης των αλκυλ-ακρυλαμιδίων, καθώς και από μία συστάδα του ασθενούς πολυηλεκτρολύτη πολύ(ακρυλικό οξύ).

Η πιο χαρακτηριστική ιδιότητα της PNIPAM συστάδας του συμπολυμερούς, είναι η αντίστροφη διαλυτότητα που παρουσιάζει, εξαιτίας μίας διαμορφωτικής μετάβασης που καθιστά τις πολυμερικές αλυσίδες υδρόφοβες κατά τη θέρμανσή του. Η θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός φάσεων ονομάζεται χαμηλότερη κρίσιμη θερμοκρασία διάλυσης (Low critical solution temperature-LCST). Αν και η τιμή της εξαρτάται άμεσα από τη φύση του διαλύτη η LCST κυμαίνεται γύρω στους 32 °C. Επίσης είναι εύκολο να ελεγχθεί και να τροποποιηθεί μέσω του συμπολυμερισμού με υδρόφιλες ή υδρόφοβες ομάδες. Στην πρώτη περίπτωση προκαλείται μετατόπιση της LCST προς υψηλότερες θερμοκρασίες ενώ στη δεύτερη μειώνεται. Σε θερμοκρασίες κοντά στην LCST το PNIPAM υφίσταται μία αυθόρμητη αντιστρεπτή διαμορφωτική μετάβαση από σπείρα σε σφαιρίδιο (coil to globule), η οποία συνοδεύεται από αύξηση της εντροπίας του συστήματος διαλύτης-πολυμερές. Σε θερμοκρασίες χαμηλότερες της LCST, η ομάδα ακρυλαμιδίου της πολυμερικής αλυσίδας αλληλεπιδρούν μέσω δεσμών υδρογόνου με τα μόρια του νερού του διαλύτη, γεγονός που επιφέρει τη διαλυτοποίησή του. Αντίθετα, σε θερμοκρασίες πάνω από την LCST, το δίκτυο των δεσμών υδρογόνου καταστρέφεται ακαριαία, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των μορίων του νερού και την ισχυροποίηση των ενδομοριακών και διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αλυσίδων η οποία οδηγεί στη συσσωμάτωσή τους (Schild, 1992; Heyda, et al., 2014).

Από την άλλη πλευρά, η συστάδα του πολύ(ακρυλικό οξύ) είναι ένας ασθενής πολυηλεκτρολύτης που αποκρίνεται σε μεταβολές του pH και της ιονικής ισχύος του μέσου στο οποίο βρίσκεται. Σε αρκετά όξινες συνθήκες και κάτω από την pKa του (pH<4), οι καρβοξυλικές του ομάδες πρωτονιώνονται με αποτέλεσμα το πολυμερές να γίνεται λιγότερο υδρόφιλο και λιγότερο διαλυτό στο νερό. Αντίθετα, σε ουδέτερες ή βασικές συνθήκες αναπτύσσονται αρνητικά φορτία που ευνοούν τη διάλυσή του. Όπως συμβαίνει και στην περίπτωση του PNIPAM, με συμπολυμερισμό με υδρόφιλες ή υδρόφοβες ομάδες είναι δυνατό

να ελεγχθεί η τιμή της pK_a του, και κατά συνέπεια η συμπεριφορά του (Munaviron, et al., 2014).

Εξαιτίας των ιδιοτήτων του, το PNIPAM-b-PAA, έχει αποτελέσει αντικείμενο μίας σειράς μελετών που εξετάζουν την χρήση του για την ανάπτυξη πολυαποκρινόμενων νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμάκων. Ενδεικτικά αναφέρονται τα μικυλλιακά συστήματα τύπου πυρήνας-κορώνα (core-corona), που έχουν χαρακτηριστεί και ως «σχιζοφρενικά» λόγω των πολλών διαμορφώσεων τις οποίες μπορούν να παρουσιάσουν αναλόγως των συνθηκών (με μεταβολές μεταξύ της ισορροπίας υδρόφιλου-υδρόφοβου και στις δύο πολυμερικές συστάδες) (Bastakoti, et al., 2015). Επίσης έχουν αναπτυχθεί πολυαποκρινόμενα λιποσώματα στα οποία το συγκεκριμένο πολυμερές είναι προσδεμένο μέσω μίας μικρής υδρόφοβης ομάδας-άγκυρας (anchor) στην μεμβράνη, προκαλώντας διάρρηξη της και απελευθέρωση του φαρμάκου κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (Ta, et al., 2010). Τέλος μία εφαρμογή στην οποία έχει χρησιμοποιηθεί το PNIPAM-b-PAA είναι ενέσιμα συστήματα που σχηματίζουν *in situ* αποκρινόμενες υδρογέλες (Garbern, et al., 2010).

Δομή της εργασίας

Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται μία προσπάθεια να περιγραφούν οι αρχές που διέπουν τις διαδικασίες της αυτο-συναρμολόγησης, η συμπεριφορά των αυτό-συναρμολογούμενων συστημάτων, αλλά και πώς αυτά μπορούν να αξιοποιηθούν για την ανάπτυξη λειτουργικών νανοδομών.

Στα επόμενα δύο κεφάλαια αναλύονται τα χαρακτηριστικά των δύο μεγαλύτερων κατηγοριών βιοϋλικών, τα οποία χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη καινοτόμων συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων και τα οποία χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα εργασία. Συγκεκριμένα στο δεύτερο κεφάλαιο περιγράφονται τα πολυμερή υλικά με έμφαση σε αυτά που διαθέτουν την ιδιότητα να αποκρίνονται-απαντούν σε ερεθίσματα που λαμβάνουν από το περιβάλλον, ενώ στο τρίτο επιχειρείται μια σύντομη περιγραφή των λιπιδίων και ιδιαίτερα αυτών που έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν αυθόρμητα διπλοστοιβάδες όπως για παράδειγμα τα φωσφολιπίδια. Στο τέταρτο κεφάλαιο, το τελευταίο του θεωρητικού τμήματος, περιγράφεται η βασική τεχνική ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

Ακολουθεί το πειραματικό τμήμα της εργασίας, στο οποίο περιγράφονται οι πειραματικές διαδικασίες (κεφάλαιο 5^ο), παρατίθενται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν (κεφάλαιο 6^ο) και τέλος, παρουσιάζονται τα γενικά συμπεράσματα της μελέτης (κεφάλαιο 7^ο).

1 ΑΥΤΟ-ΣΥΝΑΡΜΟΛΟΓΗΣΗ (SELF-ASSEMBLY)

Ως μοριακή αυτό-συναρμολόγηση (self-assembly) ορίζεται η αυθόρμητη και αντιστρέψιμη οργάνωση μοριακών συστημάτων, σύμφωνα με εγγενείς πληροφορίες που περιέχονται σε αυτά για τον σχηματισμό νέων πολύπλοκων υπερμοριακών δομών. Οι εγγενείς αυτές πληροφορίες, αφορούν συνήθως στο σχήμα, στην επιφάνεια, στο φορτίο, στην πολικότητα, στη μάζα κτλ. (Whitesides & Grzybowski, 2002). Η αρχή που διέπει την αυτό-συναρμολόγηση είναι η ελαχιστοποίηση της ελεύθερης ενέργειας Gibbs, μέσα από τη μεγιστοποίηση των ελκτικών μεταξύ των μορίων δυνάμεων και την ελαχιστοποίηση των απωστικών (O'Mahony, et al., 2011). Τα υπερμοριακά συστήματα που προκύπτουν εμφανίζουν συνολικά νέες ιδιότητες σε σύγκριση με τις δομικές τους μονάδες.

Ο σχηματισμός μοριακών κρυστάλλων, οι λιπιδικές διπλοστοιβάδες, οι μονοστοιβάδες των τασιενεργών ουσιών, ακόμα και η αναδίπλωση των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων προς τις λειτουργικές τους μορφές αποτελούν μερικά μόνο παραδείγματα μοριακής αυτό-συναρμολόγησης (Elizondo, et al., 2011).

1.1 Η σημασία του μηχανισμού της αυτό-συναρμολόγησης

Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον το γεγονός ότι στη φύση μπορούμε να εντοπίσουμε πολλές αυθόρμητες διαδικασίες αυτό-συναρμολόγησης, μέσα από τις οποίες προκύπτουν έμβια «συστήματα» διαφορετικής πολυπλοκότητας. Τα φωσφολιπίδια που απαντώνται στη φύση συσσωματώνονται σε κυστιδικές δομές, τις κυτταρικές μεμβράνες, το DNA και το RNA συνθέτουν υπερμοριακά συστήματα αποθήκευσης πληροφοριών, ενώ τα χρωμοσωμικά χρωμοφόρα αυτό-συναρμολογούνται με τέτοιο τρόπο ώστε να διευκολύνεται η συλλογή και μεταφορά της φωτονικής ενέργειας. Επιπλέον, πολλά βιοχημικά συστήματα εξαρτώνται από διαδικασίες που βασίζονται στην υπερμοριακή «δραστικότητα» (π.χ. η σύζευξη και η απελευθέρωση του οξυγόνου από την αιμοσφαιρίνη). Βέβαια, αυτές οι διαδικασίες αυτό-συναρμολόγησης δεν μπορούν να υπάρξουν χωρίς την προηγούμενη σύνθεση καταλλήλως δομημένων μοριακών ειδών. Η μοριακή δομή που προκύπτει από ομοιοπολικές ενώσεις αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα που πρέπει να λάβει κανείς υπόψη κατά το σχεδιασμό ενός αυτό-συναρμολογούμενου συστήματος. Κατ' αντιστοιχία με την πρωτεϊνική ορολογία θα μπορούσε πει κανείς ότι η μοριακή δομή είναι η πρωτοταγής δομή, ενώ οποιαδήποτε αυτό-

συναρμολογούμενη, μη-ομοιοπολικά συνδεδεμένη μορφή, θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως μία δευτεροταγής ή μεγαλύτερης τάξης δομή.

Παρά το ότι οι διαδικασίες κρυσταλλοποίησης ήταν γνωστές από πολύ παλιά, η πρώτη ουσιαστικά παρατήρηση μίας διαδικασίας αυτό-συναρμολόγησης οργανικής –ευμετάβλητης– ύλης (soft matter) έγινε το 1888 από τον Reinitzer, ο οποίος ανακάλυψε την υγρή κρυσταλλική κατάσταση σε υλικά που είχαν προκύψει από φυσική πηγή. Η ανακάλυψη αυτή θεωρήθηκε πολύ σημαντική για την εποχή της και ως τέτοια παραμένει ακόμα και σήμερα. Μάλιστα, η κατάσταση αυτή αποκαλείται συχνά ως η τέταρτη κατάσταση της ύλης (Hil, et al., 2014).

Η λειτουργικότητα των βιολογικών μακρομορίων, όπως τα νουκλεϊκά οξέα και οι πολυσακχαρίτες, βασίζεται κατά κύριο λόγο στον συνδυασμό και στην ισορροπία μεταξύ της μοριακής κινητικότητας και της οργάνωσης που αυτά παρουσιάζουν. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση των κυτταρικών μεμβρανών. Ο συνδυασμός της μοριακής κινητικότητας και της οργάνωσης είναι τα κύρια χαρακτηριστικά της υγρής κρυσταλλικής κατάστασης (Ringsdorf, et al., 1988).

Οι υγροί κρύσταλλοι ως αυτό-συναρμολογούμενα συστήματα βασίζονται σε ασθενείς ενδομοριακές δυνάμεις van der Waals, οι οποίες επιτρέπουν στα μόρια να συμπεριφέρονται ως ρευστά αλλά ταυτόχρονα να διαθέτουν ανισοτροπία, η οποία προκύπτει από την ύπαρξη τάξης ως προς τους μοριακούς προσανατολισμούς ή τις θέσεις τους (Goodby, et al., 1998; Φωτεινός, 2007). Η τάξη αυτή, σε αντίθεση με τους συμβατικούς κρυστάλλους, δεν διατηρείται σε μεγάλες αποστάσεις.

Οι υγροί κρύσταλλοι αποτέλεσαν για χρόνια αντικείμενο της επιστημονικής περιέργειας και μόνο στα τέλη της δεκαετίας του 1960 και στις αρχές του 1970 άρχισε να συζητείται η εφαρμογή τους. Χαρακτηριστική είναι η ενσωμάτωση τους στις συσκευές προβολής, η οποία είναι ίσως η πρώτη εφαρμογή ενός αυτο-συναρμολογούμενου μη-κρυσταλλικού υλικού. Οι αυτο-συναρμολογούμενες δομές είναι σημαντικές όχι μόνο εξαιτίας των όσων μπορούμε να μάθουμε για τα φυσικά συστήματα μέσα από τη μελέτη τους, αλλά και επειδή παρουσιάζουν συγκεκριμένες ιδιότητες και χαρακτηριστικά, τα οποία δεν απαντώνται σε κρυσταλλικά και άμορφα υλικά (Hil, et al., 2014).

1.2 Υγροί Κρύσταλλοι

Οι υγροί κρύσταλλοι (liquid crystals) είναι μεσοφάσεις μεταξύ κρυσταλλικών στερεών και ισοτροπικών υγρών και χαρακτηρίζονται από τον συνδυασμό μοριακής κινητικότητας και

μοριακής οργάνωσης, είναι ρευστά τα οποία παρουσιάζουν ανισοτροπία. Εμφανίζουν αταξία από άποψη μοριακής οργάνωσης, τουλάχιστον σε μία από τις τρεις διαστάσεις του χώρου και κάποια τάξη μοριακών προσανατολισμών ή θέσεων, τουλάχιστον σε μία διεύθυνση (Ringsdorf, et al., 1988; Φωτεινός, 2007).

Η αυτό-συναρμολόγηση μπορεί να εμφανιστεί σε τήγματα ή σε διαλύματα. Η πρώτη περίπτωση αφορά κυρίως μόρια που χαρακτηρίζονται από ασυμμετρία ως προς το σχήμα (όπως ραβδόμορφα-rod like- και δισκόμορφα -disc like- μόρια) ή ως προς την κατεύθυνση των διαμοριακών τους αλληλεπιδράσεων, τα υπερμοριακά σύνολα των οποίων δύναται να απαντούν αναλόγως της θερμοκρασίας σε διάφορες φάσεις. Γι' αυτό το λόγο χαρακτηρίζονται ως θερμοτροπικοί (thermotropic) υγροί κρύσταλλοι. Η δεύτερη περίπτωση αφορά κυρίως μόρια με αμφίφιλο χαρακτήρα που παρουσιάζουν ασυμμετρία κυρίως ως προς τις ιδιότητες διαλυτότητας μεταξύ των διακριτών τους τμημάτων, τα οποία κατά την διασπορά τους σε έναν εκλεκτικό διαλύτη και υποκινούμενα από υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, οργανώνονται σε υπερμοριακά συσσωματώματα. Η μορφολογία αυτών των δομών εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά των μορίων που αλληλεπιδρούν, ενώ με μεταβολές στη συγκέντρωσή τους ή και στη θερμοκρασία μπορούν να μεταβαίνουν μεταξύ διαφορετικών υγροκρυσταλλικών φάσεων. Για το λόγο αυτό ονομάζονται λυοτροπικοί (lyotropic) υγροί κρύσταλλοι (Ringsdorf, et al., 1988).

Η αυτό-συναρμολόγηση των αμφίφιλων αποτελεί διαδικασία θεμελιώδους σημασίας με εφαρμογή σε διάφορα πεδία όπως αυτό των τροφίμων, των καλλυντικών, της φαρμακευτικής και ιδιαίτερα στον τομέα της ανάπτυξης καινοτόμων συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων (advanced drug delivery systems).

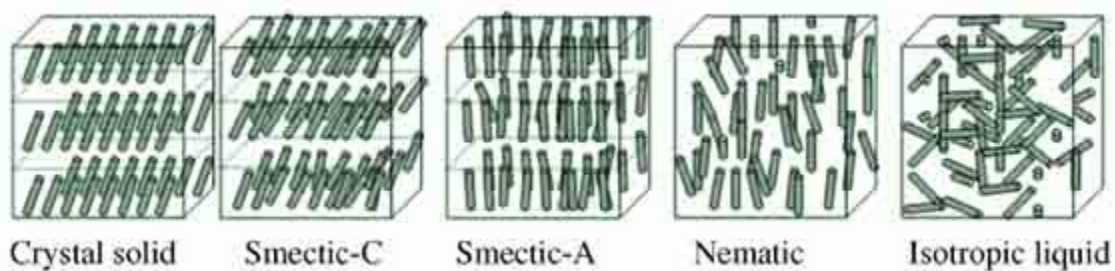
1.2.1 Θερμοτροπικοί υγροί κρύσταλλοι

Τα ραβδόμορφα μόρια μπορούν εμφανίζουν μια σειρά υγροκρυσταλλικών φάσεων μεταξύ της κρυσταλλικής κατάστασης και του ισότροπου υγρού. Όλες αυτές οι μεσοφάσεις χαρακτηρίζονται από την παράλληλη διεύθυνση των μορίων ως προς τους διαμήκεις μοριακούς τους άξονες, ενώ μπορούν να μετασχηματίζονται από την μία στην άλλη, απαντώντας σε μεταβολές της θερμοκρασίας. Οι δύο διακριτές κατηγορίες φάσεων που έχουν παρατηρηθεί, είναι η νηματική φάση (nematic phase) και οι σμηκτικές φάσεις (smectic phases)

Στην πρώτη περίπτωση τα μόρια εμφανίζουν τάξη ως προς τον προσανατολισμό τους με ευθυγράμμιση των μοριακών αξόνων κατά μήκος μίας προεξέχουσας διεύθυνσης αλλά αταξία ως προς τις θέσεις τους (ισότροπη κατανομή των μοριακών κέντρων). Στην δεύτερη

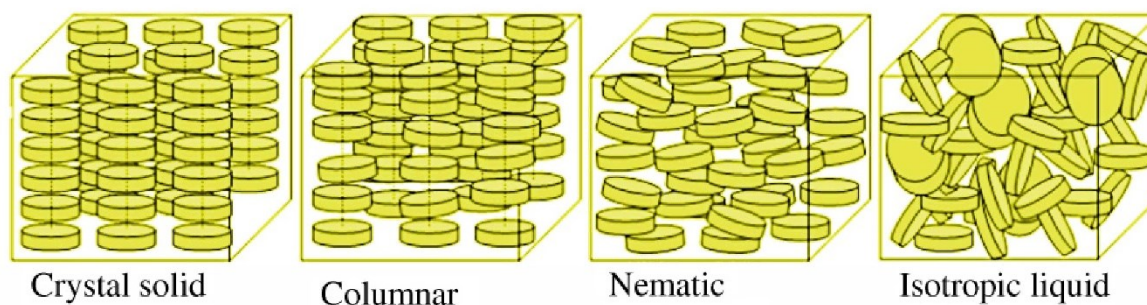
περίπτωση τα μόρια εκτός τάξης ως προς τον προσανατολισμό εμφανίζουν μερική τάξη και ως προς τις θέσεις τους σχηματίζοντας στρώματα κάθετα ως προς την διεύθυνση των αξόνων τους (κατανομή των μοριακών κέντρων σε στρώματα). Τα μόρια μπορούν να κινηθούν μέσα στον όγκο κάθε στρώματος σαν ένα δισδιάστατο υγρό. Οι σμηκτικές φάσεις μπορούν να διακριθούν περαιτέρω ανάλογα με το αν εμφανίζουν κλίση ως προς το επίπεδο των στρωμάτων ή όχι. (πχ smectic phases A/B/C).

Στην πρώτη περίπτωση τα μόρια εμφανίζουν τάξη ως προς τον προσανατολισμό τους με ευθυγράμμιση των μοριακών αξόνων κατά μήκος μίας προεξέχουσας διεύθυνσης αλλά αταξία ως προς τις θέσεις τους (ισότροπη κατανομή των μοριακών κέντρων). Στην δεύτερη περίπτωση τα μόρια εκτός τάξης ως προς τον προσανατολισμό εμφανίζουν μερική τάξη και ως προς τις θέσεις τους σχηματίζοντας στρώματα κάθετα ως προς την διεύθυνση των αξόνων τους (κατανομή των μοριακών κέντρων σε στρώματα). Τα μόρια μπορούν να κινηθούν μέσα στον όγκο κάθε στρώματος σαν ένα δισδιάστατο υγρό. Οι σμηκτικές φάσεις μπορούν να διακριθούν περαιτέρω ανάλογα με το αν εμφανίζουν κλίση ως προς το επίπεδο των στρωμάτων ή όχι. (πχ smectic phases A/B/C).



Σχήμα 1.2.1 Αναπαράσταση των υγροκρυσταλλικών φάσεων ραβδόμορφων μορίων.

Μια άλλη κατηγορία μορίων που εμφανίζουν μια σειρά υγροκρυσταλλικών φάσεων, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, είναι τα δισκόμορφα μόρια. Στην περίπτωση των μορίων αυτών οι δύο διακριτές κατηγορίες φάσεων που έχουν παρατηρηθεί, είναι η νηματική δισκοτική φάση (nematic discotic phase) κατ' αναλογία με τα ραβδόμορφα μόρια και οι διάφορες κίονοειδείς δισκοτικές φάσεις (columnar discotic phases) στις οποίες τα μόρια σχηματίζουν ευθύγραμμες στήλες που διατάσσονται περιοδικά, κατά το κάθετο των κίωνων επίπεδο, προς τον σχηματισμό μίας δισδιάστατης δομής. (Σχήμα 1.2.2) Τα μόρια μπορούν να κινούνται χωρίς περιορισμούς κατά μήκος της διεύθυνσης των κίωνων (Ringsdorf, et al., 1988; Φωτεινός, 2007).



Σχήμα 1.2.2 Αναπαράσταση των υγροκρυσταλλικών φάσεων δισκόμορφων μορίων.

1.2.2 Λυοτροπικοί υγροί κρύσταλλοι και αυτο-συναρμολόγηση αμφίφιλων μορίων

Σε αντίθεση με τους θερμοτροπικούς κρυστάλλους, οι λυοτροπικοί υγροί κρύσταλλοι αποτελούνται από τουλάχιστον δύο συστατικά. Το ένα από αυτά είναι ένας εκλεκτικός διαλύτης, ο οποίος έχει καθοριστική σημασία στην οργάνωση και την κινητικότητα των μορίων στις υγροκρυσταλλικές φάσεις. Το δεύτερο απαραίτητο «συστατικό» είναι η ανισοτροπία ενός αμφίφιλου μορίου (Ringsdorf, et al., 1988).

1.2.2.1 Αμφίφιλα ή Αμφιφιλικά μόρια

Αμφιφιλικό χαρακτηρίζεται ένα μόριο το οποίο αποτελείται από τουλάχιστον δύο διακριτά και μη συμβατά λόγω διαφορετικής πολικότητας τμήματα, ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο. Στα τυπικά αμφίφιλα της μορφής κεφαλής/ουράς (head/tail-s amphiphiles) το υδρόφοβο τμήμα είναι ουσιαστικά μία ή δύο υδρογονανθρακικές αλυσίδες (ουρά), ενώ το υδρόφιλο είναι μία πολική κεφαλή. Η ανισοτροπία, λοιπόν, σε αυτού του είδους τα μόρια αφορά κυρίως τα διαφορετικά χαρακτηριστικά διαλυτότητας των τμημάτων τους.

Οι υδρόφοβες ουρές μπορεί να αποτελούνται από μακριές ή κοντές, γραμμικές ή διακλαδισμένες, κορεσμένες ή ακόρεστες υδρογονανθρακικές αλυσίδες που αλληλεπιδρούν ασθενώς με τα μόρια του νερού. Οι δε πολικές κεφαλές μπορεί να είναι είτε ιονικές είτε μη-ιονικές και αλληλεπιδρούν ισχυρά με το υδατικό τους περιβάλλον μέσω διαμοριακών δυνάμεων διπόλου-διπόλου (και ιδιαίτερα δεσμών υδρογόνου) ή ιόντος-διπόλου. Τα αμφίφιλα μόρια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τέσσερις διακριτές ομάδες αναλόγως του φορτίου που λαμβάνει η πολική τους κεφαλή σε υδατικά διαλύματα. Οι κατηγορίες αυτές είναι οι εξής:

- Ανιονικά αν έχουν αρνητικό φορτίο.
- Κατιονικά αν έχουν θετικό φορτίο.
- Μη ιονικά.

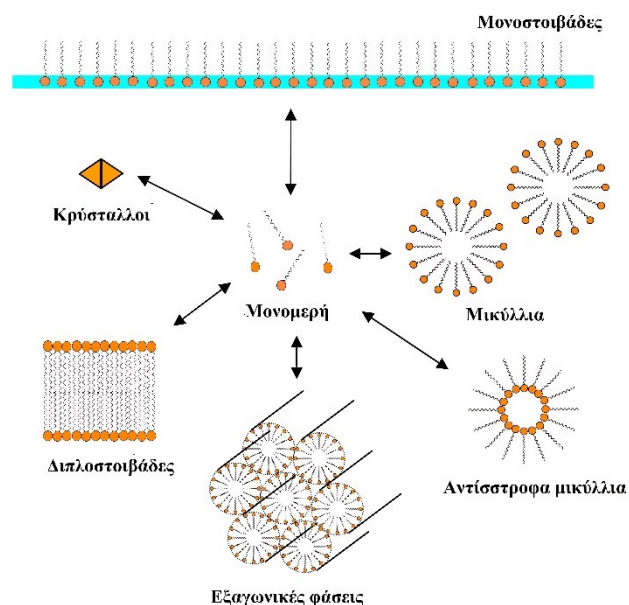
- Αμφοτερικά (amphoterics) τα οποία συνήθως περιέχουν ταυτοχρόνως θετικό και αρνητικό φορτίο.

Παράδειγμα αμφοτερικών αμφίφιλων μορίων είναι και τα φωσφολιπίδια χολίνης, βασικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, τα οποία περιγράφονται διεξοδικά στο 4^ο κεφάλαιο (Lombardo, et al., 2015).

1.2.2.2 Αυτο-συναρμολόγηση αμφίφιλων μορίων

Η ασυμβατότητα μεταξύ των τμημάτων τους, είναι η «κινητήριος δύναμη» για την αυτό-συναρμολόγηση των αμφίφιλων μορίων καθώς αυτά διασπείρονται σε έναν εκλεκτικό διαλύτη. Εξαιτίας της διπλής φύσης τους μπορούν να αυτό-οργανωθούν και να σχηματίσουν μία μεγάλη ποικιλία σύνθετων δομών-συσσωματωμάτων (aggregates), όπως για παράδειγμα μονοστοιβάδες στη διεπιφάνεια νερού/αέρα ή πολικού/μη-πολικού διαλύτη, μικύλλια, διπλοστοιβάδες, κυστίδια κτλ. (**Σχήμα 1.2.3**). Το είδος της αυτοοργάνωσης καθορίζεται από τον τρόπο με τον οποίο διατάσσονται τα αμφίφιλα μόρια και εξαρτάται από τον τύπο και τη δομή των μορίων αυτών, τη συγκέντρωσή τους, την φύση του διαλύτη (πολικότητα) στον οποίο διασπείρονται, τη θερμοκρασία κτλ.

Η κύρια παράμετρος ώστε να υπάρξει ευνοϊκή και αυθόρμητη τάση προς την αυτό-συναρμολόγηση σε ένα σύστημα, είναι η ελαχιστοποίηση της ενέργειας του συστήματος στην κατάσταση της ισορροπίας. Ειδικότερα οι δομές που προκύπτουν από την αυτό-συναρμολόγηση των αμφίφιλων μορίων εμφανίζουν μεγαλύτερου βαθμού οργάνωση (μικρότερη εντροπία) σε σύγκριση με τα μεμονωμένα μόρια.



Σχήμα 1.2.3 Διάφορες δομές στις οποίες μπορούν να αυτό-οργανωθούν τα αμφίφιλα μόρια.

Σε ένα πολικό διαλύτη, όπως για παράδειγμα το νερό, τα αμφίφιλα μόρια αρχικά συσσωρεύονται στην διεπιφάνεια αέρα-νερού σχηματίζοντας μία μονοστοιβάδα, στην οποία οι πολικές κεφαλές διαλύονται στο νερό ενώ οι υδρόφοβες ουρές προσανατολίζονται μακριά από αυτό. Εξαιτίας αυτής της ιδιότητας, μειώνουν την επιφανειακή τάση του διαλύτη και για αυτό χαρακτηρίζονται και ως τασιενεργά ή επιφανειοδραστικά. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωσή τους, η διεπιφάνεια κορένεται και ενοείται θερμοδυναμικά η λύση της συνέχειας της μονοστοιβάδας, τα μόρια διασπείρονται προς την κύρια μάζα του διαλύτη και εν τέλει σχηματίζουν μικρά κolloειδή συσσωματώματα. Στα συσσωματώματα αυτά που ονομάζονται μικκύλια, οι πολικές κεφαλές είναι εκτεθειμένες προς των διαλύτη προστατεύοντας τις υδρόφοβες αλυσίδες στο εσωτερικό, από τη μη ευνοϊκή επαφή τους με το νερό (Hil, et al., 2014).

Η διαδικασία της μικυλλιοποίησης ξεκινά αυθόρμητα μόλις η συγκέντρωση του αμφίφιλου ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο όριο το οποίο χαρακτηρίζεται ως κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση (critical micelle concentration-CMC). Κάτω από αυτό το όριο τα μόρια των αμφίφιλων είναι κατά κύριο λόγο διεσπαρμένα στον διαλύτη ως μονάδες. Η αρχή της μικυλλιοποίησης συνοδεύεται από μία ξαφνική μεταβολή των ιδιοτήτων του συστήματος, όπως για παράδειγμα η οσμωτική πίεση, η ηλεκτρική αγωγιμότητα, η θολερότητα κτλ.. Η CMC επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως από τη δομή του ίδιου του αμφίφιλου (πολική κεφαλή και υδρογονανθρακικές αλυσίδες), τη θερμοκρασία, την παρουσία αντισταθμιστικών ιόντων ή άλλων ουσιών κτλ.

Οι θερμοδυναμικές ιδιότητες των αμφίφιλων σε ένα διάλυμα ελέγχονται από την έντονη τάση των υδροφοβικών ουρών να αποφεύγουν την άμεση επαφή με το νερό (υδροφοβικότητα). Αυτή η μη ευνοϊκή αλληλεπίδραση μπορεί να ελαχιστοποιηθεί μέσω της συσσωμάτωσης αμφιφιλικών μορίων σε δομές στις οποίες τα υδρόφιλα τμήματα εκτίθενται στο νερό και τα υδροφοβικά είναι προστατευμένα. Με την μικυλλιοποίηση η συνολική εντροπία του συστήματος αυξάνεται, οδηγώντας σε μείωση της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος (Lombardo, et al., 2015).

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί πως τα αμφίφιλα μόρια μπορούν να διαχωριστούν σε μικρού μοριακού βάρους, όπως για παράδειγμα τα λιπίδια και σε μεγάλου μοριακού βάρους, όπως κάποια αμφίφιλα δισυσταδικά πολυμερή. Θεωρείται γενικά πως η διαδικασία της μικυλλιοποίησης και οι αρχές που διέπουν των πολυμορφισμό και των δύο αυτών κατηγοριών είναι κατά βάση κοινές.

1.2.2.3 Αλληλεπιδράσεις κατά την αυτό-συναρμολόγηση

Η φύση των διαμοριακών δυνάμεων, που ορίζουν την διαδικασία της αυτό-συναρμολόγησης είναι μη ομοιοπολική. Οι κυριότερες μεταξύ των δυνάμεων αυτών είναι οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται ανάμεσα στα μη πολικά τμήματα των αμφίφιλων μορίων και στα πολικά μόρια του νερού και ακολούθως οι δεσμοί υδρογόνου και οι ιοντικοί δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ των πολικών κεφαλών και των μορίων του διαλύτη, καθώς και οι δυνάμεις van der Waals.

Αυτές οι αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται είτε διαμοριακά είτε ενδομοριακά (όπως για παράδειγμα κατά την αναδίπλωση των πρωτεϊνών). Παρά την ασθενή τους φύση συγκριτικά με τους ομοιοπολικούς δεσμούς, ο μεγάλος αριθμός αυτών των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται είναι ικανός να συγκρατήσει τα διαφορετικά μόρια μεταξύ τους και να διασφαλίσει την σταθερότητα του συσσωματώματος που θα σχηματιστεί στο διάλυμα. Επιπλέον με αυτόν τον τρόπο η αυτό-συναρμολογούμενη δομή καθίσταται περισσότερο ευέλικτη και μπορεί να αντέξει μικρής έντασης διαταραχές, ενώ παράλληλα διατηρείται και η αναστρεψιμότητα της.

Η σταθερότητα των δομών που σχηματίζουν αυθόρμητα τα αμφίφιλα μόρια διασπειρόμενα σε έναν εκλεκτικό διαλύτη, είναι ουσιαστικά αποτέλεσμα της ενυδάτωσης-διάλυσης των υδρόφιλων πολικών κεφαλών μίας έντονης ενθαλπικά διεργασίας, και της προσέγγισης μεταξύ των υδρόφοβων υδρογονανθρακικών αλυσίδων λόγω του υδρόφοβου φαινομένου που συνεισφέρει στην ευνοϊκή για το σύστημα αύξηση της εντροπίας του διαλύτη. Ως αποτέλεσμα η συνολική ελεύθερη ενέργεια του συστήματος μειώνεται προς την θερμοδυναμική σταθεροποίηση του συστήματος (Lombardo, et al., 2015; Hil, et al., 2014).

1.2.2.4 Παράγοντας Πακεταρίσματος και η μορφολογία των Συσσωματωμάτων

Η μικυλλιοποίηση είναι το αρχέτυπο της αυτό-συναρμολόγησης των αμφίφιλων μορίων σε έναν εκλεκτικό διαλύτη όπως για παράδειγμα το νερό. Πέρα όμως από τα σφαιρικά μικύλλια που δημιουργούνται πάνω από την CMC, υπάρχουν διάφορες πιο σύνθετες υπερμοριακές δομές (διαφορετικού μεγέθους, σχήματος και γεωμετρίας) που μπορούν να δημιουργηθούν αλλά και να μετασχηματιστούν η μία στην άλλη. Οι δύο βασικοί παράγοντες που ορίζουν τη μορφολογία των αυτό-οργανωμένων δομών σε ένα σύστημα που ισορροπεί είναι πρωτίστως η μοριακή γεωμετρία των αμφίφιλων μορίων και η συγκέντρωσή τους. Με μεταβολές όμως των παραμέτρων του συστήματος, όπως για παράδειγμα η θερμοκρασία, η πίεση, το pH, η ιονική ισχύς, μπορεί αυτή η ισορροπία να μετατοπιστεί, με αποτέλεσμα το

μετασχηματισμό της δομής. Ο έλεγχος όλων αυτών των παραμέτρων δίνει την δυνατότητα για την κατά το δοκούν ανάπτυξη νανοδομών συγκεκριμένης μορφολογίας-αρχιτεκτονικής αλλά και λειτουργικότητας (Lombardo, et al., 2015).

Οι αρχικές εκτιμήσεις για το σχήμα και τη μορφή των υπερμοριακών δομών που μπορεί να δώσει ένα αμφίφιλο μόριο μπορούν να γίνουν με χρήση του κρίσιμου παράγοντα πακεταρίσματος (critical packing parameter – p) που πρότεινε ο Israelachvili, και παρουσιάζεται παρακάτω (Khalil & Zarari, 2014).

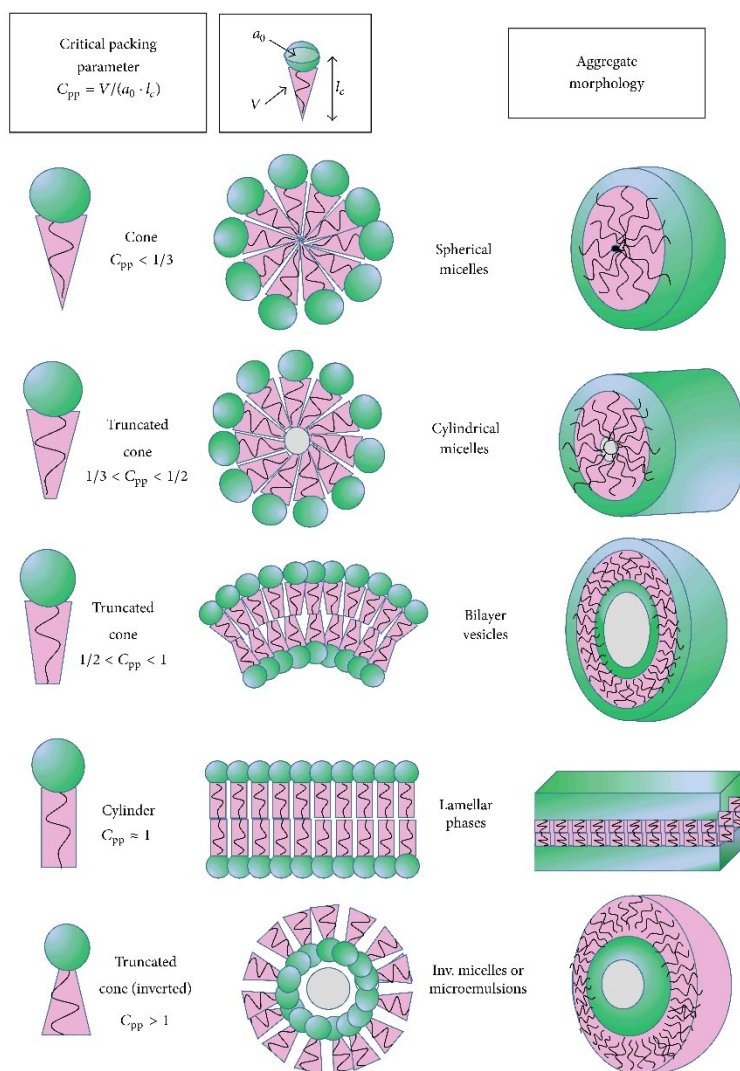
$$p = \frac{V}{a_0 \times l_c}$$

Όπου:

V : είναι ο συνολικός ωφέλιμος όγκος που καταλαμβάνουν οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες στον πυρήνα του συσσωματώματος (όπως αυτός ορίζεται από τις ακτίνες των δυνάμεων van der Waals).

L_c : είναι το μέγιστο ωφέλιμο μήκος (maximum effective length) της/των υδρογονανθρακικών αλυσίδων.

a_0 : είναι η ωφέλιμη επιφάνεια της πολικής κεφαλής στη διεπιφάνεια συσσωματώματος-διαλύτη.



Σχήμα 1.2.4 Πρόβλεψη της γεωμετρίας των διαφόρων συσσωματωμάτων που μπορούν να δημιουργήσουν τα αμφίφιλα μόρια όπως αυτή προκύπτει από την χρήση του παράγοντα πακεταρίσματος (Lombardo, et al., 2015).

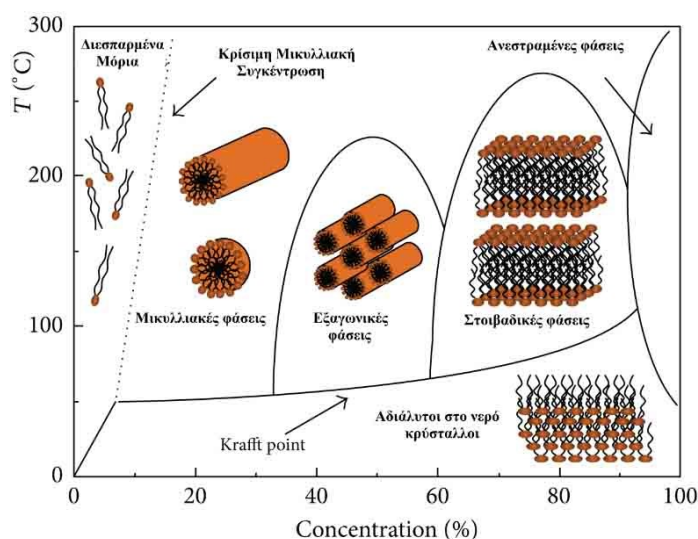
- Όταν ο παράγοντας p παίρνει τιμές μικρότερες του $1/3$ τότε υπάρχει αυθόρμητη τάση προς τον σχηματισμό σφαιρικών μικκυλίων.
- Στις τιμές $1/3 < p < 1/2$, υπάρχει η τάση προς το σχηματισμό μη-σφαιρικών, κυλινδρικών μικκυλίων, εξαγωνικής ή κυβικής τοπολογίας.
- Στις τιμές $1/2 < p < 1$, υπάρχει η τάση προς το σχηματισμό κυστιδίων (διπλοστοιβαδικών φάσεων).
- Όταν ο παράγοντας p παίρνει την τιμή 1 προκύπτουν επίπεδες διπλοστοιβάδες.

- Ενώ τέλος σε τιμές μεγαλύτερες του 1, έχουμε το σχηματισμό αντίστροφων μικυλλιακών φάσεων (Lombardo, et al., 2015; Monduzzi, et al., 2014).

(Σχήμα 1.2.4)

1.2.2.5 Πολυμορφισμός Αμφίφιλων μορίων και υγροκρυσταλλικές φάσεις

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η συγκέντρωση των αμφίφιλων μορίων επηρεάζει την μορφολογία των δομών που θα προκύψουν από την αυτό-συναρμολόγησή τους. Ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις τα μόρια είναι κυρίως διεσπαρμένα με τυχαίο τρόπο χωρίς ιδιαίτερη οργάνωση, σε υψηλότερες οι νανοδομές που σχηματίζονται οργανώνονται με τρόπο που προσεγγίζει αυτό των θερμοτροπικών υγρών κρυστάλλων.

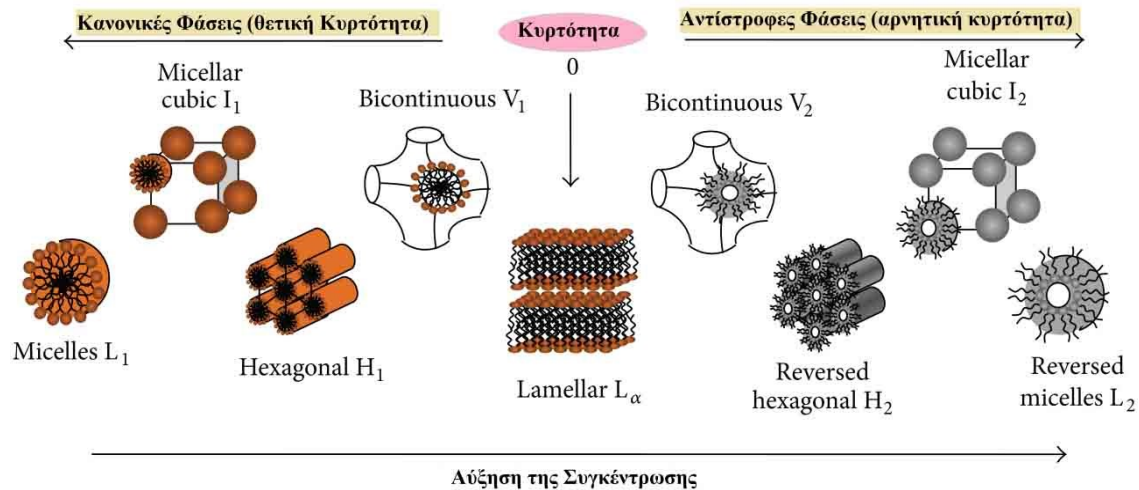


Σχήμα 1.2.5 Τυπικό διάγραμμα φάσεων αμφίφιλων μορίων εντός ενός εκλεκτικού διαλύτη (Lombardo, et al., 2015).

Η ανισοτροπία, που είναι το προαπαιτούμενο για την εμφάνιση υγροκρυσταλλικής συμπεριφοράς, οφείλεται στην περίπτωση των αμφίφιλων μορίων στις διαφορετικές διαλυτότητες μεταξύ του υδρόφιλου και του υδρόφοβου τμήματος εντός ενός εκλεκτικού διαλύτη καθώς και στην ισορροπία μεταξύ των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων. Μια σειρά από διαφορετικές υγροκρυσταλλικές φάσεις πέραν των τυπικών μικυλλίων, μπορεί να εμφανιστούν με την αύξηση της συγκέντρωσης του αμφίφιλου σε έναν διαλύτη όπως το νερό πάνω από την CMC (Σχήμα 1.2.5).

Οι φάσεις αυτές μετασχηματίζονται από την μία στην άλλη απαντώντας σε μεταβολές της ιονικής ισχύος, του pH, της πίεσης κτλ. Ένα διάγραμμα φάσεων συναρτηθεί της

συγκέντρωσης του αμφίφιλου και της θερμοκρασίας του συστήματος παρουσιάζεται στο **Σχήμα 1.2.6**. Ακολουθεί η συνοπτική περιγραφή των τυπικών φάσεων που μπορούν να εμφανιστούν.



Σχήμα 1.2.6 Αναπαράσταση των φάσεων που δημιουργούνται προοδευτικά συναρτήσει της συγκέντρωσης ενός τυπικού αμφίφιλου μορίου (Lombardo, et al., 2015).

A. Μικυλλιακές φάσεις (Micellar phases)

Τα μικύλλια θα μπορούσαν να περιγραφούν ως σφαιρικοί, κυλινδρικοί ή ελλειψοειδείς σχηματισμοί αμφίφιλων μορίων που βρίσκονται σε ισορροπία με τα μονομερή τους. Στην περίπτωση που είναι κανονικής φάσης (L_1 phase), αποτελούνται από ένα εξωτερικό υδρόφιλο τμήμα, στο οποίο οι πολικές κεφαλές διευθετούνται προς την υδατική φάση, και έναν υδρόφοβο πυρήνα, ο οποίος σχηματίζεται με την διευθέτηση των υδρογονανθρακικών αλυσίδων προς το εσωτερικό του μικυλλίου. Στα αντίστροφες φάσης (L_2 phase) που μπορούν να δημιουργηθούν σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις αμφίφιλων μορίων το εξωτερικό τμήμα είναι το υδρόφοβο, ενώ ο εσωτερικός πυρήνας είναι υδρόφιλος και αποτελείται από τις πολικές κεφαλές που περικλείουν μόρια του διαλύτη. Το σύνηθες μήκος των μικυλλίων είναι περίπου 2 nm, το οποίο αντιστοιχεί στην ακτίνα των σφαιρικών μικυλλίων ή τη διάμετρο των κυλινδρικών μικυλλίων, ανά περίπτωση.

B. Μικυλλιακές Κυβικές φάσεις (Micellar Cubic phases)

Υπάρχουν δύο κύριες μικυλλιακές κυβικές υγροκρυσταλλικές φάσεις. Η κανονική (I_1 phase), στην οποία μικύλλια (με μορφή κοντών ράβδων) διευθετούνται εντός ενός τρισδιάστατου κυβικής συμμετρίας πλέγματος ενώ συνεχής φάση είναι ο διαλύτης (πχ νερό).

Στην ανεστραμμένη κυβική φάση (I_2 phase), αντίστροφα μικύλλια διατάσσονται με αντίστοιχο τρόπο εντός μία συνεχής μη πολικής φάσης που δημιουργείται ουσιαστικά από τις υδρογονανθρακικές αλυσίδες. Οι μικυλλιακές κυβικές φάσεις είναι περισσότερο ιξώδεις από τις αντίστοιχες «γειτονικές» μικυλλιακές και εξαγωνικές φάσεις.

C. Εξαγωνικές φάσεις (Hexagonal phases)

Οι εξαγωνικές υγροκρυσταλλικές φάσεις των αμφίφιλων μορίων, μπορούν να παρομοιαστούν ως μία σειρά στενά διευθετημένων και απείρου θεωρητικά μήκους, κυλινδρικών συσσωματωμάτων (κυλινδρικά μικύλλια). Οι δομές αυτές διευθετούνται εντός ενός εξαγωνικού πλέγματος ενώ η εγγύτητά τους εντός αυτού εξαρτάται από την ποσότητα της πολικής φάσης που παρεμβάλλεται. Κατ' αναλογία με τα μικύλλια υπάρχει η κανονική εξαγωνική φάση (H_1 phase) και η ανεστραμμένη (H_2 phase).

D. Αμφισυνεχείς Κυβικές φάσεις (bicontinuous cubic phases)

Οι αμφισυνεχείς κυβικές υγροκρυσταλλικές φάσεις, οι οποίες αφορούν κάποια συστήματα αμφίφιλων, είναι δυνατό να εμφανιστούν μεταξύ των εξαγωνικών και των στοιβαδικών φάσεων. Είναι εξαιρετικά ιξώδεις φάσεις στις οποίες τόσο ο πολικός διαλύτης όσο και τα αμφίφιλα μόρια είναι διευθετημένα συνεχώς εντός ενός τρισδιάστατου κυβικού μοτίβου. Αναλόγως της κυρτότητας που εμφανίζουν οι δύο κυβικές αμφισυνεχείς φάσεις διαχωρίζονται σε κανονικής (V_1 phase) και αντίστροφης φάσης (V_2 phase).

E. Στοιβαδικές-πλακοειδείς φάσεις (Lamellar phases)

Τέλος σε αμφίφιλα μόρια με κατάλληλα χαρακτηριστικά μπορούν να σχηματίσουν διάφορες στοιβαδικές υγροκρυσταλλικές μεσοφάσεις (La phases), οι οποίες χαρακτηρίζονται από την πολυστρωματική/πολυ επίπεδη διάταξη των μορίων. Η πλέον χαρακτηριστική και σημαντική από βιολογική άποψη μορφή των στοιβαδικών φάσεων είναι οι διπλοστοιβάδες που σχηματίζονται από τα φωσφολιπίδια, βασικό συστατικό όλων των κυτταρικών μεμβρανών. Μία διπλοστοιβάδα αποτελείται από δύο παράλληλα στρώματα αμφίφιλων μορίων, των οποίων οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες βρίσκονται η μία απέναντι από την άλλη σχηματίζοντας έναν υδρόφοβο διπλοστοιβαδικό πυρήνα. Ταυτόχρονα οι πολικές κεφαλές και των δύο στρωμάτων είναι προσανατολισμένες προς τον πολικό διαλύτη

Οι στοιβαδικές μεσοφάσεις, κατ' αναλογία των σμηκτικών φάσεων που συναντάμε στους θερμοτροπικούς υγρούς κρυστάλλους, με την αύξηση της θερμοκρασίας υπόκεινται σε θερμοτροπικές μεταπτώσεις. Οι θερμοτροπικές μεταπτώσεις τυπικών φωσφολιπιδικών

διπλοστοιβάδων και οι φάσεις στις οποίες οδηγούν, αναλύονται διεξοδικά στη συνέχεια, στο 4^ο κεφάλαιο.

Επιγραμματικά αναφέρονται η φάση γέλης (Lβ') η ρυτιδωμένη φάση (Pβ') και η υγρή κρυσταλλική κατάσταση (La).

1.3 Τα πέντε βασικά χαρακτηριστικά της αυτό-συναρμολόγησης

Η ουσιαστική κατανόηση των αρχών που διέπουν τις διαδικασίες της αυτό-συναρμολόγησης είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τον σχεδιασμό απλών ή και πιο σύνθετων λειτουργικών δομών. Η αυτό-συναρμολόγηση αποτελεί συνεπώς την «βάση» πάνω στην οποία πρέπει να στηριζόμαστε με στόχο την ανάπτυξη προηγμένων-καινοτόμων νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμάκων.

Συνοπτικά η επιτυχής εκμετάλλευση των αρχών αυτών βασίζεται, σύμφωνα με τους Whitesides and Boncheva, σε πέντε βασικά χαρακτηριστικά.

1. **Τα συστατικά** (components): Ένα αυτό-συναρμολογούμενο σύστημα αποτελείται από μία ομάδα αλληλεπιδρώντων μορίων ή τμημάτων ενός μακρομορίου, ίδιων ή και διαφορετικών μεταξύ του. Η μεταξύ τους αλληλεπίδραση έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία περισσότερο οργανωμένων δομών.
2. **Τις αλληλεπιδράσεις** (interactions): Η αυτό-συναρμολόγηση λαμβάνει χώρα όταν τα μόρια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους στο πλαίσιο μίας ισορροπίας μεταξύ ελκτικών και απωστικών δυνάμεων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι μη ομοιοπολικής φύσης (πχ Van der Waals, ηλεκτροστατικές, υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και δεσμούς υδρογόνου).
3. **Την αντιστρεψιμότητα ή προσαρμοστικότητα** (reversibility/adjustability): Η δημιουργία μιας υπερμοριακής δομής μέσω αυτό-συναρμολόγησης προϋποθέτει πως η οργάνωση των μονάδων της, είτε είναι αναστρέψιμη, είτε τους επιτρέπει να προσαρμόζονται την θέση τους εντός του σχηματισμένου συσσωματώματος. Συνεπώς, η ισχύς των δυνάμεων που συγκρατούν τις μονάδες εντός της οργανωμένης δομής, πρέπει να είναι συγκρίσιμη με αυτών που τείνουν να την καταστρέψουν.
4. **Το περιβάλλον** (environment): Η μοριακή αυτό-συναρμολόγηση πραγματοποιείται συνήθως σε διάλυμα ή σε μία διεπιφάνεια όπου διευκολύνεται η απαραίτητη κίνηση των μορίων. Το ίδιο το περιβάλλον μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό την διαδικασία της αυτό-συναρμολόγησης.

5. **Την μεταφορά μάζας (mass transport):** Προϋπόθεση για να πραγματοποιηθεί η αυτό-συναρμολόγηση είναι τα μόρια να βρίσκονται σε κίνηση. Σε ένα διάλυμα η θερμική κίνηση είναι αυτή που ωθεί τα μόρια να προσεγγίσουν το ένα το άλλο.
(Whitesides & Boncheva, 2002).

2 ΠΟΛΥΜΕΡΗ

2.1 Γενικά περί πολυμερών

Πολυμερή ονομάζονται οι οργανικές ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους, των οποίων τα μόρια αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μικρότερες μονάδες, τα μονομερή, οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας τις λεγόμενες πολυμερικές αλυσίδες.

Οι δεσμοί που συγκρατούν τα μονομερή μεταξύ τους είναι ομοιοπολικοί και καθορίζουν τη θερμική και χημική σταθερότητα του υλικού. Οι πολυμερικές αλυσίδες, συνδέονται μεταξύ τους μέσω ασθενών διαμοριακών αλληλεπιδράσεων τύπου van der Waals ή δεσμούς υδρογόνου, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις φυσικές ιδιότητες του πολυμερούς (π.χ. ιξώδες, ελαστικότητα, διαλυτότητα κ.ά.).

Οι βασικές μέθοδοι πολυμερισμού είναι δύο:

i. Αλυσιδωτός πολυμερισμός (ή πολυμερισμός προσθήκης)

πρόκειται για μία γρήγορη αλυσιδωτή αντίδραση τριών φάσεων:

- **Έναρξη:** παρουσία μίας ουσίας που ονομάζεται ενεργοποιητής με την οποία πραγματοποιείται η μετατροπή ενός διπλού δεσμού σε απλό, γεγονός που τον καθιστά ενεργό κέντρο σύνδεσης.
- **Διάδοση:** είναι η αντίδραση σύνδεσης και ανάπτυξης της μακρομοριακής αλυσίδας.
- **Τερματισμός:** είναι το στάδιο διακοπής της αλυσιδωτής αντίδρασης.

ii. Σταδιακός πολυμερισμός (ή πολυμερισμός συμπύκνωσης)

Πρόκειται για μία πολύ πιο αργή αντίδραση σε σχέση με τον αλυσιδωτό πολυμερισμό, η οποία πραγματοποιείται μέσω πολλαπλών ανεξαρτήτων αντιδράσεων ζευγών μονομερών. που συνοδεύονται από απόσπαση παραπροϊόντος (συνήθως νερό ή αμμωνία), η οποία καλείται συμπύκνωση (Σιμιτζής, 1994).

2.2 Κατάταξη πολυμερών

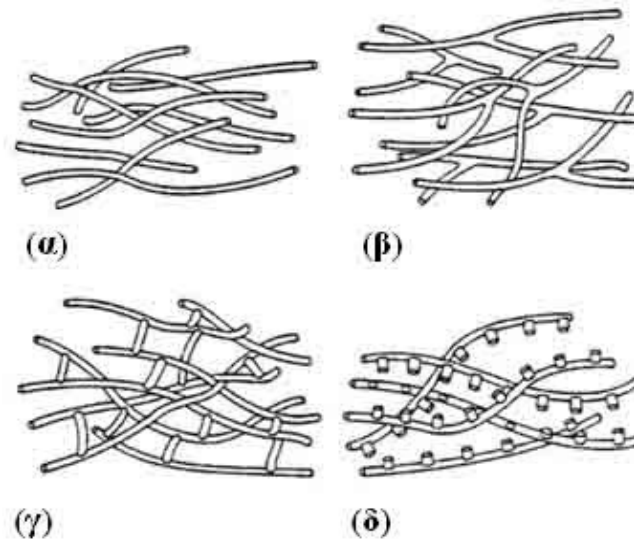
Υπάρχουν διάφοροι τρόποι ταξινόμησης των πολυμερών. Ενδεικτικά αναφέρονται οι εξής:

- Αναλόγως της προέλευσής τους διακρίνονται σε φυσικά, συνθετικά ή ημισυνθετικά.
- Αναλόγως της ικανότητας τους να διαχέονται εύκολα ή δύσκολα σε διάλυμα, διακρίνονται σε κρυσταλλοειδή ή κολλοειδή.

- Από πλευράς θερμοδυναμικής συμπεριφοράς μπορούν να χαρακτηριστούν ως θερμοπλαστικά, θερμοσκληρυνόμενα, ή ελαστικά.

Ανάλογα με την αρχιτεκτονική της πολυμερικής αλυσίδας μπορούν να διαχωριστούν σε:

- Γραμμικά: Στα οποία τα μόρια έχουν τη μορφή απλής αλυσίδας που αναπτύσσεται σε μια διάσταση του χώρου
- Διακλαδισμένα, στα οποία η αλυσίδα αναπτύσσεται σε δύο διαστάσεις και παίρνει την μορφή διακλαδώσεων
- Διασταυρωμένα (crosslinked) ή δικτυωμένα, στα οποία τα μόριά τους αποτελούνται από αλυσίδες που συνδεόμενες μεταξύ τους με διασταυρωμένες συνδέσεις σχηματίζουν ένα δίκτυο που αναπτύσσεται στις τρεις διαστάσεις του χώρου
- Με πλευρικές ομάδες, τα οποία διαθέτουν ελεύθερες πλευρικές ομάδες πάνω στην κύρια αλυσίδα τους.

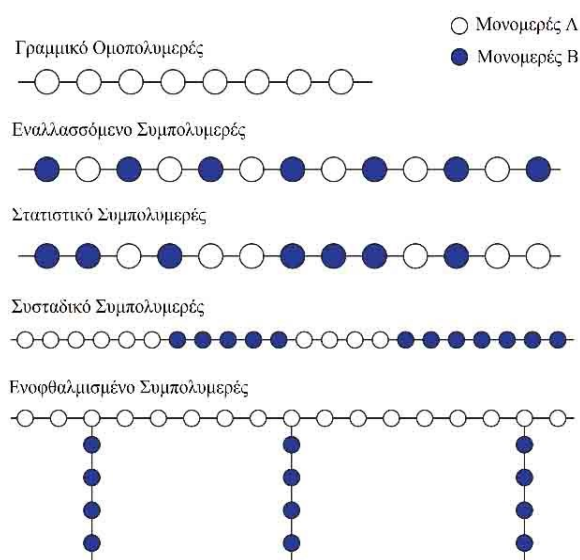


Σχήμα 2.2.1 Αρχιτεκτονική πολυμερών: (α) Γραμμικά, (β) Διακλαδισμένα, (γ) Διασταυρωμένα και (δ) Με πλευρικές ομάδες.

Τα πολυμερή μπορούν να διακριθούν επιπροσθέτως σε ομοπολυμερή, στην περίπτωση που αποτελούνται από ένα μόνο είδος μονομερών και σε συμπολυμερή, τα οποία προκύπτουν από συνδυασμό δύο ή περισσότερων δομικών μονάδων.

Τα συμπολυμερή μπορούν να διακριθούν περαιτέρω σε τέσσερις επιμέρους κατηγορίες:

- i. Τυχαία ή στατιστικά (random or statistical copolymers), στα οποία οι δομικές μονάδες κατανέμονται τυχαία κατά μήκος του μακρομορίου.
- ii. Εναλλασσόμενα συμπολυμερή (alternating copolymers), στα οποία οι δύο δομικές μονάδες εναλλάσσονται με απόλυτη κανονικότητα, στο μακρομόριο.
- iii. Συσταδικά ή αδρομερή (block copolymers), στα οποία τα γραμμικά μακρομόρια αποτελούνται από εναλλασσόμενες συστάδες συμπολυμερών (blocks). Στην περίπτωση που οι συστάδες είναι δύο τότε μιλάμε για δισυσταδικά συμπολυμερή (diblock copolymer).
- iv. Ενοφθαλμισμένα ή Εμβολιασμένα (graft copolymers), όταν κατά μήκος ενός ομοπολυμερούς ‘ενοφθαλμίζονται’ ως διακλαδώσεις, συστάδες ενός άλλου ομοπολυμερούς.



Σχήμα 2.2.2 Διάφορες κατηγορίες συμπολυμερούς ανάλογα με τον τρόπο που είναι κατανεμημένα τα δύο διαφορετικά μονομερή (Atwood & Florence, 2008).

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ιδιότητες των πολυμερών καθορίζονται από τη μικροδομή τους και ιδίως από τα χαρακτηριστικά των αλυσίδων τους. Κύρια χαρακτηριστικά είναι η κατανομή των μοριακών βαρών, η τακτικότητα και οι διαμορφώσεις των αλυσίδων.

Τα μοριακά βάρη είναι κατανεμημένα με διάφορους τρόπους και χαρακτηρίζονται από τις μέσες τιμές τους. Η τακτικότητα των πολυμερών αφορά στην ουσία την ιδιότητα των αλυσίδων να διατάσσονται με διαφορετικούς τρόπους, όταν υπάρχει διαφορετικός προσανατολισμός των

διαδοχικών δομικών τους μονάδων. Τέλος, οι διαμορφώσεις των αλυσίδων στο χώρο, που σχετίζονται με την κατάσταση των πολυμερών και την ικανότητα των ατόμων ή ομάδων ατόμων να περιστρέφονται σε διάφορες θέσεις γύρω από κύριους ατομικούς δεσμούς, διακρίνονται στις εξής δύο κατηγορίες:

Διαμορφώσεις μεγάλης κλίμακας, που αφορούν την κατάσταση του πολυμερούς (στερεό, τήγμα ή διάλυμα). Έτσι είναι δυνατόν να προκύπτει μακρομόριο που να έχει το σχήμα έλικας, διπλωμένων αλυσίδων ή ακόμα και τεθλασμένης γραμμής (στο επίπεδο).

Διαμορφώσεις μικρής κλίμακας, που είναι αποτέλεσμα των περιστροφικών κινήσεων των πλευρικών ομάδων, γύρω από απλούς δεσμούς των ατόμων άνθρακα της κύριας αλυσίδας. Οι περιστροφές αυτές δε σχετίζονται με την κατάσταση του πολυμερούς (Atwood & Florence, 2008; Σμιτζής, 1994).

2.3 Συμπολυμερή κατά συστάδες συμπολυμερή (Block Copolymers)

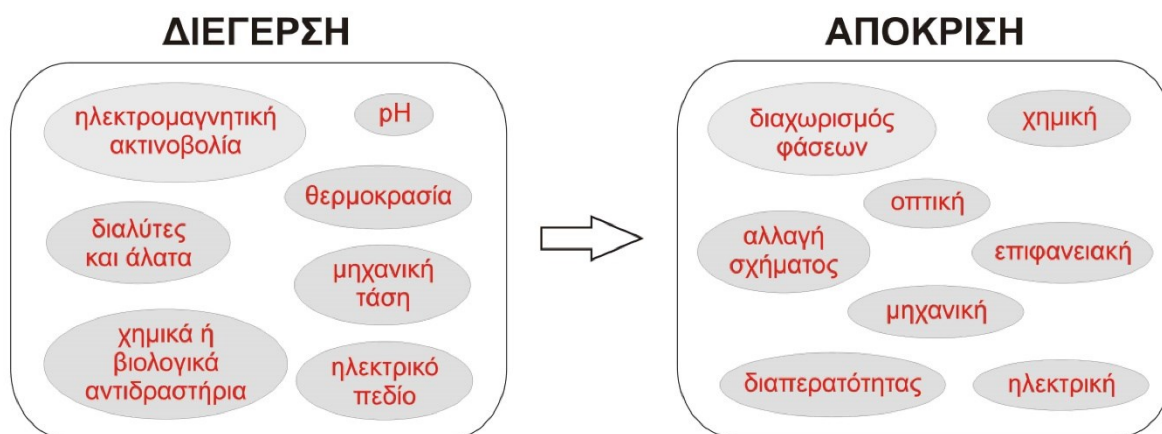
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως υποψήφια υλικά για την ανάπτυξη καινοτόμων συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων παρουσιάζουν τα συμπολυμερή κατά συστάδες (block copolymers), στα οποία διαφορετικά είδη επαναλαμβανόμενων μονάδων εντοπίζονται σε διακριτές συστάδες (blocks) κατά μήκος της αλυσίδας. Μπορούν να θεωρηθούν ως συνδυασμός δύο ή περισσότερων μακρομορίων που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα στην άκρη της αλυσίδας τους. Στην περίπτωση που υπάρχουν δύο ή τρεις συστάδες τότε χαρακτηρίζονται ως δισυσταδικά (diblock ή τρισυσταδικά (triblock) αντίστοιχα. Η σειρά οργάνωσης των δισυσταδικών συμπολυμερών έχει την μορφή AAAAAA-BBBBBB, όπου AAAAAA και BBBBBB είναι οι συστάδες κατά IUPAC. Η σειρά των συστάδων συμβολίζεται ως A_n -block- B_m , όπου n και m είναι ο βαθμός πολυμερισμού της αντίστοιχης συστάδας, και ονομάζεται ως πολύ A- block-πολύ B.

Συνήθως στα δισυσταδικά συμπολυμερή, που είναι και τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα, οι συστάδες είναι ασύμβατες μεταξύ τους. Έτσι όταν διαλύονται σε έναν εκλεκτικό διαλύτη, συμπεριφέρονται ως αμφίφιλα μόρια και οι μακρομοριακές τους αλυσίδες συσσωματώνονται σχηματίζοντας διάφορες υπερμοριακές δομές όπως για παράδειγμα μικύλλια που προσομοιάζουν σε αυτά των μικρού μοριακού βάρους αμφίφιλων μορίων. Η τελική μορφολογία του συσσωματώματος που δημιουργείται εξαρτάται κυρίως από την σύσταση και την αρχιτεκτονική του συμπολυμερούς (Πιτσικάλης & Χατζηχηρηστίδη, 2010).

2.4 Αποκρινόμενα Πολυμερή –Συστήματα μεταφοράς φαρμάκων

Ως αποκρινόμενα σε ερεθίσματα πολυμερή ορίζονται αυτά που έχουν την δυνατότητα να παρουσιάσουν σχετικά μεγάλες και απότομες μεταβολές στις φυσικές ή χημικές τους ιδιότητες, αποκρινόμενα σε συγκεκριμένες αλλαγές των συνθηκών του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται. Οι μεταβολές αυτές είναι αντιστρέψιμες. Εκτός από τον όρο «αποκρινόμενα» στην βιβλιογραφία, τα πολυμερή αυτά έχουν περιγραφεί και ως «έξυπνα» ή «περιβαλλοντικά ευαίσθητα». Είναι μία κατηγορία υλικών που συμπεριλαμβάνει μια ποικιλία από γραμμικά ή διακλαδισμένα συμπολυμερή και διασταυρωμένα πολυμερικά δίκτυα. Τα συστήματα αυτά έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν ένα ερέθισμα-σήμα και κρίνοντας το μέγεθός του να μεταβάλουν τη συμπεριφορά τους-τις ιδιότητες τους με άμεση απόκριση.

Υπάρχουν πολλά διαφορετικά ερεθίσματα που μπορούν να προκαλέσουν την απόκριση των πολυμερών. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είναι οι μεταβολές στην θερμοκρασία και στο pH του περιβάλλοντος. Ανάλογα με την φύση τους διαχωρίζονται σε δύο διακριτές κατηγορίες: ερεθίσματα χημικής ή φυσικής φύσης. Τα φυσικά ερεθίσματα, όπως η θερμοκρασία, το ηλεκτρικό ή το μαγνητικό πεδίο, οι υπέρηχοι και η ακτινοβολία, όταν λάβουν συγκεκριμένες κρίσιμες τιμές, τροποποιούν το ενεργειακό επίπεδο (επηρεάζοντας θερμοδυναμικούς παράγοντες όπως η ενθαλπία και η εντοπία) του συστήματος πολυμερούς-περιβάλλοντος, επάγοντας μια απόκριση.



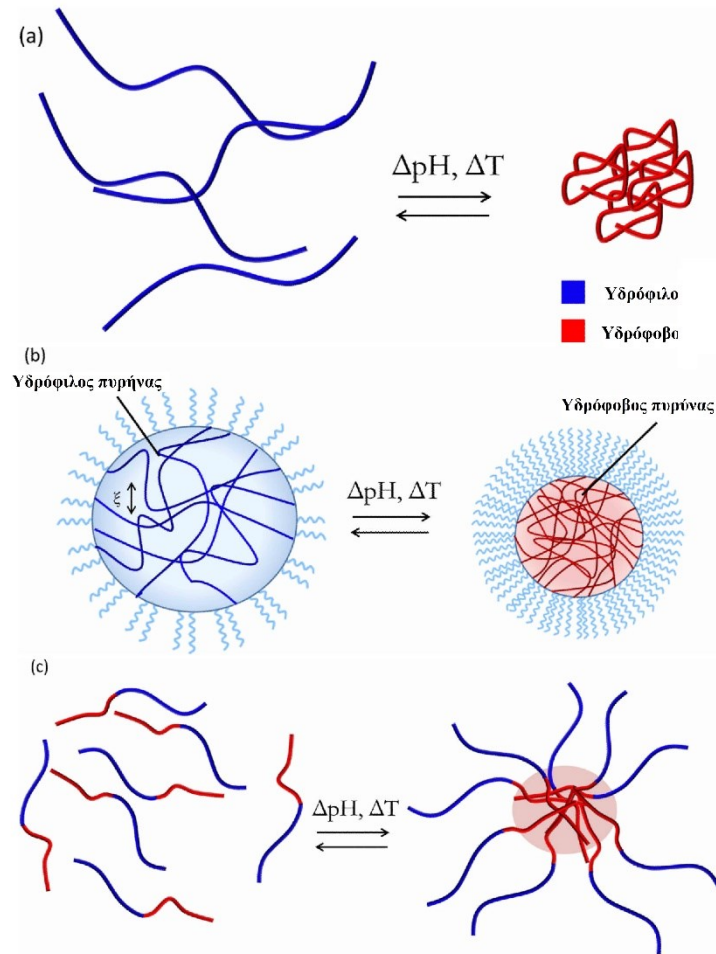
Σχήμα 2.4.1 Πιθανά Ερεθίσματα και αποκρίσεις «έξυπνων» πολυμερών. (Schmaljohann, 2006)

Τα χημικά ερεθίσματα, από την άλλη πλευρά, όπως για παράδειγμα το pH, η ιονική ισχύς, διάφοροι χημικοί ή βιοχημικοί παράγοντες και το οξειδαναγωγικό δυναμικό επάγουν

την απάντηση μεταβάλλοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολυμερούς και του συστήματος (διαλύτη) ή τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων. Στην πρώτη περίπτωση η μεταβολή έχει ως αποτέλεσμα την διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ υδρόφιλου και υδρόφοβου, ενώ στην δεύτερη μπορεί να επηρεαστούν για παράδειγμα η διασταύρωση, η ακεραιότητα του πολυμερικού σκελετού, η τάση για υδροφοβική οργάνωση ή οι ηλεκτροστατικές απώσεις (Shaikh, et al., 2010; Zhuang, et al., 2013). Μια διαφορετική κατηγοριοποίηση των ερεθισμάτων αυτών εκκινά από το αν αυτά προκύπτουν εντός ενός οργανισμού ή είναι εξωτερικά (Bawa, et al., 2009). Αυτές οι αλλαγές εκδηλώνονται με διάφορους τρόπους, όπως για παράδειγμα με μετάβαση των πολυμερικών αλυσίδων από σπείρα σε σφαιρίδιο (coil to globule), με διόγκωση–αποδιόγκωση (swelling-deswelling) των ομοιοπολικά διασταυρωμένων υδρογελών, με μετάβαση από διάλυμα σε γέλη (sol-gel) των φυσικά διασταυρωμένων υδρογελών και την αυτό-συναρμολόγηση αμφίφιλων πολυμερών (Liechty, et al., 2010). **(Σχήμα 2.4.2)**

Η συμπεριφορά αυτή των αποκρινόμενων πολυμερικών συστημάτων έχει αξιοποιηθεί σε πληθώρα εφαρμογών σε διάφορα επιστημονικά πεδία, συμπεριλαμβανομένων των συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων, την διαγνωστική και την απεικόνιση. Για παράδειγμα έχουν χρησιμοποιηθεί για την μεταφορά πρωτεϊνών όπως η ινσουλίνη, του συνενζύμου A, αντικαρκινικών φαρμάκων όπως η δοξορουβικίνη, η πακλιταξέλη κτλ. (Shaikh, et al., 2010; Zhuang, et al., 2013). Για να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν σε ιατρικές εφαρμογές πρέπει να εμφανίζουν τις ιδιότητες απόκρισης τους εντός του εύρους των βιολογικών συνθηκών (Schmaljohann, 2006).

Ακολουθώντας την ίδια λογική, έχουν αναπτυχθεί συστήματα τα οποία έχουν την ικανότητα να απαντούν σε περισσότερα του ενός ερεθίσματα, συνδυάζοντας δύο ή περισσότερους μηχανισμούς απόκρισης. Για παράδειγμα ένα πολυμερές μπορεί να αποκρίνεται απαντώντας είτε σε μεταβολές της θερμοκρασίας είτε σε μεταβολές του pH.



Σχήμα 2.4.2 Παραδείγματα αλλαγών που εκδηλώνονται σε πολυμερή μετά από απόκριση σε ερέθισμα (a) μετάβαση από σπείρα σε σφαιρίδιο (coil to globule), (b) διόγκωση-αποδιόγκωση (swelling-deswelling), (c) μικυλλιοποίηση δισυσταδικού πολυμερούς με μία αποκρίσιμη συστάδα. (Liechty, et al., 2010)

2.4.1 Χρήσεις και παραδείγματα των αποκρινόμενων πολυμερών στα Συστήματα μεταφοράς φαρμάκων

Η πλειοψηφία των αποκρινόμενων πολυμερών που χρησιμοποιούνται σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων αφορούν κυρίως υδροπηκτώμα-υδρογέλες και μικκύλια.

- i. Υδρογέλες: Οι υδρογέλες σχηματίζουν ένα τρισδιάστατο δίκτυο πολυμερικών αλυσίδων με κάποια τμήματα να διαλύονται στο νερό, ενώ κάποια άλλα τμήματα αλληλοσυνδέονται με φυσικούς ή χημικούς δεσμούς. Αυτή η δομή είναι ικανή να απορροφήσει ποσότητες νερού ή βιολογικών υγρών με αποτέλεσμα να διογκώνεται αλλά όχι να διαλύεται. Οι διαστάσεις μίας αποκρίσιμης υδρογέλης μπορεί να αλλάξουν

δραματικά με μεταβολή στην υδροφιλικότητα ή την υδροφοβικότητα των αλυσίδων ως απάντηση σε ένα ερέθισμα προκαλώντας για παράδειγμα την απελευθέρωση του εγκλωβισμένου στο εσωτερικό της φαρμάκου.

- ii. Μικκύλια: Τα μικκύλια σχηματίζονται γενικά μέσω της αυτό-συναρμολόγησης αμφίφιλων πολυμερών όταν αυτά βρεθούν σε κατάλληλο μέσο διασποράς, όπως το νερό, ως αποτέλεσμα του υδροφοβικού φαινομένου. Τα αποκρίσιμα δε μικκύλια, τα οποία αφορούν κυρίως συμπολυμερή δύο συστάδων εκ των οποίων τουλάχιστον η μία είναι αποκρίσιμη σε κάποιο ερέθισμα. Σε αυτήν την περίπτωση η μικκυλιοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί κατόπιν μιας διαμορφωτικής αλλαγής που μεταβάλλει την ισορροπία μεταξύ υδρόφιλου και υδρόφοβου τμήματος. Στην περίπτωση ενός αμφίφιλου διπλό-αποκρινόμενου συμπολυμερούς μπορούν να προκύψουν μικκύλια με αποκρίσιμη κορώνα (το εξωτερικό πολικό τμήμα του μικκυλλίου) ή με αποκρίσιμο πυρήνα (Gil, 2004).

2.4.2 Πολυμερή Αποκρινόμενα σε μεταβολές της Θερμοκρασίας.

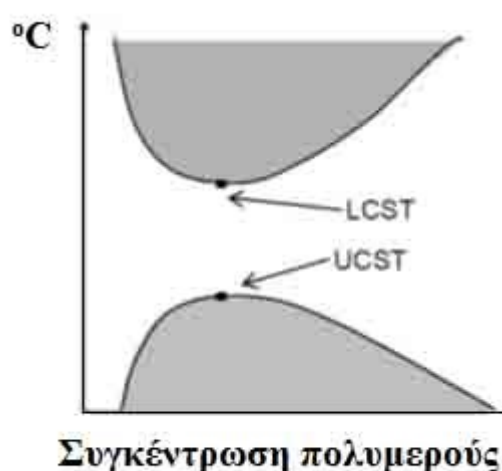
Όσον αφορά τις εφαρμογές σε βιολογικά συστήματα μεταξύ των αποκρινόμενων πολυμερών, ξεχωρίζουν αυτά που «απαντούν» σε μεταβολές της θερμοκρασίας, καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν απλά ανάλογα που μιμούνται την υδατοδιαλυτότητα των πρωτεϊνών ή άλλων βιομορίων.

Επίσης η θερμοκρασία είναι ένα φυσικό ερέθισμα σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Μπορεί να αξιοποιηθεί ως εσωτερικό ερέθισμα καθώς είναι γνωστό πως διάφορες εντοπισμένες παθολογικές καταστάσεις, όπως για παράδειγμα μία φλεγμονή ή η ανάπτυξη ενός καρκινικού ιστού χαρακτηρίζονται από ελαφρώς υψηλότερες θερμοκρασίες συγκριτικά με τους υγιείς ιστούς. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως εξωτερικό ερέθισμα με την παροχή θερμικής ενέργειας σε πάσχοντες ιστούς, με την χρήση εξωτερικών πηγών όπως για παράδειγμα μέσω ηλεκτρομαγνητισμού, με υψηλής συχνότητας υπέρηχους, η ακόμα και με υδατόλουτρο (Jhaveri, et al., 2014).

Τα θερμοαποκρινόμενα πολυμερή χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μιας κρίσιμης θερμοκρασίας διάλυσης, που στην ουσία είναι η θερμοκρασία στην οποία σε ένα διάλυμα πολυμερούς-διαλύτη (σύστημα μίας φάσης), πραγματοποιείται διαχωρισμός φάσεων. Αυτή η θερμοκρασία ταυτίζεται συνήθως με το σημείο θόλωσης (cloud point), δηλαδή την θερμοκρασία στην οποία το διάλυμα χάνει την διαύγεια του και θολώνει (Aseyev, et al., 2011).

Για να εκδηλωθεί η θερμοευαισθησία ενός τέτοιου υλικού, πρέπει αυτό να βρίσκεται εντός ενός υδατικού μέσου.

Αν το πολυμερές είναι διαλυμένο σε ένα διαλύτη κάτω από μία συγκεκριμένη θερμοκρασία, (δηλαδή το σύστημα αποτελείται από μία μόνο φάση) και πραγματοποιείται διαχωρισμός φάσεων πάνω από αυτή, λέμε ότι το πολυμερές διαθέτει χαμηλότερη κρίσιμη θερμοκρασία διάλυσης (Lowest Critical Solution Temperature, **LCST**). Στην αντίθετη περίπτωση, κατά την οποία το πολυμερές γίνεται διαλυτό με την αύξηση της θερμοκρασίας, τότε χαρακτηρίζεται από υψηλότερη κρίσιμη θερμοκρασία διάλυσης (upper critical solution temperature, **UCST**) (Bawa, et al., 2009; Aseyev, et al., 2011).



Σχήμα 2.4.3 Διάγραμμα φάσεων πολυμερούς, όπου φαίνεται η συμπεριφορά ανώτερης και κατώτερης κρίσιμης θερμοκρασίας διαλύματος. Οι γκριζες ζώνες αντιστοιχούν σε διφασικό σύστημα

Μολονότι τα περισσότερα πολυμερή παρουσιάζουν αύξηση της διαλυτότητας με θέρμανση ιδιαίτερη εφαρμογή στο πεδίο των συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων βρίσκουν αυτά τα οποία διαθέτουν LCST. Σε αυτά ο διαχωρισμός φάσεων προκύπτει από την μεταβολή του βαθμού ενυδάτωσης των πολυμερικών αλυσίδων με την αύξηση της θερμοκρασίας και συγκεκριμένα με τη μείωση του. Αυτή η μεταβολή αντανakλά την διαμόρφωση διαμοριακών και ενδομοριακών δυνάμεων που προάγονται κατά την θέρμανση του συστήματος, έναντι των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων του νερού και του πολυμερούς που οδηγούν στην διαλυτοποίησή του. Στα συστήματα που χαρακτηρίζονται από UCST, ίδιο φαινόμενο προκύπτει με την μείωση της θερμοκρασίας. Η θερμοδυναμική εξήγηση του φαινομένου, παρουσιάζεται στην ενότητα που ακολουθεί (Schmaljohann, 2006).

Στον επόμενο πίνακα παρουσιάζονται ορισμένα πολυμερή που εμφανίζουν LCST, σε ενδιαφέρουσα για βιοϊατρικές εφαρμογές θερμοκρασιακή περιοχή. Πρέπει να σημειωθεί ότι η θερμοκρασία μετάπτωσης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η συγκέντρωση των αλάτων, το pH και η φύση του ρυθμιστικού διαλύματος (αν υπάρχει τέτοιο), το μοριακό βάρος και η συγκέντρωση του πολυμερούς. Επίσης συμπολυμερισμός ενός θερμοαποκρινόμενου πολυμερούς με υδρόφιλα μονομερή προκαλεί την μετατόπιση της LCST προς υψηλότερες θερμοκρασίες, ενώ το αντίθετο αποτέλεσμα δημιουργεί ο συμπολυμερισμός με υδρόφοβες μονάδες (Heyda, et al., 2013).

Πίνακας 2.1 Πολυμερή που εμφανίζουν LCST σε εύρος θερμοκρασιών κατάλληλο για βιοϊατρικές εφαρμογές (Schmaljohann, 2006).

Πολυμερές	LCST σε υδατικό διάλυμα
πολύ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο) PNIPAM	30–34 °C
πολύ(N,N-διαιθυλακρυλαμίδιο) PDEAM	32–34 °C
πολύ(μέθυλο βινυλαιθέρας) PMVE	37 °C
πολύ(N-βινυλοκαπρολακτάμη) PVCa	30–50 °C
Πολύ(αιθυλενοξειδίο)-πολύ(προπυλενοξειδίο) PEO-b-PPO	20–85 °C

2.4.2.1 Υδρόφοβη Αλληλεπίδραση και θερμοδυναμική επεξήγηση της LCST μετάβασης.

Τα ουδέτερα υδατοδιαλυτά πολυμερή αποτελούνται από υδρόφιλες ομάδες (π.χ. αμιδοομάδες, αιθεροομάδες), οι οποίες είναι ικανές να αλληλεπιδρούν ισχυρά με τα μόρια του νερού επάγοντας την διαλυτοποίησή τους και από υδρόφοβες ομάδες (π.χ. ο βινυλικός σκελετός). Ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου μεταξύ των πολικών ομάδων των πολυμερών και των μορίων του νερού είναι στην ουσία η κινητήριος δύναμη για τη διάλυση τους. Η λέξη “υδρόφοβος” είναι μάλλον παραπλανητική. Υπονοεί ότι η διαλυμένη ουσία «αντιπαθεί» το νερό, ενώ στην πραγματικότητα η αλληλεπίδραση μεταξύ του υδρόφοβου μορίου και του νερού είναι ελκτική, εξαιτίας των δυνάμεων διασποράς. Ωστόσο, η έλξη μεταξύ των μορίων του νερού είναι αρκετά πιο ισχυρή συγκριτικά με τις δυνάμεις van der Waals, καθώς τα μόρια του νερού προτιμούν τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση από το να επιτρέψουν στις μη πολικές ουσίες να παρέμβουν στην οργάνωσή τους.

Τα υδρόφοβα τμήματα του αμφίφιλου μακρομορίου επαναπροσανατολίζουν τα γειτονικά μόρια του νερού οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό ενός διατεταγμένου-οργανωμένου υδατικού στρώματος που τα περιβάλλει. Οι διαμορφώσεις αυτές πιθανότατα έχουν την μορφή κλωβού, ενώ το φαινόμενο είναι γνωστό ως υδρόφοβη ενυδάτωση. Η οργανωμένη διευθέτηση των μορίων του νερού είναι εντροπικά μη ευνοϊκή και για αυτό το λόγο οι υδρόφοβες ουσίες φεύγουν της διαλυτοποίησής τους στο νερό. Η συμπεριφορά αυτή των υδρόφοβων μορίων στο νερό, γνωστή ως “υδροφοβικό φαινόμενο”, προκαλεί την ισχυρή, επαγόμενη από τον διαλύτη έλξη μεταξύ των υδρόφοβων μορίων, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η επιφάνεια επαφής μεταξύ αυτών και του νερού. Επομένως, ένα αμφίφιλο υδατοδιαλυτό πολυμερές δέχεται τόσο απωστικές όσο και ελκτικές δυνάμεις, το άθροισμα των οποίων καθορίζει τη διαλυτότητα του στο νερό.

Η μετάβαση που υφίστανται τα πολυμερή που εμφανίζουν LCST όταν βρίσκονται σε κάποιο υδατικό μέσο, αντικατοπτρίζει μία τοπική δομική μεταβολή εξαρτώμενη από την συμπεριφορά των μορίων του νερού. Σε χαμηλή θερμοκρασία το πολυμερές είναι «υδρόφιλο» και τα μόρια του νερού αλληλεπιδρούν με τις πολικές του ομάδες καθώς και μεταξύ τους μέσω δεσμών υδρογόνου. Έτσι οι πολυμερικές αλυσίδες υιοθετούν μία εκτεταμένη σπειροειδή (coil) διαμόρφωσή. Η ένταση του υδροφοβικού φαινομένου αυξάνει με τη θερμοκρασία και έτσι σε υψηλότερες θερμοκρασίες τα μόρια του νερού απελευθερώνονται προς την μάζα του μέσου, επιτρέποντας στις εκτεθειμένες πλέον μονάδες του πολυμερούς να πλησιάσουν και να αλληλοεπιδράσουν μεταξύ τους. Η συνολικά αρνητική μεταβολή της εντροπίας ($\Delta S < 0$) του συστήματος εξαιτίας της οργάνωσης των μορίων του νερού γύρω από τις μη πολικές ομάδες του πολυμερούς, κατά την θέρμανση, υπερνικά την εξώθερμη ενθαλπία των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των πολικών ομάδων και του νερού. Αυτό οδηγεί στη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs, η οποία αποκτά θετικό πρόσημο ($\Delta G > 0$), κάτι που δεν ευνοείται θερμοδυναμικά. Ως αποτέλεσμα επέρχεται η συστολή των αλυσίδων, η συσσωμάτωση τους και εν τέλει ο διαχωρισμός των φάσεων σε θερμοκρασία πάνω από την LCST (Aseyev, et al., 2011).

$$\Delta G_{mix} = \Delta H_{mix} - T\Delta S_{mix},$$

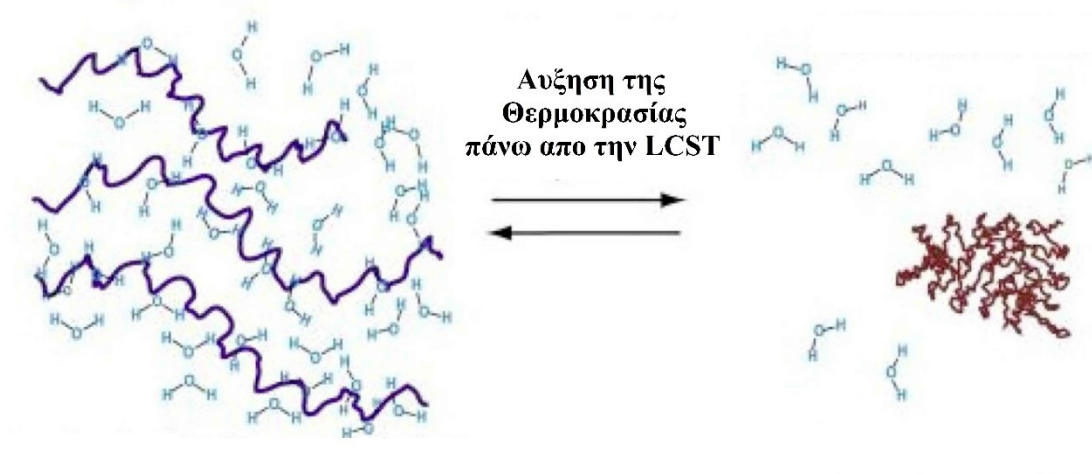
Όπου,

ΔG_{mix} : η ελεύθερη ενέργεια του συστήματος πολυμερούς/διαλύτη,

ΔH_{mix} : η ενθαλπία από τους αναπτυσσόμενους δ. υδρογόνου,

T : η θερμοκρασία

ΔS_{mix} : η εντροπία του συστήματος



Σχήμα 2.4.4 Συσσωμάτωση των πολυμερικών αλυσίδων ενός θερμοαποκρινόμενου πολυμερούς σε θερμοκρασία μεγαλύτερη της LCST. Τα μόρια του νερού «αποδεσμεύονται» από το πολυμερές καθώς ευνοούνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων. (Aseyev, et al., 2011)

2.4.3 Πολυμερή Αποκρινόμενα σε μεταβολές του pH

Ένα άλλο πολύ συχνά χρησιμοποιούμενο ερέθισμα σε πλήθος εφαρμογών και ιδιαίτερα στην ανάπτυξη αποκρινόμενων συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων είναι οι μεταβολές στο pH. Το pH μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό χημικό ερέθισμα προκειμένου να κατευθύνει την απόκριση σε συγκεκριμένους ιστούς ή κυτταρικά διαμερίσματα, καθώς διαφοροποιείται έντονα εντός του ανθρώπινου οργανισμού. Εκτός από την γνωστή μεταβολή του pH κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα από αρκετά όξινο στο στομάχι ($\text{pH} \approx 2$) σε ουδέτερο έως ασθενώς αλκαλικό στο λεπτό έντερο ($\text{pH} \approx 6.2-7.5$), μεταβολές παρατηρούνται και μεταξύ των ιστών ή και των διαφόρων κυτταρικών διαμερισμάτων. Για παράδειγμα η τιμή του pH σε έναν τραυματισμένο-φλεγμαινόντα ιστό έχει αναφερθεί ότι μπορεί να κυμαίνεται από 5.4 έως 7.4 σε σχέση με το pH 7.4 των φυσιολογικών ιστών, ενώ επίσης καρκινικοί ιστοί προκαλούν την μείωση του pH του εξωκυττάρου υγρού. Αναφορικά με τα ιδιαίτερης σημασίας κυτταρικά διαμερίσματα, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά την εισαγωγή διαφόρων νανο-φαρμακευτικών συστημάτων εντός του κυττάρου με πινοκύττωση ή ενδοκύττωση, το pH μπορεί να μεταβληθεί για παράδειγμα από 4.5 με 5.5 στα ενδοσώματα σε 5.0 έως 6.8 στα λυσοσώματα (Schmaljohann, 2006; Liechty, et al., 2010).

Πίνακας 2.2 Μεταβολές του pH μεταξύ των διαφόρων ιστών, κυτταρικών διαμερισμάτων (Schmaljohann, 2006).

Όργανο/Ιστός/Κυτταρικό διαμέρισμά	pH
Αίμα	7.35-7.45
Ενδόσωμα	5.0-6.5
Λυσόσωμα	4.5-5.0
Σύμπλεγμα Golgi	6.4
Εξωκυττάριο υγρό νεοπλάσιων	6.5-7.2

Τα πολυμερή που εμφανίζουν ευαισθησία στο pH αποτελούνται από μονομερή που μπορούν να ιονιστούν, να δώσουν ή να λάβουν δηλαδή πρωτόνια αποκρινόμενα σε μία μεταβολή του pH. Καθώς το pH αλλάζει, ο βαθμός ιονισμού ενός τέτοιου πολυμερούς, μεταβάλλεται δραματικά γύρω από μια συγκεκριμένη τιμή pH που ουσιαστικά ταυτίζεται με την pK_a του. Αυτή η γρήγορη αλλαγή στο συνολικό φορτίο της αλυσίδας μπορεί να προκαλέσει μεταβολή του υδροδυναμικού όγκου των πολυμερικών αλυσίδων. Η μετάβαση από την συρρικνωμένη στην εκτεταμένη διαμόρφωση ερμηνεύεται από την οσμωτική πίεση, που προκαλούν τα αντισταθμιστικά ιόντα των φορτίων των αλυσίδων. Τα πολυμερή που περιέχουν ιονιζόμενες ομάδες σχηματίζουν πολύηλεκτρολύτες διαλυόμενα σε ένα υδατικό μέσο. Υπάρχουν δυο είδη αποκρινόμενων στο pH πολυηλεκτρολυτών: τα ασθενή πολυοξέα και οι ασθενείς πολυβάσεις. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ασθενούς πολυοξέως είναι το πολύ(ακρυλικό οξύ) (PAA), το οποίο λόγω της καρβοξυλομάδας που περιέχει είναι ουδέτερο σε όξινο περιβάλλον, ενώ αποπρωτονιώνεται και ιονίζεται σε υψηλό pH. Από την άλλη πλευρά, πολυβάσεις όπως η 4-βινυλοπυριδίνη ιονίζονται σε όξινες συνθήκες ενώ σε υψηλό pH είναι ουδέτερες. Η επιλογή μεταξύ πολυοξέων και πολυβάσεων εξαρτάται από την επικείμενη εφαρμογή (Gil, 2004).

2.4.3.1 Πολυοξέα και Πολυβάσεις

Ασθενή πολυοξέα που υφίστανται έντονη μεταβολή στο βαθμό ιονισμού τους σε περιοχή pH από 4 έως 8, κατατάσσονται στην κατηγορία των pH-αποκρινόμενων πολυμερών. Τα πολυοξέα που φέρουν την καρβοξυλική ομάδα με pK_a κοντά στο 5-6 είναι τα πιο αντιπροσωπευτικά ασθενή πολυοξέα. Μεταξύ αυτών, το πολύ(ακρυλικό οξύ) (PAA) και το πολύ(μεθακρυλικό οξύ) (PMAA) είναι τα πιο συχνά εμφανιζόμενα στις αναφορές για τα pH-

αποκρίσιμα πολυοξέα. Σε όξινο περιβάλλον η καρβοξυλική ομάδα φέρει πρωτόνιο, το οποίο απομακρύνονται με την αύξηση του pH, προκαλώντας τον ιονισμό της. Με την μετατροπή του πολυοξέως σε πολυηλεκτρολύτη αναπτύσσονται ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις που προκαλούν έκταση των πολυμερικών αλυσίδων. Στην αντίθετη περίπτωση οι αλυσίδες μπορεί να αλληλοεπιδράσουν και να συσσωματωθούν υποκινούμενες από υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις ή δεσμούς υδρογόνου. Οι αλλαγές αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στην καταβύθιση ή διαλυτοποίηση πολυμερικών αλυσίδων, στη συρρίκνωση ή διόγκωση των υδρογελών κτλ.

Τα πολυ(2-διμέθυλο-αμινοαιθυλο-μεθακρυλικός εστέρας) (PDMAEMA) και πολυ (2-Διαίθυλο-αμινοαιθυλο μεθακρυλικός εστέρας) (PDEAEMA) είναι τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα pH-αποκρίσιμων πολυβάσεων. Η αμινομάδα είναι ουδέτερη σε αλκαλικό περιβάλλον, ενώ πρωτονιώνεται και φορτίζεται θετικά σε όξινο περιβάλλον. Τόσο το PDMAEMA, όσο και το PDEAEMA καταβυθίζονται σε τιμές pH μεγαλύτερες από 8 λόγω της επαγόμενης αλληλεπίδρασης μεταξύ των αλυσίδων τους.

3 ΛΙΠΙΔΙΑ

Τα λιπίδια είναι το κύριο συστατικό όλων των βιολογικών μεμβρανών. Τα μόρια αυτά αποτελούνται από τρία διακριτά μέρη:

- i. το μη-πολικό τμήμα, την περιοχή δηλαδή των υδρογονανθρακικών αλυσίδων,
- ii. την πολική κεφαλή και
- iii. τον σκελετό, το τμήμα εκείνο το οποίο συνδέει τα δύο πρώτα μέρη.

Κατατάσσονται σε τρεις κύριες κατηγορίες:

- i. Τα φωσφολιπίδια,
- ii. τα σφιγγολιπίδια και
- iii. τις στερόλες ή στεροειδή (Li, et al., 2015).

Τα περισσότερα λιπίδια είναι αμφίφιλα μόρια, τα οποία συμπεριφέρονται ως λυοτροπικοί υγροί κρύσταλλοι. Παρουσία ύδατος έχουν την ικανότητα να αυτό-οργανώνονται σε διάφορες υπερμοριακές δομές-φάσεις με διαφορετική γεωμετρία, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως καταστάσεις ισορροπίας. Η γεωμετρία των φάσεων είναι συνάρτηση της χημικής δομής τους αλλά και διαφόρων εξωγενών μεταβλητών όπως η ποσότητα του ύδατος, η θερμοκρασία, η πίεση και η σύσταση της υδατικής φάσης. Αυτές οι φάσεις αποτελούν υπερμοριακές δομές (aggregates) διαφορετικής αρχιτεκτονικής. Η δημιουργία των δομών αυτών οφείλεται και ορίζεται κυρίως από το υδρόφοβο φαινόμενο το οποίο οδηγεί τα υδρόφοβα τμήματα των λιπιδίων να πλησιάζουν το ένα το άλλο και ανάλογα να διατάσσονται, αλλά και από τους αναπτυσσόμενους δεσμούς van der Waals. Το είδος των δομών αυτών καθορίζεται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της πολικής κεφαλής, της υδρόφοβης περιοχής και από τα χαρακτηριστικά του διαλύτη (Koynova & Tenchov, 2013; Koynovaa & Caffrey, 1998).

Οι υπερμοριακές λιπιδικές δομές χαρακτηρίζονται με βάση τα τρία χαρακτηριστικά της οργάνωσής τους:

- i. την οργάνωση μακράς εμβέλειας (στιβάδες, μικύλλια κ.λπ.)
- ii. τη διαμόρφωση των υδρόφοβων αλυσίδων (οργανωμένες, κεκλιμένες κ.λπ.)
- iii. την κανονικότητα φάσεων (κανονικές ή ανάστροφες φάσεις)

3.1 Ονοματολογία Λιπιδικών Φάσεων

Οι λιπιδικές φάσεις συμβολίζονται διεθνώς με βάση την ονοματολογία που καθιέρωσε ο V. Luzzati το 1968: X_1^2

Το κεφαλαίο λατινικό γράμμα (X) δηλώνει την οργάνωση μακράς εμβέλειας, που σχετίζεται με το κρυσταλλικό σύστημα στο οποίο ανήκει το συσσωμάτωμα.

- Με (M) αναπαρίστανται οι μικυλλιακές φάσεις στις οποίες τα λιπιδικά μόρια είναι διατεταγμένα ακτινικά προς τη δημιουργία σφαιρικών μη συμπαγών δομών.
- Με (L) οι πλακοειδής φάσεις που σχηματίζονται με την οργάνωση των λιπιδικών μορίων σε διπλοστιβάδες με τις πολικές κεφαλές προσανατολισμένες προς την εξωτερική επιφάνεια και τις υδρόφοβες αλυσίδες αντίστοιχα στραμμένες προς το εσωτερικό.
- Με (P) οι πλάγιες δισδιάστατες φάσεις όπου τα λιπίδια οργανώνονται σε διπλοστιβάδες με τους άξονες των λιπιδικών μορίων να βρίσκονται υπό κλίση, οδηγώντας στην δημιουργία ρυτίδων στις επιφάνειες τους.
- Με (C) οι τρισδιάστατες κρυσταλλικές φάσεις.
- Ενώ με (H) και (Q) οι εξαγωνικές και κυβικές φάσεις αντίστοιχα.

Πίνακας 3.1 Ονοματολογία λιπιδικών μεσοφάσεων (Marsh , 1991).

Οργάνωση μακράς εμβέλειας X_1^2	Διαμόρφωση των υδρόφοβων αλυσίδων X_2^2	Κανονικότητα των φάσεων $X_{I/II}^2$
M:μικηλιακή (micellar)	α:άτακτη-υγρή κρυσταλλική(fluid/ disordered)	I: κανονική φάση
L:πλακοειδής-στοιβαδική (lamellar)	β:οργανωμένη-γέλης (gel)	II: ανάστροφη φάση
P:πλάγια ρυτιδωμένη (oblique)	β':οργανωμένη κεκλιμένη (tilted gel)	
C: κρυσταλλική (crystalline)	c:κρυσταλλική- υπογέλης (sub gel)	
H: εξαγωνική (hexagonal)		
Q: κυβική (cubic)		

Ο κάτω δείκτης (1) εάν είναι λατινικός αριθμός με (I) δηλώνει την κανονική φάση όπου οι πολικές κεφαλές είναι στραμμένες προς το εσωτερικό, με τις υδρόφοβες αλυσίδες σε επαφή με το μέσο διασποράς και με (II) την αντίστροφη φάση αντίστοιχα. Στην περίπτωση που ο κάτω δείκτης είναι μικρό ελληνικό ή λατινικό γράμμα συμβολίζει τη διαμόρφωση των υδρόφοβων αλυσίδων στο πλέγμα. Για παράδειγμα με (α) χαρακτηρίζεται η αταξία, με (β) η τάξη απουσία κάμψης των λιπιδικών αλυσίδων ως προς ορισμένο επίπεδο, με (β') η τάξη με κάμψη των λιπιδικών αλυσίδων ως προς ορισμένο επίπεδο, με (c) η κρυσταλλική τάξη. Τέλος όταν σχηματίζεται κάποιο τρισδιάστατο πλέγμα όπως στις φάσεις C ή Q, ο άνω δείκτης (2) περιγράφει την ομάδα (space group) στην οποία ανήκει (Marsh, 1991; Ματσίγκου, 2006).

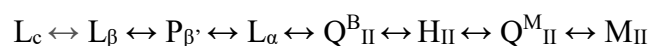
Το είδος της φάσης που θα δημιουργηθεί αυθόρμητα με τη διασπορά λιπιδικών μορίων σε ένα περίσσεια νερού εξαρτάται από τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά και το φορτίο τους. Προβλέψεις μπορούν να πραγματοποιηθούν κάνοντας χρήση του παράγοντα πακεταρίσματος (Packing parameter-p) που αναλύθηκε στο 2^ο κεφάλαιο.

3.2 Μεταβάσεις φάσεων Λιπιδικών Συστημάτων

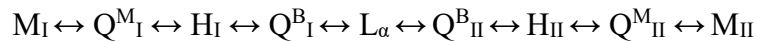
Οι διάφορες λιπιδικές φάσεις μία αναπαράσταση των οποίων παρουσιάζεται στο **Σχήμα 3.2.1**, σχετίζονται άμεσα μεταξύ τους και μπορούν να μετασχηματίζονται από την μία στην άλλη σε περίπτωση μεταβολής των παραμέτρων του συστήματος στο οποίο βρίσκονται. Αν σε ένα λιπιδικό σύστημα που ισορροπεί σε μία φάση μεταβληθεί για παράδειγμα η θερμοκρασία, η συγκέντρωση των λιπιδίων (ή η ποσότητα του ύδατος), το pH ή η ιονική ισχύς του διαλύματος, η πίεση κτλ., τότε μπορεί να προκληθεί μετάβαση σε μια άλλη φάση.

Η θερμοκρασία και η συγκέντρωση των λιπιδίων είναι οι σημαντικότερες μεταβλητές που μπορούν επηρεάζουν τον πολυμορφισμό τους (Koyanova & Tenchov, 2013). Οι μεταβάσεις φάσης που οφείλονται στην μεταβολή της λιπιδικής συγκέντρωσης, διατηρώντας τις υπόλοιπες παραμέτρους σταθερές, είναι γνωστές ως λυοτροπικές μεταβάσεις φάσεων Αντίστοιχα αυτές που οφείλονται στην μεταβολή μόνο της θερμοκρασία ονομάζονται θερμοτροπικές (Seddon & Templer, 1995).

Μια γενική αλληλουχία θερμοτροπικών μεταβάσεων φάσης διαφόρων μεμβρανικών λιπιδίων, όπως για παράδειγμα τα φωσφολιπίδια, μπορεί να συνοψιστεί ως εξής αυξανομένης της θερμοκρασίας:

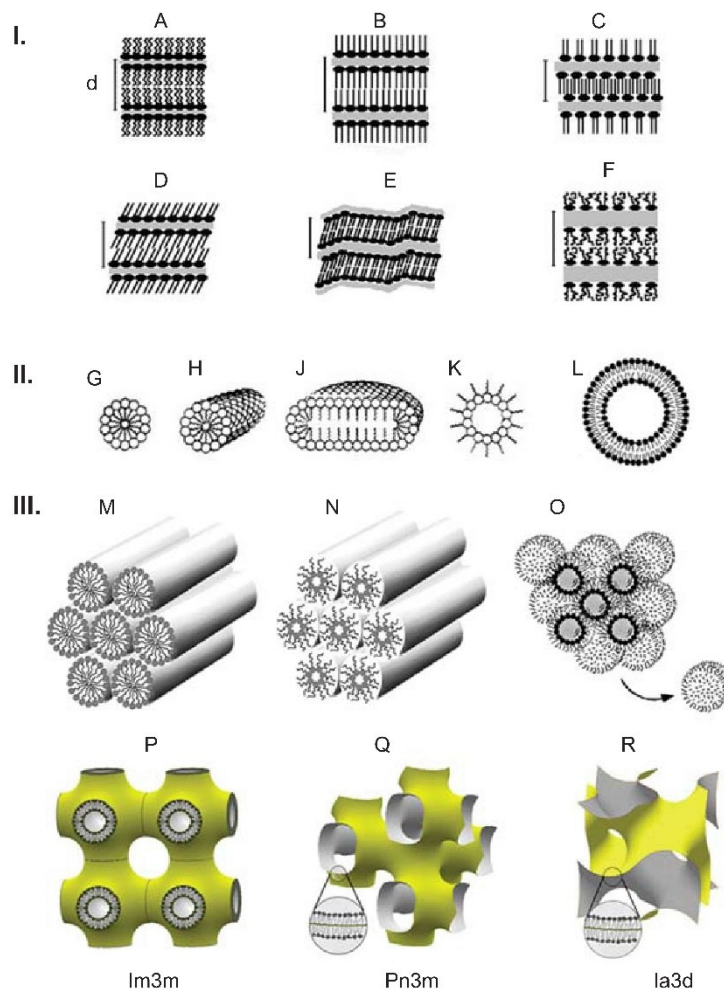


Οι λυοτροπικές μεταπτώσεις γενικά των λιπιδίων αυξανόμενης της λιπιδικής συγκέντρωσης ακολουθούν της εξής αλληλουχία:



Μερικά λιπίδια, μπορούν να σχηματίσουν δυο ή περισσότερες «παραλλαγές» μίας συγκεκριμένης φάσης, όπως για παράδειγμα η φάση ενδοεισχώρησης (interdigitated phase), η φάση γέλης (tilted phase) η ρυτιδωμένη φάση(rippled phase) που όλες γενικά είναι φάσης γέλης (Σχήμα 3.2.1).

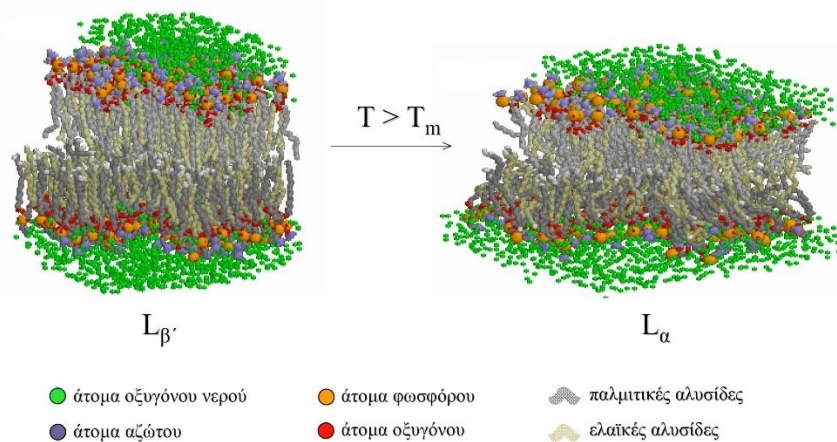
Γενικά τα λιπίδια διπλής αλυσίδας μπορούν να σχηματίσουν κυρίως στοιβαδικές καθώς και μερικές ανεστραμμένες φάσεις, ενώ λιπίδια μονής αλυσίδας μπορούν να σχηματίσουν κανονικές και μυκηλιακές φάσεις (Κογνονα & Tenchov, 2013).



Σχήμα 3.2.1 Διάφορες λιπιδικές φάσεις-μορφολογίες. I. πλακοειδείς-στοιβαδικές φάσεις: (A) L_c , (B) L_β ; (C) L_β^{int} , (D) L_β^* , (E) P_β , (F) L_α . II. Μυκηλιακές φάσεις: (G) M_I , (H) κυλινδρικά μικύλλια (tubules), (K) M_{II} (L) λιπόσωμα. III. Μη-στοιβαδικές φάσεις εξαγωνικές και κυβικές φάσεις: (M) H_I , (N) H_{II} , (O) Q^M_{II} , (Κογνονα & Tenchov, 2013).

3.2.1 Η κύρια μετάβαση φάσης των λιπιδίων

Η πιο σημαντική από βιολογικής απόψεως μετάβαση φάσης αλλά και η πιο χαρακτηριστική για τα περισσότερα «στοιβαδικά» λιπίδια, είναι μετάπτωση από την στοιβαδική φάση γέλης L_{β} στην υγρή κρυσταλλική φάση (L_{α}), γνωστή και ως κύρια μετάπτωση (main phase transition) ή μετάπτωση τήξης «melting transition» ή «solid-fluid transition» ή «ordered-disorder transition» κτλ. Πρόκειται για ένα πολύ σημαντικό ενεργειακό γεγονός που πραγματοποιείται στις διπλοστοιβάδες με αύξηση της θερμοκρασίας και συνοδεύεται από μεγάλες ενθαλπικές μεταβολές εντός ενός πολύ μικρού θερμοκρασιακού εύρους. Χαρακτηρίζεται από αύξηση της περιστροφική αταξίας των λιπαρών αλυσίδων, αύξηση του βαθμού ενυδάτωσης των πολικών κεφαλών και γενικά αύξηση της διαμοριακής εντροπίας (Κουρνονα & Tenchov, 2013). Η ενέργεια που απαιτείται για την υπερνίκηση των van der Waals αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αλειφατικών αλυσίδων καθώς και για την αύξηση της πλευρικής επιφάνειας της διπλοστοιβάδας (ενισχύοντας την έκθεση της λιπαρής φάσης της μεμβράνης στο υδατικό μέσο) προκαλούν μεγάλη μεταβολή της ενθαλπίας (Heller , et al., 1993).



Σχήμα 3.2.2 Οι μεταβολές στη λιπιδική μεμβράνη κατά την κύρια μετάπτωση φάσης: παρατηρούνται εμφανώς η “τήξη” των λιπαρών αλυσίδων και η ενυδάτωση της περιοχής ενδιάμεσης πολικότητας. Δυναμική μοριακή προσομοίωση διπλοστοιβάδων φωσφατιδυλοχολινών (Heller , et al., 1993).

Έχει αποδειχτεί, ότι κατά την κύρια μετάπτωση σε πλήρως ενυδατωμένες διπλοστοιβάδες προκύπτει μεγάλη αύξηση της λιπιδικής περιοχής (~25%) και του συνολικού όγκου της διπλοστοιβάδας (~4%) ως αποτέλεσμα της γενικότερης αποδιοργάνωσης της μεμβράνης. Η διπλοστοιβάδα μέσω αυτής την μετάβασης φάσης καθίσταται περισσότερο

διαπερατή και πιο ρευστή (Κουρνονα & Tenchov, 2013). Περισσότερα στοιχεία γεια την κύρια μετάβαση παρουσιάζονται στο τέλος του κεφαλαίου.

3.3 Φωσφολιπίδια

Τα φωσφολιπίδια είναι οι βασικότερες ουσίες για τη διατήρηση της ζωής καθώς είναι απαραίτητα συστατικά όλων των κυτταρικών και υπο-κυτταρικών μεμβρανών. Αποτελούν γενικά το μεγαλύτερο ποσοστό των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης. Από αυτό και μόνο γίνεται αντιληπτή η σημασία τους. Χρησιμοποιούνται ευρέως για τον σχηματισμό μεμβρανικών μοντέλων στην προσπάθεια να κατανοηθούν η δομή, η οργάνωση και η λειτουργία των βιολογικών μεμβρανών. Επίσης ευρεία είναι και η χρήση τους ως δομικά συστατικά συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων καθώς παρουσιάζουν εξαιρετική βιοσυμβατότητα. Τα συστήματα αυτά περιλαμβάνουν τα διάφορων ειδών λιποσώματα, λιπιδικά γαλακτώματα (lipid emulsions), μικύλλια, διάφορα σύμπλοκα φαρμάκου-φωσφολιπιδίου (drug-phospholipid complexes) κτλ. (Li, et al., 2015).

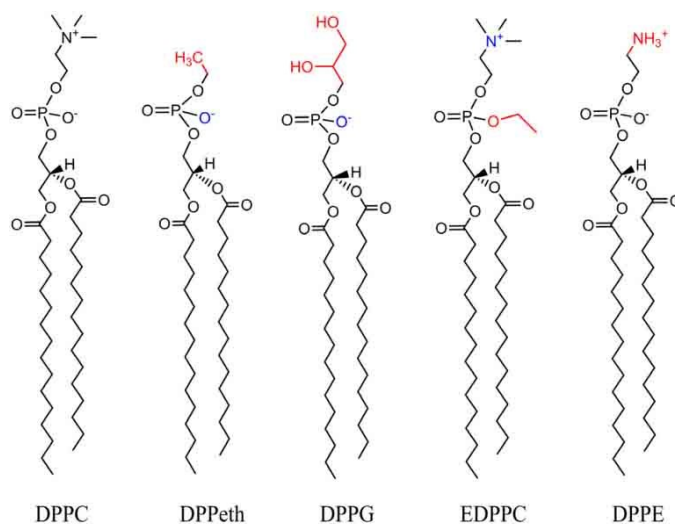
Τα μόρια αυτά, αποτελούνται από ένα κεντρικό «σκελετό» γλυκερόλης, οι δύο υδροξυλομάδες της οποίας εστεροποιούνται συνήθως με δύο μόρια λιπαρών οξέων. Εξαιρέση αποτελεί το φωσφολιπίδιο της σφιγγομυελίνης, όπου ως σκελετός, αντί της γλυκερόλης υπάρχει η σερίνη. Η τρίτη υδροξυλομάδα των φωσφολιπιδίων της γλυκερόλης εστεροποιείται με μία φωσφορική ομάδα, που με την σειρά της συνδέεται με ένα μικρό μόριο πολικό που αναφέρεται ως ομάδα πολικής κεφαλής.

Τα φωσφολιπίδια διακρίνονται για την ευρεία ποικιλομορφία τους; αρκεί να αναλογιστεί κανείς το πλήθος των διαφορετικών πολικών ομάδων και των διαφορετικού μήκους ή βαθμού κορεσμού υδρογονανθρακικών αλυσίδων από τις οποίες μπορεί να συντίθενται. Μια ποικιλομορφία που διευρύνεται αναλόγως των πηγών λήψης τους (πχ εργαστηριακή-συνθετική ή ημισυνθετική Παρασκευή ή λήψη με εκχύλιση από βιολογικές κυτταρικές μεμβράνες) (Caplan, 2006; Li, et al., 2015)

Διαφοροποιήσεις στο είδος της πολικής κεφαλής οδηγούν σε διαφορετικές υποομάδες φωσφολιπιδίων όπως για παράδειγμα,

- φωσφατιδυλοχολίνη (phosphatidylcholine-PC),
- φωσφατιδυλ-αιθανολαμίνη (phosphatidylethanolamine-PE),
- φωσφατιδυλσερίνη (phosphatidylserine-PS),
- φωσφατιδικό οξύ (phosphatidic acid -PA),

- φωσφατίδυλινοσιτόλη (phosphatidylinositol-PI),
- φωσφατίδυλγλυκερόλη (phosphatidylglycerol-PG)



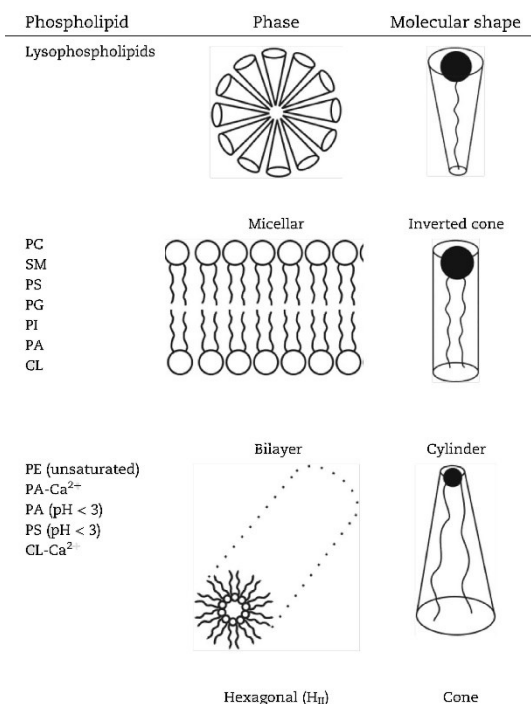
Σχήμα 3.3.1 Διάφορα φωσφολιπίδια που διαφέρουν ως προς τις πολικές τους κεφαλές (Smith & Dea, 2013).

Σε αυτές τις υποομάδες υπάρχουν φωσφολιπίδια με λιπαρές αλυσίδες διαφορετικού μήκους και βαθμού ακορεστότητας. Ενδεικτικά αναφέρονται τα παρακάτω:

- Διπαλμιτόυλο-φωσφατιδυλοχολίνη (DPPC), που περιέχει δύο εστεροποιημένες ομάδες παλμιτικού οξέος (16-C)
- Διμυριστόυλο-φωσφατιδυλοχολίνη (DMPC), με δύο ομάδες μυριστικού οξέος (14-C)
- Διστεαρόυλο-φωσφατιδυλοχολίνη (DSPC), με δύο ομάδες στεατικού οξέος (18-C)
- 1-1-παλμιτοϋλο-2-ολειοϋλο-φωσφατιδυλοχολίνη, με μία ομάδα παλμιτικού και μία ομάδα ολεϊκού οξέος (18-C & 1 δ.δ.)

Τα φωσφολιπίδια ως αμφιπαθή-αμφίφιλα μόρια, και όπως προαναφέρθηκε όταν αναμειχθούν με ένα υδατικό μέσο, εμφανίζουν έντονο πολυμορφισμό. Προστιθέμενα σε νερό σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις σχηματίζουν μία μονοστοιβάδα στην διεπιφάνεια ύδατος αέρα, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ξεκινούν να οργανώνονται σε συσσωματώματα (Hyde, 2001). Για παράδειγμα μπορούν να σχηματίσουν μικύλλια (τα μικύλλια συνήθως αφορούν φωσφολιπίδια με μία μόνο λιπαρή αλυσίδα, τα λεγόμενα λυσοφωσφολιπίδια), διπλοστοιβάδες ή αντίστροφες εξαγωνικές φάσεις (H_{II}), ανάλογα με τη δομή, τα χαρακτηριστικά τους και το δυναμικό τους σχήμα (Σχήμα 3.3.2) (Li, et al., 2015). Γενικά οι

διάφορες μορφολογίες στις οποίες μπορούν να διαμορφωθούν, είναι ουσιαστικά αποτέλεσμα της ισορροπίας των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υδρογονανθρακικών αλυσίδων και μεταξύ των πολικών κεφαλών και του μέσου ενυδάτωσης στην διεπιφάνεια των δύο φάσεων (Smith & Dea, 2013).



Σχήμα 3.3.2 Σχέση της διαμορφωτικής φάσης συγκεκριμένων φωσφολιπιδίων και του δυναμικού μοριακού τους σχήματος.

Γενικά εκτός από τα λυσοφωσφολιπίδια που έχουν την τάση να σχηματίζουν μικύλλια, και την φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη που «προτιμά» την αντίστροφη εξαγωγική διαμόρφωση, τα περισσότερα φωσφολιπίδια διασπειρόμενα σε νερό σχηματίζουν διπλοστοιβάδες.

Η κατανόηση του πολυμορφισμού των φωσφολιπιδίων αποτελεί τη βάση για τη δημιουργία λειτουργικών συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων (Li, et al., 2015).

3.3.1 Παράγοντες που επηρεάζουν τον πολυμορφισμό των φωσφολιπιδίων.

Οι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τον πολυμορφισμό των φωσφολιπιδίων είναι:

- i. Τα χαρακτηριστικά του μορίου τους, όπως το μέγεθος και το φορτίο της πολικών κεφαλών, το μήκος και ο βαθμός ακορεστότητας των λιπαρών αλυσίδων
- ii. Ο βαθμός ενυδάτωσης των πολικών κεφαλών, που μπορεί για παράδειγμα να επηρεασθεί από την ιονική ισχύ του μέσου ενυδάτωσης
- iii. Η θερμοκρασία στην οποία βρίσκεται το σύστημα

- iv. Το pH του μέσου ενυδάτωσης που μπορεί να μεταβάλλει τον βαθμό ιονισμού των πολικών κεφαλών
- v. Η παρουσία άλλων ενεργών ουσιών όπως για παράδειγμα δισθενών ιόντων Ca^{2+} κτλ.

3.3.2 Θερμοκρασία μετάβασης Φάσης Στοιβαδικών Φωσφολιπιδίων

Ως θερμοκρασία μετάβασης φάσης ορίζεται η θερμοκρασία που απαιτείται για να προκληθεί μετάβαση από την φάση γέλης στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση. Η τιμή της μπορεί να διαπιστωθεί με φυσικές μεθόδους κατά την αύξηση της θερμοκρασίας. Η πλέον διαδεδομένη τεχνική για τον προσδιορισμό της είναι όμως η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC).

3.3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μετάβαση φάσης των φωσφολιπιδίων που σχηματίζουν διπλοστοιβάδες.

Η θερμοτροπική συμπεριφορά των φωσφολιπιδίων, κυρίως τα χαρακτηριστικά της κύριας μετάβασης τους στην υγρή κρυσταλλική φάση, καθορίζονται από τις Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γειτονικών λιπιδίων και κατά συνέπεια την διευθέτηση εντός της διπλοστοιβάδας. Παράγοντες που μεταβάλλουν την συμπεριφορά λιπιδίων μπορεί να είναι τόσο εξωγενείς όσο και ενδογενείς.

Οι ενδογενείς παράγοντες ουσιαστικά αναφέρονται στην ίδια την δομή των φωσφολιπιδίων και είναι οι εξής.

- i. Το μήκος των υδρογονανθρακικών αλυσίδων. Γενικά σε αλυσίδες μεγάλου μήκους ευνοούνται οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις σε σχέση τις αλυσίδες μικρότερου μήκους, μετατοπίζοντας την κύρια μετάβαση φάσης σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Λογικό επακόλουθο είναι ότι όταν στο ίδιο μόριο υπάρχουν αλυσίδες διαφορετικού μήκους η θερμοτροπική συμπεριφορά των διπλοστοιβάδων μεταβάλλεται σημαντικά
- ii. Ο βαθμός κορεσμού των αλυσίδων. Ακόρεστοι διπλοί δεσμοί διαταράσσουν τη συνοχή των φωσφολιπιδίων στην κρυσταλλική φάση, και καθιστούν την διπλοστοιβάδα περισσότερο ρευστή. Όσο περισσότεροι ακόρεστοι δεσμοί υπάρχουν στην ακυλική αλυσίδα τόσο χαμηλότερη είναι η θερμοκρασία κύριας μετάβασης. Σημαντική είναι και η επίδραση της φύσης του διπλού δεσμού, αν δηλαδή είναι trans η cis.
- iii. Η φύση της πολικής κεφαλής των φωσφολιπιδίων. Απωστικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ όμοια φορτισμένων γειτονικών κεφαλών μπορεί να προκαλέσει πλευρική διαστολή της διπλοστοιβάδας, οδηγώντας σε υγρή-

κρυσταλλική φάση. Ενώ σημαντική είναι και η επίδραση του «όγκου» που καταλαμβάνει μια πολική κεφαλή καθώς μπορεί να επηρεάσει τον τρόπο με τον οποίο διατάσσονται οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες εντός της διπλοστοιβάδας και κατά συνέπεια τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις.

- iv. Η καθαρότητα. Ιδιαίτερα όταν πρόκειται για φωσφολιπίδια που έχουν ληφθεί από φυσικές πηγές, καθώς αυτά συνήθως πρόκειται για μείγματα με διαφορετικά χαρακτηριστικά. Έλλειψη καθαρότητας οδηγεί σε μη καλά καθορισμένες ευρείες μεταβάσεις που συνεπάγεται δυσκολία στον ακριβή προσδιορισμό της θερμοκρασίας μετάβασης,

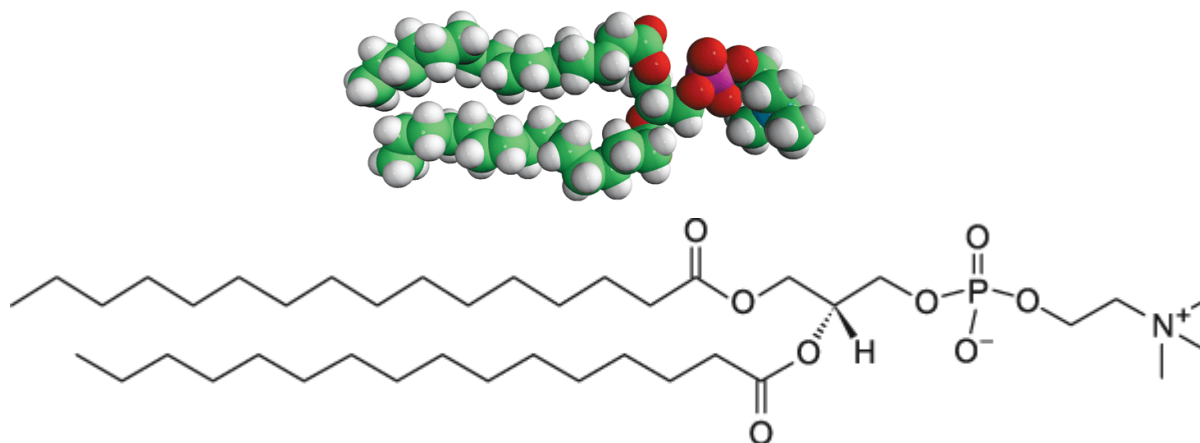
Οι εξωγενείς παράγοντες ουσιαστικά αφορούν το περιβάλλον των φωσφολιπιδίων. Συμπεριλαμβάνουν μεταξύ άλλων :

- i. Τη χημική σύσταση του μέσου διασποράς
 - ii. Το pH του μέσου διασποράς
 - iii. Την ιονική ισχύ του μέσου διασποράς
 - iv. Χημικές ουσίες εντός του μέσου διασποράς που αλληλεπιδρούν με τις διπλοστοιβάδες
 - v. Την ατμοσφαιρική πίεση
- (Huang & Li, 1999)

3.4 Διπαλμιτόυλο-φωσφατιδυλοχολίνη (DPPC)

Η Διπαλμιτόυλο-φωσφατιδυλοχολίνη (DPPC) είναι ένα από τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα φωσφολιπίδια, καθώς αποτελεί ένα απλό σύστημα προσομοίωσης των δομικών ιδιοτήτων των βιολογικών μεμβρανών αλλά ταυτόχρονα αποτελεί βασικό εργαλείο-συστατικό για την ανάπτυξη σειράς καινοτόμων συστημάτων για θεραπευτικούς ή διαγνωστικούς σκοπούς (Li, et al., 2015). Είναι ένα αμφοτερικό (zwitterionic) λιπιδικό μόριο, που ανήκει στην κατηγορία των γλυκεροφωσφολιπιδίων. Αποτελείται από ένα γλυκερολικό σκελετό στον οποίο οι δύο γειτονικές υδροξυλομάδες είναι εστεροποιημένες με δύο μόρια παλμιτικού οξέος ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$). Οι αλκυλικές αλυσίδες του οξέος αποτελούν το υδρόφοβο τμήμα του μορίου. Η πολική κεφαλή του αποτελείται από μια φωσφορυλιωμένη χολίνη που είναι εστεροποιημένη στην τρίτη υδροξυλομάδα της γλυκερόλης. Το μόριο του DPPC είναι λοιπόν ένα αμφίφιλο λιπίδιο με δύο συμμετρικές αλειφατικές αλυσίδες και ως τέτοιο σε περίσσεια ύδατος σχηματίζει αυθόρμητα διπλοστοιβάδες, με το πολικό του τμήμα να διευθετείτε προς την εξωτερική επιφάνεια τις διπλοστοιβάδας και να έρχεται σε επαφή με το

υδατικό μέσο. Αντίθετα τα υδρόφοβα τμήματα στην προσπάθεια στην προσπάθεια τους να μειώσουν την μη ευνοϊκή ενεργειακά επαφή τους με το νερό στρέφονται προς το εσωτερικό όπου και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω δυνάμεων Van der Waals.



Σχήμα 3.4.1 Το μόριο της Διπαλμιτόυλο-φωσφατιδυλοχολίνης (DPPC)

Η θερμοκρασία μετάβασης φάσης για τις διπλοστοιβάδες που σχηματίζονται με την αυτό-συναρμολόγηση μορίων DPPC σε νερό υπό φυσιολογικές συνθήκες έχει βρεθεί ότι είναι περίπου 41°C (avantilipids.com, 2015).

3.5 Αυοτροπικές μεταβάσεις φάσεων σε διπλοστοιβάδες DPPC

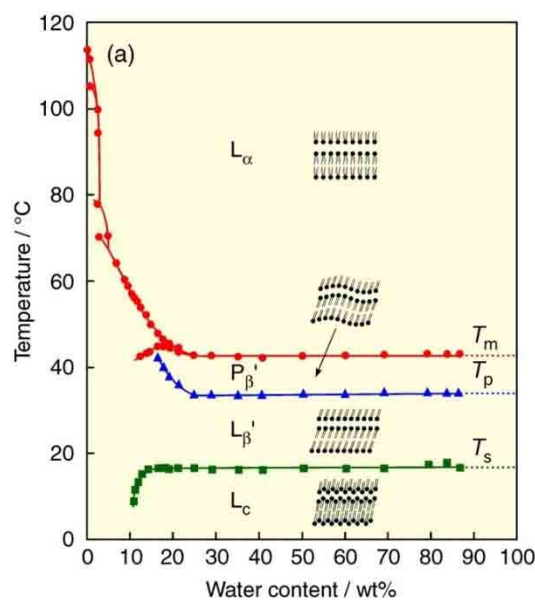
3.5.1 Προσθήκη υδατικού μέσου στην μάζα αφυδατωμένων κρυσταλλικών φωσφολιπιδίων

Απουσία νερού τα φωσφολιπίδια διατάσσονται σε μία στερεή κρυσταλλική μορφή, ένα πολύ καλά οργανωμένο συσσωμάτωμα (aggregate) με πλακοειδείς-στοιβαδικές δομές (lamellar structures). Με την προσθήκη νερού στον στερεό αυτό κρύσταλλο, τα μόρια του νερού ενυδατώνουν τις πολικές ομάδες κεφαλής των λιπιδικών μορίων. Τα μόρια του προστιθέμενου νερού συσσωρεύονται στην ενδιάμεση επιφάνεια μεταξύ των διπλοστοιβάδων με αποτέλεσμα οι στοιβαδικές δομές να διογκώνονται. Δεδομένου ότι υπάρχει ένα όριο όσον αφορά το πάχος της ενδιάμεσης αυτής επιφανείας (πχ. της τάξης των δέκα μορίων για τις φωσφατιδυλοχολίνες (PC) στην φάση γέλης), περίσσεια μορίων νερού αρχίζει σταδιακά και διαχωρίζεται από τις διπλοστοιβάδες. Δημιουργείται έτσι η κύρια μάζα του μέσου στο οποίο είναι διεσπαρμένες η φωσφολιπιδικές δομές. Τα σχηματιζόμενα με την ενυδάτωση

συσσωματώματά είναι κλειστά μικροσώματα (microsomes) με διάμετρο που κυμαίνεται από 20 nm σε έως 1000 nm (η διάμετρος εξαρτάται κυρίως από τη μοριακή δομή των φωσφολιπιδίων και τη μέθοδο παρασκευής που χρησιμοποιείται (O'Mahony, et al., 2011)).

3.5.2 Μετάβαση φάσης και ποσοστό ενυδάτωσης

Οι διπλοστιβάδες των φωσφολιπιδίων υπόκεινται σε λυοτροπικές μεταβάσεις φάσης κατά την ενυδάτωσή τους. Οι λυοτροπικές μεταβάσεις διπλοστιβάδων φωσφατιδυλοχολίνης έχουν ερευνηθεί λεπτομερώς ως συνάρτηση της θερμοκρασίας και του περιεχομένου νερού [18,19]. Ένα διάγραμμα φάσεων διπλοστιβάδων DPPC, θερμοκρασίας/ποσοστού ενυδάτωσης παρουσιάζεται στο **Σχήμα 3.5.1**. Οι διαμορφωτικές καταστάσεις που δημιουργούνται κατά την ενυδάτωσή τους, είναι η ενυδατωμένη κρυσταλλική ή φάση υπογέλης (subgel) (L_c), η φάση γέλης (gel phase) (L_{β}') και υγρή κρυσταλλική φάση (liquid crystalline phase) (L_{α}). Το σημείο τήξης του μη ενυδατωμένου κρυστάλλου του DPPC (περίπου 115°C) μειώνεται δραστικά αυξανόμενης της περιεκτικότητας σε νερό, έως και 10% κατά βάρος. Όταν η ποσότητα νερού υπερβαίνει το 10%, εμφανίζεται εκτός της τήξης μια επιπλέον μετάβαση φάσης σε χαμηλές θερμοκρασίες, που οφείλεται στην ενυδάτωση των πολικών κεφαλών των διπλοστιβάδων.



Σχήμα 3.5.1 Επίδραση της % κ.β. περιεκτικότητας σε νερού, στις θερμοκρασίες μεταβάσεως φάσης των διπλοστιβάδων DPPC. Με πράσινο η υπομετάπτωση, με μπλε η προμετάπτωση και με κόκκινο η κύρια μετάπτωση.

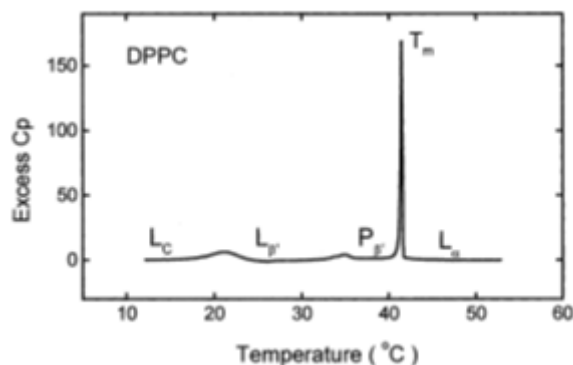
Με περαιτέρω αύξηση του περιεχόμενου νερού πάνω από 15 %, εμφανίζεται μια ακόμα μετάβαση σε θερμοκρασίες ενδιάμεσες των δύο προηγούμενων μεταβάσεων εξαιτίας των διακυμάνσεων της μοριακής διαμόρφωσης της διπλοστοιβάδας. Αυτές οι μεταβάσεις φάσης είναι η υπομετάπτωση, η προμετάπτωση και η κύρια μετάπτωση, που αντιστοιχούν στις μεταβάσεις από την φάση υπογέλης (Lc) στην φάση γέλης (Lβ'), από την γέλης (Lβ') στην ρυτιδωμένη φάση (Pβ') και κατόπιν στην υγρή κρυσταλλική φάση (La) αντίστοιχα. Πρέπει να σημειωθεί ότι η Pβ' φάση είναι ένα χαρακτηριστικό των διπλοστοιβάδων φωσφατιδυλοχολίνης με κορεσμένες υδρόφοβες αλυσίδες.

Όταν η ποσότητα του νερού ξεπερνά το 25%, οι τρεις αυτές μεταβάσεις σταθεροποιούνται σε σχέση με την θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιούνται. Για αυτό τον λόγο διπλοστοιβάδες φωσφατιδυλοχολινών ενυδατωμένες με περίσσεια νερού πέραν του 25% (w/w) θεωρούνται πλήρως ενυδατωμένες (Matsuki, et al., 2013). Αυτός είναι και ο λόγος που στην πειραματική διαδικασία που θα περιγραφεί στα επόμενα κεφάλαια οι διπλοστοιβάδες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πλήρως ενυδατωμένες.

3.6 Θερμοτροπικές μεταβάσεις φάσεων πλήρως ενυδατωμένων διπλοστοιβάδων DPPC

Όταν λιπιδικές διπλοστοιβάδες που έχουν παρασκευασθεί από έναν τύπο φωσφολιπιδίων υποβάλλονται σε θέρμανση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες πίεσης, συχνά υφίστανται πολλαπλές θερμοτροπικές μεταβάσεις. Αυτές οι μεταβάσεις μπορεί να ανιχνευθούν χρησιμοποιώντας ένα ευρύ σύνολο τεχνικών όπως η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC), η περίθλαση ακτινών-X (X-ray diffraction), η Δυναμική Σκέδαση φωτός (DLS), ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR), φασματοσκοπίες φθορισμού ή δόνησης κτλ. Αν και κάθε μία από αυτές τις τεχνικές μπορεί να μας παρέχει πολλές και σημαντικές πληροφορίες, η τεχνική της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) έχει αποδειχθεί ότι είναι η πολυτιμότερη για την κατανόηση των θερμοτροπικών μεταβολών που συνοδεύουν τις μεταβάσεις φάσεως των λιπιδίων (Lewis & McElhane, 2005).

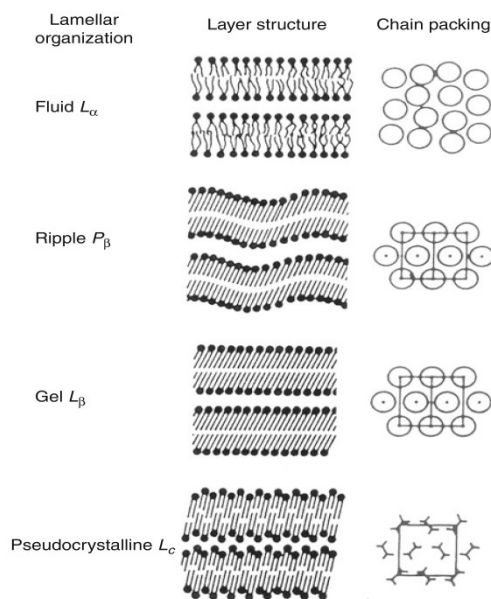
Ένα τυπικό θερμόγραμμα, το οποίο αντιστοιχεί σε μεταβάσεις φάσεων μιας πλήρως ενυδατωμένης διπλοστοιβάδας αποτελούμενης από Διπαλμιτόυλο-φωσφατιδυλοχολίνη (DPPC), απεικονίζεται στο **Σχήμα 3.6.1**. Στην περίπτωση αυτή το δείγμα έχει «επωασθεί» στους 0°C για μεγάλο χρονικό διάστημα (≥ 24 h).



Σχήμα 3.6.1 Τυπικό θερμόγραμμα διπλοστοιβάδων Διπαλμιτόυλο-φωσφατιδυλοχολίνης (DPPC), όπου διακρίνονται τρεις ενδόθερμες κορυφές. Η πρώτη αντιστοιχεί στην Υπομετάπτωση η δεύτερη στην Προμετάπτωση και η τρίτη στην Κύρια μετάπτωση.

Στην πρώτη σάρωση διακρίνονται τρεις ενδόθερμες κορυφές. Η πρώτη μικρής ενθαλπίας μετάβασης κορυφή που παρατηρείται στις χαμηλότερες θερμοκρασίες αντιστοιχεί στην μετάβαση που είναι γνωστή ως υπομετάπτωση (sub-transition). Η δεύτερη επίσης μικρής ενθαλπίας που παρατηρείται στις ενδιάμεσες θερμοκρασίες αντιστοιχεί στην προμετάπτωση (pre-transition), ενώ η υψηλής ενθαλπίας μετάβαση αποτελεί την κύρια μετάπτωση (main transition). Η εμφάνιση των τριών αυτών διακριτών μεταβάσεων καταδεικνύει πως οι πλήρως ενυδατωμένες DPPC διπλοστοιβάδες μπορούν να υφίστανται σε τέσσερις διαφορετικές μεσομορφικές φάσεις, αναλόγως της θερμοκρασίας αλλά και της θερμοιστορίας τους. Οι φάσεις αυτές, που αποτυπώνονται και στο **Σχήμα 3.6.2**, είναι η πλακοειδής-στοιβαδική κρυσταλλική (L_c), η φάση γέλης (L_{β'}), η ρυτιδωμένη φάση (P_{β'}) η υγρή κρυσταλλική φάση (L_α). Μετά από άμεση επανάληψη του κύκλου θέρμανσης η υπομετάπτωση δεν είναι εμφανής ενώ και η προμετάπτωση φαίνεται να πραγματοποιείται σε λίγο χαμηλότερη θερμοκρασία.

Η μόνη μετάπτωση που είναι επαναλήψιμη μετά από επαναλαμβανόμενες θερμικές διεργασίες είναι η κύρια μετάπτωση. Συχνά η κύρια μετάπτωση, και επειδή η προμετάπτωση είναι συγκριτικά πολύ ασθενής, καλείται μετάβαση από την φάση γέλης στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση περιγράφοντας την μετάβαση φάσης από την L_{β'} στην L_α (Huang & Li, 1999).



Σχήμα 3.6.2 Οργάνωση της διπλοστοιβάδας DPPC, στις διάφορες φάσεις. Στην μεσαία στήλη παρουσιάζεται η διαμόρφωση των υδρογονανθρακικών αλυσίδων εντός της διπλοστοιβάδας ενώ στην δεξιά παρουσιάζεται η οργάνωση των φωσφολιπιδίων στην επιφάνεια της (Dzikovski & Freed, 2013).

3.6.1 Υπομετάπτωση $L_c \rightarrow L_{\beta}$

Η πλακοειδής κρυσταλλική φάση (L_c) χαρακτηρίζεται από εκτεταμένες υδρογονανθρακικές αλυσίδες που εμφανίζουν μία ελαφριά κλίση σε σχέση με το επίπεδο της διπλοστοιβάδας. Οι αλυσίδες είναι πολύ «σφικτά» διευθετημένες και η περιστροφή γύρω από τους άξονες τους είναι εξαιρετικά περιορισμένη. Αντίστοιχα οι πολικές κεφαλές περιέχουν πολύ λίγα μόρια ύδατος και οι κινήσεις τους είναι ιδιαίτερα περιορισμένες. Στην φάση αυτή τα λιπίδια είναι διατεταγμένα εντός ενός τρισδιάστατου άκαμπτου πλέγματος υβριδισμένης ορθορομβικής συμμετρίας με τις λιπιδικές αλυσίδες σε all-trans διαμόρφωση.

Με την αύξηση της θερμοκρασίας, η στερικές και οι van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων που ευνοούν την κρυσταλλική διαμόρφωση, των μορίων DPPC, προοδευτικά αντισταθμίζονται μέσω της θερμικά επαγόμενης περιστροφικής τους διέγερσης. Έτσι, στη θερμοκρασία υπομετάπτωσης, η διπλοστοιβάδα μεταπίπτει από την κρυσταλλική φάση (L_c) στην φάση γέλης (L_{β}). Στην φάση αυτή οι εκτεταμένες λιπαρές αλυσίδες που εμφανίζουν και πάλι «all-trans» διαμόρφωση, παρουσιάζουν μία πιο έντονη κλίση σε σχέση με το επίπεδο της διπλοστοιβάδας. Φαίνεται ακόμα πως είναι διατεταγμένες σχεδόν κάθετα μεταξύ τους εντός ενός δισδιάστατου πλέγματος εξαγωνικής σχεδόν συμμετρίας, ενώ

παρουσιάζουν μια σχετικά αργή αλλά λιγότερο περιορισμένη αξονική περιστροφική κινητικότητα. Στην φάση γέλης (L_{β}'), οι πολικές κεφαλές παρουσιάζονται περισσότερο ενυδατωμένες σε σχέση με την πλακοειδή κρυσταλλική φάση (L_c) (ανά μόριο οι πολικές κεφαλές αλληλοεπιδρούν με περίπου 15-18 μόρια ύδατος) ενώ παράλληλα εμφανίζουν μια κάπως περιορισμένη και αργή κινητικότητα. Με την υπομετάπτωση, αυξάνεται ελαφρώς το εμβαδό της εγκάρσιας διατομής της υδρογονανθρακικής περιοχής των διπλοστοιβάδων (αύξηση της τάξης των 0.2 nm^2), και περισσότερο το εμβαδόν της πλευρικής τους επιφάνειας τους (περίπου 0.53 nm^2) κάτι που οδηγεί στην εντονότερη κάμψη των αλυσίδων. Αυτό προκύπτει λόγω της «χαλαρότερης» διεύθεσης των φωσφολιπιδίων και την εντονότερη ενυδάτωση στην φάση γέλης (L_{β}') σε σχέση με την κρυσταλλική φάση (L_c) (Lewis & McElhaney, 2005).

Η υπομετάπτωση είναι ένα φαινόμενο το οποίο χαρακτηρίζεται από πολύ αργή κινητική και προκειμένου να γίνει αντιληπτό απαιτείται εξισορρόπηση της διπλοστοιβάδας για μεγάλο χρονικό διάστημα σε χαμηλές θερμοκρασίες. Έτσι τις περισσότερες φορές δεν καθίσταται εμφανής σε ένα τυπικό θερμογράμμα ιδιαίτερα αν αυτό προέρχεται από επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης-θέρμανσης. Η ύπαρξη της υπομετάπτωσης δηλαδή εξαρτάται και από τη θερμοϊστορία της διπλοστοιβάδας.

Κατά την αντίστροφη πορεία, η διπλοστοιβάδα από τη φάση γέλης L_{β}' δεν μεταπίπτει απευθείας στην πλακοειδή κρυσταλλική φάση L_c , καθώς η μετάβαση αυτή είναι μια αργή κινητική διαδικασία. Συγκεκριμένα σε διπλοστοιβάδες DPPC έχει αποδειχθεί πως η αναστροφή πραγματοποιείται μέσω κάποιων διακριτών σταδίων. Η φάση γέλης L_{β} μεταπίπτει πρώτα στη φάση υπό-υπογέλης (sub-subgel) κατά την οποία οι πλήρως εκτεταμένες λιπιδικές αλυσίδες εμφανίζουν την ίδια επαναλαμβανόμενη περιοδικά απόσταση μεταξύ των διαδοχικών διπλοστοιβάδων όπως ακριβώς στη φάση γέλης L_{β}' . Η μετατροπή αυτή είναι αντιστρεπτή και προφανώς συμβαίνει χωρίς σημαντικές αλλαγές στην κατάσταση ενυδάτωσης της διπλοστοιβάδας. Ο σχηματισμός της σταθερής πλακοειδούς κρυσταλλικής φάσης L_c , προκύπτει με την αφυδάτωση της πολικής επιφάνειας της διπλοστοιβάδας στη φάση υπό-υπογέλης κατά την εξισορρόπηση της σε χαμηλές θερμοκρασίες. Ο χρόνος που απαιτείται για την εξισορρόπηση εξαρτάται από το μήκος των λιπιδικών αλυσίδων (πχ για τις διπλοστοιβάδες DPPC απαιτούνται περισσότερες από 10 μέρες).

Η φάση υπό-υπογέλης αποτελεί λοιπόν ένα ενδιάμεσο στάδιο κατά τον σχηματισμό της L_c φάσης, το οποίο περιλαμβάνει μία ή περισσότερες μετασταθερές καταστάσεις ανάλογα με τη θερμοϊστορία της διπλοστοιβάδας (Ματσίγκου, 2006; Koynovaa & Caffrey, 1998).

3.6.2 Προμετάπτωση $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$

Περεταίρω αύξηση της θερμοκρασίας σε διπλοστοιβάδες DPPC που ισορροπούν στην φάση γέλης $L_{\beta'}$, προκαλεί σημαντική αύξηση των περιστροφικών αξονικών κινήσεων των λιπαρών αλυσίδων και έτσι στην θερμοκρασία προμετάπτωσης πραγματοποιείται η μετάβαση στην ρυτιδωμένη φάση $P_{\beta'}$. Στην φάση αυτή οι εκτεταμένες υδρογονανθρακικές αλυσίδες παρουσιάζουν κλίση σε σχέση με το επίπεδο της διπλοστοιβάδας αλλά διευθετούνται πλέον σε ένα εξαγωνικό πλέγμα, εντός του οποίου εμφανίζουν συμμετρικότητα κατά την περιστροφή τους ελαττώνοντας έτσι την ανισοτροπία της διπλοστοιβάδας.

Η προμετάπτωση προκαλεί μικρή έκταση στην εγκάρσια διατομή των διπλοστοιβάδων. Αντίθετα παρατηρείται σημαντική έκταση του εμβαδού στην διεπιφάνεια της μεμβράνης κυρίως λόγω της εκτόπισης γειτονικών φωσφολιπιδίων κατά μήκος του άξονα των αλυσίδων τους. Η αύξηση των αποστάσεων μεταξύ των πολικών κεφαλών, αν και δεν ενισχύει σημαντικά την ενυδάτωση τους, επιτρέπει την σχεδόν ελεύθερη περιστροφή τους. Σε αντίθεση με τις φάσεις L_C και L_{β} , οι διπλοστοιβάδες δεν είναι πλέον επίπεδες, αλλά εμφανίζουν την χαρακτηριστική μορφολογία των ρυτίδων. Από εκεί άλλωστε προκύπτει και ο χαρακτηρισμός της φάσης αυτής ως ρυτιδωμένη φάση «ripple». Γενικά καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται, εννοείται ιδιαίτερα ο σχηματισμός των “gause” διαμορφομερών στις λιπαρές αλυσίδες, σε σχέση με τις χαμηλότερες θερμοκρασίες κατά τις οποίες η διαμόρφωση τους είναι ως επί το πλείστον “all-trans”. Το γεγονός αυτό απαιτεί ελεύθερο χώρο στο εσωτερικό της διπλοστοιβάδας προκειμένου να καθίσταται εφικτή η περιστροφή των λιπιδικών αλυσίδων προκαλώντας δικαιολογώντας έτσι την κάθετη στο επίπεδο της διπλοστοιβάδας εκτόπιση γειτονικών φωσφολιπιδίων. Η λιπαρές αλυσίδες, λόγω αυτής της εκτόπισης είναι περισσότερο εκτεθειμένες στο υδατικό μέσο. Για να αντισταθμιστεί αυτή η διαταραχή το επίπεδο της διπλοστοιβάδας κάμπτεται οδηγώντας τελικά στο σχηματισμό των χαρακτηριστικών ρυτίδων (Lewis & McElhaney, 2005; Venturolia, et al., 2006).

Υπάρχουν θεωρητικά μοντέλα και μοντέλα μοριακής προσομοίωσης του σχηματισμού της ρυτιδωμένης φάσης που υποστηρίζουν την συνύπαρξη περιοχών στη διπλοστοιβάδα με χαρακτήρα φάσης γέλης και υγρής κρυσταλλικής φάσης. Τα μοντέλα αυτά βασίζονται στην υπόθεση ότι η προμετάπτωση συνδέεται με τη διαδικασία «τήξης» των λιπιδικών αλυσίδων και ο σχηματισμός της μορφολογίας των ρυτίδων οφείλεται στην περιοδικά διαταγμένη συσσώρευση των φωσφολιπιδίων με χαρακτήρα υγρής κρυσταλλικής φάσης μέσα στη μάζα των φωσφολιπιδίων με χαρακτήρα φάσης γέλης. Ο σχηματισμός των ρυτίδων στην επιφάνεια της διπλοστοιβάδας αναφέρεται ως το αποτέλεσμα στερικών και γεωμετρικών/δομικών

περιορισμών που επιβάλλονται στη δομή της διπλοστοιβάδας και η αντίστοιχη εγκάρσια επιφάνεια των φωσφολιπιδίων στις δύο φάσεις διαφέρουν σημαντικά.

Έχει αποδειχθεί πως ο σχηματισμός της ρυτιδωμένη φάση δεν είναι μία τέλεια αντιστρεπτή διαδικασία. Κατά την αντίστροφη πορεία, με ψύξη δηλαδή της διπλοστοιβάδας από την υγρή κρυσταλλική φάση προς τη φάση γέλης, δεν παρατηρείται η ρυτιδωμένη φάση ως ενδιάμεση κατάσταση. Αντ' αυτού εμφανίζεται μια μετασταθερή ρυτιδωμένη φάση P_{β}^{mst} , διαφορετικής θερμοκρασία και ενθαλπικής μεταβολής σε σχέση με την P_{β} , αλλά και με διαφορετική μορφολογία και περιοδικότητα των ρυτίδων. Η κινητική της μετατροπής της μετασταθερής ρυτιδωμένης φάσης P_{β}^{mst} στη συνήθη ρυτιδωμένη φάση P_{β} είναι γενικά αργή, και απαιτούνται συνήθως μερικές ώρες πλήρη αποκατάστασή της (Ματσίγκου, 2006; Κορνοναά & Caffrey, 1998).

Γενικά το φαινόμενο της προμετάπτωσης και ο σχηματισμός της ρυτιδωμένης φάσης P_{β} , παρατηρείται μόνο σε διπλοστοιβάδες που αποτελούνται από φωσφολιπίδια χολίνης (PC) και γλυκερόλης (PG) με κορεσμένες ανθρακικές αλυσίδες και κατ' εξαίρεση σε διπλοστοιβάδες διμέθυλο-αιθανολαμίνης (Ματσίγκου, 2006).

3.6.3 Κύρια μετάπτωση $P_{\beta} \rightarrow L_a$

Όπως αναφέρθηκε, ήδη η αύξηση της θερμοκρασίας ευνοεί τον σχηματισμό των “gauche” διαμορφομερών στις λιπαρές αλυσίδες. Στην θερμοκρασία της κύριας μετάβασης από την P_{β} φάση στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση L_a , ο αριθμός των “gauche” διαμορφομερών είναι αρκετά μεγάλος προκαλώντας ουσιαστικά την τήξη των αλυσίδων. Μελέτες έχουν δείξει ότι στην υγρή κρυσταλλική φάση οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες περιέχουν τέσσερις με πέντε “gauche” δεσμούς ανά αλυσίδα.

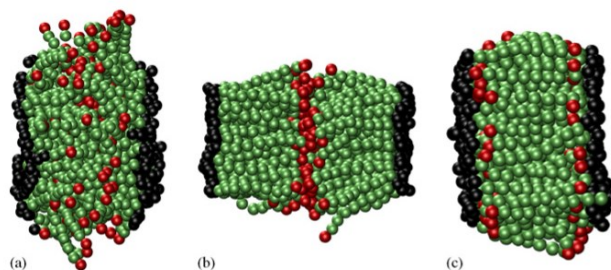
Με τον πολλαπλασιασμό των “gauche” διαμορφομερών και καθώς οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες τήκονται, η εγκάρσια επιφάνεια της διπλοστοιβάδας παρουσιάζει αξιοσημείωτη αύξηση, το μήκος των αλυσίδων μειώνεται δραστικά προκαλώντας λέπτυνση της διπλοστοιβάδας, ενώ παράλληλα σημειώνεται σημαντική έκταση της πλευρικής της επιφάνειας (Lewis & McElhanev, 2005). Η ισομερίωση παρατηρείται κυρίως στα τελικά μεθυλικά άκρα των λιπιδικών αλυσίδων καθώς και στην περιοχή κοντά στη διεπιφάνεια (Ματσίγκου, 2006).

Παρόλο που στη υγρή κρυσταλλική κατάσταση οι λιπαρές αλυσίδες εμφανίζουν πολύ μεγάλη κινητικότητα καθώς κάμπτονται και περιστρέφονται ταχέως, είναι κατά κανόνα κάθετα προσανατολισμένες προς την επιφάνεια της διπλοστοιβάδας και διευθετούνται εντός

ενός χαλαρού εξαγωνικού πλέγματος. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στην φάση αυτή ο «όγκος» που καταλαμβάνουν οι δύο υδρογονανθρακικές αλυσίδες ανά μόριο φωσφολιπιδίου είναι σχεδόν ίδιος με τον όγκο των πολικών κεφαλών. Τέλος αύξηση της εγκάρσιας διατομής ανά μόριο λιπιδίου, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαθέσιμης επιφάνειας ανά πολική κεφαλή, και κατά συνέπεια την έντονη ενυδάτωση και κινητικότητα τους. Ο μεγαλύτερος βαθμός ενυδάτωσης είναι πιθανό να οφείλεται στην αυξημένη έκθεση προς το υδατικό μέσο, τμημάτων των πολικών κεφαλών που εντοπίζονται πιο κοντά στο εσωτερικό της διπλοστοιβάδας όπως για παράδειγμα τα καρβονυλικά οξυγόνα των λιπαρών αλυσίδων.

Η κύρια μετάβαση φάσης χαρακτηρίζεται από υψηλή συνεργασιμότητα και είναι ένα έντονα ενδόθερμο φαινόμενο. Η μεταβολή της ενθαλπίας είναι ουσιαστικά η ενέργεια που δαπανάται για το σύνολο των gauche ισομερειώσεων, αλλά επίσης και για την «υπερνίκηση» των δυνάμεων Van der Waals μεταξύ των γειτονικών ακυλικών αλυσίδων και των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πολικών κεφαλών, καθώς η πλευρική επιφάνεια των διπλοστοιβάδων διαστέλλεται. Θερμοδυναμικά η υγρή κρυσταλλική φάση χαρακτηρίζεται από σημαντική αύξηση στην εντροπία του συστήματος ενώ διαμορφωτικά από την απότομη αύξηση της ενδομοριακής αταξίας των λιπιδικών αλυσίδων (Lewis & McElhane, 2005).

3.6.4 Το Φαινόμενο Ενδοεισχώρησης. Μετάβαση $L_{\beta 1} \rightarrow L_{\alpha}$



Σχήμα 3.6.3 Μοριακή προσομοίωση διπλοστοιβάδων: (a) υγρή κρυσταλλική φάση, (b) φάση γέλης (c) φάση γέλης ενδοεισχώρησης. (Venturoli, et al., 2006)

Στην «προσπάθεια» των λιπιδίων να οργανωθούν εντός ενός υδατικού μέσου με τον ενεργειακά ευνοϊκότερο τρόπο (χαμηλότερη ολική ενέργεια), υπάρχει η τάση να μεγιστοποιούνται οι van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υδρογονανθρακικών αλυσίδων, να περιορίζεται στο ελάχιστο ο αριθμός των gauche διαμορφομερών αλλά και των κενών που μπορούν να δημιουργηθούν μεταξύ των αλυσίδων στο εσωτερικό διπλοστοιβάδας.

Στην λογική τη ελάχιστης ολικής ενέργειας, η περιοχή που ορίζεται μεταξύ των πολικών κεφαλών και της διεπιφάνειας πρέπει να προσεγγίζει την περιοχή που ορίζουν οι λιπιδικές αλυσίδες. Η συνήθης γεωμετρία που συναντάται στις διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων με συμμετρικές κορεσμένες λιπιδικές αλυσίδες πληροί τις παραπάνω προϋποθέσεις (Slater & Huang, 1988).

Παράγοντες που διαταράσσουν την γεωμετρία της διπλοστοιβάδας επεμβαίνοντας στη διευθέτηση των φωσφολιπιδίων έχει αποδειχθεί πως μπορεί να προκαλέσουν διαμορφωτικές αλλαγές στην διπλοστοιβάδα επάγοντας την εμφάνιση νέων φάσεων όπως αυτή της ενδοεισχώρησης. Η αλληλεπίδραση της διπλοστοιβάδας με βιοδραστικά, αμφίφιλα κυρίως μόρια όπως για παράδειγμα η αιθανόλη, η εφαρμογή συνθηκών υψηλής υδροστατικής πίεσης, ακόμα και οι μεταβολές του pH και της ιονικής ισχύος, είναι παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν την εμφάνιση μίας φάσης ενδοεισχώρησης σε διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων που δεν διαθέτουν αυθόρμητα την τάση αυτή (Smith & Dea, 2013).

Η διατάραξη της γεωμετρίας της διπλοστοιβάδας που μπορεί να οδηγήσει σε φάση ενδοεισχώρησης αφορά κυρίως στον σχηματισμό μη ευνοϊκών ενεργειακά κενών μεταξύ των λιπιδικών αλυσίδων και στην έκταση της πλάγιας επιφάνειας της μεμβράνης, διαμορφώσεις που κατά κανόνα οδηγούν σε αύξηση της ενέργειας του συστήματος. Κατά συνέπεια, η διπλοστοιβάδα επιβάλλεται να τροποποιήσει την οργάνωσή της προκειμένου να ελαχιστοποιήσει την ολική ενέργεια του συστήματος. Οι λιπιδικές αλυσίδες της κάθε μονοστοιβάδας δύναται είτε να καμφθούν είτε να εισχωρήσουν μεταξύ των λιπιδικών αλυσίδων της απέναντι μονοστοιβάδας σχηματίζοντας τη φάση ενδοεισχώρησης $L_{\beta 1}$. Η φάση αυτή θεωρείται η πλέον σταθερή γιατί έχει τη χαμηλότερη ενέργεια (Smith & Dea, 2013). Το φαινόμενο της ενδοεισχώρησης σε διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων προϋποθέτει ότι οι λιπιδικές αλυσίδες είναι κορεσμένες, σε all-trans διαμόρφωση. Φωσφολιπίδια με λιπιδικές αλυσίδες που περιέχουν cis ακόρεστους δεσμούς δεν σχηματίζουν τη φάση ενδοεισχώρησης.

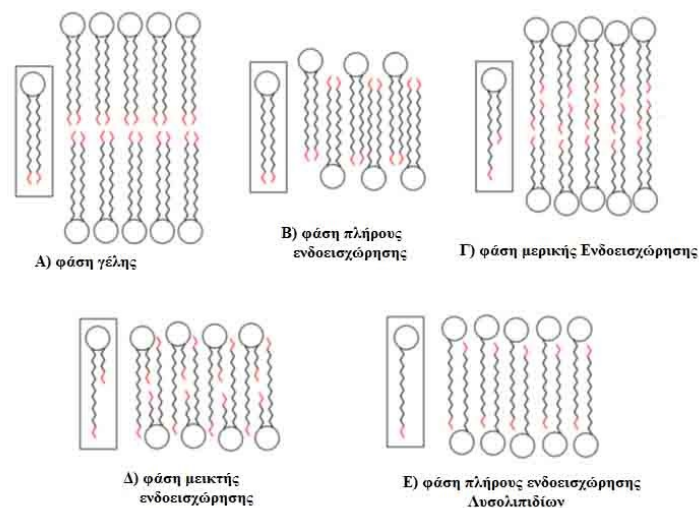
Έχει δειχθεί επίσης ότι η πλήρης ενδοεισχώρηση λιπιδικών αλυσίδων εξαλείφει τη ρυτιδωμένη φάση $P_{\beta'}$ και η διπλοστοιβάδα μεταβαίνει με την αύξηση της θερμοκρασίας απευθείας από τη φάση ενδοεισχώρησης $L_{\beta 1}$ στην υγρή κρυσταλλική φάση L_a . Αυτό συμβαίνει καθώς η απόσταση των πολικών άκρων σε μία φάση ενδοεισχώρησης αυξάνεται με την παρεμβολή των λιπιδικών αλυσίδων της απέναντι μονοστοιβάδας, όπως και η εγκάρσια επιφάνεια των λιπιδικών αλυσίδων. Ελαττώνεται έτσι η δυσαναλογία μεταξύ της διεπιφάνειας και της περιοχής των λιπαρών αλυσίδων, που είναι και η αιτία της εμφάνισης της ρυτιδωμένης φάσης (Ματσίγκου, 2006).

Σε ένα θερμογράμμα διπλοστοιβάδων φωσφολιπιδίων, τα χαρακτηριστικά που υποδεικνύουν την επαγόμενη (εξαιτίας της αλληλεπίδρασης με ένα χημικό παράγοντα) ανάπτυξη μίας φάσης ενδοεισχώρησης είναι:

- Η διφασική συμπεριφορά της μετάβασης, που χαρακτηρίζεται από μία μικρή μείωση της θερμοκρασίας μετάβασης T_m σε χαμηλές συγκέντρωσης του αντίστοιχου παράγοντα, και από μικρή αύξηση ή σταθεροποίηση της σε μεγαλύτερες, μεταβολές που συνοδεύονται από παράλληλη αύξηση της ενθαλπίας μετάβασης
- Η αυξημένη υστέρηση της θερμοκρασίας μετάβασης κατά τον κύκλο ψύξης,
- Και η εξαφάνιση της κορυφής προμετάπτωσης.

Εκτός από την επαγόμενη ενδοεισχώρηση υπάρχουν και λιπίδια, τα οποία αυτό-οργανώνονται στην φάση ενδοεισχώρησης όταν είναι πλήρως ενυδατωμένα και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες πίεσης. Ως παράδειγμα θα μπορούσαν να αναφερθούν κάποια κατιονικά λιπίδια με μονοφθοριομένες ακυλικές αλυσίδες.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι ενδοεισχώρησης, όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 3.6.4**. Συνοπτικά αναφέρονται η πλήρης, η μερική και η μεικτού τύπου ενδοεισχώρηση. Το ποιος τύπος προκύπτει κάθε φορά εξαρτάται κυρίως από τη δομή και την συμμετρία των υδρογονανθρακικών αλυσίδων των φωσφολιπιδίων.



Σχήμα 3.6.4 Διάφορες φάσεις ενδοεισχώρησης που μπορούν να αναπτυχθούν. (Smith & Dea, 2013).

Το κατά πόσον είναι δυνατό ή όχι συγκεκριμένα λιπίδια να βρίσκονται αυθόρμητα στη φάση ενδοεισχώρησης εξαρτάται από την ισορροπία των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των

λιπιδικών αλυσίδων, μεταξύ των πολικών κεφαλών και μεταξύ της διεπιφανειακής περιοχής της διπλοστοιβάδας με την υδατική φάση.

Οι δομικές διαφορές μεταξύ μίας φάσης ενδοεισχώρησης και μίας διαφορετικής φάσης είναι ουσιώδεις. Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 3.6.4**, σε μια διπλοστοιβάδα που δεν παρουσιάζει ενδοεισχώρηση και τα δύο άκρα των υδρογονανθρακικών αλυσίδων συναντώνται στο μέσο επίπεδο της μεμβράνης δημιουργώντας δύο καλά καθορισμένες περιοχές, που ορίζουν μία μεσεπιφάνεια. Σε αυτήν την περίπτωση το πάχος της διπλοστοιβάδας είναι αυξημένο. Οι διπλοστοιβάδες που εμφανίζουν πλήρη ενδοεισχώρηση είναι αρκετά πιο λεπτές (**Σχήμα 3.6.4**) και έχουν απωλέσει την μεσεπιφάνεια (midplane). Η απόσταση μεταξύ των πολικών κεφαλών των λιπιδίων αυξάνεται σημαντικά ενώ τα τελικά άκρα των λιπαρών αλυσίδων είναι πιο εκτεθειμένα στο υδατικό μέσο. Φάση μερικής ενδοεισχώρησης, εμφανίζεται κυρίως σε λιπίδια με ασύμμετρες υδρογονανθρακικές αλυσίδες. Σε αυτή η μακρύτερη αλυσίδα εκτείνεται ως την άλλη πλευρά της μεμβράνης όπου και αλληλοεπιδρά με την αντίστοιχη βραχύτερη αλυσίδα του απέναντι φωσφολιπιδίου, καλύπτοντας έτσι το θερμοδυναμικά μη ευνοούμενο κενό που θα πρόκυπτε (**Σχήμα 3.6.4**).

Κατά τη μεικτή ενδοεισχώρηση οι βραχύτερες αλυσίδες των λιπιδίων ευθυγραμμίζονται μεταξύ τους, ενώ οι μακρύτερες εκτείνονται ως την άλλη πλευρά της διπλοστοιβάδας και εκτιθέμενες στο υδατικό μέσο (Smith & Dea, 2013).

4 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΘΕΡΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Σύμφωνα με τον ορισμό που προτάθηκε από τον ICTAC (International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry) η θερμική Ανάλυση (Thermal Analysis, TA) περιλαμβάνει μια μεγάλη ποικιλία τεχνικών, στις οποίες παρακολουθείται μία ιδιότητα του υπό μελέτη δείγματος σε συνάρτηση με τον χρόνο ή τη θερμοκρασία, ενώ το δείγμα υποβάλλεται σε μια καθορισμένη θερμική διεργασία, σε καθορισμένο περιβάλλον.

Με την τεχνική αυτή μπορούν να προσδιοριστούν μεταβολές σε μεγέθη όπως η ενθαλπία, η θερμοχωρητικότητα, ο συντελεστής θερμικής διαστολής, η μάζα, το μέτρο ελαστικότητας, οι οπτικές και ακουστικές ιδιότητες ενός υλικού στη στερεά ή την υγρή φάση. Ειδικότερα στη στερεά κατάσταση με τη μέθοδο της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σαρώσεως εξετάζονται οι μεταβολές φάσεων, η κρυστάλλωση, το σημείο υαλώδους μετάπτωσης κ.ά.

Τα μετρούμενα μεγέθη καταγράφονται σε συνάρτηση με το χρόνο ή τη θερμοκρασία, η οποία προγραμματίζεται σε συγκεκριμένες συνθήκες πίεσης. Το πρόγραμμα μπορεί να περιλαμβάνει θέρμανση ή ψύξη του εξεταζόμενου υλικού με συγκεκριμένο ρυθμό μεταβολής της θερμοκρασίας ή με σταθερή θερμοκρασία ή ακόμα και συνδυασμό αυτών. Κατά τη διαδικασία αυτή, η δομή και η χημική σύσταση του σώματος υφίστανται αλλαγές φάσης όπως η τήξη, η κρυστάλλωση, η οξειδωση και η αποσύνθεση.

4.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της Θερμικής Ανάλυσης έναντι άλλων τεχνικών

Έναντι άλλων τεχνικών ανάλυσης, οι τεχνικές θερμικής ανάλυσης χαρακτηρίζονται από τα εξής γνωρίσματα και πλεονεκτήματα:

- i. Είναι σχετικά απλές ως προς τις πειραματικές διατάξεις που χρησιμοποιούν και τις μεθόδους ανάλυσης των πειραματικών δεδομένων
- ii. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ευρεία περιοχή θερμοκρασιών και με διάφορα προγράμματα μεταβολής της θερμοκρασίας (θέρμανση – ψύξη, μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία μέσω καθορισμένου προγράμματος)
- iii. Δεν υπάρχει περιορισμός ως προς τη φυσική μορφή του δείγματος, ενώ η προετοιμασία του είναι συνήθως απλή
- iv. Δεν απαιτείται μεγάλη ποσότητα δείγματος (~ 0.1-10 mg)
- v. Η ατμόσφαιρα των μετρήσεων επιλέγεται και μπορεί να μεταβληθεί εύκολα.

- vi. Ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση μίας μέτρησης εξαρτάται από το πρόγραμμα μεταβολής της θερμοκρασίας και ποικίλλει από μερικά λεπτά έως αρκετές ώρες.

Το βασικό μειονέκτημα αυτών των τεχνικών είναι ότι οι πληροφορίες που προκύπτουν από την ανάλυση των μετρήσεων αφορούν μακροσκοπικά μεγέθη, σε αντιδιαστολή με άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές, από τις οποίες προκύπτουν πληροφορίες σε μοριακό επίπεδο. Επίσης οι πληροφορίες αυτές δεν αναφέρονται σε κατάσταση θερμοδυναμικής ισορροπίας. Ένα δεύτερο μειονέκτημα είναι ότι αποτελούν μη εκλεκτικές τεχνικές ανάλυσης και σε ποσοτικές μετρήσεις εμφανίζουν χαμηλή ευαισθησία και ακρίβεια.

4.2 Κατηγορίες Θερμικής Ανάλυσης

Ανάλογα με την ιδιότητα που μετράται κατά τη θερμική διεργασία, υπάρχουν διάφορα είδη θερμικής ανάλυσης. Ενδεικτικά αναφέρονται οι εξής τεχνικές:

- a) DTA (Differential Thermal Analysis) – Διαφορική Θερμική Ανάλυση. Με την τεχνική αυτή μετράται η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ του προς μέτρηση δείγματος και του δείγματος αναφοράς σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία και συνεπώς επιτρέπεται η παρακολούθηση των μεταβολών στη θερμοχωρητικότητα του υλικού. Η DTA μέθοδος επιτρέπει τη μελέτη των μεταβολών αυτών για όλες τις κατηγορίες υλικών
- b) DSC (Differential Scanning Calorimetry) – Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης. Με τη μέθοδο αυτή εκτιμώνται ποσοτικά οι μεταβολές της ενθαλπίας του δείγματος σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία ή το χρόνο
- c) TGA (Thermogravimetric Analysis) – Θερμοσταθμική Ανάλυση. Με τη μέθοδο αυτή καταγράφεται η μεταβολή της μάζας ενός υλικού σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία ή το χρόνο
- d) TMA (Thermomechanical Analysis) – Θερμομηχανική Ανάλυση. Με τη μέθοδο αυτή καταγράφεται η μεταβολή των μηχανικών ιδιοτήτων των υλικών με τη μεταβολή θερμοκρασίας χωρίς την εφαρμογή μηχανικής τάσης. Αντίστοιχα υπάρχει και η μέθοδος DMTA (Dynamic Mechanical Thermal Analysis) – Δυναμική Θερμική Μηχανική Ανάλυση, η οποία καταγράφει τις ίδιες μεταβολές με την επίδραση μηχανικής τάσης (Brown, 2001; Demetzos , 2008; Γαρδίκης & Δεμέτζος , 2005).

Η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης, που είναι η βασική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, συχνά προτιμάται έναντι των άλλων μεθόδων καθώς μπορεί να μας παρέχει γρήγορα, εύκολα και με ακρίβεια λεπτομερείς πληροφορίες που αφορούν ενεργειακές και φυσικές ιδιότητες διαφόρων ουσιών.

4.3 Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry-DSC)

Η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry-DSC) αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη πειραματική τεχνική θερμικής ανάλυσης, η οποία χρησιμοποιείται για τη μελέτη μεταβάσεων σε ένα ευρύ φάσμα υλικών όπως κεραμικά, πολυμερή υγροκρυσταλλικά υλικά και συστήματα όπως οι λιπιδικές διπλοστιβάδες. Με τη μέθοδο αυτή γίνεται ο προσδιορισμός των κυριότερων θερμοδυναμικών παραμέτρων που συνοδεύουν την αντίστοιχη μετάβαση.

Μετάβαση φάσης ενός υλικού είναι μια φυσικοχημική διεργασία, η οποία προϋποθέτει ανταλλαγή θερμότητας μεταξύ του υλικού και του περιβάλλοντός του και μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ένα υλικό που υποβάλλεται σε θέρμανση ή ψύξη. Αν κατά τη μετάβαση φάσης το υλικό λαμβάνει θερμότητα από το περιβάλλον, η διεργασία χαρακτηρίζεται ενδόθερμη, ενώ αν αποδίδει θερμότητα προς το περιβάλλον τότε η διεργασία είναι εξώθερμη.

Παραδείγματα μεταβάσεων φάσης που μελετώνται με τη Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης είναι η τήξη, η πήξη, η κρυστάλλωση ενός υλικού ή ακόμη και πιο δυσδιάκριτες μεταβολές, όπως η υαλώδης μετάπτωση ενός πολυμερούς ή η μεταβάσεις μιας λιπιδικής διπλοστιβάδας.

4.4 Αρχή Λειτουργίας

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στη μέτρηση της ροής ενέργειας η οποία μεταφέρεται ή απελευθερώνεται από ένα υλικό σε σχέση με ένα δείγμα αναφοράς, ώστε και τα δύο να διατηρηθούν στην ίδια θερμοκρασία, καθώς υπόκεινται σε ελεγχόμενο πρόγραμμα θέρμανσης ή/και ψύξης, υπό σταθερές συνθήκες πίεσης που δημιουργείται από αδρανές αέριο (Klančnik, et al., 2010). Στο **Σχήμα 4.4.1** αναπαρίσταται ένα Διαφορικό Θερμιδόμετρο Σάρωσης. Αποτελείται από ένα σύστημα ελέγχου θερμοκρασίας με θερμαντές, το οποίο

αυξάνει ή ελαττώνει τη θερμοκρασία του προς εξέταση δείγματος και του δείγματος αναφοράς, σύμφωνα με το θερμικό πρόγραμμα που ορίζεται κάθε φορά από τον εκάστοτε αναλυτή .

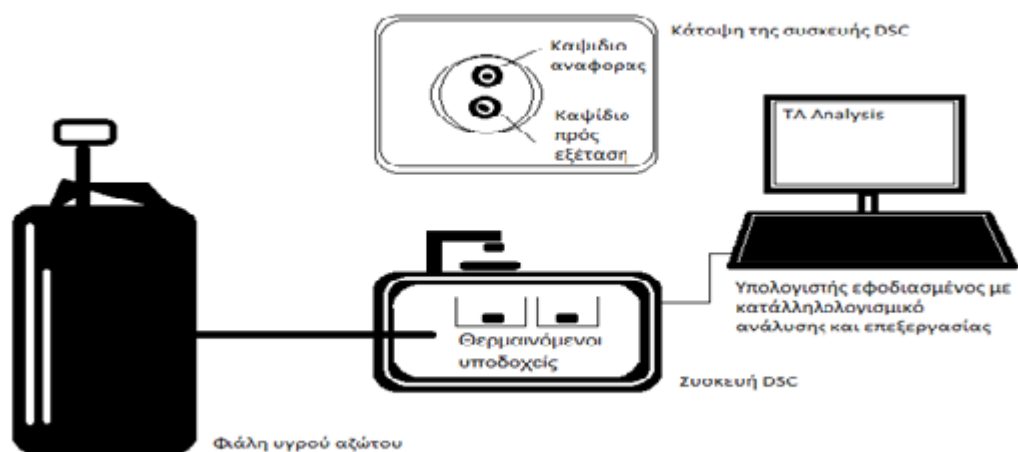
Η θέρμανση ή ψύξη γίνεται με σταθερό, όμοιο και προκαθορισμένο τρόπο, μέσω πηγής θέρμανσης ή ψύξης. Το σύστημα ελέγχου αποτελείται από δύο βρόχους ελέγχου, οι οποίοι λειτουργούν με τέτοιο τρόπο ώστε η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ του υπό μελέτη δείγματος και του δείγματος αναφοράς να διατηρείται σταθερή και ίση με μηδέν. Το μέσο ποσοστό θέρμανσης των δύο δειγμάτων ελέγχεται από τον ένα βρόγχο, ενώ μέσω του δεύτερου εξαλείφεται, οποιαδήποτε διαφορά θερμοκρασίας (ΔT) προκύπτει λόγω θερμοδυναμικής μεταβολής που υφίσταται το εξεταζόμενο υλικό. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι στην περίπτωση ενός θερμικού φαινομένου το σύστημα ευαισθητοποιείται και παρέχει μεγαλύτερη ή μικρότερη θερμότητα στο υπό μελέτη δείγμα προκειμένου να διατηρηθεί η θερμοκρασία του ίση με την αντίστοιχη του δείγματος αναφοράς.

Η ροή ενέργειας (heat flow) που μεταφέρεται ή απελευθερώνεται από το υλικό, μετράται από το θερμιδόμετρο και υπολογίζεται η διαφορική θερμότητα (differential heat) σε συνάρτηση με την θερμοκρασία. Η διαφορά στην ενέργεια που παρέχεται σε ένα σύστημα υπό την μορφή θερμότητας στην μονάδα του χρόνου (dQ/dt) είναι ανάλογη προς τη στιγμιαία συγκεκριμένη θερμοχωρητικότητα του δείγματος προς ανάλυση C_p (υπό σταθερή πίεση) και με την επιλογή πρότυπου (δείγματος αναφοράς), το οποίο έχει σαφώς καθορισμένη θερμοχωρητικότητα στην περιοχή της θερμοκρασιακής σάρωσης, είναι δυνατό να ληφθούν τα ακριβή στοιχεία θερμοχωρητικότητας για ένα άγνωστο δείγμα.

Κατά τη διάρκεια της θερμιδομέτρησης, το περιβάλλον των δειγμάτων είναι αδρανές. Αυτό επιτυγχάνεται με την σταθερή ροή ξηρού αερίου N_2 . Τέλος υπάρχει υπολογιστής που καταγράφει τη θερμοκρασία (Θερμόγραμμα) και ρυθμίζει τη ροή της θερμότητας και ένα σύστημα ελέγχου (Γαρδίκης & Δεμέτζος , 2005; Ματσίγκου, 2006).

Τέλος πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν δύο τύποι συσκευών διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης:

- i. DSC δυναμικής αντιστάθμισης (power – compensation) ,στον οποίο υπάρχουν δύο διαφορετικοί αλλά ίδιοι φούρνοι, που θερμαίνουν το άγνωστο δείγμα και το δείγμα αναφοράς
- ii. DSC θερμικής ροής (heat-flux), στον οποίο το άγνωστο δείγμα και το δείγμα αναφοράς θερμαίνονται, μέσω μιας μικρής αντίστασης, στον ίδιο φούρνο.



Σχήμα 4.4.1 Πειραματική Διάταξη Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC).

4.5 Γραφήματα DSC

Το αποτέλεσμα ενός πειράματος Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) είναι μια καμπύλη θέρμανσης ή ψύξης, στην οποία καταγράφεται η διαφορική θερμότητα ως προς την θερμοκρασία κατά την πραγματοποίηση ενός θερμικού φαινομένου (**Σχήμα 4.5.1**). Η καμπύλη αυτή αποτελεί το θερμόγραμμα του υπό μελέτη δείγματος. Στην περίπτωση που στο δείγμα δεν υφίσταται κάποιο θερμικό γεγονός ο καταγραφέας καταγράφει μία σταθερή ευθεία γραμμή βάσης. Όταν όμως συντελεστεί κάποιο θερμικό γεγονός, τότε προκύπτει μία καμπύλη που αναλόγως αν το φαινόμενο είναι ενδόθερμο ή εξώθερμο έχει τα κοίλα στραμμένα είτε προς τα πάνω είτε προς τα κάτω. Ο προσανατολισμός των κοίλων εξαρτάται τόσο από το όργανο όσο και από το είδος του λογισμικού που χρησιμοποιείται κατά την θερμιδομετρία.

Στον άξονα των τετμημένων παριστάνεται η θερμοκρασία T ενώ στον άξονα των τεταγμένων παριστάνεται η διαφορά ισχύος dQ/dt ανάμεσα στους δύο χώρους· δείγματος και αναφοράς. Επειδή ο χρόνος συνδέεται με τη θερμοκρασία μέσω του προκαθορισμένου ρυθμού μεταβολής θερμοκρασίας με το χρόνο, ο όρος dQ/dt ισοδυναμεί με τον όρο dQ/dT ο οποίος είναι ανάλογος της θερμοχωρητικότητας. Έτσι, τελικά, παρατηρούνται μεταβολές στη θερμοχωρητικότητα της ουσίας.

Από την καμπύλη DSC είναι δυνατό να υπολογιστούν μια σειρά παραμέτρων χρήσιμων για την περαιτέρω διερεύνηση-χαρακτηρισμό του υπό μελέτη υλικού:

- i. Η Ενθαλπία μετάβασης (ΔH), που υπολογίζεται με την ολοκλήρωση της κορυφής που αντιστοιχεί σε μια δεδομένη μετάβαση. Η Ενθαλπία μετάβασης από μία φάση σε μία άλλη αποτελεί το ποσό της ενέργειας που μεταφέρεται ως θερμότητα υπό σταθερή πίεση και συνδέεται με την θερμοχωρητικότητα του συστήματος (C_p), ενώ εκφράζεται συνήθως σε Kcal/mol, σε J/gr ή σε J/mol. Γενικά η μεταβολή της ενθαλπίας κατά την μεταβολή της θερμοκρασίας από T_0 σε T_1 ορίζεται ως:

$$\Delta H = \int_{T_0}^{T_1} C_p dT$$

- ii. Η Θερμοκρασία μετάβασης φάσης T_m , που είναι η θερμοκρασία στην οποία η ειδική θερμοχωρητικότητα C_p έχει τη μέγιστη τιμή της. Για μία συμμετρική καμπύλη η T_m αντιπροσωπεύει τη θερμοκρασία στην οποία η μετάβαση (π.χ. από μία φάση γέλης στην υγρή-κρυσταλλική φάση) έχει κατά το ήμισυ ολοκληρωθεί και ότι το σύστημα απαντάται ως μείγμα δύο ισοδύναμων καταστάσεων. Σε αυτήν την περίπτωση η ελεύθερη ενέργεια Gibbs του συστήματος λαμβάνει μηδενική τιμή και από την εξίσωση

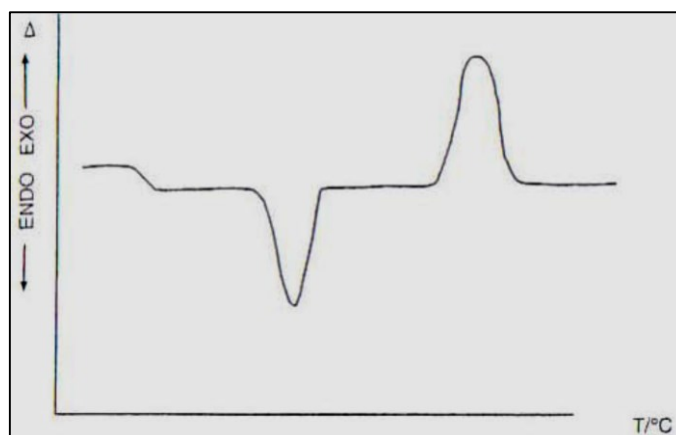
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S,$$

όπου ΔH είναι η μεταβολή της ενθαλπίας, και ΔS η μεταβολή στην εντροπία αντίστοιχα, μπορούμε να υπολογίσουμε την T_m .

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S}$$

Ωστόσο, σε καμπύλες οι οποίες χαρακτηρίζονται από ασυμμετρία, η θερμοκρασία T_m δεν αντιστοιχεί στο μέσο σημείο της μετάβασης φάσης, αλλά αντί αυτού χρησιμοποιείται ο όρος $T_{1/2}$, ο οποίος αποτελεί την πραγματική θερμοκρασία στην οποία το φαινόμενο έχει ολοκληρωθεί κατά το ήμισυ

- iii. Η Θερμοκρασία στην οποία αρχίζει ο θερμικός μετασχηματισμός (T_{onset}). Ουσιαστικά πρόκειται για τη θερμοκρασία στην οποία η προέκταση της ευθείας γραμμής βάσης τέμνεται με την προέκταση της ευθείας από την κορυφή της καμπύλης η οποία αντιστοιχεί στο T_m προς τη γραμμική βάση.
- iv. Το εύρος θερμοκρασίας που αντιστοιχεί στο ήμισυ του ύψους της καμπύλης ($\Delta T_{1/2}$), το οποίο σχετίζεται με την καθαρότητα του συστήματος καθώς και τη φύση της συνεργασιμότητας της μετάβασης.



Σχήμα 4.5.1 Τυπική καμπύλη Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης . Η «ενδόθερμη» κορυφή κατευθύνεται προς τα κάτω. Το Δ συμβολίζει το διαφορικό σήμα για την ισχύ.

4.6 Παράγοντες που επηρεάζουν τα αποτελέσματα της Θερμικής Ανάλυσης

Τα αποτελέσματα μίας θερμικής ανάλυσης είναι άμεσα εξαρτώμενα από τις συνθήκες κάτω από τις οποίες γίνονται τα πειράματα. Το σήμα που παράγεται από τον αισθητήρα εξαρτάται από το ποσοστό μετατροπής και το ρυθμό με τον οποίο συμβαίνει η αντίδραση ή το ρυθμό με τον οποίο μεταβάλλεται η υπό μελέτη ιδιότητα. Η μεταφορά θερμότητας με οποιονδήποτε τρόπο εντός των θαλάμων που βρίσκονται το δείγμα και η αναφορά επηρεάζει αυτές τις μεταβολές. Είναι, λοιπόν, πολύ σημαντικό στα πειράματα θερμικής ανάλυσης και άρα και κατά την Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης να προσδιορίζονται οι ακριβείς συνθήκες κάτω από τις οποίες αυτά πραγματοποιούνται. Συγκρίσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων πρέπει να γίνονται μόνον όταν τα διαγράμματά τους έχουν ληφθεί κάτω από τις ίδιες συνθήκες ή όταν είναι γνωστές οι διαφοροποιήσεις στις συνθήκες αυτές. Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν ένα πείραμα θερμικής ανάλυσης και θα πρέπει να προσδιορίζονται είναι οι εξής:

- i. Το δείγμα
- ii. Ο δειγματοφορέας
- iii. Ο ρυθμός θέρμανσης
- iv. Η ατμόσφαιρα του πειράματος
- v. Η μάζα του δείγματος.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

Πρωταρχικός στόχος της παρούσας εργασίας είναι η εκτίμηση των μεταβολών που δύναται να επιφέρει η εισαγωγή ενός συμπολυμερούς δύο συστάδων του τύπου PNIPAM-b-PAA [Poly(N-isopropylacrylamide)-block-poly(acrylic acid)] στις θερμοτροπικές ιδιότητες διπλοστοιβάδων DPPC. Σε μία προσπάθεια να ερμηνευθεί η επίδραση της κάθε συστάδας ξεχωριστά χρησιμοποιήθηκαν δύο μορφές του PNIPAM-b-PAA που διέφεραν ως προς την αναλογία μεταξύ των δυο δομικών τους τμημάτων και ως προς το μοριακό τους βάρος.

Για τον σκοπό παρασκευάστηκαν πλήρως ενυδατωμένες φωσφολιπιδικές διπλοστοιβάδες παρουσία διαφορετικών ποσοτήτων από το κάθε συμπολυμερές και αναλύθηκαν με τη χρήση της Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης.

Η σύσταση του συγκεκριμένου τύπου συμπολυμερούς, του επιτρέπει να αποκρίνεται σε ερεθίσματα που λαμβάνει από το περιβάλλον του, μεταβάλλοντας τη διαμόρφωση του και εν τέλει τις ιδιότητές του. Τα ερεθίσματα αυτά αφορούν κυρίως την θερμοκρασία και το pH. Κρίθηκε λοιπόν σκόπιμο να διερευνηθεί και ο τρόπος με τον οποίο η φύση του μέσου ενυδάτωσης μπορεί να επηρεάσει την αλληλεπίδραση μεταξύ φωσφολιπιδίων και πολυμερούς. Για τον λόγο αυτό όλα τα δείγματα που παρασκευάστηκαν ενυδατώθηκαν σε τρία μέσα, που διαφέρουν ως προς το pH και την ιονική τους ισχύ. Ο παράγοντας θερμοκρασία μελετήθηκε μέσω των κύκλων θέρμανσης-ψύξης στους οποίους υποβλήθηκαν τα δείγματα κατά την θερμιδομετρία.

Η πιο απλά με «bullets».

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης ώστε να μελετηθούν:

- Η επίδραση της φύσης του μέσου ενυδάτωσης και συγκεκριμένα το pH και η ιονική ισχύς στη θερμοτροπική συμπεριφορά διπλοστοιβάδων που αποτελούνται από φωσφολιπίδια DPPC
- Οι θερμοτροπικές μεταβολές που επιφέρει η προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων του συμπολυμερούς δύο συστάδων τύπου PNIPAM-b-PAA, σε πλήρως ενυδατωμένες διπλοστοιβάδες DPPC,
- Η τρόπος με τον οποίο η φύση του μέσου ενυδάτωσης μπορεί να επηρεάσει την αλληλεπίδραση φωσφολιπιδίων-πολυμερούς. (όπως έχει ήδη αναφερθεί το συμπολυμερές PNIPAM-b-PAA έχει την ιδιότητα να μετασχηματίζεται αποκρινόμενο σε «ερεθίσματα όπως η θερμοκρασία και το pH)
- και τέλος η σημασία της σύστασης του πολυμερούς και συγκεκριμένα το μοριακό του βάρος και η αναλογία μεταξύ των δύο συστάδων στο μόριο του.

Για τους σκοπούς αυτούς παρασκευάστηκαν:

- Διπλοστοιβάδες αποτελούμενες μόνο από φωσφολιπίδια DPPC
- Μεικτές διπλοστοιβάδες αποτελούμενες από φωσφολιπίδια DPPC και συμπολυμερές τύπου PNIPAM-b-PAA_{50:50}
- Μεικτές διπλοστοιβάδες αποτελούμενες από φωσφολιπίδια DPPC και συμπολυμερές τύπου PNIPAM-b-PAA_{70:30}

Όλες οι διπλοστοιβάδες που παρασκευάστηκαν, ενυδατώθηκαν στα τρία διαφορετικά μέσα:

- Νερό καθαρότητας HPLC
- Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών PBS
- Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5

Β.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5 Υλικά και Μέθοδοι

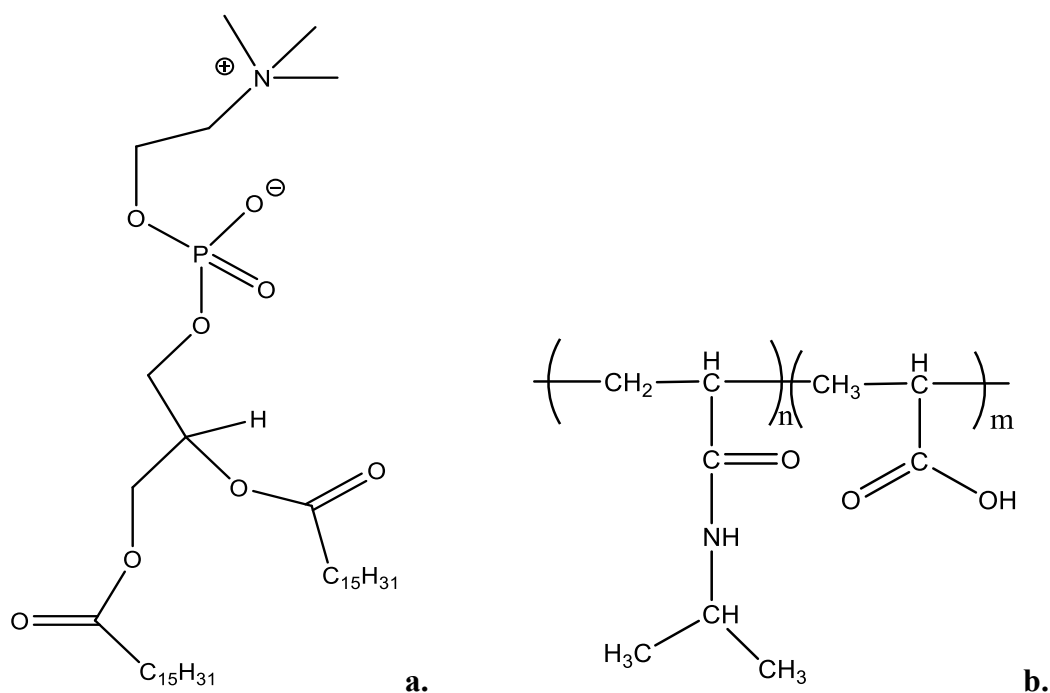
5.1 Υλικά

Κατά την διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

- i. Διπαλμιτοϋλογλυκεροφωσφοχολίνη
[1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine – DPPC]
- ii. Πολύ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο)-πολύ(ακρυλικό οξύ),
α) 50% w/w ως προς το πολύ(ακρυλικό οξύ), και β) 30% w/w ως προς το ακρυλικό οξύ
[Poly(N-isopropylacrylamide)-block-poly(acrylic acid) – PNIPAM-b-PAA_{50:50} & PNIPAM-b-PAA_{70:30}].
- iii. Χλωροφόρμιο (CHCl₃).
- iv. Μεθανόλη (CH₃OH).
- v. Νερό καθαρότητας HPLC.
- vi. Δισκία για την παρασκευή αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών - Phosphate-buffered saline (PBS).
- vii. Υδροχλωρικό οξύ (HCl).
- viii. Χωνευτήρια (κάψες) Αλουμινίου όγκου 40 μl.

Το DPPC και τα PNIPAM-b-PAA_{50:50} και PNIPAM-b-PAA_{70:30} αποτέλεσαν το δομικά συστατικά των διπλοστοιβάδων που παρασκευάστηκαν. Το φωσφολιπίδια DPPC αγοράστηκαν από την «Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA» και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό, ενώ τα δύο συμπολυμερή συντέθηκαν και χορηγήθηκαν από τα εργαστήρια του ινστιτούτου θεωρητικής και φυσικής χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Πρόκειται για γραμμικά συμπολυμερή δύο συστάδων (diblock copolymer), που παρασκευάστηκαν με πολυμερισμό ριζών μεταφοράς αλυσίδας με αντιστρεπτή προσθήκη και απόσπαση (RAFT polymerization). Και στα δύο συμπολυμερή η μία συστάδα (block) είναι το πολυ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο) και η δεύτερη το πολύ(ακρυλικό οξύ), ενώ διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μοριακό τους βάρος, και την αναλογία μεταξύ των δύο δομικών τμημάτων τους. Τα συμπολυμερή χαρακτηρίστηκαν και βρέθηκε να έχουν τα εξής χαρακτηριστικά: Η μοριακή μάζα του PNIPAM-b-PAA_{50:50} είναι $M_w=40000 \text{ g mol}^{-1}$, ενώ η κατά βάρος (%w/w) περιεκτικότητα του σε PAA είναι 50%. Αντίστοιχα το PNIPAM-b-PAA_{70:30} έχει μοριακή μάζα

$M_w=34000 \text{ g mol}^{-1}$, ενώ το PAA αποτελεί το 30% της μάζας του. Οι δομές των συμπολυμερών αλλά και του φωσφολιπιδίου παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 5.1.1. Χημική δομή των a. φωσφολιπιδίων DPPC και των b. συμπολυμερών τύπου PNIPAM-b-PAA που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Το χλωροφόρμιο και η μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρασκευή των διπλοστοιβάδων ως διαλύτες, ήταν καθαρότητας αναλυτικού βαθμού (analytical grade) και αγοράστηκαν από την «Sigma-Aldrich Chemical Co.».

Για την ενυδάτωση των διπλοστοιβάδων χρησιμοποιήθηκε νερό καθαρότητας HPLC (ProTMPS Labconco System) και αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών - Phosphate-buffered saline (PBS). Η ρύθμιση του pH του μέσου ενυδάτωσης όπου χρειάστηκε πραγματοποιήθηκε με Υδροχλωρικό οξύ καθαρότητας αναλυτικού βαθμού (analytical grade). Τόσο το Υδροχλωρικό οξύ όσο και τα δισκία που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του PBS αγοράστηκαν από την «Sigma-Aldrich Chemical Co.». Τέλος χρησιμοποιήθηκαν κάψες (χωνευτήρια) Αλουμινίου όγκου 40 μl (ME26763, Mettler-Toledo, Switzerland) για την μεταφορά και μελέτη των δειγμάτων στο θερμιτόμετρο.

5.2 Όργανα

Τα όργανα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων περιγράφονται παρακάτω.

- i. Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας (College B154, Mettler-Toledo, Switzerland).
- ii. Συσκευή δημιουργίας κενού (Techne Dri-Block DB3Thermostat Teche Sample Concentrator).
- iii. Ξηραντήρας κενού
- iv. Διαφορικό Θερμιδόμετρο σάρωσης (822e Mettler-Toledo, Switzerland), εφοδιασμένο με σύστημα εσωτερικής ψύξης (intracooler, Julabo FT900).

5.3 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ώστε να προσδιοριστούν οι θερμοτροπικές παράμετροι των μεταβάσεων φάσης στις οποίες υπόκεινται διπλοστοιβάδες DPPC κατά την θέρμανσή τους, παρουσία ή και όχι δισυσταδικών συμπολυμερών τύπου PNIPAM-b-PAA, και πως αυτές επηρεάζονται από την φύση του μέσου ενυδάτωσης.

Για τους σκοπούς αυτούς παρασκευάστηκαν διπλοστοιβάδες αποτελούμενες μόνο από φωσφολιπίδια DPPC και μεικτές διπλοστοιβάδες αποτελούμενες είτε από φωσφολιπίδια DPPC και συμπολυμερές τύπου PNIPAM-b-PAA_{50:50} είτε από φωσφολιπίδια DPPC και συμπολυμερές τύπου PNIPAM-b-PAA_{70:30}. Οι αναλογίες του πολυμερούς ως προς τα λιπίδια ήταν σε όλες τις περιπτώσεις προκαθορισμένες. Όλες οι διπλοστοιβάδες που παρασκευάστηκαν, ενυδατώθηκαν στα τρία διαφορετικά μέσα που περιγράφονται παρακάτω.

5.3.1 Μέθοδοι παρασκευής των διπλοστοιβάδων

5.3.1.1 Πλήρως ενυδατωμένες Διπλοστοιβάδες DPPC

Κατάλληλες ποσότητες DPPC αφού ζυγιστούν, μεταφέρονται σε γυάλινα φιαλίδια όπου διαλύονται με προσθήκη μείγματος χλωροφορμίου/μεθανόλης (1:1 v/v). Ο διαλύτης απομακρύνεται με εφαρμογή κενού και ήπιας θέρμανσης (50 °C) για τουλάχιστον δύο ώρες. Τυχόν ίχνη διαλύτη απομακρύνονται με την τοποθέτηση των δειγμάτων σε ξηραντήρα κενού για τουλάχιστον 24 ώρες.

Το ξηρό υλικό μεταφέρεται σε προζυγισμένες κάψες αλουμινίου όγκου 40 μl και ζυγίζεται (~5mg). Στη συνέχεια προστίθεται σε περίσσεια το αντίστοιχο κάθε φορά μέσο ενυδάτωσης ώστε η αναλογία δείγματος/μέσου ενυδάτωσης να είναι 5mg/10μl. Οι κάψες σφραγίζονται ερμητικά και αφήνονται για τουλάχιστον 30 λεπτά, χρονικό διάστημα επαρκές για να πραγματοποιηθεί η πλήρης ενυδάτωση των διπλοστοιβάδων. Τα δείγματα κατόπιν μεταφέρονται στο θερμιδόμετρο όπου υποβάλλονται σε προκαθορισμένο πρόγραμμα θέρμανσης-ψύξης και σαρώνονται.

5.3.1.2 Πλήρως ενυδατωμένες Διπλοστοιβάδες DPPC/PNIPAM-b-PAA

Αρχικά παρασκευάζονται διαλύματα παρακαταθήκης, για κάθε ένα συμπολυμερές. Τα συμπολυμερή PNIPAM-b-PAA_{50:50} και PNIPAM-b-PAA_{70:30}, αφού ζυγιστούν, μεταφέρονται σε γυάλινα φιαλίδια, όπου διαλύονται με προσθήκη μείγματος χλωροφορμίου/μεθανόλης (1:1 v/v) για την παραλαβή διαλυμάτων 1% (w/v).

Κατάλληλες ποσότητες από τα διαλύματα παρακαταθήκης, προστίθενται σε προζυγισμένες εντός φιαλιδίων ποσότητες DPPC, ώστε να ληφθούν διαλύματα με τις επιθυμητές μοριακές αναλογίες DPPC/συμπολυμερούς. Αν κριθεί απαραίτητο προστίθεται ποσότητα μείγματος χλωροφορμίου/μεθανόλης (1:1 v/v) για την πλήρη διάλυση των ουσιών. Ο διαλύτης απομακρύνεται με εφαρμογή κενού και ήπιας θέρμανσης (50 °C) για τουλάχιστον δύο ώρες. Τυχόν ίχνη διαλύτη απομακρύνονται με την τοποθέτηση των δειγμάτων σε ξηραντήρα κενού για τουλάχιστον 24 ώρες.

Το ξηρό υλικό όπως αναφέρθηκε και προηγούμενος, μεταφέρεται σε προζυγισμένες κάψες αλουμινίου όγκου 40 μl και αφού ζυγιστεί, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα από το αντίστοιχο κάθε φορά μέσο ενυδάτωσης ώστε η αναλογία δείγματος/μέσου ενυδάτωσης να είναι 5mg/10μl. Οι κάψες σφραγίζονται ερμητικά και αφήνονται για σε ηρεμία για 30 λεπτά, και κατόπιν τα δείγματα κατόπιν μεταφέρονται στο θερμιδόμετρο και σαρώνονται.

Η μοριακές αναλογίες DPPC/συμπολυμερούς στις διπλοστοιβάδες που μελετήθηκαν ήταν 9:0.01, 9:0.05, 9:0.1, 9:0.2 και 9:0.3.

5.3.2 Μέσα ενυδάτωσης

Για της ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά μέσα Ενυδάτωσης.

- Νερό καθαρότητας HPLC, pH 5.5
- Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος, pH 4.5
- Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), pH 7.4 και ισοτονικό
(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl και 10 mM φωσφορικά)

5.3.3 Παράμετροι Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC)

Το Διαφορικό Θερμιδόμετρο Σάρωσης (822e Mettler-Toledo, Switzerland), πριν από κάθε χρήση, βαθμονομήθηκε βάσει της θερμοκρασίας και της ενθαλπίας τήξης του Ίνδιου, (In) ($T_m=156.6\text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta H=28.45\text{ kJ/g}$), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο.

Όλα τα δείγματα που παρασκευάστηκαν υποβλήθηκαν σε προκαθορισμένο πρόγραμμα θέρμανσης-ψύξης δυόμιση κύκλων ώστε να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων (λήψη όμοιων θερμογραμμάτων). Τα θερμογράμματα που εν τέλει λαμβάνονται υπόψη και αναλύονται, αντιστοιχούν στον δεύτερο κύκλο. Άδειες σφραγισμένες κάψες, όμοιες με αυτές που περιείχαν τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα αναφοράς. Το θερμοκρασιακό εύρος στο οποίο μελετήθηκαν οι διπλοστοιβάδες ορίστηκε μεταξύ 20°C και 60°C , (εύρος εντός του οποίου πραγματοποιείται η κύρια μετάβαση φάσης της DPPC διπλοστοιβάδας, $T_m\approx 41^\circ\text{C}$ (avantilipids.com, 2015), ενώ ο ρυθμός σάρωσης που εφαρμόστηκε τόσο κατά την ψύξη όσο και κατά την θέρμανση ήταν της τάξης των $5^\circ\text{C}/\text{min}$. Πριν από κάθε κύκλο τα δείγματα υποβάλλονται σε σάρωση σε σταθερή θερμοκρασία 20°C , ώστε να έρθουν σε κατάσταση θερμοδυναμικής ισορροπίας. Συνοπτικά το πρόγραμμα ψύξης-θέρμανσης παρουσιάζεται στον **Πίνακα 5.1**.

Πίνακας 5.1 Πρόγραμμα κύκλων θέρμανσης-ψύξης που εφαρμόστηκε στην μελέτη των διπλοστοιβάδων DPPC και των υπόλοιπων μεικτών συστημάτων φωσφολιπιδίου-συμπολυμερούς.

1 ^{ος} κύκλος	10 λεπτά ισόθερμο στους 20°C →	θέρμανση μέχρι τους 60°C , $5^\circ\text{C}/\text{min}$ →	ψύξη μέχρι τους 20°C , $5^\circ\text{C}/\text{min}$ →
2 ^{ος} κύκλος	10 λεπτά ισόθερμο στους 20°C →	θέρμανση μέχρι τους 60°C , $5^\circ\text{C}/\text{min}$ →	ψύξη μέχρι τους 20°C , $5^\circ\text{C}/\text{min}$ →
3 ^{ος} κύκλος	10 λεπτά ισόθερμο στους 20°C →	θέρμανση μέχρι τους 60°C , $5^\circ\text{C}/\text{min}$	

Τα θερμογράμματα που ελήφθησαν, αναλύθηκαν με χρήση του πακέτου λογισμικού «STARe της Mettler-Toledo», προς τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών παραμέτρων των μεταβάσεων των διπλοστοιβάδων μεταξύ των διαφόρων φάσεων.

Οι παράμετροι που προσδιορίστηκαν είναι:

T_{onset} :Θερμοκρασία (°C) στην οποία αρχίζει ένα θερμικό φαινόμενο. Μας δίνει συνήθως στοιχεία για την κινητικότητα των πολικών κεφαλών των φωσφολιπιδίων

ΔT_{1/2} :Θερμοκρασιακό εύρος στο ήμισυ της κορυφής. Μας δίνει ένδειξη για τον βαθμό συνεργατικότητας κατά την μετάβαση από την μία φάση στην άλλη.

ΔH :Ενθαλπία μετάβασης φάσης (mJ mol⁻¹)

T_m :Θερμοκρασία κύριας μετάβασης φάσης (°C) όπου το σύστημα έχει την μέγιστη θερμοχωρητικότητα C_p

T_p :Θερμοκρασία προμετάπτωσης

T_s :Θερμοκρασία δευτερεύουσας κορυφής

Τα όρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά των προσδιορισμό των παραμέτρων για όλα τα δείγματα είναι:

- Άνω θερμοκρασιακό όριο:22 °C
- Κάτω θερμοκρασιακό όριο:52 °C

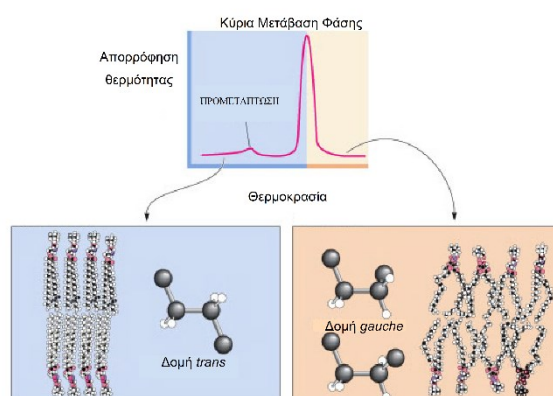
6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 Εισαγωγή

Η θερμοτροπική συμπεριφορά των πλήρως ενυδατωμένων διπλοστοιβάδων DPPC έχει εκτενώς μελετηθεί όπως παρουσιάστηκε και στο 3^ο κεφάλαιο.

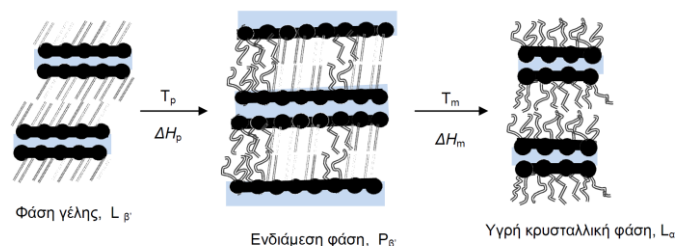
Κατά την θερμική τους επεξεργασία και με την αύξηση της θερμοκρασίας υπόκεινται σε μεταβάσεις φάσεων (phase transitions), οι οποίες αντιστοιχούν σε μεταβολές στη γεωμετρία και την οργάνωση της διπλοστοιβάδας.

Οι δύο συνηθέστερες μεταβάσεις που ανιχνεύονται με χρήση της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης είναι η προμετάπτωση κατά την οποία η διπλοστοιβάδα από την φάση γέλης ($L_{\beta'}$), μεταπίπτει σε μία ενδιάμεση κατάσταση την ρυτιδωμένη φάση ($P_{\beta'}$) και η κύρια μετάπτωσή από την ρυτιδωμένη φάση ($P_{\beta'}$) στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση (L_{α}) (Κουνοαα & Caffrey, 1998; Καρου, et al., 2005). (Σχήμα 6.1.1).



Σχήμα 6.1.1 Τυπικό θερμόγραμμα διπλοστοιβάδων DPPC, και οι αντίστοιχες διαμορφωτικές αλλαγές της διπλοστοιβάδας

Σύμφωνα με αυτές τις μεταβάσεις φάσεων οι διπλοστοιβάδες DPPC μεταπίπτουν σε τρεις διαφορετικές καταστάσεις ανάλογα με τις μεταβολές της θερμοκρασίας. Στην φάση γέλης σε θερμοκρασίες μικρότερες από 34 °C, στη ρυτιδωμένη κατάσταση μεταξύ 34°C και 41°C και στην υγρή κρυσταλλική φάση σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 42°C (Σχήμα 6.1.2)



Σχήμα 6.1.2 Αναπαράσταση των φάσεων στις οποίες απαντώνται οι λιπιδικές διπλοστοιβάδες της DPPC στις διάφορες θερμοκρασίες.

6.2 Θερμοτροπική Συμπεριφορά των διπλοστοιβάδων DPPC

Οι διπλοστοιβάδες που αποτελούνται μόνο από φωσφολιπίδια DPPC, ενυδατώθηκαν πλήρως σε τρία διαφορετικά μέσα και σαρώθηκαν στο εύρος θερμοκρασιών 20-60 °C με ταχύτητα σάρωσης 5 °C/min τόσο κατά τη θέρμανση, όσο και κατά τη ψύξη. Τα θερμογράμματα που ελήφθησαν κατά την θέρμανση των δειγμάτων απεικονίζονται στο **Σχήμα 6.2.1** ενώ οι αντίστοιχες θερμοδυναμικές παράμετροι παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.2.1**.

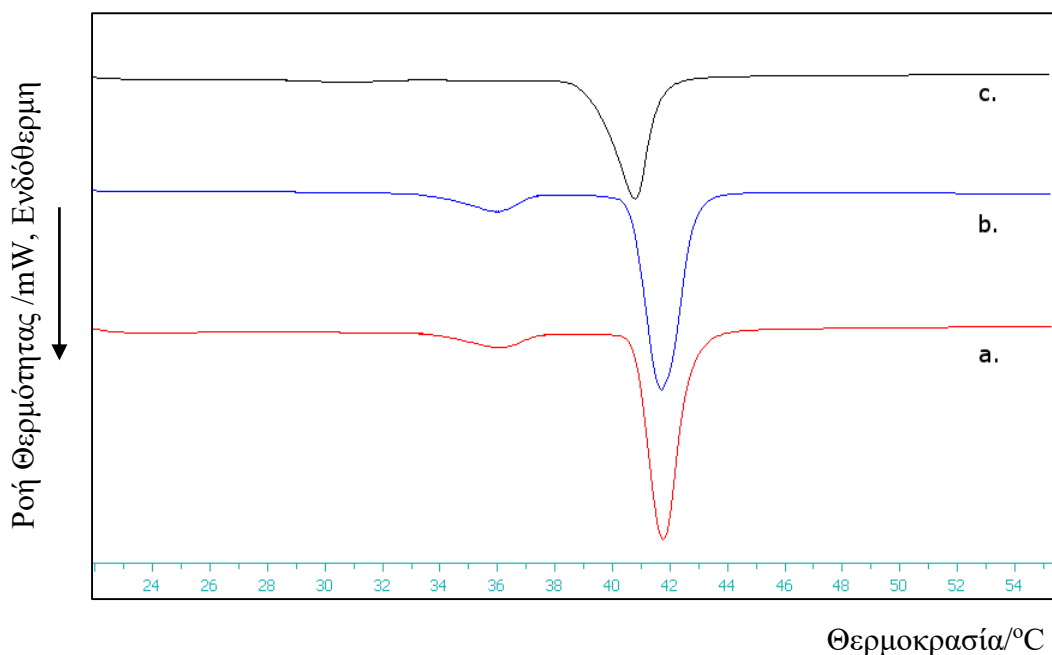
Πίνακας 6.2.1 Θερμοτροπικές παράμετροι κύριας μετάπτωσης και προμετάπτωσης που υπολογίστηκαν κατά την θέρμανση DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε νερό καθαρότητας HPLC, σε διάλυμα PBS και σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5.

Δείγματα	$T_{\text{onset,m}}/^{\circ}\text{C}$	$T_m/^{\circ}\text{C}$	$\Delta T_{1/2,m}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_m/\text{mJ mol}^{-1}$	$T_{\text{onset,p}}/^{\circ}\text{C}$	$T_p/^{\circ}\text{C}$	$\Delta T_{1/2,p}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_p/\text{mJ mol}^{-1}$
DPPC (H ₂ O, pH 5.5)	40.4	41.2	1.34	324.4	33.6	35.9	1.99	24.9
DPPC (PBS, pH 7.4)	40.5	41.3	1.14	212.8	33.5	35.9	2.22	21.8
DPPC (δ/μσ HCl, pH 4.5)	38.9	40.4	1.34	193.9	28.2	30.5	3.10	4.2

Οι ενυδατωμένες σε νερό καθαρότητας HPLC διπλοστοιβάδες, κατά την θέρμανση τους και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, παρουσιάζουν δύο ενδόθερμες κορυφές: μία ευρεία μικρής ενθαλπικής μεταβολής ($\Delta H_p=24.9 \text{ mJ mol}^{-1}$) που αντιστοιχεί στην προμετάπτωση, με T_p στους 35.9 °C, και μία οξεία και συμμετρική κορυφή, με θερμοκρασία μετάβασης φάσης T_m στους 41.2 °C, που αντιστοιχεί στην κύρια μετάβαση στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση (L_{α}). Η δεύτερη κορυφή παρουσιάζει ενθαλπική μεταβολή της τάξης των 324.4 mJ mol⁻¹.

Όταν οι διπλοστοιβάδες DPPC αντί για νερό ενυδατωθούν σε διάλυμα PBS, η κορυφή της κύριας μετάβασης γίνεται λίγο πιο έντονη και πιο συμμετρική. Οι θερμοδυναμικές παράμετροι που αφορούν τόσο στο κύριο θερμικό συμβάν όσο και στην προμετάπτωση,

παραμένουν ουσιαστικά ανεπηρέαστες, πλην του εύρους της κύριας κορυφής. Αυτό εμφανίζεται ελαφρώς μειωμένο, όπως προκύπτει από την διαφορά μεταξύ των τιμών $\Delta T_{1/2,m}$. Η διαφορά αυτή είναι της τάξης των 0.2 °C. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την καλύτερη συνεργασιμότητα των διπλοστοιβάδων κατά την κύρια μετάπτωση.

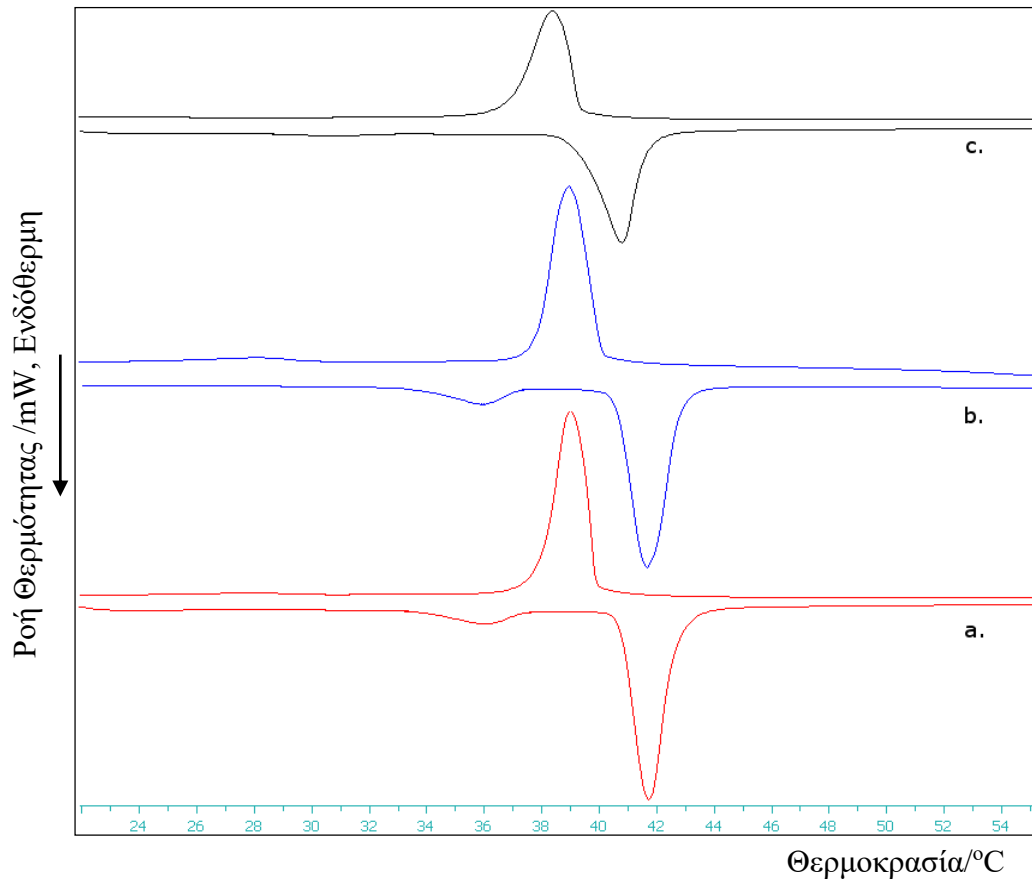


Σχήμα 6.2.1 Καμπύλες DSC κατά την θέρμανση διπλοστοιβάδων DPPC ενυδατωμένων σε a. νερό καθαρότητας HPLC, b. διάλυμα PBS, c. διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5. Οι ενδόθερμες τιμές ροής θερμότητας έχουν κανονικοποιηθεί ως προς το βάρος του δείγματος.

Όταν οι φωσφολιπιδικές μεμβράνες ενυδατώνονται με διάλυμα PBS, φαίνεται πως περισσότερα μόρια DPPC μεταβαίνουν ταυτόχρονα στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση, πιθανότατα λόγω της παρεμβολής (screening) των ιόντων που περιέχονται στο αλατούχο διάλυμα φωσφορικών, στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φορτισμένων ομάδων των πολικών ομάδων κεφαλής των φωσφολιπιδίων (Berényi, et al., 2013). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή του βαθμού ενυδάτωσης της μεμβρανικής επιφάνειας (Koynova & Caffrey, 1998). Πρέπει να σημειωθεί ότι οι διαφορές μεταξύ νερού HPLC και PBS, εντοπίζονται στην τονικότητα και στο pH. Το pH του νερού είναι περίπου 5.5 και είναι ουσιαστικά απιονισμένο, ενώ το PBS είναι ένα ισοτονικό (παρουσία 0.138 M NaCl; 0.0027 M KCl) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.01M με pH περίπου 7.4.

Η μείωση του pH του μέσου ενυδάτωσης, όπως προκύπτει από το θερμογράμματα των διπλοστοιβάδων που ενυδατώθηκαν σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5 έχει ως αποτέλεσμα την μετατόπιση του φαινομένου προμετάπτωσης σε χαμηλότερη θερμοκρασία ($T_p=30.5\text{ }^\circ\text{C}$), την σημαντική διαπλάτυνση της αντίστοιχης κορυφής και παράλληλα τη μείωση της ενθαλπίας μετάβασης στη ρυτιδωμένη φάση P_β . Η συμπεριφορά αυτή και σε αυτήν την περίπτωση υποδεικνύει μεταβολές στο πολικό τμήμα των διπλοστοιβάδων. Ευδιάκριτες είναι και οι μεταβολές στην κορυφή της κύριας μετάβασης. Συγκεκριμένα η θερμοκρασία της κύριας μετάπτωσης (T_m) και η θερμοκρασία στην οποία αρχίζει το θερμικό συμβάν ($T_{\text{onset},m}$), μετατοπίζονται προς χαμηλότερες θερμοκρασίες, κατά $0.8\text{ }^\circ\text{C}$ και $1.5\text{ }^\circ\text{C}$ αντίστοιχα, ενώ σημαντική είναι και η μείωση που παρατηρείται στη μεταβολή της ενθαλπίας κατά την μετάβαση. Αν και το εύρος στο ήμισυ της κύριας κορυφής ($\Delta T_{1/2,m}$) δεν φαίνεται να μεταβάλλεται σε σχέση με τις ενυδατωμένες σε νερό HPLC διπλοστοιβάδες, η κύρια κορυφή εμφανίζεται λιγότερο οξεία και περισσότερο ασύμμετρη υποδεικνύοντας τη συγκριτικά ελαττωμένη συνεργασιμότητα κατά την τήξη των λιπαρών αλυσίδων. Η μείωση της θερμοκρασίας και της αντίστοιχης ενθαλπίας της κύριας μετάβασης, πιθανότατα σχετίζεται με μείωση της κινητικότητας των πολικών κεφαλών και επακόλουθη έκταση της στοιβαδικής επιφάνειας, ως αποτέλεσμα του αυξημένου ποσοστού των θετικά φορτισμένων πολικών κεφαλών στην επιφάνεια της διπλοστοιβάδας, που προκύπτει από την μείωση του pH του μέσου ενυδάτωσης σε τιμές κοντά στην pK_a της φωσφορικής ομάδας του DPPC (Κογνοναα & Caffrey, 1998). Τελικά οι διπλοστοιβάδες που ενυδατώνονται σε διάλυμα pH 4.5, χαρακτηρίζονται συγκριτικά με τις αντίστοιχες που ενυδατώνονται σε PBS και νερό από χαλάρωση της πυκνότητας στοιβάσης των υδρόφοβων αλυσίδων στο εσωτερικό της μεμβράνης και εν τέλει από ελαφρά ρευστοποίηση της.

Παρατηρώντας τα θερμογράμματα που ελήφθησαν κατά την ψύξη των DPPC διπλοστοιβάδων που απεικονίζονται στο **Σχήμα 6.2.2**, βλέπουμε πως και στις τρεις περιπτώσεις οι κορυφές κύριας μετάπτωσης που ανιχνευθήκαν κατά την θέρμανση επανεμφανίστηκαν σε λίγο χαμηλότερες θερμοκρασίες (της τάξης των $1.6\text{-}1.9\text{ }^\circ\text{C}$). Αυτή η υστέρηση είναι φυσιολογική και προκύπτει λόγω της διαφορετικής κινητικής της μετάβασης προς την υγρή κρυσταλλική φάση συγκριτικά με την αντίστροφη διαδικασία (Smith, et al., 2010; Semmler, et al., 2000). Φυσιολογική κρίνεται και η σημαντική υστέρηση της κορυφής της προμετάπτωσης όπου αυτή εμφανίστηκε, καθώς έχει αποδειχθεί ότι η μετάβαση στην ρυτιδωμένη φάση δεν είναι μία τέλεια αντιστρεπτή διαδικασία και ότι κατά την μετάβαση από την υγρή κρυσταλλική φάση στη φάση γέλης μεσολαβεί μία μετασταθερή φάση (P^{β^*mst}) λίγο διαφορετικής μορφολογίας της P^{β^*} (Ματσίγκου, 2006; Κογνονα & Tenchov, 2013).



Σχήμα 6.2.2 Καμπύλες DSC θέρμανσης-ψύξης DPPC ενυδατωμένων σε a. νερό καθαρότητας HPLC, b. διάλυμα PBS, c. διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5.

6.3 Θερμοτροπική Συμπεριφορά του συστήματος DPPC/PNIPAM-b-PAA_{50:50}

Η ενσωμάτωση του συμπολυμερούς δύο συστάδων PNIPAM-b-PAA_{50:50} (50% w/w PAA), εντός των φωσφολιπιδικών (DPPC) διπλοστοιβάδων που ενυδατώνονται και στα τρία διαφορετικά μέσα, προκαλεί έντονες μεταβολές στις θερμοδυναμικές τους παραμέτρους, όπως αυτές ανιχνεύτηκαν από την Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης και κατ' επέκταση στην θερμοτροπική τους συμπεριφορά. Ο τρόπος δε κατά τον οποίο συντελούνται αυτές οι μεταβολές εξαρτάται από την ποσότητα του πολυμερούς που χρησιμοποιείται. Οι μοριακές αναλογίες DPPC/PNIPAM-b-PAA_{50:50} που μελετήθηκαν είναι 9:0.01, 9:0.05, 9:0.1, 9:0.2 και 9:0.3.

6.3.1 Νερό καθαρότητας HPLC ως μέσο ενυδάτωσης

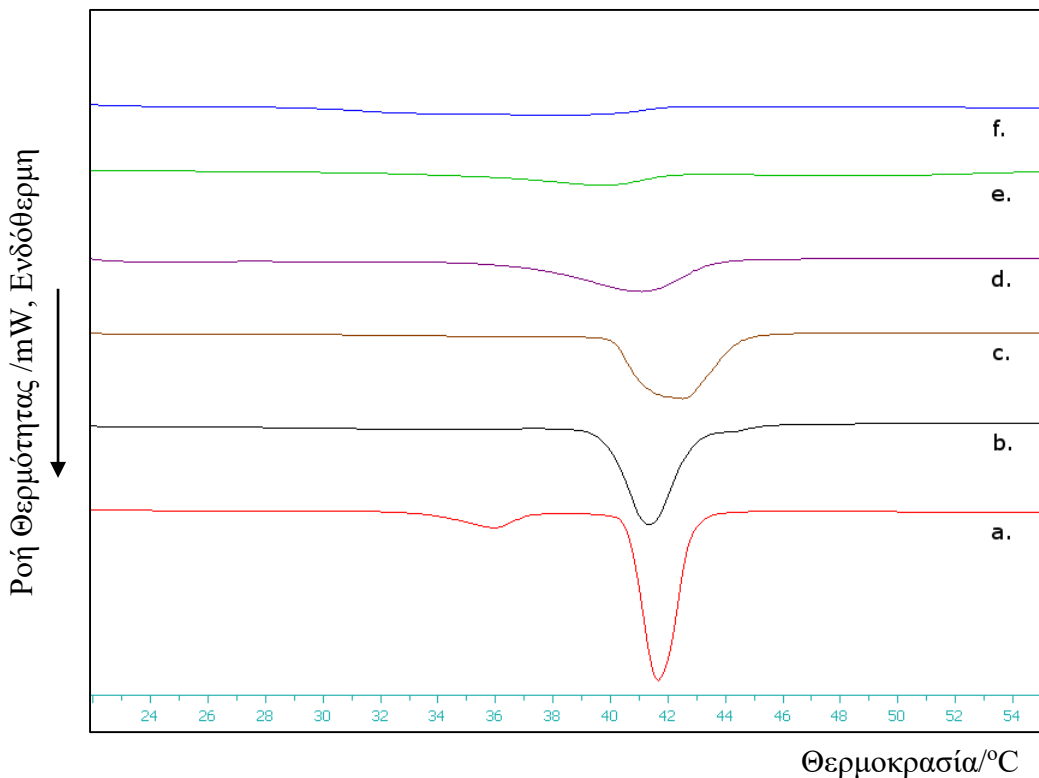
Οι πλήρως ενυδατωμένες σε νερό καθαρότητας HPLC διπλοστοιβάδες DPPC που φέρουν αυξανόμενες συγκεντρώσεις PNIPAM-b-PAA_{50:50}, σαρώθηκαν στο εύρος θερμοκρασιών 20-60 °C με ταχύτητα σάρωσης 5 °C/min τόσο κατά τη θέρμανση όσο και κατά τη ψύξη. Τα θερμογράμματα που ελήφθησαν κατά τους κύκλους θέρμανσης απεικονίζονται στο **Σχήμα 6.2.1** ενώ οι αντίστοιχες θερμοδυναμικές παράμετροι παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.3.1**.

Πίνακας 6.3.1 Θερμοτροπικές παράμετροι κύριας μετάπτωσης και προμετάπτωσης που υπολογίστηκαν κατά την θέρμανση DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε νερό καθαρότητας HPLC, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων δισυσταδικού συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{50:50}.

Δείγματα σε Νερό HPLC	Μοριακή Αναλογία	T _{onset,m} /°C	T _m /°C	ΔT _{1/2,m} /°C	ΔH _m /mJ mol ⁻¹	T _{onset,p} /°C	T _p /°C	ΔT _{1/2,p} /°C	ΔH _p /mJ mol ⁻¹
DPPC	-	40.4	41.2	1.34	324.4	33.6	35.9	1.99	24.9
DPPC:PNIPAM-PAA _{50:50}	9:0.01	39.6	41.0	1.86	277.3	29.3	33.9	4.45	6.2
DPPC:PNIPAM-PAA _{50:50}	9:0.05	39.9	42.3	3.00	219.8	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{50:50}	9:0.1	36.3	40.9	4.25	186.6	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{50:50}	9:0.2	34.3	39.6	4.73	92.4	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{50:50}	9:0.3	21.8	37.8	10.46	117.3	-	-	-	-

Η παρουσία του PNIPAM-b-PAA_{50:50} στις διπλοστοιβάδες, φαίνεται να επηρεάζει έντονα την φάση της προμετάπτωσης, η οποία μειώνεται ανάλογα με την συγκέντρωσή του.

Συγκεκριμένα στη μοριακή αναλογία 9:0.01, η αντίστοιχη κορυφή εμφανίζεται έντονα διαπλευσμένη, η ενθαλπία της μετάβασής μειώνεται αισθητά, ενώ παράλληλα η θερμοκρασία μετάβασης στη ρυτιδωμένη φάση (T_p), ελαττώνεται περίπου κατά 2°C περίπου. Περαιτέρω αύξηση της μοριακής αναλογίας του πολυμερούς σε αναλογία ίση ή μεγαλύτερη της 9:0.05 καθιστά την προμετάπτωση ουσιαστικά μη ανιχνεύσιμη. Η μετατόπιση της T_p προς χαμηλότερες θερμοκρασίες και η σταδιακή εξαφάνιση της προμετάπτωσης υποδεικνύουν την έντονη αλληλεπίδραση του πολυμερούς με την επιφάνεια της διπλοστοιβάδας και την τάση προς «απορρόφηση-τοποθέτηση» τμημάτων του πολυμερούς στην περιοχή των πολικών κεφαλών (Berényi, et al., 2013). Μια άλλη πιθανή εξήγηση της εξαφάνισης της προμετάπτωσης είναι η εισχώρηση, σε κάποια έκταση τουλάχιστον, του συμπολυμερούς εντός τις διπλοστοιβάδας.



Σχήμα 6.3.1 Καμπύλες DSC κατά την θέρμανση DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε νερό καθαρότητας HPLC, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{50:50}. Μοριακές αναλογίες DPPC:PNIPAM-b-PAA_{50:50} a. 9:0, b. 9:0.01, c. 9:0.05 d. 9:0.1, e. 9:0.2 και f. 9:0.3. Οι ενδόθερμες τιμές ροής θερμότητας έχουν κανονικοποιηθεί ως προς το βάρος του δείγματος.

Συνέπεια των αλληλεπιδράσεων αυτών είναι η μεταβολή της γεωμετρίας-διαμόρφωσης της διπλοστοιβάδας και η σταθεροποίηση της φάσης γέλης των διπλοστοιβάδων (L_{β}), έναντι της ρυτιδωμένης φάσης (P_{β}). Οι διπλοστοιβάδες τείνουν λοιπόν να μεταπίπτουν από την φάση γέλης απευθείας στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση (Berényi, et al., 2013; Bonora, et al., 2003).

Εμφανείς είναι και οι μεταβολές που προκαλεί η προσθήκη του πολυμερούς στην κύρια μετάβαση φάσης των διπλοστοιβάδων. Παρατηρώντας το **Σχήμα 6.3.1** φαίνεται πως προκαλείται μία σταδιακή διαταραχή της κορυφής της κύριας μετάπτωσης, συναρτήσει της συγκέντρωσης του PNIPAM-b-PAA_{50:50} στο μείγμα. Όσο αυξάνεται η ποσότητα του πολυμερούς, η καμπύλη γίνεται περισσότερο ευρεία και λιγότερο συμμετρική, η ενθαλπία μετάβασης και οι χαρακτηριστικές θερμοκρασίες της κύριας μετάβασης (T_m και $T_{onset,m}$) μεταβάλλονται έντονα, ενώ παράλληλα σε θερμοκρασίες υψηλότερες της T_m αρχίζουν να εμφανίζονται κάποιοι ώμοι.

Συγκεκριμένα στην μικρότερη μοριακή αναλογία πολυμερούς-λιπιδίου (9:0.01), η διαπλάτυνση της κορυφής συνοδεύεται από μία ελαφρά μείωση των T_m και $T_{onset,m}$, και την εμφάνιση δύο ώμων σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες, περίπου στους 42.3 °C και στους 44.0 °C. Στην αμέσως υψηλότερη αναλογία (9:0.05) οι ώμοι μεγαλώνουν-εντείνονται σε βάρος της κορυφής κύριας μετάβασης, κάτι που ίσως εξηγεί την αυξημένη θερμοκρασία κύριας μετάπτωσης ($T_m=42.3$ °C) όπως φαίνεται και στον αντίστοιχο **Πίνακα 6.3.1**. Σε μεγαλύτερες ποσότητες PNIPAM-b-PAA_{50:50}, οι ώμοι αυτοί εξαφανίζονται, ενώ παρατηρείται μια σταδιακή μετατόπιση των χαρακτηριστικών θερμοκρασιών της κύριας μετάβασης προς χαμηλότερες θερμοκρασίες και ανάλογη μείωση στην μεταβολή της ενθαλπίας.

Ωμοι που εντοπίζονται στην κύρια κορυφή των διπλοστοιβάδων σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες σε σχέση με την θερμοκρασία κύριας μετάπτωσης, αποτελούν σαφή ένδειξη για την περιφερειακή διευθέτηση μορίων στην μεμβρανική επιφάνεια (Berényi, et al., 2013). Κατά συνέπεια μπορούμε να υποθέσουμε πως το συμπολυμερές PNIPAM-b-PAA_{50:50}, αλληλεπιδρά πιθανότατα με τις πολικές ομάδες κεφαλής της φωσφολιπιδικής μεμβράνης και ότι η αλληλεπίδραση αυτή γίνεται όλο και πιο έντονη με την αύξηση της ποσότητας του πολυμερούς. Είχε επίσης τεκμηριωθεί στην βιβλιογραφία ότι οι εμφάνιση ώμων στην κύρια κορυφή, σχετίζεται με τη δημιουργία εντός της διπλοστοιβάδας περιοχών (domains) με διαφορετική σύσταση, που μπορεί να είναι είτε πλούσιοι είτε φτωχοί ως προς το μόριο «ξενιστή». Αυτές οι περιοχές σχετίζονται με μία μείωση στο ωφέλιμο κλάσμα (effective volume fraction) των λιπιδικών νανοπεριοχών (nanodomains), το οποίο παραμένει

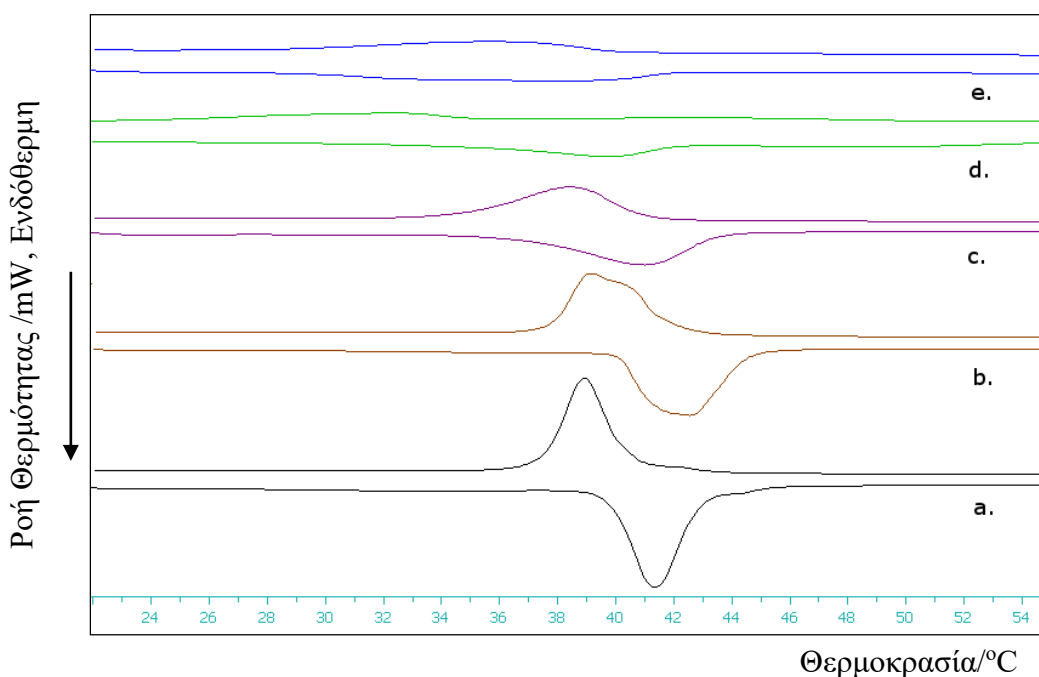
αναλλοίωτο, και ανεπηρέαστο από παρουσία του συμπολυμερούς, συνεχίζει να τήκεται μεταβαίνοντας στην υγροκρυσταλλική κατάσταση (Pirra, et al., 2015).

Επιπλέον η θερμοκρασία κύριας μετάπτωσης (T_m) για ένα συγκεκριμένο τύπο φωσφολιπιδίων εξαρτάται άμεσα από την κινητικότητα των υδρόφοβων ακυλ-αλυσίδων, ενώ η θερμοκρασία στην οποία ξεκινά η μετάβαση φάσης ($T_{onset,m}$) σχετίζεται με την κινητικότητα των πολικών κεφαλών στην επιφάνεια της διπλοστοιβάδας. Η μείωση αυτών των δύο χαρακτηριστικών θερμοκρασιών εξαιτίας της παρουσίας του συμπολυμερούς, πιθανότατα αντικατοπτρίζει μία προοδευτική χαλάρωση της πυκνότητας στοιβάσεως των λιπιδικών περιοχών των διπλοστοιβάδων και αύξηση της μεμβρανικής ρευστότητας (Pantusa, et al., 2007). Η σταδιακή μείωση της (T_m), αποτελεί ίσως ένδειξη για την εις βάθος εισχώρηση τμήματος του PNIPAM-b-PAA_{50:50} στο υδρόφοβο εσωτερικό των διπλοστοιβάδων φαινόμενο που γίνεται εντονότερο με την αύξηση της παρουσίας του συμπολυμερούς και πιθανώς οδηγεί σε πλάγιο διαχωρισμό φάσεων.

Από τις τιμές του εύρους στο ήμισυ της κορυφής κύριας μετάπτωσης ($\Delta T_{1/2,m}$) που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.3.1** γίνεται αντιληπτό πως η συνεργασιμότητα των διπλοστοιβάδων κατά την μετάβαση τους στην (L_a) κατάσταση μειώνεται αισθητά. Το ίδιο συμβαίνει και με την συμμετρία της καμπύλης που διαταράσσεται λόγω της παρουσίας του PNIPAM-b-PAA_{50:50}. Ιδιαίτερα σε υψηλές μοριακές αναλογίες πολυμερούς η διπλοστοιβάδα εμφανίζει μεγάλη ανομοιογένεια στην σύσταση της, γεγονός που ευνοεί την υπόθεση για εισχώρηση του πολυμερούς εντός της λιπιδικής περιοχής.

Όσον αφορά την ενθαλπική μεταβολή (ΔH_m) κατά τη μετάβαση των μεμβρανών στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση, ακολουθεί και αυτή το μοντέλο της προοδευτικής, ως προς το πολυμερικό περιεχόμενο των διπλοστοιβάδων, ελάττωσης. Στις διπλοστοιβάδες με χαμηλή περιεκτικότητα συμπολυμερούς και συγκεκριμένα στις μοριακές αναλογίες 9:0.01 και 9:0.05, η μείωση της ενθαλπίας ΔH_m , τη στιγμή που η θερμοκρασία μετάβασης φάσης T_m παραμένει ουσιαστικά σταθερή ενώ παράλληλα εμφανίζονται όμοιοι υψηλότερης θερμοκρασίας, ενισχύει την ένδειξη για αυξημένη κινητικότητα στην περιοχή των πολικών κεφαλών λόγω πιθανής «προσρόφησης» του πολυμερούς στην επιφάνεια της διπλοστοιβάδας (Berényi, et al., 2013; Kenji & Tirrell, 1984; Munaviron, et al., 2014). Η αλληλεπίδραση αυτή φαίνεται να είναι εντονότερη στην μοριακή αναλογία 9:0.05. Όταν η αναλογία του πολυμερούς στο μείγμα λιπιδίων-πολυμερούς αυξάνεται ακόμα περισσότερο (9:0.1, 9:0.2, 9:0.3) η αξιοσημείωτη ελάττωση στην ενθαλπική μεταβολή της κύριας μετάπτωσης σε συνδυασμό με την παράλληλη μείωση της T_m και αύξηση στην $\Delta T_{1/2,m}$, ενισχύουν την ένδειξη ότι το συμπολυμερές ή καλύτερα ένα τμήμα αυτού, διασπείρεται εντός της υδρογονανθρακικής περιοχής των

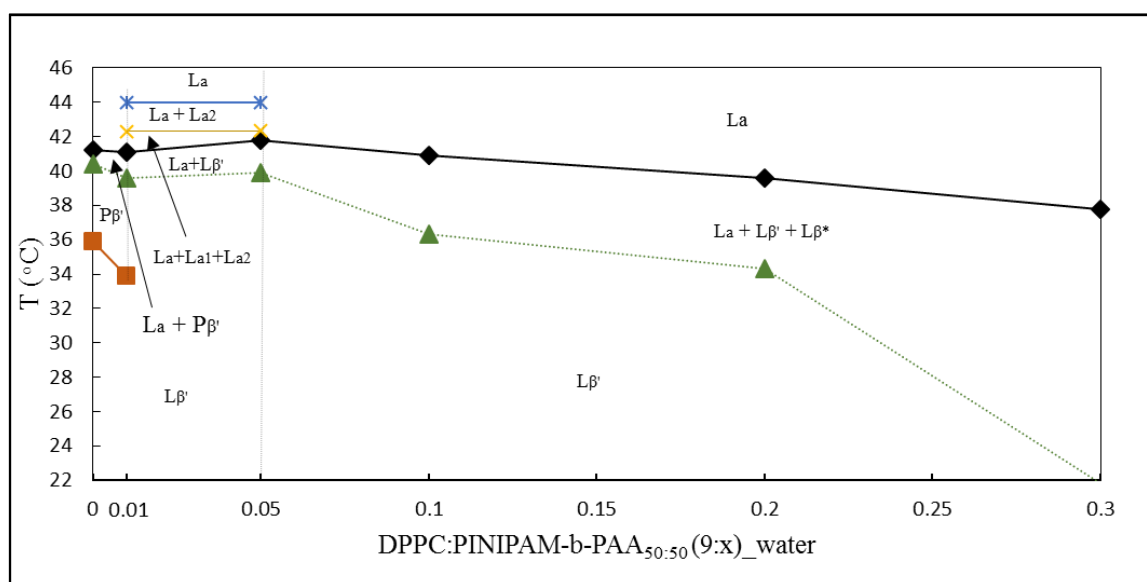
διπλοστοιβάδων, με επακόλουθη διατάραξη της οργάνωσης των μεμβρανικών λιπιδίων (Grasso, et al., 2001). Είναι τεκμηριωμένο πως παράλληλη μείωση της ενθαλπίας και της θερμοκρασίας κύριας μετάπτωσης υποδεικνύουν μερική ενσωμάτωση του αλληλοεπιδρώντος μακρομορίου εντός των DPPC διπλοστοιβάδων, γεγονός που καθιστά τη μεμβράνη πιο ρευστή και λιγότερο σταθερή (Tabbakhian & Rogers, 2012). Γενικά μείωση στην ενθαλπία μετάβασης υποδεικνύει την εξασθένιση της μοριακής οργάνωσης «molecular packing» των διπλοστοιβάδων λόγω μείωσης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φωσφολιπιδίων (Bonora, et al., 2003).



Σχήμα 6.3.2 Καμπύλες DSC θέρμανσης-ψύξης DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε νερό καθαρότητας HPLC, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{50:50}. Μοριακές αναλογίες DPPC:PNIPAM-b-PAA_{50:50} a. 9:0.01, b. 9:0.05, c.9:0.1 d. 9:0.2 και e. 9:0.3.

Παρατηρώντας τα θερμογράμματα που ελήφθησαν κατά την ψύξη των διπλοστοιβάδων που απεικονίζονται στο **Σχήμα 6.3.2**, βλέπουμε πως σε όλες τις αναλογίες συμπολυμερούς οι κύριες κορυφές επανεμφανίστηκαν με μια δικαιολογημένη υστέρηση της τάξης των 2 °C περίπου. (η μεγάλη υστέρηση που παρατηρήθηκε στην αναλογία 9:0.2 οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα και δεν μπορεί να αξιολογηθεί.) Το ίδιο ισχύει και για τους ώμους υψηλότερης θερμοκρασίας γεγονός που επιβεβαιώνει την ανάπτυξη νέων φάσεων-

διαμορφώσεων εντός της μεμβράνης, εξαιτίας της αλληλεπίδρασης με το πολυμερές, που προσεγγίζουν από θερμοδυναμική σκοπιά την υγρή κρυσταλλική κατάσταση. Στην αναλογία 9:0.05 η υστέρηση της τάξης των 3 °C που παρουσιάστηκε οφείλεται στην μείωση της έντασης του ώμου που ευθυνόταν για την αύξηση στην T_m κατά την θέρμανση του συστήματος, προς όφελος της κύριας μετάπτωσης.



Σχήμα 6.3.3 Διάγραμμα φάσεων DPPC διπλοστοιβάδων ενυδατωμένων σε νερό καθαρότητας HPLC, συναρτήσει της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης του PNIPAM-b-PAA_{50:50}. Θερμοκρασία προμετάπτωσης από τη φάση γέλης $L_{\beta'}$ στη ρυτιδωμένη φάση $P_{\beta'}$ (—■—), θερμοκρασία εκκίνησης T_{onset} της μετάπτωσης στην υγρή κρυσταλλική φάση L_{α} (···▲···), θερμοκρασία κύριας μετάπτωσης στην υγρή κρυσταλλική φάση L_{α} (—◆—), θερμοκρασία μετάπτωσης της υγρής κρυσταλλικής φάσης $L_{\alpha 1}$ (—χ—), θερμοκρασία μετάπτωσης της υγρής κρυσταλλικής φάσης $L_{\alpha 2}$ (—x—).

Με βάση τις θερμοκρασίες μετάπτωσης των διαφόρων φάσεων που παρατηρούνται στα θερμογράμματα είναι δυνατό να κατασκευαστεί το διάγραμμα φάσεων των ενυδατωμένων σε νερό καθαρότητας HPLC διπλοστοιβάδων DPPC, παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης PNIPAM-b-PAA_{50:50}. Το διάγραμμα φάσεων (Σχήμα 6.3.3) δίνει πληροφορίες που σχετίζονται με τη φυσικοχημική κατάσταση της διπλοστοιβάδας σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία και τη συγκέντρωση του συμπολυμερούς. Συνοπτικά, απόντος του συμπολυμερούς οι DPPC διπλοστοιβάδες κατά την αύξηση της θερμοκρασίας μεταβαίνουν

από τη φάση γέλης $L_{\beta'}$ στη ρυτιδωμένη φάση $P_{\beta'}$ και στη συνέχεια στην υγρή κρυσταλλική φάση L_{α} . Μικρή ποσότητα PNIPAM-b-PAA_{50:50} και σε μοριακή αναλογία 9:0.01, οδηγεί στη ανάπτυξη δύο νέων υγρών κρυσταλλικών φάσεων $L_{\alpha 1}$ και $L_{\alpha 2}$ οι οποίες συνυπάρχουν με την υγρή κρυσταλλική φάση L_{α} σε στενό εύρος θερμοκρασιών. Με την αύξηση της ποσότητας του συμπολυμερούς έως και την αναλογία 9:0.05, η κορυφή της προμετάπτωσης εξαφανίζεται και έτσι οι διπλοστοιβάδες μεταβαίνουν απευθείας από την φάση γέλης $L_{\beta'}$ στις τρεις υγροκρυσταλλικές φάσεις. Σε μεγαλύτερες μοριακές αναλογίες από 9:0.1 έως και 9:0.3, οι νέες υγροκρυσταλλικές φάσεις $L_{\alpha 1}$ και $L_{\alpha 2}$ που αναπτύχθηκαν, παύουν να υφίστανται και έτσι οι διπλοστοιβάδες μεταβαίνουν από την φάση γέλης $L_{\beta'}$ στην υγρή κρυσταλλική φάση L_{α} . Ωστόσο, η διαπλάτυνση που συνοδεύει την κύρια μετάπτωση στις αναλογίες αυτές υποδεικνύει μείωση στην συνεργασιμότητα της μεμβράνης που πιθανότατα οφείλεται σε ανομοιογενή κατανομή τμημάτων του συμπολυμερούς εντός της διπλοστοιβάδας. Εξίσου πιθανή είναι και η δημιουργία κάποιων νέων φάσεων γέλης L_{β^*} με την αύξηση της θερμοκρασίας και εξαιτίας της εισχώρησης του συμπολυμερούς στη διπλοστοιβάδα, που συνυπάρχουν με την $L_{\beta'}$ και την L_{α} σε στενό θερμοκρασιακό εύρος.

6.3.2 Αλατούχο διάλυμα Φωσφορικών (PBS) ως μέσο ενυδάτωσης

Οι πλήρως ενυδατωμένες σε Αλατούχο διάλυμα Φωσφορικών (PBS) διπλοστοιβάδες DPPC που φέρουν αυξανόμενες συγκεντρώσεις PNIPAM-b-PAA_{50:50} σαρώθηκαν στο εύρος θερμοκρασιών 20-60 °C με ταχύτητα σάρωσης 5 °C/min τόσο κατά τη θέρμανση, όσο και κατά τη ψύξη. Τα θερμογράμματα που ελήφθησαν κατά τους κύκλους θέρμανσης απεικονίζονται στο **Σχήμα 6.3.4**, ενώ οι αντίστοιχες θερμοδυναμικές παράμετροι παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.3.2**.

Όταν για την ενυδάτωση των «χημικών» διπλοστοιβάδων DPPC-συμπολυμερούς χρησιμοποιείται διάλυμα PBS η διατάραξη της θερμοτροπικής τους συμπεριφοράς, δεν φαίνεται να διαφοροποιείται σημαντικά σε σχέση με τις αντίστοιχες διπλοστοιβάδες που ενυδατώθηκαν με νερό καθαρότητας (HPLC).

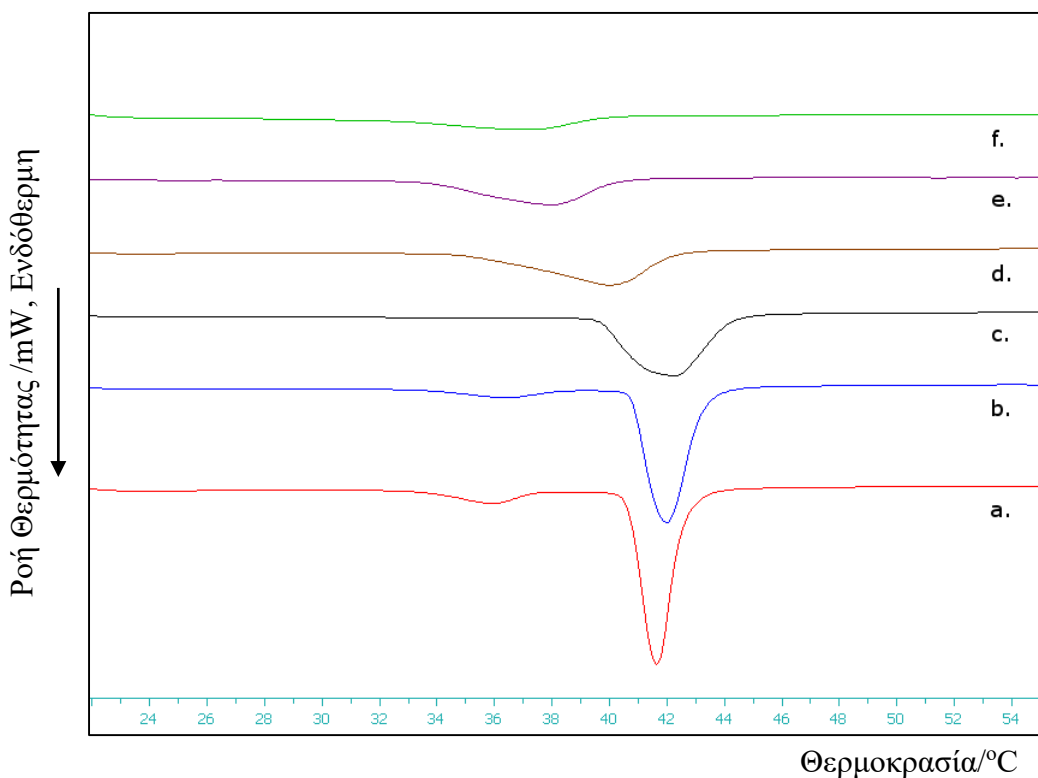
Και σε αυτήν την περίπτωση η προμετάπτωση, παρουσία του PNIPAM-b-PAA_{50:50} τείνει να εξαφανιστεί. Συγκεκριμένα προσθήκη του συμπολυμερούς σε μοριακή αναλογία 9:0.01, προκαλεί μικρή διαπλάτυνση της αντίστοιχης κορυφής, ενώ παράλληλα η ενθαλπία προμετάπτωσης (ΔH_p) ελαττώνεται ελαφρά. Οι μεταβολές αυτές είναι λιγότερο έντονες συγκριτικά με τις αντίστοιχες που παρατηρήθηκαν στα ενυδατωμένα στο νερό συστήματα. Η θερμοκρασία μετάβασης στη ρυτιδωμένη φάση (T_p) ουσιαστικά παραμένει αμετάβλητη.

Πιθανότατα η παρουσία των ιόντων που περιέχονται στο ισότονο διάλυμα PBS και το αυξημένο pH, καθιστούν την αλληλεπίδραση του πολυμερούς με την επιφάνεια των διπλοστοιβάδων τουλάχιστον στην συγκεκριμένη αναλογία ασθενέστερη. Στην μοριακή αναλογία 9:0.05 η προμετάπτωση είναι ουσιαστικά μη ανιχνεύσιμη (μη ποσοτικοποιήσιμη), και εξαφανίζεται με επιπλέον προσθήκη συμπολυμερούς.

Πίνακας 6.3.2 Θερμοτροπικές παράμετροι κύριας μετάπτωσης και προμετάπτωσης που υπολογίστηκαν κατά την θέρμανση DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε διάλυμα PBS, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων δισυσταδικού συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{50:50}.

Δείγματα σε Διάλυμα PBS	Μοριακή Αναλογία	T _{onset,m} /°C	T _m /°C	ΔT _{1/2,m} /°C	ΔH _m /mJ mol ⁻¹	T _{onset,p} /°C	T _p /°C	ΔT _{1/2,p} /°C	ΔH _p /mJ mol ⁻¹
DPPC	-	40.5	41.3	1.14	212.8	33.5	35.9	2.22	21.8
DPPC:PNIPAM-PAA _{50:50}	9:0.01	40.6	41.6	1.54	271.5	33.5	36.3	2.68	19.7
DPPC:PNIPAM-PAA _{50:50}	9:0.05	39.9	42.0	3.01	212.8	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{50:50}	9:0.1	35.6	39.9	4.01	156.8	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{50:50}	9:0.2	33.3	37.9	4.10	116.5	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{50:50}	9:0.3	30.9	37.0	5.25	91.7	-	-	-	-

Όσον αφορά τις μεταβολές στην κορυφή της κύριας μετάπτωσης που προκαλεί η ενσωμάτωση αυξανόμενων ποσοτήτων PNIPAM-b-PAA_{50:50} σε PBS, φαίνεται πως ακολουθούν το ίδιο μοντέλο με τις αντίστοιχες στα συστήματα που ενυδατώθηκαν με νερό HPLC, αν και συγκριτικά συντελούνται με ομαλότερο τρόπο. Όπως φαίνεται και στα αντίστοιχα σχήματα, η παρουσία του συμπολυμερούς σε όλες τις αναλογίες προκαλεί συγκριτικά ηπιότερη διεύρυνση (σύγκρισή τιμών ΔT_{1/2,m}) και διαταραχή της συμμετρίας της κύριας κορυφής, υποδεικνύοντας καλύτερη συνεργασιμότητα της μεμβράνης κατά την κύρια μετάπτωση όταν τα μεικτά συστήματα ενυδατώνονται σε PBS. Οι χαρακτηριστικές θερμοκρασίες της μετάβασης στην υγρή κρυσταλλική T_m και T_{onset,m}, σε μικρές αναλογίες εμφανίζονται ελαφρώς αυξημένες κάτι που και σε αυτήν την περίπτωση πιθανότατα οφείλεται στην ανάπτυξη ώμων σε υψηλότερες θερμοκρασίες, ενώ στην συνέχεια μειώνονται προοδευτικά συναρτήσει της μοριακής αναλογίας του πολυμερούς. Τέλος η ενθαλπική μεταβολή (ΔH_m) μετά από μία σημαντική αύξηση που παρατηρήθηκε στην μικρότερη αναλογία ακολουθεί το μοντέλο της προοδευτικής μείωσης.



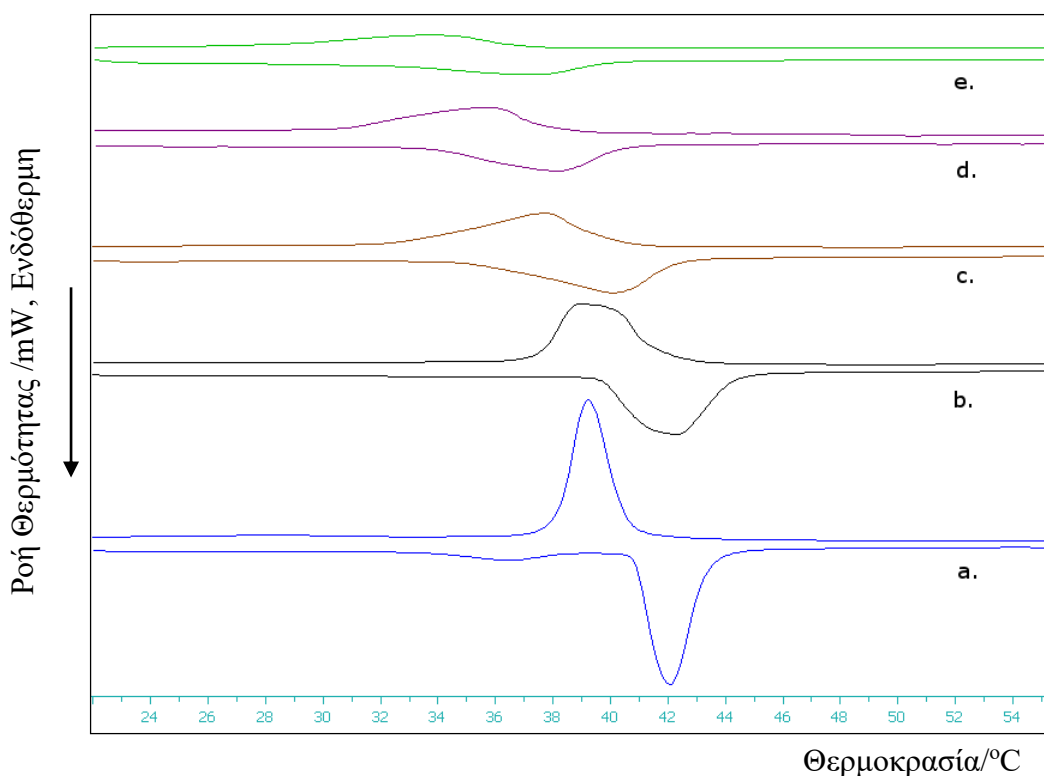
Σχήμα 6.3.4 Καμπύλες DSC κατά την θέρμανση DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε διάλυμα PBS, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{50:50}. Μοριακές αναλογίες DPPC:PNIPAM-b- PAA_{50:50} a. 9:0, b. 9:0.01, c. 9:0.05 d. 9:0.1, e. 9:0.2 και f. 9:0.3. Οι ενδόθερμες τιμές ροής θερμότητας έχουν κανονικοποιηθεί ως προς το βάρος του δείγματος.

Συγκεκριμένα μέχρι και την μοριακή αναλογία 9:0.05, παρατηρείται μια βαθμιαία αλλά μικρή διεύρυνση της κύριας κορυφής, σε σχέση τις καθαρά φωσφολιπιδικές διπλοστοιβάδες, και ελαφρά μετατόπιση της θερμοκρασίας μετάβασης σε υψηλότερες θερμοκρασίες, η οποία προσεγγίζει τους 42.0 °C. Οι αναπτυσσόμενοι ώμοι που δεν είναι εύκολα διακριτοί κατά τους κύκλους θέρμανσης, τουλάχιστον στην μικρότερη αναλογία 9:0.01, είναι πιθανότατα η αιτία της μετατόπισης αυτής και εξηγεί την ασυμμετρία που παρατηρήθηκε προς τα δεξιά της κορυφής και την αύξηση στην τιμή του ημιεύρους ($\Delta T_{1/2,m}$). Αυτή η συμπεριφορά υποδεικνύει και πάλι την αλληλεπίδραση μεταξύ του μορίου του συμπολυμερούς με την επιφάνεια της μεμβράνης που έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία περιοχών (nanodomains) εντός της διπλοστοιβάδας με αυξημένη οργάνωση των αλκυλικών αλυσίδων. Αυτή η υπόθεση ισχυροποιείται λόγω της παρατηρούμενης αύξησης της ενθαλπίας μετάβασης τουλάχιστον στην αναλογία 9:0.01.

Περαιτέρω αύξηση της ποσότητας του PNIPAM-b-PAA_{50:50}, προκαλεί την εξαφάνιση του ώμου και προοδευτική μετατόπιση των θερμοκρασιών της κύριας μετάβασης σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, υποδεικνύοντας και πάλι ικανότητα του πολυμερούς να επιφέρει ρευστοποίηση της διπλοστοιβάδας. Στις μοριακές αναλογίες 9:01, 9:0.2 και 9:0.3 η ασυμμετρία της κορυφής εντείνεται, παρουσιάζοντας «tailing» προς την αριστερή πλευρά, ενώ η συνεργασιμότητα των λιπιδίων κατά την μετάβαση στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση μειώνεται δραστικά όπως φαίνεται από την αύξηση στις τιμές του εύρους στο ήμισυ της κορυφής ($\Delta T_{1/2,m}$). Τα αποτελέσματα αυτά, δεδομένης και της προοδευτικής μείωσης που υφίσταται η ενθαλπία της μετάβασης, αποτελούν ένδειξη για τη σταδιακή εισχώρηση τμήματος του πολυμερούς στο εσωτερικό της μεμβράνης με την αύξηση της θερμοκρασίας, με αποτέλεσμα το σχηματισμό περιοχών εντός της στοιβάδας με διαφορετική «σύσταση».

Τα αποτελέσματα που λαμβάνουμε κατά την θερμιδομέτρηση των ενυδατωμένων σε PBS μεικτών διπλοστοιβάδων, και σε σύγκριση με τα αντίστοιχα για το νερό HPLC, υποδεικνύουν ότι η διαταραχή που προκαλεί η ενσωμάτωση του PNIPAM-b-PAA_{50:50} στη φωσφολιπιδική μεμβράνη, δεν μεταβάλλεται σημαντικά με την αλλαγή του μέσου ενυδάτωσης. Οι μικροδιαφορές που παρατηρούνται και ιδιαίτερα στις χαμηλές συγκεντρώσεις πολυμερούς, είναι πιθανότατα απόρροια του αυξημένου pH στο διάλυμα PBS, που επηρεάζει την ιονική κατάσταση του πολυμερούς (το PAA τμήμα είναι πολύηλεκτρολύτης και αυξανόμενου του pH, αυξάνεται το κλάσμα που είναι ιονισμένο), αλλά και της παρουσίας των ηλεκτρολυτών τα οποία πιθανότατα δρουν κυρίως μέσω κάλυψης (screening) των φορτισμένων ομάδων.

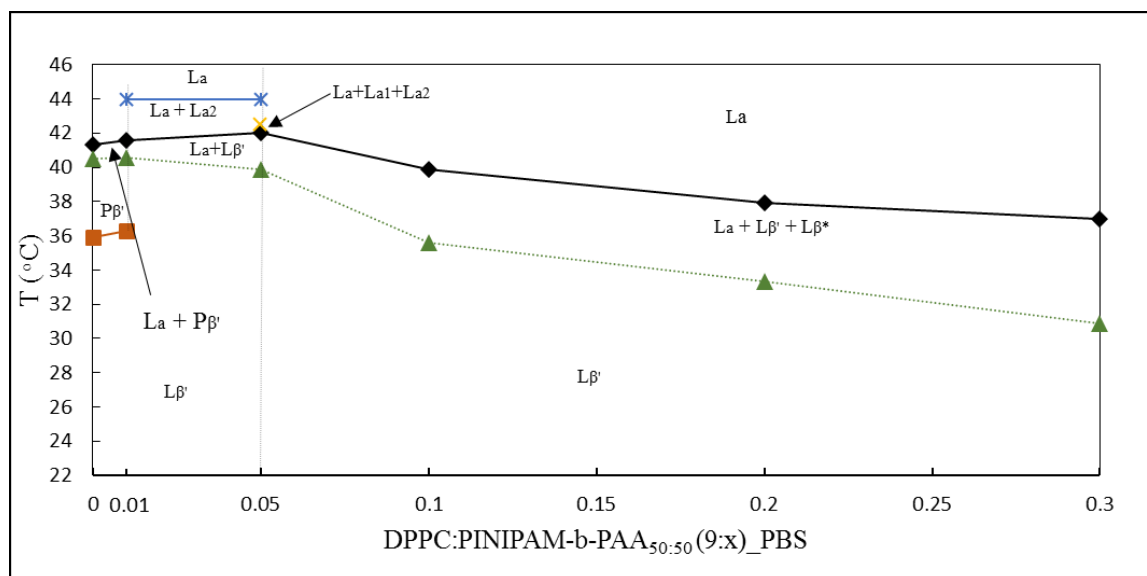
Παρατηρώντας τα θερμογράμματα που ελήφθησαν κατά την ψύξη των διπλοστοιβάδων που απεικονίζονται στο **Σχήμα 6.3.5**, βλέπουμε πως σε όλες τις αναλογίες συμπολυμερούς οι κύριες κορυφές επανεμφανίστηκαν με μια δικαιολογημένη υστέρηση της τάξης των 2 °C περίπου. Το ίδιο ισχύει και για τους ώμους υψηλότερης θερμοκρασίας όπου αυτοί εμφανίστηκαν, γεγονός που επιβεβαιώνει την ύπαρξη νέων φάσεων που συνυπάρχουν με την υγρή κρυσταλλική φάση, εξαιτίας της επιφανειακής αλληλεπίδρασης των διπλοστοιβάδων με τα μόρια του πολυμερούς. Στην αναλογία 9:0.05 η υστέρηση της τάξης των 3 °C που παρουσιάστηκε οφείλεται στη μείωση της έντασης του ώμου που ευθυνόταν για την αύξηση στην T_m κατά την θέρμανση του συστήματος προς όφελος της κύριας μετάπτωσης.



Σχήμα 6.3.5 Καμπύλες DSC θέρμανσης-ψύξης DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε διάλυμα PBS, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{50:50}. Μοριακές αναλογίες DPPC:PNIPAM-b- PAA_{50:50} a. 9:0.01, b. 9:0.05, c.9:0.1 d. 9:0.2 και e. 9:0.3.

Στο **Σχήμα 6.3.6** απεικονίζεται το διάγραμμα φάσεων των ενυδατωμένων σε διάλυμα PBS διπλοστοιβάδων DPPC παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης PNIPAM-b-PAA_{50:50}, το οποίο έχει κατασκευαστεί με βάση τις θερμοκρασίες μετάπτωσης των διαφόρων φάσεων που παρατηρούνται στα αντίστοιχα θερμογράμματα. Οι καθαρές DPPC διπλοστοιβάδες κατά την αύξηση της θερμοκρασίας μεταβαίνουν από τη φάση γέλης $L_{\beta'}$ στη ρυτιδωμένη φάση $P_{\beta'}$ και στη συνέχεια στην υγρή κρυσταλλική φάση L_{α} . Το PNIPAM-b-PAA_{50:50} σε μοριακή αναλογία προκαλεί την εμφάνιση της κρυσταλλικής φάσης $L_{\alpha 2}$, πιθανότατα όμοια με την αντίστοιχη των διπλοστοιβάδων που ενυδατώθηκαν με νερό καθαρότητας HPLC. Η φάση αυτή συνυπάρχει σε στενό εύρος θερμοκρασιών με την L_{α} . Με την αύξηση της ποσότητας του συμπολυμερούς έως και την αναλογία 9:0.05 η κορυφή της προμετάπτωσης εξαφανίζεται, ενώ φαίνεται πως αναπτύσσεται εκ νέου η φάση $L_{\alpha 1}$. Έτσι οι διπλοστοιβάδες με την αύξηση της θερμοκρασίας μεταβαίνουν απευθείας από τη φάση γέλης $L_{\beta'}$ στις τρεις υγροκρυσταλλικές φάσεις που συνυπάρχουν στη μεμβράνη (L_{α} , $L_{\alpha 1}$, $L_{\alpha 2}$) και από εκεί στην L_{α} . Στις μεγαλύτερες μοριακές αναλογίες συμπολυμερούς από 9:0.1 έως και 9:0.3, οι υγροκρυσταλλικές φάσεις $L_{\alpha 1}$ και $L_{\alpha 2}$

εξαφανίζονται, ενώ παράλληλα μειώνεται η συνεργασιμότητα της μεμβράνης που πιθανότατα αποτελεί ένδειξη για την ανάπτυξη νέων φάσεων γέλης L_{β^*} , όπως και στην περίπτωση της ενυδάτωσης με νερό καθαρότητας HPLC.



Σχήμα 6.3.6 Διάγραμμα φάσεων DPPC διπλοστοιβάδων ενυδατωμένων σε διάλυμα PBS, συναρτήσει της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης του PNIPAM-b-PAA_{50:50}. Θερμοκρασία προμετάπτωσης από τη φάση γέλης $L_{\beta'}$ στη ρυτιδωμένη φάση $P_{\beta'}$ (—■—), θερμοκρασία εκκίνησης Tonset της μετάπτωσης στην υγρή κρυσταλλική φάση L_{α} (···▲···), θερμοκρασία κύριας μετάπτωσης στην υγρή κρυσταλλική φάση L_{α} (—◆—), θερμοκρασία μετάπτωσης της υγρής κρυσταλλικής φάσης $L_{\alpha 1}$ (—χ—), θερμοκρασία μετάπτωσης της υγρής κρυσταλλικής φάσης $L_{\alpha 2}$ (—x—).

6.3.3 Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5 ως μέσο ενυδάτωσης

Οι πλήρως ενυδατωμένες σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5 διπλοστοιβάδες DPPC που φέρουν αυξανόμενες συγκεντρώσεις PNIPAM-b-PAA_{50:50} σαρώθηκαν στο εύρος θερμοκρασιών 20-60 °C με ταχύτητα σάρωσης 5 °C/min τόσο κατά τη θέρμανση, όσο και κατά τη ψύξη. Τα θερμογράμματα που ελήφθησαν κατά τους κύκλους θέρμανσης απεικονίζονται στο **Σχήμα 6.3.7**, ενώ οι αντίστοιχες θερμοδυναμικές παράμετροι παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.3.3**.

Η θερμοτροπική συμπεριφορά των καθαρά DPPC διπλοστοιβάδων, όπως έχει ήδη διευκρινιστεί, επηρεάζεται από το pH του μέσου ενυδάτωσης. Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος

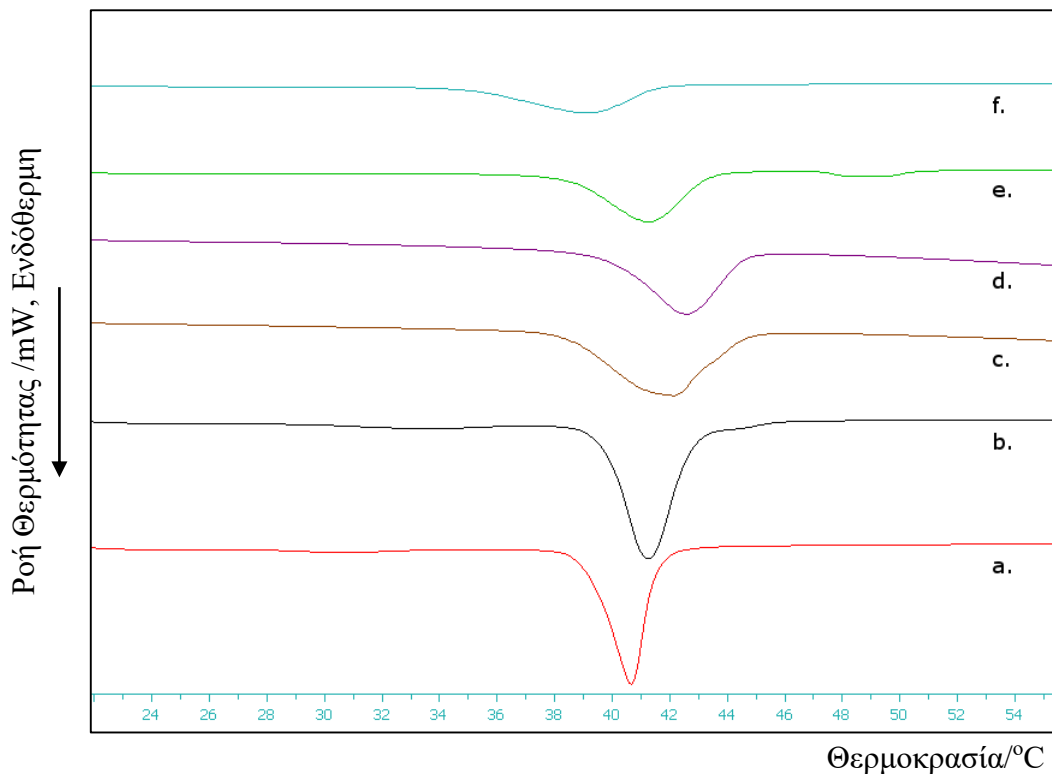
pH 4.5 προκαλεί ελαφρά μείωση της θερμοκρασίας κύριας μετάπτωσης (T_m) και υποβάθμιση της κορυφής προμετάπτωσης όπως προκύπτει από την μείωση των T_p , και ΔH_p και την παράλληλη αύξηση του ημιεύρους $\Delta T_{1/2,p}$. Η μεμβράνη λοιπόν εμφανίζει, συγκριτικά με τα άλλα μέσα ενυδάτωσης, ήπια ρευστοποίηση και ενώ η φάση γέλης ($L_{\beta'}$) σταθεροποιείται εις βάρος της ρυτιδωμένης φάσης ($P_{\beta'}$). Οι διαφορές αυτές είναι πιθανό να προκύπτουν λόγω της αύξησης του ποσοστού των θετικά φορτισμένων πολικών κεφαλών στην επιφάνεια διπλοστοιβάδας, ενώ η επαγόμενη έκτασή της έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στην διευθέτηση των λιπαρών αλυσίδων και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων, στο εσωτερικό της μεμβράνης

Πίνακας 6.3.3 Θερμοτροπικές παράμετροι κύριας μετάπτωσης και προμετάπτωσης που υπολογίστηκαν κατά την θέρμανση DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων δισυσταδικού συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{50:50}.

Δείγματα σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5	Μοριακή Αναλογία	$T_{onset,m}/^{\circ}C$	$T_m/^{\circ}C$	$\Delta T_{1/2,m}/^{\circ}C$	$\Delta H_m/mJ mol^{-1}$	$T_{onset,p}/^{\circ}C$	$T_p/^{\circ}C$	$\Delta T_{1/2,p}/^{\circ}C$	$\Delta H_p/mJ mol^{-1}$
DPPC	-	38.9	40.4	1.34	193.9	28.2	30.5	3.10	4.2
DPPC:PNIPAM-PAA _{50:50}	9:0.01	39.5	40.9	1.85	266.6	29.4	33.1	4.30	10.2
DPPC:PNIPAM-PAA _{50:50}	9:0.05	38.2	41.9	3.66	184.7	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{50:50}	9:0.1	39.8	42.4	2.69	133.8	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{50:50}	9:0.2	38.2	41.1	2.88	142.5	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{50:50}	9:0.3	34.4	39.1	4.05	115.9	-	-	-	-

Η εισαγωγή μικρής ποσότητας PNIPAM-b-PAA_{50:50}, σε μοριακή αναλογία 9:0.01 ως προς DPPC προκαλεί μετατόπιση της κορυφής της προμετάπτωσης σε υψηλότερη θερμοκρασία, ήπια διαπλάτυνση ($T_p=33.1^{\circ}C$ σε σχέση με την $T_p=30.5^{\circ}C$ των καθαρά φωσφολιπιδικών διπλοστοιβάδων), και διπλασιασμό της ενθαλπίας μετάβασης ($\Delta H=10.2 mJ mol^{-1}$). Με περαιτέρω αύξηση της ποσότητας του συμπολυμερούς και σε αναλογία ίση ή μεγαλύτερη από 9:0.05, η προμετάπτωση εξαφανίζεται.

Η κορυφή της κύριας μετάπτωσης των διπλοστοιβάδων που ενυδατώνονται σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5, φαίνεται πως επηρεάζεται περισσότερο από την παρουσία μικρών ποσοτήτων συμπολυμερούς, εν σχέση με τα συστήματα που ενυδατώθηκαν σε νερό HPLC και PBS. Αντίθετα όταν η μοριακή αναλογία του PNIPAM-b-PAA_{50:50}, ως προς το DPPC μεγαλώνει η διαταραχή της κορυφής είναι συγκριτικά ηπιότερη.



Σχήμα 6.3.7 Καμπύλες DSC κατά την θέρμανση DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων συμπολυμερούς PNIPAM-b- PAA_{70:30}. Μοριακές αναλογίες DPPC:PNIPAM-b-PAA_{50:50} a. 9:0, b. 9:0.01, c. 9:0.05 d. 9:0.1, e. 9:0.2 και f. 9:0.3. Οι ενδόθερμες τιμές ροής θερμότητας έχουν κανονικοποιηθεί ως προς το βάρος του δείγματος.

Αυξανόμενης της ποσότητας του PNIPAM-b-PAA_{50:50} στο διάλυμα με pH 4.5, μέχρι και τη μοριακή αναλογία 9:0.1, παρατηρείται μία προοδευτική μετατόπιση της κορυφής κύριας μετάπτωσης σε υψηλότερες θερμοκρασίες (σε σχέση με τους 40.4 °C που καταγράφηκε απουσία πολυμερούς), όπου και προσεγγίζει τους $T_m=42.4$ °C. Η αύξηση αυτή συνοδεύεται από την επανεμφάνιση των υψηλότερης θερμοκρασίας ώμων που και σε αυτήν την περίπτωση συμβάλουν στην βαθμιαία αύξηση του εύρους και της ασυμμετρίας των κορυφών. Οι ώμοι αυτοί εντείνονται προοδευτικά εις βάρος της κύριας κορυφής ενώ σε αντίθεση με τα συστήματα που ενυδατώθηκαν σε νερό και PBS είναι εμφανείς και στην 9:0.1 αναλογία. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την εντονότερη αλληλεπίδραση του πολυμερούς με την μεμβρανική επιφάνεια στο συγκεκριμένο μέσο. Αλληλεπίδραση που αυξάνει σε ισχύ συναρτήσει της ποσότητας του PNIPAM-b-PAA_{50:50}, τουλάχιστον μέχρι την προαναφερθείσα αναλογία.

Η κορυφή της κύριας μετάπτωσης των διπλοστοιβάδων που ενυδατώνονται σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5, φαίνεται πως επηρεάζεται περισσότερο από την παρουσία μικρών ποσοτήτων συμπολυμερούς, εν σχέση με τα συστήματα που ενυδατώθηκαν σε νερό HPLC και PBS. Αντίθετα όταν η μοριακή αναλογία του PNIPAM-b-PAA_{50:50}, ως προς το DPPC μεγαλώνει η διαταραχή της κορυφής είναι συγκριτικά ηπιότερη.

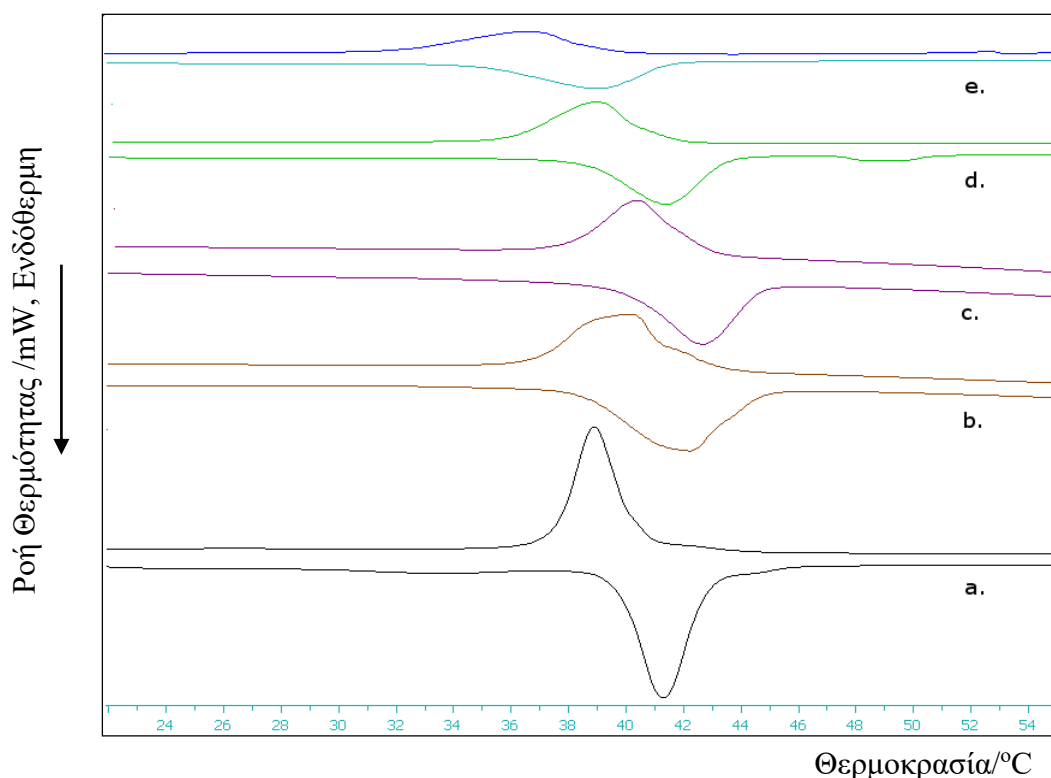
Αυξανόμενη της ποσότητας του PNIPAM-b-PAA_{50:50} στο διάλυμα με pH 4.5, μέχρι και τη μοριακή αναλογία 9:0.1, παρατηρείται μία προοδευτική μετατόπιση της κορυφής κύριας μετάπτωσης σε υψηλότερες θερμοκρασίες (σε σχέση με τους 40.4 °C που καταγράφηκε απουσία πολυμερούς), όπου και προσεγγίζει τους $T_m=42.4$ °C. Η αύξηση αυτή συνοδεύεται από την επανεμφάνιση των υψηλότερης θερμοκρασίας ώμων που και σε αυτήν την περίπτωση συμβάλουν στην βαθμιαία αύξηση του εύρους και της ασυμμετρίας των κορυφών. Οι ώμοι αυτοί εντείνονται προοδευτικά εις βάρος της κύριας κορυφής ενώ σε αντίθεση με τα συστήματα που ενυδατώθηκαν σε νερό και PBS είναι εμφανείς και στην 9:0.1 αναλογία. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την εντονότερη αλληλεπίδραση του πολυμερούς με την μεμβρανική επιφάνεια στο συγκεκριμένο μέσο. Αλληλεπίδραση που αυξάνει σε ισχύ συναρτήσει της ποσότητας του PNIPAM-b-PAA_{50:50}, τουλάχιστον μέχρι την προαναφερθείσα αναλογία.

Με περαιτέρω προσθήκη συμπολυμερούς η θερμοκρασία της μετάπτωσης αρχίζει να ελαττώνεται αλλά όχι δραματικά. Έτσι στην μεγαλύτερη αναλογία συμπολυμερούς (9:0.3) προσεγγίζει τους 39.1 °C, ενώ παράλληλα οι ώμοι φαίνεται να απορροφούνται από την κύρια κορυφή. Πρέπει να σημειωθεί πως παρά την τάση που υπήρχε για προοδευτική διαπλάτυνση των κορυφών, στις αναλογίες 9:0.1 και 9:0.2 και συγκριτικά με τις αμέσως μικρότερες συγκεντρώσεις, παρατηρείται μία σημαντική ελάττωση του εύρους, αλλά και βελτίωση της συμμετρίας, που υποδεικνύει αυξημένη συνεργατικότητα. Στην αναλογία 9:0.5 η τάση για διαπλάτυνση αλλά και ένταση της ασυμμετρίας των κορυφών προς της χαμηλότερες θερμοκρασίες «επανεμφανίζεται».

Όσον αφορά την ενθαλπία της κύριας μετάπτωσης, εμφανίζεται ασθενώς αυξημένη παρουσία μικρής ποσότητας PNIPAM-b-PAA_{50:50} (σε αναλογία 9:0.01), ενώ εν συνεχεία μειώνεται προοδευτικά συναρτήσει της ποσότητας του πολυμερούς επιβεβαιώνοντας και σε αυτήν την περίπτωση την βαθμιαία χαλάρωση της πυκνότητας στοίβασης των φωσφολιπιδίων εντός της διπλοστοιβάδας πιθανότατα λόγω εισχώρησης του πολυμερούς.

Σε σύγκριση με τα θερμογράμματα που ελήφθησαν για τις διπλοστοιβάδες που ενυδατώθηκαν στα άλλα δύο μέσα, οι κορυφές που αντιστοιχούν στις μοριακές αναλογίες 9:0.1 έως 9:0.3 είναι περισσότερο συμμετρικές και οξείες, υποδεικνύοντας μικρότερης έντασης διαχωρισμό φάσεων εντός της μεμβράνης, ενώ οι αυξημένες θερμοκρασίες κύριας μετάβασης και οι

ελαφρώς υψηλότερες ενθαλπίες, συνηγορούν στην σταθεροποίηση της φάσης γέλης έναντι της τάσης για ρευστοποίηση της μεμβράνης παρουσία μεγάλων ποσοτήτων PNIPAM-b-PAA_{50:50}. Πιθανότατα τα παραπάνω προκύπτουν λόγω της ασθενέστερης εισχώρησης του πολυμερούς εντός της διπλοστοιβάδας. Στις μικρότερες αναλογίες όμως, όπως διαπιστώθηκε και προηγούμενος, οι αλληλεπιδράσεις πολυμερούς-διπλοστοιβάδας είναι ισχυρότερες.

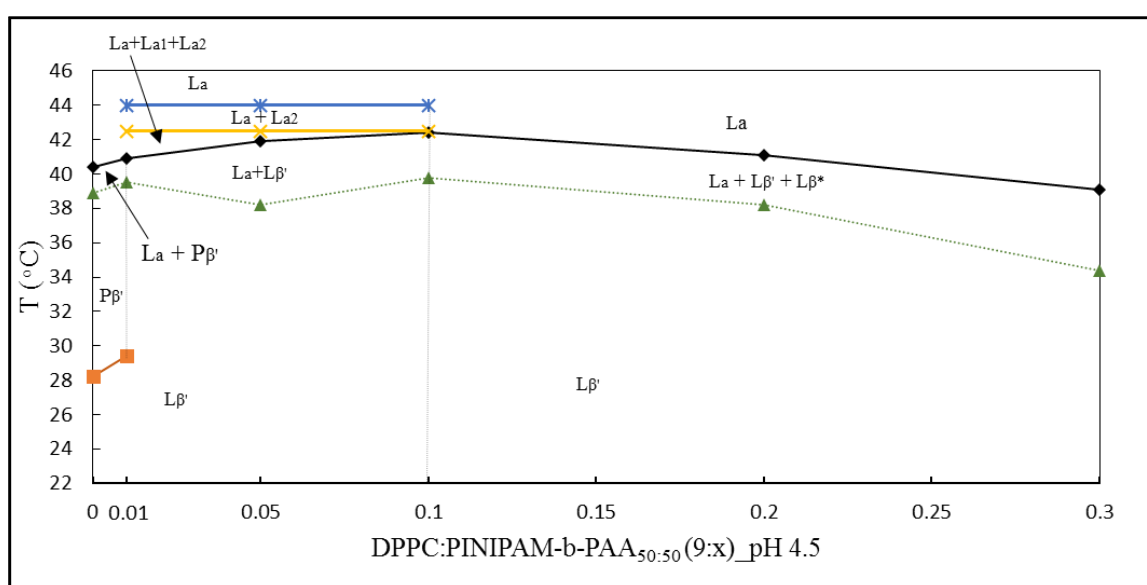


Σχήμα 6.3.8 Καμπύλες DSC θέρμανσης-ψύξης DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{50:50}. Μοριακές αναλογίες DPPC:PNIPAM-b- PAA_{50:50} a. 9:0.01, b. 9:0.05, c.9:0.1 d. 9:0.2 και e. 9:0.3.

Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι η μείωση του pH σε τιμές κοντά στην pKa του PAA τμήματος του πολυμερούς καθιστά το πολυμερές σε μεγάλο ποσοστό (μεγαλύτερο σε σχέση με υψηλότερες τιμές pH) αφόρτιστο, ευνοώντας έτσι την ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μη-ιονισμένων καρβοξυλίων του PAA και των πολικών κεφαλών. Δυνάμεων που έχει αποδειχθεί ότι είναι υπεύθυνες για την περιφερειακή διευθέτηση πολυμερών του τύπου του πολύ(ακρυλικού οξέος) ως προς την επιφάνεια φωσφολιπιδικών διπλοστοιβάδων (Kenji & Tirrell, 1984).

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι οι επιδράσεις του δυσσταδικού συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{50:50}, στις DPPC διπλοστοιβάδες, εξαρτώνται άμεσα από την φύση, και ιδιαίτερα από το pH του μέσου στο οποίο αυτές ενυδατώνονται.

Παρατηρώντας τα θερμογράμματα που ελήφθησαν κατά την ψύξη των διπλοστοιβάδων που απεικονίζονται στο **Σχήμα 6.3.8**, βλέπουμε πως σε όλες τις αναλογίες συμπολυμερούς οι κύριες κορυφές επανεμφανίστηκαν με μια δικαιολογημένη υστέρηση της τάξης των 2 οC περίπου. Το ίδιο ισχύει και για τους ώμους υψηλότερης θερμοκρασίας σε όλες τις αναλογίες όπου εμφανίστηκαν, γεγονός που επιβεβαιώνει και σε αυτήν την περίπτωση την ανάπτυξη νέων φάσεων ύπαρξή τους.



Σχήμα 6.3.9 Διάγραμμα φάσεων DPPC διπλοστοιβάδων ενυδατωμένων σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 4.5, συναρτήσει της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης του PNIPAM-b-PAA_{50:50}. Θερμοκρασία προμετάπτωσης από τη φάση γέλης $L_{\beta'}$ στη ρυτιδωμένη φάση $P_{\beta'}$ (—■—), θερμοκρασία εκκίνησης Tonset της μετάπτωσης στην υγρή κρυσταλλική φάση L_{α} (···▲···), θερμοκρασία κύριας μετάπτωσης στην υγρή κρυσταλλική φάση L_{α} (—◆—), θερμοκρασία μετάπτωσης της υγρής κρυσταλλικής φάσης $L_{\alpha 1}$ (—χ—), θερμοκρασία μετάπτωσης της υγρής κρυσταλλικής φάσης $L_{\alpha 2}$ (—x—).

Στο **Σχήμα 6.3.9** απεικονίζεται το διάγραμμα φάσεων των ενυδατωμένων σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5 διπλοστοιβάδων DPPC παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης PNIPAM-b-PAA_{50:50}, το οποίο έχει κατασκευαστεί με βάση τις θερμοκρασίες μετάπτωσης των διαφόρων φάσεων που παρατηρούνται στα αντίστοιχα θερμογράμματα. Μέχρι και την

μικρότερη μοριακή αναλογία του συμπολυμερούς οι διπλοστοιβάδες (9:0.01) μεταβαίνουν από τη φάση γέλης $L_{\beta'}$ στην υγρή κρυσταλλική φάση L_{α} , με την μεσολάβηση της ρυτιδωμένης φάσης $P_{\beta'}$. Στη μοριακή αναλογία 9:0.01 εμφανίζονται οι δύο υγροκρυσταλλικές φάσεις $L_{\alpha 1}$, $L_{\alpha 2}$ που συνυπάρχουν με την L_{α} , οι οποίες σε αυτή την περίπτωση διατηρούνται έως και την μοριακή αναλογία 9:0.1 ως προς PNIPAM-b-PAA_{50:50}, ενώ η κορυφή της προμετάπτωσης εξαφανίζεται και πάλι σε αναλογίες άνω της 9:0.05. Στις μεγαλύτερες μοριακές αναλογίες συμπολυμερούς (9:0.2 και 9:0.3), οι υγροκρυσταλλικές φάσεις $L_{\alpha 1}$ και $L_{\alpha 2}$ εξαφανίζονται. Η συνεργασιμότητα της μεμβράνης δε φαίνεται να μειώνεται αισθητά συγκριτικά με τις ενυδατωμένες σε νερό διπλοστοιβάδες, εντούτοις η ανάπτυξη νέων φάσεων γέλης L_{β^*} είναι πιθανή.

6.4 Θερμοτροπική Συμπεριφορά του συστήματος DPPC/PNIPAM-b-PAA_{70:30}

Η συμπεριφορά ενός δευτέρου γραμμικού συμπολυμερούς δύο συστάδων της μορφής PNIPAM-b-PAA, διαφορετικού μοριακού βάρους και διαφορετικής αναλογίας μεταξύ των συστάδων πολυ(N-ισοπροπυλακρυλαμιδίου) και πολύ(ακρικού οξέος), μελετήθηκε θερμιδομετρικά ως προς την ικανότητα του να διαταράσσει την θερμοτροπική συμπεριφορά των διπλοστοιβάδων DPPC. Η ενσωμάτωση του PNIPAM-b-PAA_{70:30} (MW 34000 g mol⁻¹ & 30% w/w PAA) στις μεμβράνες αυτές και στα τρία μέσα ενυδάτωσης προκαλεί, όπως ήταν αναμενόμενο, έντονες μεταβολές στις θερμοδυναμικές παραμέτρους των χαρακτηριστικών μεταβάσεων τους, σημαντικά διαφορετικές όμως συγκριτικά με αυτές που προκαλεί η ενσωμάτωση του PNIPAM-b-PAA_{50:50} (MW 40000 g mol⁻¹ & 50% w/w PAA). Σε αντίθεση με το συμπολυμερές που εξετάστηκε προηγουμένως, φαίνεται πως μεγάλες ποσότητες PNIPAM-b-PAA_{70:30}, ευθύνονται για την ανάπτυξη νέων κορυφών που υποδεικνύουν πιθανότατα δημιουργία νέων φάσεων εντός των διπλοστοιβάδων. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των φωσφολιπιδικών μεμβρανών και του συμπολυμερούς εξαρτάται άμεσα λοιπόν από την σύσταση του και ιδιαίτερα από την αναλογία μεταξύ των δομικών του τμημάτων. Οι μοριακές αναλογίες DPPC/PNIPAM-b-PAA_{70:30} που μελετήθηκαν είναι 9:0.01, 9:0.05, 9:0.1, 9:0.2 και 9:0.3.

6.4.1 Νερό καθαρότητας HPLC ως μέσο ενυδάτωσης

Οι πλήρως ενυδατωμένες σε νερό καθαρότητας HPLC διπλοστοιβάδες DPPC που φέρουν αυξανόμενες συγκεντρώσεις PNIPAM-b-PAA_{70:30} σαρώθηκαν στο εύρος θερμοκρασιών 20-60 °C με ταχύτητα σάρωσης 5 °C/min τόσο κατά τη θέρμανση όσο και κατά τη ψύξη. Τα θερμογράμματα που ελήφθησαν απεικονίζονται στο **Σχήμα 6.4.1**, ενώ οι αντίστοιχες θερμοδυναμικές παράμετροι παρουσιάζονται στους **Πίνακες 6.4.1 και 6.4.2**.

Η παρουσία του PNIPAM-b-PAA_{70:30} στις DPPC διπλοστοιβάδες, επηρεάζει έντονα την προμετάπτωση, η οποία και σε αυτήν την περίπτωση τείνει να εξαφανιστεί αυξανόμενης της ποσότητάς του. Συγκεκριμένα η προσθήκη πολυμερούς σε μοριακή αναλογία 9:0.01, έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της σε χαμηλότερη θερμοκρασία ($T_p = 30.2$ °C) και παράλληλα τον υποδιπλασιασμό της ενθαλπία μετάβασης (ΔH_p) υποδεικνύοντας την σταθεροποίηση της φάσης γέλης ($L_{\beta'}$) έναντι της ρυτιδωμένης φάσης ($P_{\beta'}$). Με περεταίρω αύξηση της ποσότητας του πολυμερούς και σε αναλογία ίση ή μεγαλύτερη από 9:0.05 ως προς DPPC, η προμετάπτωση ουσιαστικά εξαφανίζεται. Αντ' αυτού στα αντίστοιχα θερμογράμματα

εμφανίζονται νέες κορυφές χαμηλής θερμοκρασίας που πιθανότατα αντιστοιχούν σε νέες μετασταθικές φάσεις (L_s) (metastable phases).

Πίνακας 6.4.1 Θερμοτροπικές παράμετροι κύριας μετάπτωσης και προμετάπτωσης που υπολογίστηκαν κατά την θέρμανση DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε νερό καθαρότητας HPLC, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων δισυσταδικού συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{70:30}.

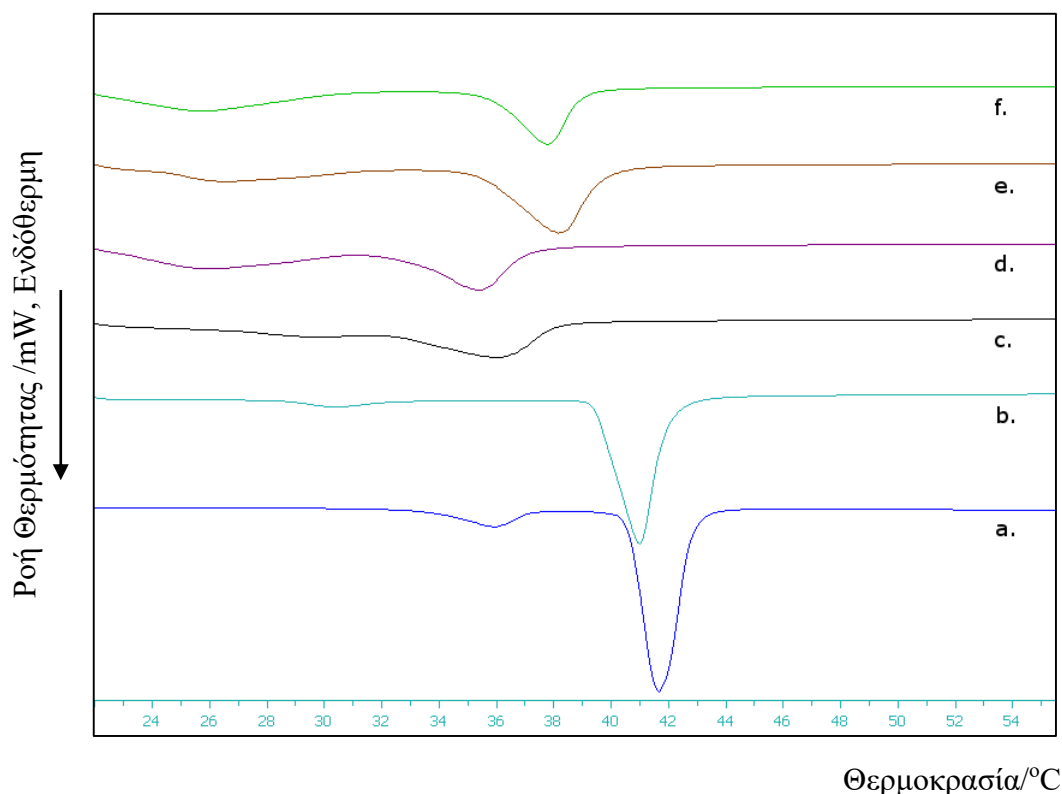
Δείγματα σε Νερό HPLC	Μοριακή Αναλογία	$T_{onset,m}/^{\circ}C$	$T_m/^{\circ}C$	$\Delta T_{1/2,m}/^{\circ}C$	$\Delta H_m/mJ mol^{-1}$	$T_{onset,p}/^{\circ}C$	$T_p/^{\circ}C$	$\Delta T_{1/2,p}/^{\circ}C$	$\Delta H_p/mJ mol^{-1}$
DPPC	-	40.4	41.2	1.34	324.4	33.5	35.8	2.07	36.7
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.01	39.2	40.6	1.42	272.7	28.4	30.2	2.48	18.8
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.05	30.4	35.8	4.35	238.7	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.1	32.2	35.2	2.80	245.3	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.2	35.1	37.9	2.59	345.8	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.3	35.7	37.5	1.81	183.1	-	-	-	-

Πίνακας 6.4.2 Θερμοτροπικές παράμετροι δευτερεύουσας κορυφής που υπολογίστηκαν κατά την θέρμανση DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε νερό καθαρότητας HPLC, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων δισυσταδικού συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{70:30}.

Δείγματα σε Νερό HPLC	Μοριακή Αναλογία	$T_{onset,s}/^{\circ}C$	$T_s/^{\circ}C$	$\Delta T_{1/2,s}/^{\circ}C$	$\Delta H_s/mJ mol^{-1}$
DPPC	-	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.01	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.05	22.0	29.7	n.d.	75.4
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.1	21.9	25.7	5.10	78.2
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.2	21.8	26.4	5.27	85.7
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.3	21.8	25.7	4.98	83.4

Εξετάζοντας τις μεταβολές των θερμοδυναμικών παραμέτρων της κύριας μετάπτωσης που προκύπτουν από την αύξηση της ποσότητας του PNIPAM-b-PAA_{70:30} στο μείγμα λιπιδίων-συμπολυμερούς, φαίνεται πως το σύστημα φαίνεται πως μία διφασική συμπεριφορά. (Σχήμα 6.4.1). Επίσης σε αντίθεση με τα θερμογράμματα του PNIPAM-b-PAA_{50:50}, η κύρια κορυφή στερείται της παρουσίας, υψηλότερης θερμοκρασίας ώμων, κάτι που πιθανότατα υποδεικνύει

την ελάττωση της ισχύος της αλληλεπίδρασης του πολυμερούς με τις πολικές ομάδες κεφαλής της μεμβρανικής επιφάνειας.



Σχήμα 6.4.1 Καμπύλες DSC κατά την θέρμανση DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε νερό καθαρότητας HPLC, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{70:30}. Μοριακές αναλογίες DPPC:PNIPAM-b-PAA/2 a. 9:0, b. 9:0.01, c. 9:0.05 d. 9:0.1, e. 9:0.2 και f. 9:0.3. Οι ενδόθερμες τιμές ροής θερμότητας έχουν κανονικοποιηθεί ως προς το βάρος του δείγματος.

Μικρή ποσότητα συμπολυμερούς και σε αναλογία 9:0.01 καθιστά την κορυφή της κύριας μετάπτωσης περισσότερο ευρεία, διατηρώντας όμως την συμμετρία της. Με επιπλέον προσθήκη PNIPAM-b-PAA_{50:50}, η κορυφή εμφανίζεται έντονα διαταραγμένη, ασύμμετρη και έντονα διαπλατυσμένη, λόγω της ανάπτυξης μίας νέας κορυφής υπό μορφή ενός μεγάλου εύρους ώμου, χαμηλής θερμοκρασίας. Σταδιακά ο εν λόγω ώμος αρχίζει να μετατοπίζεται προς χαμηλότερες θερμοκρασίες, να αυξάνει σε εμβαδό, να γίνεται πιο οξύς και να διαχωρίζεται από την κύρια κορυφή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την προοδευτική βελτίωση της συμμετρίας της κύριας κορυφής και την μείωση του εύρους της, όπως προκύπτει από τις τιμές ($\Delta T_{1/2,m}$) του Πίνακα 6.4.2. Στην μοριακή αναλογία 9:0.3 DPPC-πολυμερούς, ο ώμος εμφανίζεται

πλέον ως μία διακριτή κορυφή με ενθαλπική μεταβολή $\Delta H_s=83.4 \text{ mJ mol}^{-1}$ και θερμοκρασία μετάβασης $T_s=25.7 \text{ }^\circ\text{C}$.

Καθώς το πολυμερικό περιεχόμενο των διπλοστοιβάδων αυξάνεται, η θερμοκρασία της κύριας μετάβασης (T_m) και η θερμοκρασία στην οποία ξεκινά το θερμικό συμβάν ($T_{\text{onset},m}$), ελαττώνονται προοδευτικά ως και την μοριακή αναλογία 9:0.1, όπου και προσεγγίζουν τις τιμές $35.3 \text{ }^\circ\text{C}$ και $32.0 \text{ }^\circ\text{C}$ αντίστοιχα, υποδεικνύοντας αύξηση της μεμβρανικής ρευστότητας (Pantusa, et al., 2007), πιθανότατα λόγω της εις βάθος εισχώρησης τμήματος του PNIPAM-b- $\text{PAA}_{70:30}$ στο εσωτερικό των διπλοστοιβάδων. Με προσθήκη μεγαλύτερων ποσοτήτων η συμπεριφορά αυτή αντιστρέφεται, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση των χαρακτηριστικών θερμοκρασιών της μετάβασης προς τα δεξιά, ακολουθώντας την τάση για διαχωρισμό μεταξύ ώμου-κορυφής (**Σχήμα 6.4.1**). Η T_m για τις μοριακές αναλογίες 9:0.2 και 9:0.3 διαμορφώνονται σε $37.9 \text{ }^\circ\text{C}$ και $37.5 \text{ }^\circ\text{C}$ αντίστοιχα.

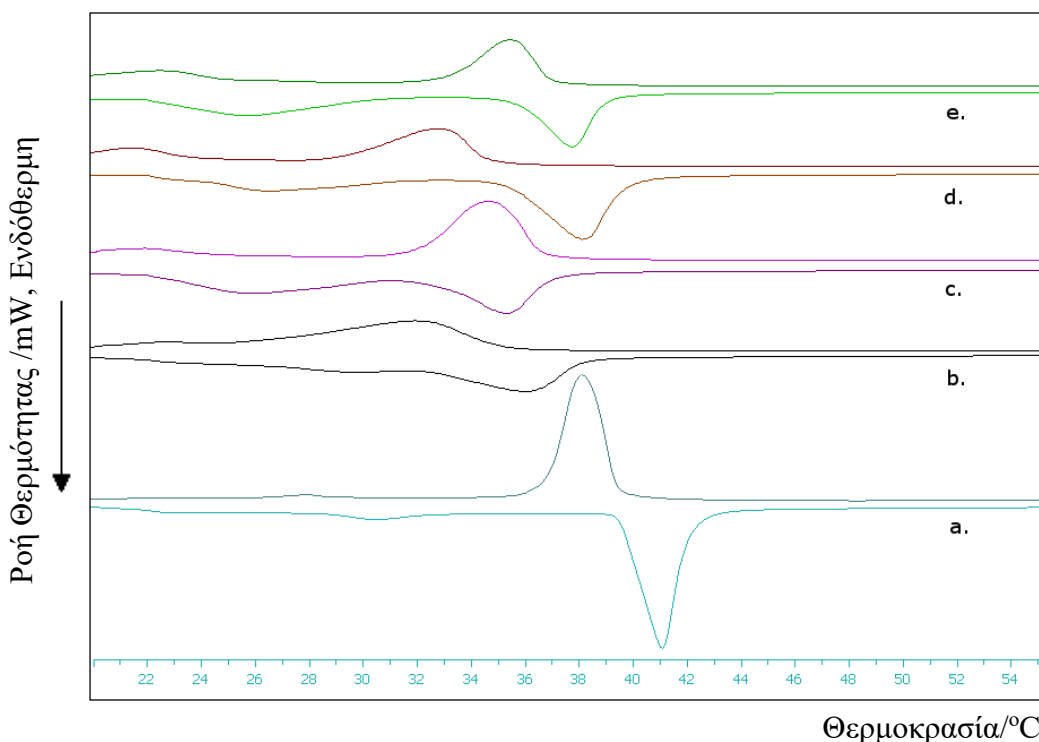
Η μεταβολή της ενθαλπίας κατά την κύρια μετάπτωση στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση, φαίνεται πως επηρεάζεται έντονα από την παρουσία του ώμου, αλλά ακολουθεί και αυτή το διαφασικό μοντέλο. Μέχρι και την αναλογία 9:0.05 μειώνεται προοδευτικά με την αύξηση της ποσότητας του πολυμερούς, φαινόμενο το οποίο αντιστρέφεται στις με περαιτέρω προσθήκη PNIPAM-b- $\text{PAA}_{70:30}$. Στην μοριακή αναλογία όπου έχει επέλθει ο πλήρης διαχωρισμός μεταξύ κορυφής κύριας μετάπτωσης και ώμου, η ενθαλπική μεταβολή κατά την τήξη της διπλοστοιβάδας εμφανίζεται ελαφρώς μειωμένη.

Η συνύπαρξη ώμου-κορυφής σε υψηλές μοριακές αναλογίες πολυμερούς αποτελεί ένδειξη για διαχωρισμό φάσεων εντός της μεμβράνης και ως εκ τούτου η διπλοστοιβάδα μπορεί να περιγράψει ως ένα μείγμα δύο διαφορετικών φάσεων (Bonora, et al., 2003).

Η αύξηση στην τιμή της ενθαλπικής μεταβολής σε συνδυασμό με την εμφάνιση μίας νέας φάσης υψηλής συνεργασιμότητας, όπως φαίνεται από τις τιμές ($\Delta T_{1/2,s}$), υποδεικνύει την σταθεροποίηση της φάσης της γέλης σε μεγάλες αναλογίες συμπολυμερούς συγκριτικά με μικρότερες ποσότητες. Σταθεροποίηση που μπορεί οφείλεται σε μία φάση ενδοεισχώρησης.

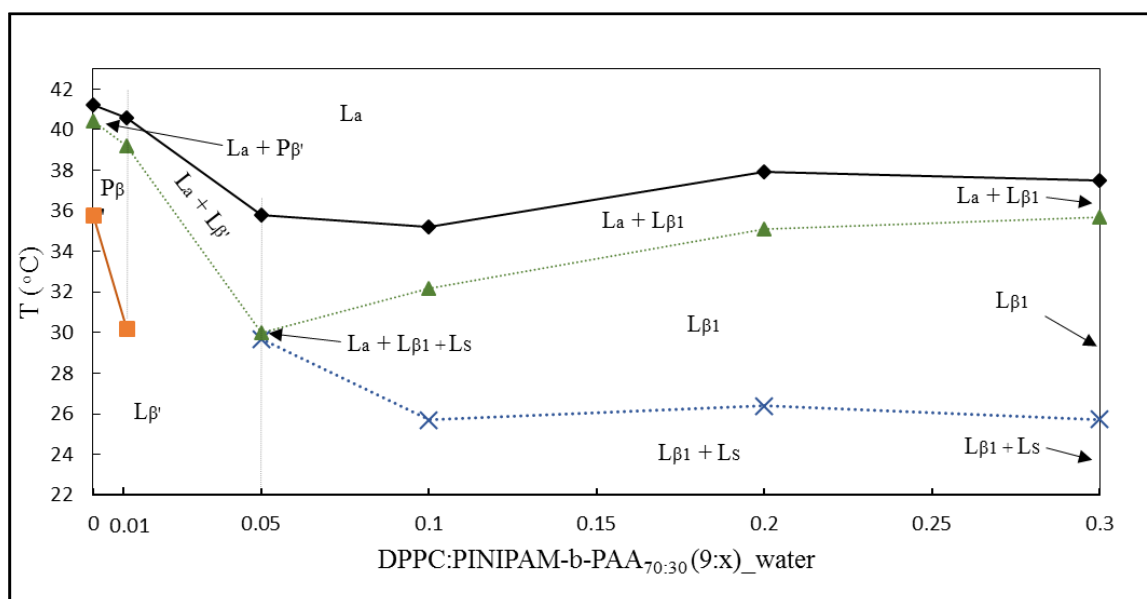
Παρατηρώντας τα θερμογράμματα που ελήφθησαν κατά την ψύξη των διπλοστοιβάδων, όπως απεικονίζονται στο **Σχήμα 6.4.2**, βλέπουμε πως στις αναλογίες 9:0.01 και 9:0.3 οι κύριες κορυφές επανεμφανίστηκαν με μια δικαιολογημένη υστέρηση της τάξης των 2°C περίπου, ενώ στην αναλογία 9:0.1 η υστέρηση αυτή είναι ακόμα μικρότερη. Στην αναλογία 9:0.05 η κύρια κορυφή εμφανίζει μεγάλη υστέρηση, η οποία πιθανότατα οφείλεται στην συνύπαρξη της με μία φάση ενδοεισχώρησης που αντιστοιχεί στον μεγάλο εύρους ώμο σε χαμηλότερη θερμοκρασία.

Μεγάλη υστέρηση εμφανίζεται και στην 9:0.02 αναλογία (της τάξης των 4.95 °C). Επίσης στις αναλογίες 9:0.05, 9:0.1 και 9:0.2 οι κορυφές που εμφανίζονται κατά τη θέρμανση υπό τη μορφή ώμων χαμηλότερης θερμοκρασίας, εμφανίζονται κατά την ψύξη ως διακριτές κορυφές και εμφανίζουν υστέρηση μεγαλύτερη των 3.7 °C. Το γεγονός αυτό ισχυροποιεί την υπόθεση ότι οι κορυφές αυτές αντικατοπτρίζουν την ανάπτυξη μίας φάσης ενδοεισχώρησης, που συνυπάρχει με την φάση γέλης και σε κάποιες αναλογίες και με την υγρή κρυσταλλική φάση.



Σχήμα 6.4.2 Καμπύλες DSC θέρμανσης-ψύξης DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε νερό καθαρότητας HPLC, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{70:30}. Μοριακές αναλογίες DPPC:PNIPAM-b-PAA_{70:30} a. 9:0.01, b. 9:0.05, c. 9:0.1 d. 9:0.2 και e. 9:0.3.

Πράγματι, η κατάργηση της προμετάπτωσης, η εμφάνιση μικρής ενθαλπίας κορυφών σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από την κύρια μετάπτωση, η κατάργηση της προμετάπτωσης, η διφασική φύση συνολικά της μετάβασης και κυρίως η εμφάνιση μεγάλης υστέρησης αποτελούν σημαντικές ενδείξεις για την ύπαρξη του φαινομένου της ενδοεισχώρησης στη διπλοστοιβάδα του DPPC παρουσία του PNIPAM-b-PAA_{70:30} (Smith & Dea, 2013; Pippa, et al., 2015; Smith & Dea, 2013).



Σχήμα 6.4.3 Διάγραμμα φάσεων DPPC διπλοστοιβάδων ενυδατωμένων σε νερό καθαρότητας HPLC, συναρτήσει της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης του PNIPAM-b-PAA_{70:30}. Θερμοκρασία προμετάπτωσης από τη φάση γέλης L_{β'} στη ρυτιδωμένη φάση P_β (—■—), θερμοκρασία εκκίνησης Tonset της μετάπτωσης στην υγρή κρυσταλλική φάση L_α (···▲···), θερμοκρασία κύριας μετάπτωσης στην υγρή κρυσταλλική φάση L_α (—◆—), θερμοκρασία μετάπτωσης της φάσης γέλης L_s (···x···) που εμφανίζεται ως ώμος στην κύρια κορυφή.

Στο **Σχήμα 6.4.3** απεικονίζεται το διάγραμμα φάσεων των ενυδατωμένων σε νερό καθαρότητας HPLC διπλοστοιβάδων DPPC παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης PNIPAM-b-PAA_{70:30}, το οποίο έχει κατασκευαστεί με βάση τις θερμοκρασίες μετάπτωσης των διαφόρων φάσεων που παρατηρούνται στα αντίστοιχα θερμογράμματα. Οι διπλοστοιβάδες παρουσία του συμπολυμερούς στη μικρότερη μοριακή αναλογία (9:0.01) μεταπίπτουν με την αύξηση της θερμοκρασίας από τη φάση γέλης L_{β'}, στην υγρή κρυσταλλική φάση L_α με τη μεσολάβηση της ρυτιδωμένης φάσης P_β. Οι φάσεις P_β και L_α συνυπάρχουν σε στενό εύρος θερμοκρασιών. Στις μεγαλύτερες μοριακές αναλογίες συμπολυμερούς όπως καταδεικνύει η εξαφάνιση της κορυφής της προμετάπτωσης η ρυτιδωμένη φάση παύει να υφίσταται, ενώ παράλληλα μία νέα φάση L_s (πιθανότατα φάση ενδοεισχώρησης) εμφανίζεται. Έτσι στη μοριακή αναλογία 9:0.05 ως προς PNIPAM-b-PAA_{70:30}, οι διπλοστοιβάδες με την αύξηση της θερμοκρασίας μεταπίπτουν πιθανότατα από ένα μείγμα φάσεων γέλης (της L_s και της L_{β1} που μάλλον διαφέρει από την L_{β'}) στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση ενώ οι τρεις αυτές φάσεις φαίνεται πως

συνυπάρχουν σε στενό θερμοκρασιακό εύρος. Στις μεγαλύτερες μοριακές αναλογίες συμπολυμερούς, όπως προκύπτει και από την τάση για διαχωρισμό μεταξύ της νέας και της κύριας κορυφής, οι διπλοστοιβάδες μεταπίπτουν προς την φάση $L_{\beta 1}$ και με περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση L_{α} . Σε αυτή την περίπτωση οι φάσεις $L_{\beta 1}$ και L_{α} συνυπάρχουν σε στενό εύρος θερμοκρασιών.

6.4.2 Αλατούχο διάλυμα Φωσφορικών (PBS) ως μέσο ενυδάτωσης

Οι πλήρως ενυδατωμένες σε Αλατούχο διάλυμα Φωσφορικών (PBS) διπλοστοιβάδες DPPC που φέρουν αυξανόμενες συγκεντρώσεις PNIPAM-b- PAA_{70:30} σαρώθηκαν στο εύρος θερμοκρασιών 20-60 °C με ταχύτητα σάρωσης 5 °C /min τόσο κατά τη θέρμανση όσο και κατά τη ψύξη. Τα θερμογράμματα που ελήφθησαν κατά του κύκλους θέρμανσης απεικονίζονται στο **Σχήμα 6.4.4**, ενώ οι αντίστοιχες θερμοδυναμικές παράμετροι παρουσιάζονται στους **Πίνακες 6.4.3 και 6.4.4**.

Πίνακας 6.4.3 Θερμοτροπικές παράμετροι κύριας μετάπτωσης και προμετάπτωσης που υπολογίστηκαν κατά την θέρμανση DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε διάλυμα PBS, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων δισυσταδικού συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{70:30}.

Δείγματα σε Διάλυμα PBS	Μοριακή Αναλογία	$T_{onset,m}/^{\circ}C$	$T_m/^{\circ}C$	$\Delta T_{1/2,m}/^{\circ}C$	$\Delta H_m/mJ mol^{-1}$	$T_{onset,p}/^{\circ}C$	$T_p/^{\circ}C$	$\Delta T_{1/2,p}/^{\circ}C$	$\Delta H_p/mJ mol^{-1}$
DPPC	-	40.5	41.3	1.14	212.8	33.7	35.9	2.11	16.3
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.01	39.9	40.9	1.56	397.6	30.4	34.0	3.66	23.7
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.05	38.1	39.8	1.65	267.2	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.1	35.5	38.4	2.66	279.7	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.2	33.9	36.9	2.70	279.5	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.3	35.3	37.5	2.13	215.7	-	-	-	-

Παρουσία του PNIPAM-b-PAA_{70:30} στις DPPC διπλοστοιβάδες που ενυδατώθηκαν σε PBS, η κορυφή της προμετάπτωσης τείνει να εξαφανιστεί· ανιχνεύτηκε μόνο κατά την θερμιδομέτρηση του συστήματος με την μικρότερη μοριακή αναλογία λιπιδίων–πολυμερούς (9:0.01). Συγκεκριμένα σε αυτήν την αναλογία η θερμοκρασία της μετάβασης στη ρυτιδωμένη φάση (P_{β}) μετατοπίζεται προς χαμηλότερες θερμοκρασίες ($T_p=34.0^{\circ}C$), ενώ η κορυφή εμφανίζεται έντονα διαπλατυσμένη λόγω της ανάπτυξης ενός ώμου σε χαμηλότερες θερμοκρασίες ($T_s\sim 28.5^{\circ}C$). Η μείωση της θερμοκρασίας της προμετάπτωσης (T_p) σε σχέση

με τις καθαρές DPPC που ενυδατώνονται σε PBS, σε αντιπαράβολή με την αυξημένη ενθαλπική μεταβολή ($\Delta H_p=23.7 \text{ J mol}^{-1}$), υποδεικνύουν την σταθεροποίηση της φάσης γέλης (L_β), ενώ η παράλληλη εμφάνιση του χαμηλής θερμοκρασίας ώμου, οφείλεται μάλλον στη συνύπαρξη δύο φάσεων εντός της διπλοστοιβάδας (Bonora, et al., 2003), πριν την πλήρη μετάβαση στην P_β φάση. Η μία εκ των οποίων είναι η φάση γέλης (L_β) ενώ η δεύτερη (L_s), πιθανότατα αντιστοιχεί στην φάση που αναπτύχθηκε κατά την ενυδάτωση των μεικτών συστημάτων σε νερό καθαρότητας HPLC. Μεγαλύτερες αναλογίες πολυμερούς, οδηγούν στην εξαφάνιση της προμετάπτωσης, ενώ παράλληλα ο ώμος λαμβάνει την μορφή μίας διακριτής πλέον κορυφής, η οποία μετατοπίζεται γραμμικά προς χαμηλότερες θερμοκρασίες σε συνάρτηση με την ποσότητα του PNIPAM-b- PAA_{70:30} (κατά 1.0 °C περίπου μεταξύ διαδοχικών αναλογιών) και προσεγγίζει τελικά τους 23.2 °C, στην μοριακή αναλογία 9:0.3. Η μεταβολή της ενθαλπίας αυξάνεται με την αύξηση της ποσότητας του συμπολυμερούς υποδεικνύοντας την σταθεροποίηση της νέας μετασταθερής φάσης, ενώ παράλληλα η κορυφή γίνεται όλο και πιο ευρεία

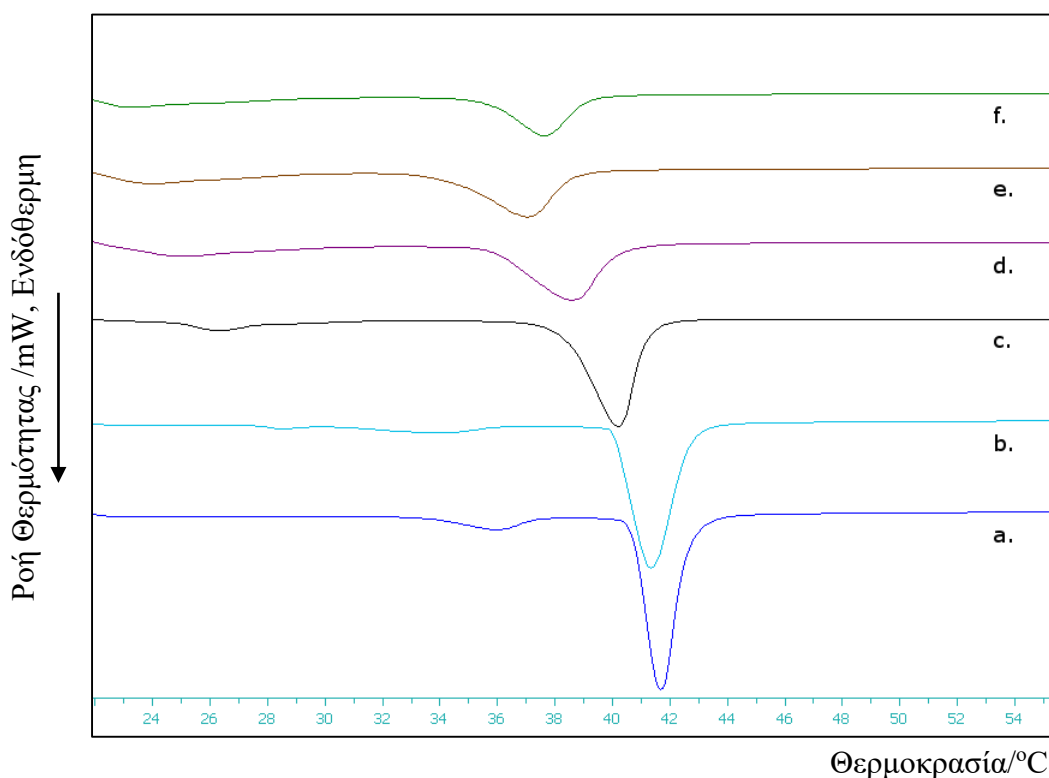
Πίνακας 6.4.4 Θερμοτροπικές παράμετροι δευτερεύουσας κορυφής που υπολογίστηκαν κατά την θέρμανση DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε διάλυμα PBS, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων δισυσταδικού συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{70:30}.

Δείγματα σε Διάλυμα PBS	Μοριακή Αναλογία	$T_{\text{onset, s}}/^\circ\text{C}$	$T_s/^\circ\text{C}$	$\Delta T_{1/2, s}/^\circ\text{C}$	$\Delta H_s/\text{mJ mol}^{-1}$
DPPC	-	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.01	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.05	24.6	26.1	2.06	26.9
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.1	22.4	25.0	3.85	38.5
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.2	21.9	23.8	4.23	46.1
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.3	21.9	23.2	4.39	42.5

Αναφορικά με τις μεταβολές που υφίσταται η κύρια κορυφή των ενυδατωμένων σε PBS, διπλοστοιβάδων, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων PNIPAM-b-PAA_{70:30}, φαίνεται ότι αυτές συντελούνται με ομαλότερο τρόπο σε σχέση με τα συστήματα που ενυδατώθηκαν σε νερό HPLC. Οι κορυφές κύριας μετάπτωσης δεν αλληλεπικαλύπτονται με τις σταδιακά αναπτυσσόμενες κορυφές χαμηλότερων θερμοκρασιών με επακόλουθο, σε όλες τις αναλογίες οι κορυφές εμφανίζονται περισσότερο συμμετρικές και οξείες. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει

και από την σύγκριση μεταξύ των τιμών $\Delta T_{1/2,m}$, (Πίνακες 6.4.1 και Πίνακας 6.4.36.4.3) γεγονός που υποδεικνύει την αυξημένη συνεργατικότητα των διπλοστοιβάδων κατά την μετάβαση τους στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση στο PBS σε σχέση με το νερό καθαρότητας HPLC. Οι διαφοροποιήσεις αυτές είναι πιθανό να οφείλονται στο αυξημένο pH και την παρουσία ιόντων στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών.

Επιπροσθέτως αξίζει να σημειωθεί ότι και σε αυτή την αλληλουχία πειραμάτων, οι κύριες κορυφές και ιδιαίτερα αυτές που αντιστοιχούν στα μείγματα με τις χαμηλότερες περιεκτικότητες συμπολυμερούς, στερούνται ανάπτυξης ώμων υψηλότερης θερμοκρασίας, πιθανότατα λόγω της ελαττωμένης επιφανειακής αλληλεπίδρασης πολυμερούς-διπλοστοιβάδας, ως συνέπεια της μείωσης της συστάδας του πολύ(ακρυλικού οξέος).



Σχήμα 6.4.4 Καμπύλες DSC κατά την θέρμανση DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε διάλυμα PBS, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{70:30}. Μοριακές αναλογίες DPPC:PNIPAM-b-PAA_{70:30} a. 9:0, b. 9:0.01, c. 9:0.05 d. 9:0.1, e. 9:0.2 και f. 9:0.3. Οι ενδόθερμες τιμές ροής θερμότητας έχουν κανονικοποιηθεί ως προς το βάρος του δείγματος.

Με την αύξηση της ποσότητας του PNIPAM-b-PAA_{70:30} στις διπλοστοιβάδες, μέχρι και την αναλογία 9:0.2, οι χαρακτηριστικές θερμοκρασίες της κύριας μετάπτωσης, T_m και

$T_{\text{onset,m}}$, μετατοπίζονται προοδευτικά προς χαμηλότερες τιμές προσεγγίζοντας εν τέλει τους 36.9°C και 33.9°C αντίστοιχα και παράλληλα οι κορυφές διευρύνονται. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν την βαθμιαία ρευστοποίηση της μεμβράνης συναρτήσει της μοριακής αναλογίας του συμπολυμερούς, που συνοδεύεται από αντίστοιχη μείωση της συνεργατικότητας κατά την κύρια μετάπτωση της. Η τάση αυτή αντιστρέφεται με επιπλέον προσθήκη PNIPAM-b-PAA_{70:30} και έτσι στην αναλογία 9:0.3, και σε σύγκριση με την αμέσως μικρότερη περιεκτικότητα, η θερμοκρασία κύριας μετάβασης φάσης και η θερμοκρασία έναρξης του θερμικού συμβάντος εμφανίζονται ελαφρώς αυξημένες ($T_m=37.5^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{onset,m}}=35.3^{\circ}\text{C}$). Το εύρος της αντίστοιχης κορυφής επίσης μειώνεται, όπως φαίνεται και από τις τιμές του $\Delta T_{1/2m}$, καθιστώντας την κορυφή περισσότερο οξεία και την μεμβράνη περισσότερο σταθερή.

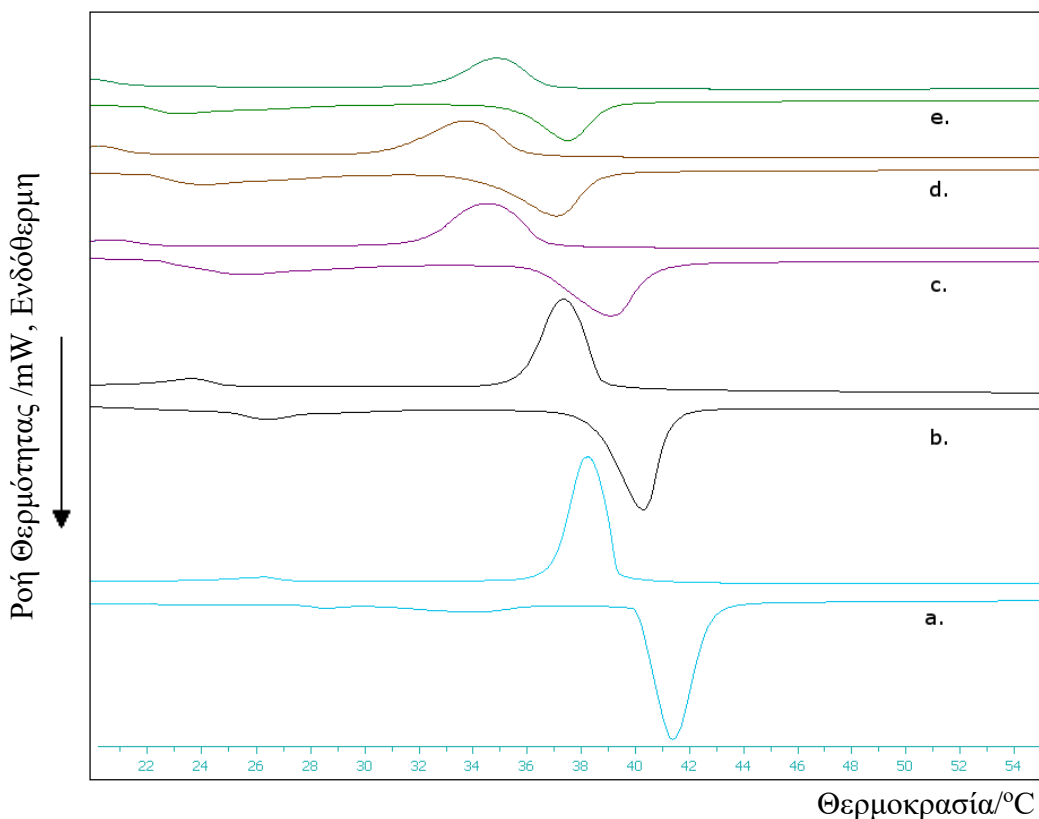
Σχετικά με την μεταβολή της ενθαλπίας της κύριας μετάβασης, αυτή εμφανίζεται αρκετά αυξημένη στην αναλογία 9:0.01, συγκριτικά με τις καθαρές DPPC διπλοστοιβάδες. Περαιτέρω αύξηση της περιεκτικότητας των μεμβρανών σε συμπολυμερές επιφέρει την προοδευτική ελάττωσή της, που πιθανότατα οφείλεται στην βαθμιαία ανάπτυξη της νέας κορυφής σε βάρος της κύριας μετάπτωσης

Κάτι που θα πρέπει επίσης να τονιστεί είναι πως η μεταβολή στη θερμοτροπική συμπεριφορά των DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων τόσο σε νερό HPLC όσο και σε διάλυμα PBS, που προκαλεί η εισαγωγή του PNIPAM-b-PAA_{70:30}, στην μεγαλύτερη δυνατή αναλογία (9:0.3) οδηγεί σε σχεδόν όμοια θερμογράμματα (**Σχήμα 6.4.4 και 6.4.1**). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει πως καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυμερούς, η επιρροή της φύσης του μέσου ενυδάτωσης στον τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρούν το συμπολυμερές με τις διπλοστοιβάδες, υποβαθμίζεται.

Παρατηρώντας τα θερμογράμματα που ελήφθησαν κατά την ψύξη των διπλοστοιβάδων, όπως απεικονίζονται στο **Σχήμα 6.4.5**, βλέπουμε ότι οι κορυφές κύριας μετάπτωσης δεν παρουσιάζουν στις περισσότερες αναλογίες σημαντική υστέρηση. Πλην της αναλογίας 9:0.1 για την οποία η υστέρηση είναι της τάξης των 3.2°C , σε όλες τις άλλες περιπτώσεις κυμαίνονται σε φυσιολογικά επίπεδα.

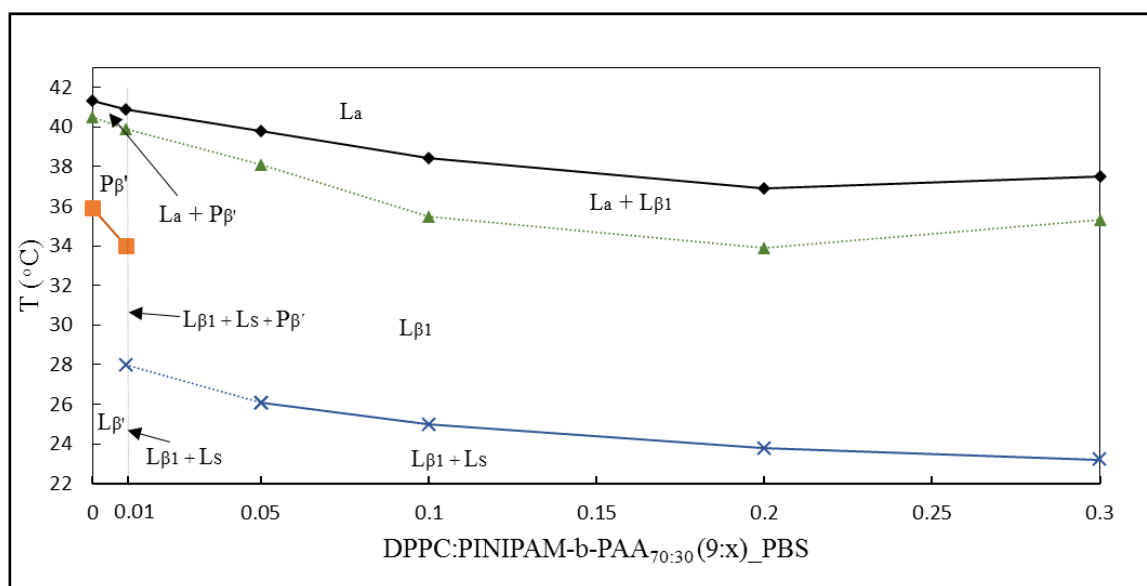
Στις αναλογίες που εμφανίστηκαν κορυφές χαμηλής θερμοκρασίας (9:0.1-9:0.3), κατά την ψύξη των δειγμάτων, εμφανίζουν υστέρηση σίγουρα μεγαλύτερη των 3°C , που δεν είναι δυνατό να υπολογιστεί με ακρίβεια καθώς εντοπίζονται στα όρια του εύρους θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάλυση. Επίσης στις αναλογίες 9:0.05, 9:0.1 και 9:0.2 οι κορυφές που εμφανίζονται κατά τη θέρμανση υπό τη μορφή ώμων χαμηλότερης θερμοκρασίας, εμφανίζονται κατά την ψύξη ως διακριτές κορυφές και εμφανίζουν υστέρηση μεγαλύτερη των 3.7°C . Το γεγονός αυτό ισχυροποιεί την υπόθεση ότι οι κορυφές αυτές

αντικατοπτρίζουν την ανάπτυξη μίας φάσης ενδοεισχώρησης, που συνυπάρχει με την φάση γέλης και σε κάποιες αναλογίες και με την υγρή κρυσταλλική φάση.



Σχήμα 6.4.5 Καμπύλες DSC θέρμανσης-ψύξης DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε διάλυμα PBS, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{70:30}. Μοριακές αναλογίες DPPC:PNIPAM-b-PAA_{70:30} a. 9:0.01, b. 9:0.05, c. 9:0.1 d. 9:0.2 και e. 9:0.3.

Και στα συστήματα DPPC:PNIPAM-b-PAA_{70:30} που ενυδατώθηκαν με PBS, η κατάργηση της προμετάπτωσης, η εμφάνιση μικρής ενθαλπίας κορυφής σε θερμοκρασίες χαμηλότερες της κύριας μετάπτωσης, οι αυξημένες τιμές της ενθαλπίας και η εμφάνιση υστέρησης των αναπτυσσόμενων κορυφών ενισχύουν την υπόθεση ότι η παρουσία του πολυμερούς προκαλεί την εμφάνιση μιας φάσης ενδοεισχώρησης στη διπλοστοιβάδα του DPPC, που προκύπτει λόγω της παρουσίας υψηλών ποσοτήτων συμπολυμερούς (Smith & Dea, 2013; Pírpa , et al., 2015).



Σχήμα 6.4.6 Διάγραμμα φάσεων DPPC διπλοστοιβάδων ενυδατωμένων σε διάλυμα PBS, συναρτήσει της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης του PNIPAM-b-PAA_{70:30}. Θερμοκρασία προμετάπτωσης από τη φάση γέλης $L_{\beta'}$ στη ρυτιδωμένη φάση $P_{\beta'}$ (—■—), θερμοκρασία εκκίνησης Tonset της μετάπτωσης στην υγρή κρυσταλλική φάση L_{α} (···▲···), θερμοκρασία κύριας μετάπτωσης στην υγρή κρυσταλλική φάση L_{α} (—◆—), θερμοκρασία μετάπτωσης της υγρής κρυσταλλικής φάσης L_s (···x···) που εμφανίζεται ως ώμος στην προμετάπτωση ή ως διακριτή κορυφή (—x—).

Στο **Σχήμα 6.4.6** απεικονίζεται το διάγραμμα φάσεων των ενυδατωμένων σε διάλυμα PBS διπλοστοιβάδων DPPC παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης PNIPAM-b-PAA_{70:30}, το οποίο έχει κατασκευαστεί με βάση τις θερμοκρασίες μετάπτωσης των διαφόρων φάσεων που παρατηρούνται στα αντίστοιχα θερμογράμματα. Σε αυτή την περίπτωση οι διπλοστοιβάδες παρουσία του συμπολυμερούς στη μικρότερη μοριακή αναλογία (9:0.01), με την αύξηση της θερμοκρασίας μεταπίπτουν πιθανότατα από ένα μείγμα δύο διαφορετικών φάσεων γέλης (της L_s και της $L_{\beta 1}$) στην ρυτιδωμένη φάση $P_{\beta'}$. Οι τρεις αυτές φάσεις πιθανότατα συνυπάρχουν σε στενό εύρος θερμοκρασιών. Κατόπιν, η μεμβράνη μεταπίπτει στην υγρή κρυσταλλική φάση L_{α} . Στις μεγαλύτερες μοριακές αναλογίες συμπολυμερούς από 9:0.05 έως 9:0.3, οι διπλοστοιβάδες μεταπίπτουν με την αύξηση της θερμοκρασίας από το μείγμα φάσεων γέλης στη φάση γέλης $L_{\beta 1}$ και έπειτα στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση, χωρίς τη μεσολάβηση της ρυτιδωμένης φάσης. Οι φάσεις $L_{\beta 1}$ και L_{α} συνυπάρχουν σε στενό θερμοκρασιακό εύρος.

6.4.3 Διάλυμα υδροχλωρικού οξέως ως μέσο ενυδάτωσης

Οι πλήρως ενυδατωμένες σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέως pH 4.5 διπλοστοιβάδες DPPC που φέρουν αυξανόμενες συγκεντρώσεις PNIPAM-b-PAA_{70:30} σαρώθηκαν στο εύρος θερμοκρασιών 20-60 °C με ταχύτητα σάρωσης 5 °C /min τόσο κατά τη θέρμανση, όσο και κατά τη ψύξη. Τα θερμογράμματα που ελήφθησαν κατά τους κύκλους θέρμανσης απεικονίζονται στο **Σχήμα 6.4.7**, ενώ οι αντίστοιχες θερμοδυναμικές παράμετροι παρουσιάζονται στους **Πίνακες 6.4.5 και 6.4.6**.

Διπλοστοιβάδες αποτελούμενες μόνο από DPPC ενυδατωμένες σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5, όπως έχει επισημανθεί, παρουσιάζουν ελαφρώς διαφορετικό θερμοτροπισμό. Σε σύγκριση με τα άλλα δύο μέσα η μεμβράνη ρευστοποιείται ασθενώς, προκαλώντας αντίστοιχες μεταβολές στις κορυφές των θερμογραμμάτων.

Πίνακας 6.4.5 Θερμοτροπικές παράμετροι κύριας μετάπτωσης και προμετάπτωσης που υπολογίστηκαν κατά την θέρμανση DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων δισυσταδικού συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{70:30}.

Δείγματα σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5	Μοριακή Αναλογία	T _{onset,m} /°C	T _m /°C	ΔT _{1/2,m} /°C	ΔH _m /mJ mol ⁻¹	T _{onset,p} /°C	T _p /°C	ΔT _{1/2,p} /°C	ΔH _p /mJ mol ⁻¹
DPPC	-	39.0	40.4	1.34	194.0	28.0	30.5	3.10	4.2
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.01	40.4	41.2	1.34	378.2	32.4	34.3	2.57	21.1
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.05	37.0	39.2	2.01	308.5	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.1	35.0	37.6	2.31	373.3	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.2	35.2	37.5	2.17	275.3	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.3	36.3	38.3	1.92	341.3	-	-	-	-

Η εισαγωγή μικρής ποσότητας PNIPAM-b-PAA_{70:30}, και σε μοριακή αναλογία 9:0.01 ως προς DPPC, έχει ως αποτέλεσμα την μετατόπιση της κορυφής της προμετάπτωσης σε υψηλότερη κατά 4 °C περίπου θερμοκρασία (T_p=34.3 °C), συγκριτικά με την T_p των καθαρά φωσφολιπιδικών διπλοστοιβάδων. Παράλληλα η κορυφή εμφανίζεται περισσότερο οξεία, μικρότερου εύρους και μεγαλύτερης ενθαλπικής μεταβολής. Η συμπεριφορά αυτή αποτελεί ένδειξη για την σταθεροποίηση της ρυτιδωμένης φάσης (P_β), στην οποία η μεμβράνη μεταπίπτει μέσω μίας περισσότερο «συνεργατικής» μετάβασης φάσης. Με περαιτέρω αύξηση της ποσότητας του συμπολυμερούς και σε αναλογία ίση ή μεγαλύτερη από 9:0.05, η

προμετάπτωση καθίσταται ουσιαστικά μη ανιχνεύσιμη, ενώ παράλληλα εμφανίζεται μία νέα κορυφή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Η νέα αυτή κορυφή στην αναλογία 9:0.05 παρουσιάζει θερμοκρασία μετάβασης φάσης στους $T_s=27.8$ °C και ενθαλπική μεταβολή της τάξης των $\Delta H_s=21.1$ mJ mol⁻¹. Με επιπλέον προσθήκη PNIPAM-b-PAA_{70:30}, η T_s μετατοπίζεται και σταθεροποιείται γύρω από τους 26.0 °C, ενώ αντίθετα η μεταβολή της ενθαλπίας κατά την μετάβαση φάσης αυξάνεται σημαντικά συναρτήσει της περιεκτικότητας της μεμβράνης σε πολυμερές.

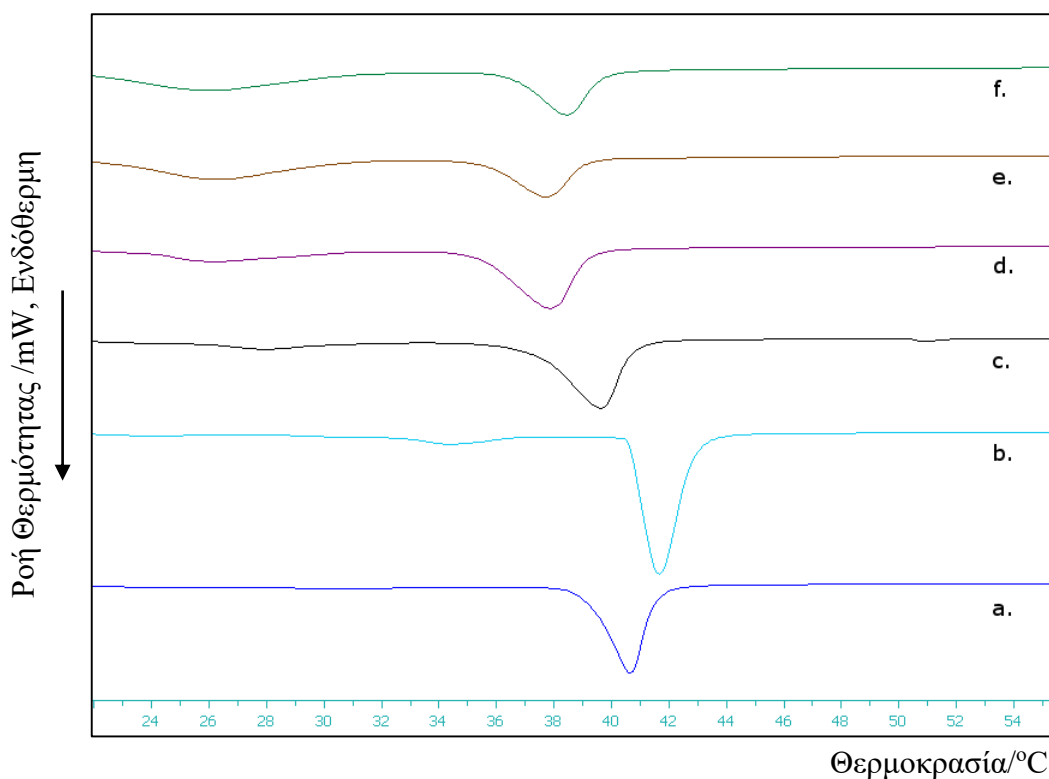
Πίνακας 6.4.6 Θερμοτροπικές παράμετροι δευτερεύουσας κορυφής που υπολογίστηκαν κατά την θέρμανση DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων δισυσταδικού συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{70:30}.

Δείγματα σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5	Μοριακή Αναλογία	$T_{onset,s}/^{\circ}C$	$T_s/^{\circ}C$	$\Delta T_{1/2,s}/^{\circ}C$	$\Delta H_s/mJ\ mol^{-1}$
DPPC	-	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.01	-	-	-	-
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.05	22.4	27.8	3.0	27.1
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.1	23.7	26.0	4.20	54.7
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.2	22.3	26.2	4.74	100.9
DPPC:PNIPAM-PAA _{70:30}	9:0.3	21.9	25.9	5.42	117.5

Φαίνεται λοιπόν πως, η νέα μετασταθερή φάση που σχηματίστηκε σταθεροποιείται αυξανόμενης της ποσότητας του PNIPAM-b-PAA_{70:30}. Το μεγάλο εύρος στο ήμισυ της κορυφής ($\Delta T_{1/2,s}$) όπως φαίνεται στον **Πίνακα 6.4.6**, υποδεικνύει τέλος πλάγιο διαχωρισμό φάσεων που πιθανότατα οφείλεται στην συνύπαρξη δύο διαφορετικών φάσεων εντός της διπλοστοιβάδας πριν την κύρια μετάβαση φάσης, γεγονός που παρατηρήθηκε και στις μεμβράνες που ενυδατώθηκαν στα δύο προηγούμενα μέσα. Η μία φάση που εμφανίζεται πιθανότατα αντιστοιχεί στις μετασταθερές φάσεις (L_s) που αναπτύχθηκαν και στα ενυδατωμένα σε νερό HPLC και σε PBS μεικτά συστήματα, ενώ η δεύτερη πιθανότατα αντιστοιχεί σε μία φάση γέλης (L_β).

Όσον αφορά την κύρια μετάπτωση, η παρουσία του πολυμερούς στην μικρότερη αναλογία που μελετήθηκε (9:0.01) και σε σύγκριση με τις διπλοστοιβάδες που αποτελούνται μόνο από DPPC, προκαλεί αύξηση της θερμοκρασίας κύριας μετάπτωσης κατά περίπου 1 °C

($T_m=41.2\text{ }^\circ\text{C}$), διπλασιασμό της ενθαλπίας της μετάβασης (ΔH_m), ενώ παράλληλα η κορυφή καθίσταται περισσότερο οξεία και συμμετρική. Επιβεβαιώνεται λοιπόν η τάση προς σταθεροποίηση της μεμβράνης στην συγκεκριμένη αναλογία πολυμερούς και η αύξηση της συνεργατικότητας της κατά την κύρια μετάπτωση.

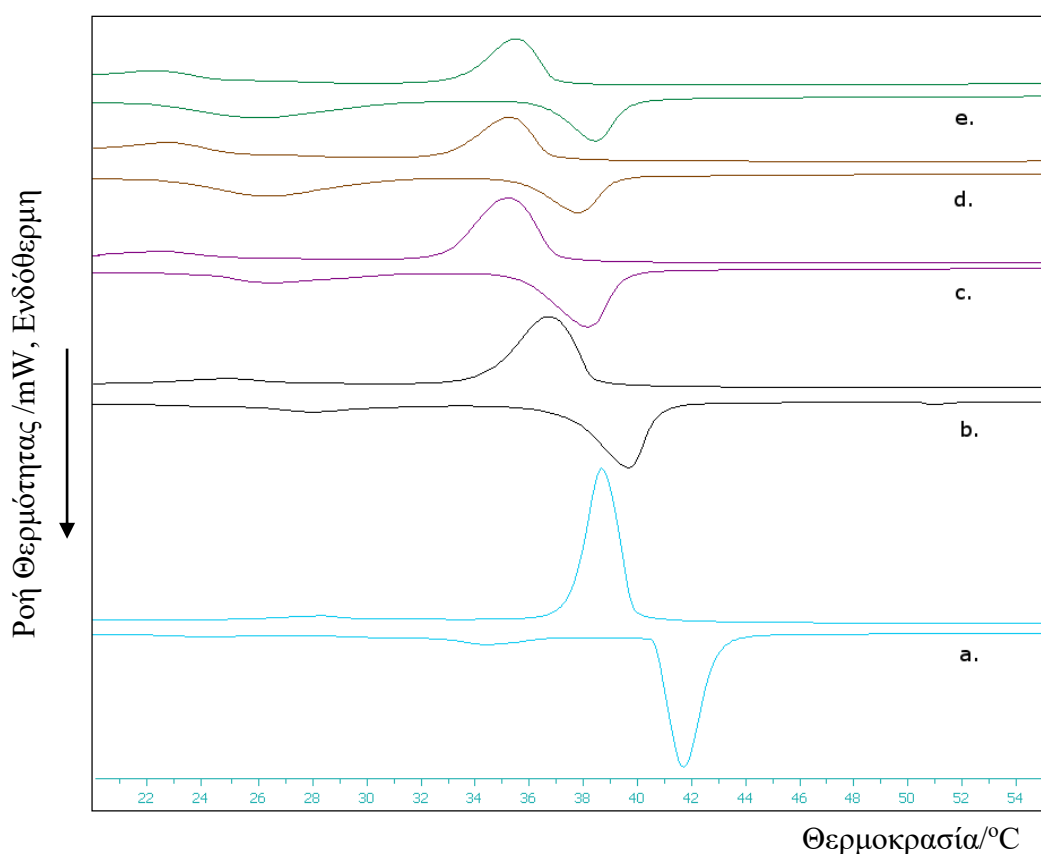


Σχήμα 6.4.7 Καμπύλες DSC κατά την θέρμανση DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{70:30}. Μοριακές αναλογίες DPPC:PNIPAM-b-PAA_{70:30} a. 9:0, b. 9:0.01, c. 9:0.05 d. 9:0.1, e. 9:0.2 και f. 9:0.3. Οι ενδόθερμες τιμές ροής θερμότητας έχουν κανονικοποιηθεί ως προς το βάρος του δείγματος.

Αυξανόμενης της ποσότητας του PNIPAM-b-PAA_{70:30}, στις διπλοστοιβάδες που ενυδατώθηκαν σε pH 4.5 (πλέον της μοριακής αναλογίας 9:0.01), οι θερμοδυναμικές παράμετροι της κύριας μετάβασης φαίνεται πως μεταβάλλονται ακολουθώντας και σε αυτήν την περίπτωση ένα διφασικό μοντέλο. Συγκεκριμένα ως και την μοριακή αναλογία 9:0.1, οι χαρακτηριστικές θερμοκρασίες της κύριας μετάπτωσης, T_m και $T_{onset,m}$, μετατοπίζονται προοδευτικά προς χαμηλότερες τιμές, προσεγγίζοντας εν τέλει τους $37.6\text{ }^\circ\text{C}$ και $35.0\text{ }^\circ\text{C}$ αντίστοιχα, υποδεικνύοντας ρευστοποίηση της μεμβράνης. Παράλληλα οι κορυφές διευρύνονται και εμφανίζονται λιγότερο οξείες και συμμετρικές, ως αποτέλεσμα της

μειωμένης συνεργασιμότητας της μεμβράνης κατά την κύρια μετάπτωση ενώ η ενθαλπία μετάβασης μειώνεται. Στην αμέσως μεγαλύτερη αναλογία (9:0.2) δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές μεταβολές στις θερμοκρασίες και στο εύρος της κορυφής μετάπτωσης, υποδεικνύοντας κατά κάποιον τρόπο την σταθεροποίηση του θερμοτροπισμού των συστημάτων στις συγκεκριμένες αναλογίες. Η μόνη διαφορά εντοπίζεται στη συγκριτικά χαμηλότερη τιμή της ενθαλπίας μετάβασης, που σε αντιπαράβολή με την παράλληλη αύξηση της ενθαλπίας της δευτερεύουσας κορυφής, αποτελεί ένδειξη για σταθεροποίηση της νέας μετασταθερής φάσης (L_s) εις βάρος της φάσης γέλης (L_β).

Στα συστήματα με την μεγαλύτερη αναλογία σε PNIPAM-b-PAA_{70:30}, (9:0.3) η τάση αυτή αντιστρέφεται με αποτέλεσμα την ασθενή μετατόπιση της κύριας μετάπτωσης σε μεγαλύτερη θερμοκρασία ($T_m=38.3$ °C), που συνοδεύεται από σημαντική αύξηση της ενθαλπίας μετάβασης και παράλληλη μείωση του εύρους της κορυφής.

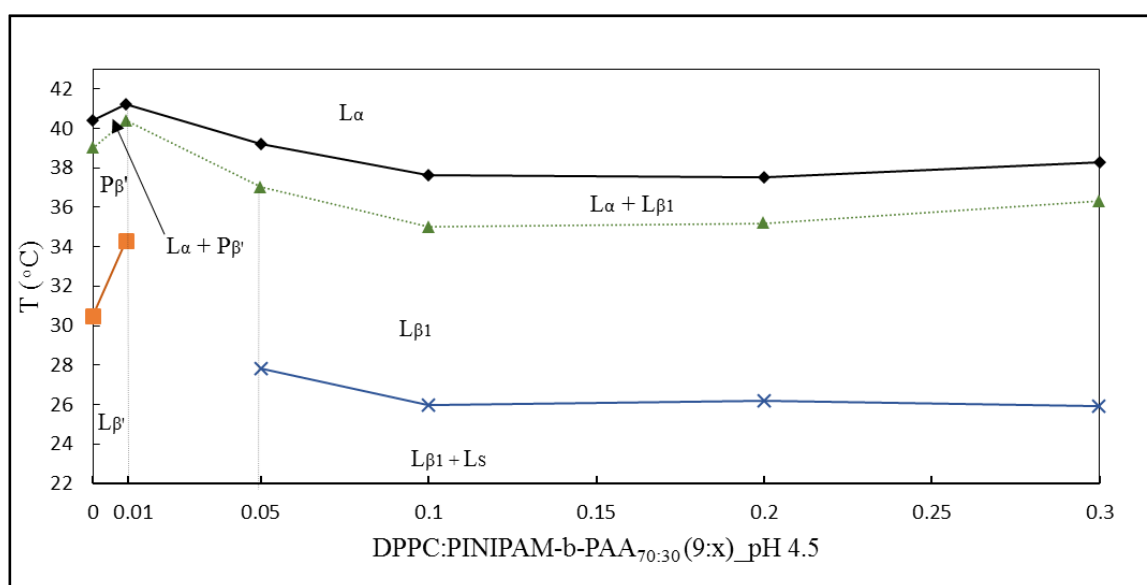


Σχήμα 6.4.8 Καμπύλες DSC θέρμανσης-ψύξης DPPC διπλοστοιβάδων, ενυδατωμένων σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA_{70:30}. Μοριακές αναλογίες DPPC:PNIPAM-b-PAA_{70:30} a. 9:0.01, b. 9:0.05, c.9:0.1 d. 9:0.2 and e. 9:0.3.

Και στα συστήματα που ενυδατώθηκαν σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέως pH 4.5, όπως και στις μεγάλες συγκεντρώσεις πολυμερούς παρατηρήθηκε μία τάση προς διαχωρισμό της νεό-σχηματιζόμενης κορυφής από την κύρια κορυφή, με παράλληλη ενίσχυση της νέας φάσης εις βάρος της μετάπτωσης.

Παρατηρώντας τα θερμογράμματα που ελήφθησαν κατά την ψύξη των διπλοστοιβάδων, όπως απεικονίζονται στο **Σχήμα 6.4.8**, βλέπουμε πως σε όλες τις αναλογίες συμπολυμερούς οι κύριες κορυφές επανεμφανίστηκαν με μια δικαιολογημένη υστέρηση της τάξης των 2 °C περίπου. Στις αναλογίες που εμφανίστηκαν οι κορυφές χαμηλής θερμοκρασίας, κατά την ψύξη των δειγμάτων, εμφάνισαν υστέρηση σίγουρα μεγαλύτερη των 3 °C, που πάλι δεν είναι δυνατό να υπολογιστεί με ακρίβεια καθώς στο θερμογράμμα κύκλου ψύξης, εντοπίζονται στα όρια του εύρους θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάλυση.

Και στα συστήματα DPPC:PNIPAM-b-PAA_{70:30} που ενυδατώθηκαν με διάλυμα υδροχλωρικού οξέως pH 4.5, είναι πιθανό οι νέες κορυφές να αντιστοιχούν με μία φάση ενδοεισχώρησης που συνυπάρχει με την φάση γέλης εντός των διπλοστοιβάδων.



Σχήμα 6.4.9 Διάγραμμα φάσεων DPPC διπλοστοιβάδων ενυδατωμένων σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέως pH 4.5, συναρτήσεως της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης του PNIPAM-b-PAA_{70:30}. Θερμοκρασία προμετάπτωσης από τη φάση γέλης L_{β'} στη ρυτιδωμένη φάση P_{β'} (—■—), θερμοκρασία εκκίνησης Tonset της μετάπτωσης στην υγρή κρυσταλλική φάση L_α (···▲···), θερμοκρασία κύριας μετάπτωσης στην υγρή κρυσταλλική φάση L_α (—◆—), θερμοκρασία μετάπτωσης της φάσης γέλης L_s (—x—).

Στο **Σχήμα 6.4.9** απεικονίζεται το διάγραμμα φάσεων των ενυδατωμένων σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5 διπλοστοιβάδων DPPC παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης PNIPAM-*b*-PAA_{70:30}, το οποίο έχει κατασκευαστεί με βάση τις θερμοκρασίες μετάπτωσης των διαφόρων φάσεων που παρατηρούνται στα αντίστοιχα θερμογράμματα. Μέχρι και τη μικρότερη μοριακή αναλογία συμπολυμερούς (9:0.01), οι διπλοστοιβάδες μεταπίπτουν από τη φάση γέλης $L_{\beta'}$ στη ρυτιδωμένη φάση $P_{\beta'}$ και στη συνέχεια στην υγρή κρυσταλλική φάση L_{α} . Στις μεγαλύτερες μοριακές αναλογίες συμπολυμερούς από 9:0.05 έως 9:0.3, στις διπλοστοιβάδες φαίνεται να συνυπάρχουν οι δύο φάσεις γέλης $L_{\beta 1}$ και L_s , που συναντήσαμε και στα άλλα δύο μέσα ενυδάτωσης. Με την αύξηση της θερμοκρασίας η L_s φάση μεταπίπτει στην $L_{\beta 1}$ και από αυτήν οι διπλοστοιβάδες μεταβαίνουν στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση L_{α} .

6.5 Συνολική Εκτίμηση της επίδρασης των συμπολυμερών τύπου PNIPAM-b-PAA, στις θερμοτροπικές ιδιότητες DPPC διπλοστοιβάδων, και ο ρόλος του μέσου ενυδάτωσης.

Είναι γνωστό ότι η θερμική συμπεριφορά των μεταβάσεων φάσης των φωσφολιπιδικών διπλοστοιβάδων επηρεάζεται έντονα από την παρουσία ξένων μορίων. Οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ μακρομορίων (πχ πρωτεϊνών ή πολυμερών) και φωσφολιπιδίων έχουν ταξινομηθεί σε τρεις μεγάλες κατηγορίες.

1. Αλληλεπιδράσεις που περιλαμβάνουν μόνο την προσρόφηση του μορίου στην επιφάνεια των μεμβρανών
2. Μερική ενσωμάτωση του μακρομορίου εντός της λιπιδικής διπλοστοιβάδας (κατ' αναλογία των μεμβρανικών πρωτεϊνών)
3. Πλήρης διείσδυση του μακρομορίου στον υδρόφοβο εσωτερικό πυρήνα

Οι αλληλεπιδράσεις που ανήκουν στην πρώτη κατηγορία έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενθαλπίας (ΔH_m) που συνοδεύεται από αύξηση ή και όχι της θερμοκρασίας μετάβασης (T_m), ενώ αντίστοιχα αυτές της δεύτερης και της τρίτης κατηγορίας οδηγούν σε μείωση της ενθαλπίας μετάβασης με παράλληλη μείωση ή και όχι της T_m (Parahadjopoulos, et al., 1975; Tabbakhian & Rogers, 2012). Όταν το μακρομόριο είναι πολυμερές η τρίτη κατηγορία αλληλεπίδρασης μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη διάρρηξη της διπλοστοιβάδας προς τον σχηματισμό μεικτών μικυλλίων πολυμερούς-λιπιδίου ή άλλου τύπου συσσωματωμάτων. Από τη σκοπιά της θερμοδυναμικής, αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα το μηδενισμό ουσιαστικά της ενθαλπίας μετάβασης (ΔH_m) (Kenji & Tirrell, 1984).

Με βάση τα παραπάνω και σε συνδυασμό με τα χαρακτηριστικά του πολυμερούς που χρησιμοποιήθηκε, στην συνέχεια θα γίνει μία προσπάθεια να αναλυθούν τα αποτελέσματα των πειραμάτων της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης των μεικτών συστημάτων DPPC:PNIPAM-b-PAA.

Το συμπολυμερές δύο συστάδων τύπου PNIPAM-b-PAA, όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχει την ιδιότητα να «απαντά» σε ερεθίσματα-μεταβολές του υδατικού περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται. Η συστάδα του πολύ(ακρυλικού οξέος) ως πολύηλεκτρολύτης έχει την ικανότητα να πρωτονιώνεται ή να αποπρωτονιώνεται-δίσταται, απαντώντας σε μεταβολές του pH του μέσου ενυδάτωσης, ενώ η συστάδα του πολύ(N-ισοπροπυλακρυλαμιδίου) έχει την ιδιότητα με την αύξηση της θερμοκρασίας πάνω από το θερμοκρασιακό όριο της LCST (low critical solution temperature), να υφίσταται μία αλλαγή στην διαμόρφωση του, μετάβαση

γνωστή ως «coil to globule transition», με αποτέλεσμα να αυξάνεται δραματικά η υδροφοβικότητά του.

Στο **Σχήμα 6.5.1** απεικονίζονται συγκριτικά διαγράμματα των θερμοτροπικών παραμέτρων των DPPC διπλοστοιβάδων, σε συνάρτηση με τη μοριακής αναλογία των πολυμερών PNIPAM-b-PAA_{50:50} και PNIPAM-b-PAA_{70:30}. Οι παράμετροι αυτές είναι:

- i. Η θερμοκρασία μετάβασης από τη φάση γέλης στην υγρή κρυσταλλική φάση (T_m), η οποία σχετίζεται με την ικανότητα ενός μορίου να προκαλεί ή όχι ρευστοποίηση της μεμβράνης
- ii. Το εύρος στο ήμισυ της κορυφής κύριας μετάβασης ($\Delta T_{1/2}$), που αποτελεί δείκτη της συνεργασιμότητας της μετάβασης από τη φάση γέλης στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση
- iii. Η ενθαλπία μετάβασης από τη φάση γέλης στην υγρή κρυσταλλική φάση (ΔH_m) μέσω της οποίας μπορεί να προσδιοριστεί πιθανή σταθεροποίηση ή αποσταθεροποίηση της φάσης γέλης.

Από το παρακάτω σχήμα, λοιπόν, καθίσταται φανερό πως το PNIPAM-b-PAA_{50:50} ανεξαρτήτως του μέσου ενυδάτωσης και σε μοριακή αναλογία έως και 9:0.05 (9:0.1 σε pH 4.5), σταθεροποιεί τη διπλοστοιβάδα, αυξάνοντας την T_m , ενώ παράλληλα μειώνει τη συνεργατικότητα της κατά τη μετάβαση στην υγρή κρυσταλλική φάση. Λαμβάνοντας υπόψη τη φύση του μορίου, την παράλληλη υποβάθμιση της προμετάπτωσης που έχει σημειωθεί αλλά και βιβλιογραφικές αναφορές (Munaviron, et al., 2014; Fujiwara, et al., 1997; Kenji & Tirrell, 1984), αυτό πιθανότατα προκύπτει λόγω της αλληλεπίδρασης της PAA συστάδας του πολυμερούς με την επιφάνεια της διπλοστοιβάδας. Η αλληλεπίδραση αυτή τουλάχιστον σε PBS και σε διάλυμα pH 4.5 και μέχρι την αναλογία 9:0.01 όπως φαίνεται από την αύξηση της ενθαλπίας μετάβασης, συνεπάγεται πιθανότατα μία σημειακή αύξηση της εν τω βάθει οργάνωσης των λιπαρών αλυσίδων και σταθεροποίηση της φάσης γέλης. Η αλληλεπίδραση αυτή επηρεάζεται από τη φύση του μέσου ενυδάτωσης, και φαίνεται να γίνεται εντονότερη με τη μείωση του pH και την απουσία ιονικής ισχύος.

Σε μεγαλύτερες μοριακές αναλογίες το PNIPAM-b-PAA_{50:50}, όπως υποδεικνύει η βαθμιαία μείωση της T_m και της ΔH_m , ρευστοποιεί τη μεμβράνη προοδευτικά συναρτήσσει της περιεκτικότητάς του, ενώ παράλληλα αποσταθεροποιεί τη φάση γέλης. Η ρευστοποίηση της μεμβράνης εντείνεται με την αύξηση του pH του μέσου ενυδάτωσης. Οι μεταβολές αυτές πιθανότατα οφείλονται στην αύξηση της έντασης της αλληλεπίδρασης των διπλοστοιβάδων με την PNIPAM συστάδα του πολυμερούς. Με την αύξηση της θερμοκρασίας πάνω από την

LCST του μορίου το PNIPAM καθίσταται υδρόφοβο. Αυτό του επιτρέπει να διεισδύει στο εσωτερικό των διπλοστοιβάδων, πιθανότατα σχηματίζοντας υδρόφοβα συσπειρώματα (clusters), τα οποία εν τέλει οδηγούν στη διάρρηξη της μεμβράνης (Kono, et al., 2010; Ta & Porter, 2013; Ta, et al., 2014).

Η μεγάλη αύξηση που υφίσταται το εύρος στο ήμισυ της κορυφής κύριας μετάβασης υποδεικνύει την προοδευτική, επίσης, μείωση της συνεργατικότητας των διπλοστοιβάδων κατά τη μετάβαση στην υγρή κρυσταλλική φάση. Μία πιθανή αιτία είναι η ανομοιογενής κατανομή των δημιουργουμένων συσπειρωμάτων κατά μήκος των διπλοστοιβάδων, και ο σχηματισμός περιοχών (nanodomains) διαφορετικής σύστασης ως προς την ποσότητα τους σε PNIPAM. Η ανισοκατανομή φαίνεται πως είναι εντονότερη στο νερό καθαρότητας HPLC.

Πρέπει να σημειωθεί πως η PNIPAM συστάδα του πολυμερούς πιθανότατα διεισδύει στο υδρόφοβο εσωτερικό των διπλοστοιβάδων, ακόμα και στις μικρότερες μοριακές αναλογίες (9:0.01 και 9:0.05). Αυτό εξηγεί την μικρή πτώση της ενθαλπίας μετάβασης που παρατηρείται ιδιαίτερα στην αναλογία 9:0.05, (αντίθετη ως προς την προβλεπόμενη αλληλεπίδραση της με τη συστάδα PAA) και την αντίστοιχη μείωση της συνεργατικότητας της μεμβράνης ($\Delta T_{1/2}$). Όμως, καθώς ο αριθμός των δημιουργούμενων συσπειρωμάτων είναι περιορισμένος, η μεταβολή του θερμοτροπικού προφίλ των διπλοστοιβάδων, που οφείλεται στην PNIPAM συστάδα δεν είναι έντονα εμφανής.

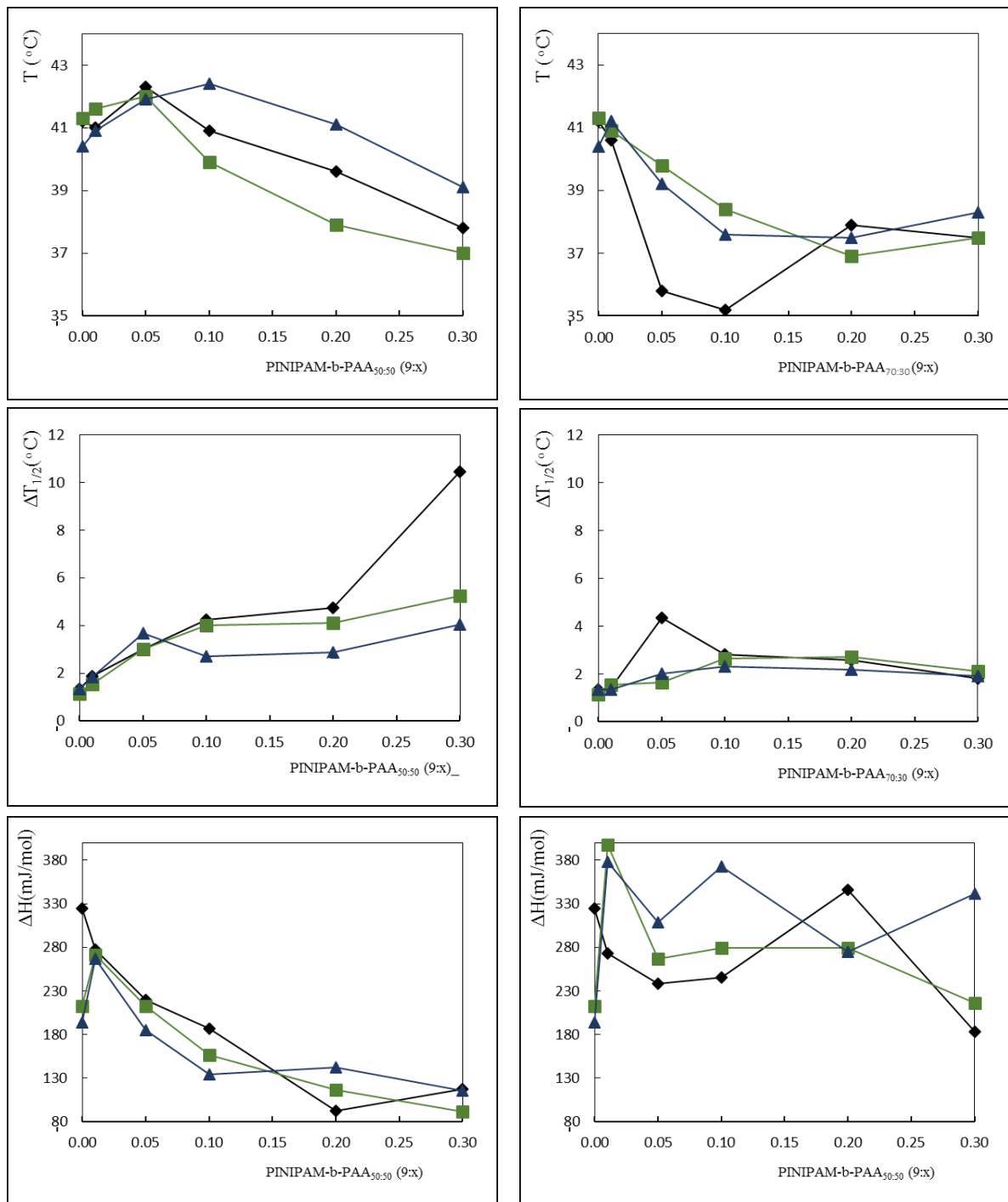
Όσον αφορά το PNIPAM-b-PAA_{70:30}, παρατηρώντας το σχήμα βλέπουμε πως η παρουσία του συγκεκριμένου συμπολυμερούς, πλην των ενυδατωμένων σε pH 4.5 διπλοστοιβάδων που το περιέχουν σε αναλογία 9:0.01, οδηγεί στην προοδευτική ελάττωση την θερμοκρασίας μετάβασης φάσης συγκριτικά με της καθαρά φωσφολιπιδικές διπλοστοιβάδες. Όπως ήταν αναμενόμενο λοιπόν, η μείωση της συστάδας του πολύ(ακρυλικού οξέος), οδηγεί σε μείωση της έντασης της αλληλεπίδρασης του συμπολυμερούς με την επιφάνεια της μεμβράνης. Γενικά η ρευστοποίηση της μεμβράνης είναι προοδευτική μέχρι και την αναλογία 9:0.1, ενώ σε μεγαλύτερες ποσότητες σημειώνεται σταθεροποίηση της T_m και άρα και του επιπέδου ρευστότητας της διπλοστοιβάδας. Αυτό πιθανότατα σχετίζεται με την ανάπτυξη της νέας κορυφής που παρατηρήθηκε σε χαμηλότερες της θερμοκρασίες από την κύρια μετάπτωση και την τάση για το μεταξύ τους διαχωρισμό παρουσία υψηλών ποσοτήτων PNIPAM-b-PAA_{70:30}. Η νέα αυτή κορυφή υποδεικνύει την ύπαρξη εντός της μεμβράνης μιας ακόμα φάσης που «συνυπάρχει με τη φάση γέλης. Η διακύμανση της T_m είναι εντονότερη όταν η ενυδάτωση των διπλοστοιβάδων γίνεται σε νερό καθαρότητας HPLC.

Η συνεργατικότητα της μεμβράνης κατά τη μετάβαση στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση, όπως επιβεβαιώνουν οι τιμές του $\Delta T_{1/2}$, μειώνεται προοδευτικά αλλά ελαφρώς και

στα τρία μέσα μέχρι αυξανόμενης της ποσότητας του συμπολυμερούς μέχρι και την αναλογία 9:0.1. Με περαιτέρω προσθήκη φαίνεται να σταθεροποιείται, παράλληλα με την ανάπτυξη της νέας κορυφής. Σε σύγκριση με το συμπολυμερές PNIPAM-b-PAA_{50:50} σε όλες τις αναλογίες και σε όλα τα μέσα ενυδάτωσης οι διπλοστοιβάδες DPPC παρουσία PNIPAM-b-PAA_{70:30} εμφανίζουν μεγαλύτερη συνεργατικότητα κατά την κύρια μετάπτωση.

Τέλος, όσον αφορά τις ενθαλπίες μετάβασης, στο PBS και στο διάλυμα υδροχλωρικού οξέος pH 4.5, εμφανίζονται σε όλες τις αναλογίες PNIPAM-b-PAA_{70:30} αυξημένες συγκριτικά με τις καθαρά φωσφολιπιδικές διπλοστοιβάδες, υποδεικνύοντας τη σταθεροποίηση της φάσης γέλης. Αντίθετα, όταν η ενυδάτωση πραγματοποιείται σε νερό καθαρότητας HPLC, τότε αυτές εμφανίζονται κατά βάση μικρότερες. Σε όλες όμως τις περιπτώσεις η ΔH_m εμφανίζει μία έντονη διακύμανση, που σε αντιπαράβολή με την εμφάνιση της νέας κορυφής χαμηλής θερμοκρασίας στα αντίστοιχα θερμογράμματα, υποδεικνύει την ανάπτυξη φάσεως ενδοεισχώρησης εντός των λιπιδικών μεμβρανών.

Παρά την περίεργη συμπεριφορά της ενθαλπίας μετάβασης, τα αποτελέσματα για το PNIPAM-b-PAA_{70:30} υποδεικνύουν και σε αυτήν την περίπτωση ότι το PNIPAM διεισδύει στο εσωτερικό της διπλοστοιβάδας, ενώ οι κατά κανόνα χαμηλότερες θερμοκρασίες μετάβασης των συστημάτων που περιέχουν PNIPAM-b-PAA_{70:30}, σε σχέση με τα αντίστοιχα συστήματα με PNIPAM-b-PAA_{50:50}, δείχνουν πως μία αναλογική αύξηση της PNIPAM συστάδας του πολυμερούς επιφέρει εντονότερες μεταβολές στο υδρόφοβο εσωτερικό των μεμβρανών.



Σχήμα 6.5.1 Θερμοτροπικές παράμετροι DPPC διπλοστοιβάδων, συναρτήσει της μοριακής αναλογίας (9:x) των συμπολυμερών a. PNIPAM-b-PAA_{50:50} και b. PNIPAM-b-PAA_{70:30} ενυδατωμένων σε: (--♦--) νερό καθαρότητας HPLC, (--■--) PBS, (--▲--) διάλυμα υδροχλωρικού οξέος.

7 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με σκοπό να αξιολογηθούν οι θερμοδυναμικές μεταβολές που υφίστανται οι πλήρως ενυδατωμένες διπλοστοιβάδες αποτελούμενες από DPPC κατά την αλληλεπίδραση τους με γραμμικά συμπολυμερή του τύπου PNIPAM-b-PAA, αλλά και ο ρόλος που διαδραματίζει η φύση του μέσου ενυδάτωσης.

Τα αποτελέσματα της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης έδειξαν πως η εισαγωγή του συμπολυμερούς προκαλεί ιδιαίτερα σημαντικές μεταβολές στη θερμοτροπική συμπεριφορά των διπλοστοιβάδων, η βαρύτητα των οποίων εξαρτάται από τη μοριακή αναλογία του PNIPAM-b-PAA έναντι των φωσφολιπιδίων. Σημαντικές διαφοροποιήσεις σημειώθηκαν με την αλλαγή της δομής του συμπολυμερούς και συγκεκριμένα της αναλογίας μεταξύ των δομικών του τμημάτων και του μοριακού του βάρους, καταδεικνύοντας το ρόλο που διαδραματίζει η κάθε συστάδα ξεχωριστά. Τέλος, φάνηκε η σημασία και ο ρόλος που διαδραματίζει η φύση του μέσου ενυδάτωσης σε αυτές της αλληλεπιδράσεις και συγκεκριμένα το pH και η ιονική ισχύς.

Εξαιτίας της διπλής φύσης του συμπολυμερούς, το οποίο αποτελείται από δύο διαφορετικές συστάδες-ομοπολυμερών, η αλληλεπίδραση με τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών είναι ιδιαίτερα σύνθετη και κινείται σε δύο κατευθύνσεις. Το PNIPAM-b-PAA έχει την ικανότητα να προσροφάται στην επιφάνεια των διπλοστοιβάδων πιθανότατα λόγω των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ της συστάδας του πολύ(ακρυλικού οξέος) και των πολικών κεφαλών των φωσφολιπιδίων. Η αλληλεπίδραση αυτή εξαρτάται άμεσα από τη φύση του μέσου ενυδάτωσης και ιδιαίτερα του pH, επιβεβαιώνοντας έτσι την απαντητικότητα του σε αντίστοιχες μεταβολές. Από την άλλη, εξαιτίας της δεύτερης συστάδας του, η οποία με την αύξηση της θερμοκρασίας υφίσταται μια διαμορφωτική αλλαγή που την καθιστά υδρόφοβη, το συμπολυμερές εισχωρεί στο υδρόφοβο εσωτερικό των διπλοστοιβάδων διαρρηγνύοντάς τις. Η αλληλεπίδραση αυτή εξαρτάται από τη θερμοκρασία και πραγματοποιείται μόνο πάνω από την LCST του PNIPAM.

Συνοψίζοντας, θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διπλοστοιβάδων DPPC και του συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA επηρεάζονται άμεσα από τη σύσταση του μορίου του πολυμερούς, από την ποσότητα η οποία ενσωματώνεται στις διπλοστοιβάδες και από τη φύση του μέσου στο οποίο αυτές ενυδατώνονται.

Προοπτικές

Αυτή η μελέτη θα μπορούσε να αποτελέσει βάση για τον ορθολογικό σχεδιασμό μεικτών συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων, τα οποία αποκρινόμενα σε ερεθίσματα θα αποδίδουν την δραστική ουσία σε βιολογικούς στόχους.

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Aseyev, V., Tenhu, H. & Wi, F. M., 2011. Non-ionic Thermoresponsive Polymers in Water. *Advances in Polymer Science*, Volume 242, p. 29–89.
- Atwood, D. & Florence, A., 2008. Polymers. Στο: *Physical Pharmacy*. s.l.:Fasttrack, pp. 81-95.
- avantilipids.com, 2015. [Online].
- Bastakoti, P. B., Guragain, S., Nakashima, K. & Yamauchi, Y., 2015. Stimuli-Induced Core–Corona Inversion of Micelle of Poly(acrylic acid)-block-Poly(N-isopropylacrylamide) and Its Application in Drug Delivery. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 216(3), pp. 287-291.
- Bawa, P., Pillay, V., Choonara, Y. E. & du Toi, L. C., 2009. Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery. *Biomedical Materials*, Volume 4, pp. 1-15.
- Berényi, S. et al., 2013. Thermotropic and structural effects of poly(malic acid) on fully hydrated multilamellar DPPC-water systems.. *Biochim Biophys Acta*, 1828(2), pp. 661-669.
- Bonora, S., Torreggiani, A. & Finia, G., 2003. DSC and Raman study on the interaction between polychlorinated biphenyls (PCB) and phospholipid liposomes.. *Thermochim Acta.*, 408(1-2), pp. 55-65.
- Brown, M. E., 2001. Introduction to Thermal Analysis Techniques and Applications. In: M. . E. Brown, ed. *Differential Thermal Analysis(DTA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC)*. s.l.:Kluwer Academic Publishers, pp. 55-89.
- Caplan, J. M., 2006. Λειτουργική Οργάνωση του Κυττάρου. In: M. Κουτσιλιέρης, ed. *Ιατρική Φυσιολογία και μοριακή προσέγγιση*. s.l.:Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, pp. 11-19.
- Cheng, R. και συν., 2013. Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticles for programmed site-specific drug delivery. *Biomaterials*, 34(14), p. 3647–3657.
- Demetzos, C., 2008. Differential Scanning Calorimetry (DSC): A Tool to Study the Thermal Behavior of Lipid Bilayers and Liposomal Stability. *Journal of Liposome Research*, Volume 18, pp. 159-173.
- Dzikovski, B. & Freed, J., 2013. Membrane Fluidity. In: G. C. K. Roberts, ed. *Encyclopedia of Biophysics*. s.l.:Springer, pp. 1440-1445.
- Elizondo, E. et al., 2011. Liposomes and Other Vesicular Systems: Structural Characteristics, Methods of Preparation, and Use in Nanomedicine. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Volume 104, pp. 1-52.
- Fujiwara, M., Grubbs, R. & Baldeschwieler, J., 1997. Characterization of pH-Dependent Poly(acrylic Acid) Complexation with Phospholipid Vesicles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 185(1), pp. 210-216..
- Gardikis, K. et al., 2010. New chimeric advanced Drug Delivery nanosystems (chi-aDDnSs) as Doxorubicin. *Int. J. of Pharmac.*, Volume 402, pp. 231-237.

- Gil, E. S., 2004. Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Progress in Polymer Science*, 29(12), pp. 1173-1222..
- Goodby, J. W. et al., 1998. Liquid crystals with restricted molecular topologies: supermolecules and supramolecular assemblies. *Chemical Communications*, Volume 19, pp. 2057-2070.
- Grasso, D., Milardi, D., La Rosa, C. & Rizzarelli, E., 2001. DSC study of the interaction of the prion peptide PrP106-126 with artificial membranes. *New J Chem.*, 25(12), pp. 1543-1548.
- Heller, H., Schaefer, M. & Schulten, K., 1993. Molecular dynamics simulation of a bilayer of 200 lipids in the gel and in the liquid crystal phase. *The Journal of Physical Chemistry*, Volume 97, p. 8343 – 8360.
- Heyda, J., Soll, S., Yuan, J. & Dzubiella, J., 2014. Thermodynamic Description of the LCST of Charged Thermoresponsive Copolymers. *Macromolecules*, 47(6), pp. 2096-2102..
- Heyda, J., Soll, S., Yuan, J. & Dzubiella, J., 2013. Thermodynamic Description of the LCST of Charged Thermoresponsive Copolymers. *Soft Condensed Matter*, pp. 1-8.
- Hil, J. P. et al., 2014. Self-Assembly: From Amphiphiles to Chromophores and Beyond. *Molecules*, 19(6), pp. 8589-8609.
- Huang, C.-h. & Li, S., 1999. Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 16 November, 1422(3), p. 273–307.
- Hyde, S. S., 2001. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: K. Holmberg, ed. *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*. s.l.:J. Wiley & Sons, pp. 1021-1023.
- Jhaveri, A., Deshpande, P. & Torchilin, V., 2014. Stimuli-sensitive nanopreparations for combination cancer therapy.. *Journal of Controlled Release*, Volume 190, pp. 352-370.
- Kapou, A., Nikolaropoulos, S., Siapi, E. & Mauromoustakos, T., 2005. Effects of steroidal carriers of alkylating agents on the phase transition in DPPC membrane bilayers.. *Thermochim Acta.*, 429(1), pp. 53-56.
- Kenji, S. & Tirrell, D., 1984. pH-Dependent complexation of poly(acrylic acid) derivatives with phospholipid vesicle membranes. *Macromolecules*, 17(9), p. 1692–1698.
- Khalil, R. A. & Zarari, A.-h. A., 2014. Theoretical estimation of the critical packing parameter of amphiphilic self-assembled aggregates. *Applied Surface Science*, Volume 318, p. 85–89.
- Kim, J., Bae, S. & Kim, J., 1997. Temperature-sensitivity of liposomal lipid bilayers mixed with poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid). *J. Biochem.*, 121(1), pp. 15-19.
- Klančnik, G., Medved, J. & Mrvar, P., 2010. Differential thermal analysis (DTA) and differential scanning calorimetry (DSC) as a method of material investigation. *Materials and Geoenvironment*, 57(1), pp. 127-142.

- Kono, K., Nakai, R., Morimoto, K. & Takagishi, T., 1999. Thermosensitive polymer-modified liposomes that release contents around physiological temperature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1416(1-2), pp. 239-250.
- Kono, K. και συν., 2010. Highly temperature-sensitive liposomes based on a thermosensitive block copolymer for tumor-specific chemotherapy.. *Biomaterials*, 31(27), p. 7096–7105.
- Kontogiannopoulos, K. N. και συν., 2012. Chimeric advanced drug delivery nano systems (chi-aDDnSs) for shikonin combining dendritic and liposomal technology. *International Journal of Pharmaceutics*, 422(1-2), pp. 381-389.
- Koynova , R. & Tenchov, . B., 2013. Transitions between lamellar and non-lamellar phases in membrane lipids and their physiological roles. *QA Biochemistry*, 01 April, 1(1), pp. 1-9.
- Koynovaa, R. & Caffrey, M., 1998. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1376(1), p. 91–145.
- Lee , S. & Nguyen , S., 2013. Smart nanoscale drug delivery platforms from stimuli-responsive polymers and liposomes. *Macromolecules*, 46(23), pp. 9169-9180.
- Lewis , R. N. & McElhaney, R. N., 2005. The Mesomorphic Phase Behavior of Lipid Bilayers. In: *The Structure of biological Membranes*. 2 ed. s.l.:CRC Press LLC, pp. 54-105.
- Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V. & Peppas, N. A., 2010. Polymers for Drug Delivery Systems. *Annual Review of Chemical and Biomolecular*, 11 Sep, Volume 1, p. 149–173.
- Li, J. et al., 2015. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, Volume 10, pp. 81-98.
- Lombardo, D., Kiselev, M. A., Magazù, S. & Calandra, P., 2015. Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches. *Advances in Condensed Matter Physics*, 27 September, 2015(151683), p. 22.
- Marsh , D., 1991. General features of phospholipid phase transitions. *Chemistry and Physics of Lipids*, Τόμος 57, pp. 109-120.
- Matsuki, H., Goto, M., Tada, K. & Tamai, N., 2013. Thermotropic and barotropic phase behavior of phosphatidylcholine bilayers.. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 January, 14(2), pp. 2282-2302.
- Monduzzi , M., Lampis, S. & Murgia, S., 2014. From self-assembly fundamental knowledge to nanomedicine developments. *Advances in Colloid and Interface Science*, Volume 205, p. 48–67.
- Munavirov, B., Filippov, A., Rudakova, M. & Antzutkinb, O. N., 2014. Polyacrylic Acid Modifies Local and Lateral Mobilities in Lipid Membranes. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 35(6), pp. 848-858.
- O'Mahony, C. T. et al., 2011. The Thermodynamics of Defect Formation in Self-Assembled Systems. In: J. C. M. Piraján, ed. *Systems in Equilibrium and Non-Equilibrium*. s.l.:InTech, p. 279–306.

- Pantusa, M., Bartucci, R. & Sportelli, L., 2007. Calorimetric and spin-label ESR studies of PEG:2000-DPPE containing DPPC/lyso-PPC mixtures. *Colloid Polym Sci.*, 285(6), pp. 649-656.
- Papahadjopoulos, D., Moscarello, M., Eylar, E. & Isac, T., 1975. Effects of proteins on thermotropic phase transitions of phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta*, 401(3), pp. 317-335.
- Pippa, N., Meristoudi, A., Pispas, S. & Demetzos, C., 2015. Temperature-dependent drug release from DPPC:C12H25-PNIPAM-COOH liposomes: Control of the drug loading/release by modulation of the nanocarriers' components. *International Journal of Pharmaceutics*, 485(1-2), p. 374-382.
- Pippa, N., Kaditi, E., Pispas, S. & Demetzos, C., 2013b. PEO-b-PCL-DPPC chimeric nanocarriers: self-assembly aspects in aqueous and biological media and drug incorporation. *Soft Matter*, 9(15), pp. 4073-4082.
- Pippa, N., Merkouraki, M., Pispas, S. & Demetzos, C., 2013a. DPPC:MPOx chimeric advanced Drug Delivery nano Systems (chi-aDDnSs): Physicochemical and structural characterization, stability and drug release studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 450(1-2), pp. 1-10.
- Pippa, N., Pispas, S. & Demetzos, C., 2014. The metastable phases as modulators of biophysical behavior of liposomal membranes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 120(1), pp. 937-945.
- Ringsdorf, H., Schlarb, B. & Venzmer, J., 1988. Molecular Architecture and Function of Polymeric Oriented Systems: Models for the Study of Organization, Surface Recognition, and Dynamics of Biomembranes. *Angewandte Chemie International Edition*, January, 27(1), pp. 113-158.
- Schild, H., 1992. Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Prog Polym Sci.*, Volume 17, pp. 163-249.
- Schmaljohann, D., 2006. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), p. 1655-1670.
- Seddon, J. M. & Templer, R. H., 1995. Polymorphism of Lipid-Water Systems. Στο: R. Lipowsky & E. Sackmann, επιμ. *Handbook of Biological Physics*. London: s.n., pp. 97-160.
- Semmler, K., Meyerb, H. W. & J., Q., 2000. The structure and thermotropic phase behaviour of dipalmitoylphosphatidylcholine codispersed with a branched-chain phosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, December, 1509(1-2), p. 385-396.
- Shaikh, R. P. και συν., 2010. A Review of Multi-Responsive Membranous Systems for Rate-Modulated Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech*, 11(1), pp. 441-459.
- Slater, J. . L. & Huang, C. H., 1988. Interdigitated bilayer membranes. *Progress in Lipid Research*, 27(4), pp. 325-259.

- Smith, E. A. & Dea, P. K., 2013. Differential Scanning Calorimetry Studies of Phospholipid Membranes: The Interdigitated Gel Phase. In: A. A. Elkordy, ed. *Applications of Calorimetry in a Wide Context - Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry*. s.l.:InTech, pp. 407-444.
- Smith, E. A., van Gorkum, C. M. & Phoebe, K., 2010. Properties of phosphatidylcholine in the presence of its monofluorinated analogue. *Biophysical Chemistry*, 147(1-2), pp. 20-27.
- Strandman, S. & Zhu, X. X., 2015. Thermo-responsive block copolymers with multiple phase transition temperatures in aqueous solutions. *Progress in Polymer Science*, Volume 42, pp. 154-176.
- Tabbakhian, M. & Rogers, J., 2012. Interaction of insulin, cholesterol-derivatized mannan, and carboxymethyl chitin with liposomes: A differential scanning calorimetry study.. *Res Pharm Sci.*, 7(1), pp. 43-50.
- Ta, T. et al., 2014. Localized delivery of doxorubicin in vivo from polymer-modified thermosensitive liposomes with MR-guided focused ultrasound-mediated heating.. *J Control Release*, Volume 194, pp. 71-81.
- Ta, T. και συν., 2010. Thermosensitive Liposomes Modified with Poly(N-isopropylacrylamide-co-propylacrylic acid) Copolymers for Triggered Release of Doxorubicin. *Biomacromolecules*, 11(8), pp. 1915-1920.
- Ta, T. & Porter, T., 2013. Thermosensitive liposomes for localized delivery and triggered release of chemotherapy. *Journal of Control Release*, 169((1-2), p. 112-125.
- Venturolia, M., Sperotto, M. M., Kranenburg, M. & Smit, B., 2006. Mesoscopic models of biological membranes. *Physics Reports*, Τόμος 437, pp. 1-54.
- Weng, Y., Ding, Y. & Zhang, G., 2006. Microcalorimetric Investigation on the Lower Critical Solution Temperature Behavior of N-Isopropylacrylamide-co-Acrylic Acid Copolymer in Aqueous Solution.. *J Phys Chem B.*, 110(24), p. 11813-11817.
- Whitesides, G. & Grzybowski, B., 2002. Self-assembly at all scales. *Science*, 29 March, 295(5564), pp. 2418-2421.
- Whitesides, G. M. & Boncheva, M., 2002. Beyond molecules: Self-assembly of mesoscopic and macroscopic components. *PNAS*, 16 April, 99(8), p. 4769-4774.
- Whitesides, G. M. & Grzybowski, B., 2002. Self-Assembly at All Scales. *Science*, 29 Mar, 295(5564), pp. 2418-2421.
- Zhuang, J. et al., 2013. Multi-stimuli responsive macromolecules and their assemblies. *Chemical Society Reviews*, 42(17), pp. 7421-7435.
- Γαρδίκης, Κ. & Δεμέτζος, Κ., 2005. Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης: Εργαλείο Θερμικής Μελέτης Φαρμακευτικών Προϊόντων και Σχεδιασμού Λιπιδικών Φορέων Μεταφοράς Βιοδραστικών Μορίων. *Φαρμακευτική*, 19(3), pp. 68-76.

- Ματσίγκου, Τ.-Χ., 2006. Μελέτη αλληλεπίδρασης λιπόφιλων βιοδραστικών μορίων με πρότυπα λιπιδικών μεμβρανών με διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης. Σχεδιασμός, ανάπτυξη λιποσωμάτων και in vitro φαρμακολογική αξιολόγηση. In: Αθήνα: s.n.
- Πιτσικάλης, Μ. & Χατζηχρηστίδη, Μ., 2010. *Ειδικά Θέματα Επιστήμης Πολυμερών*. Αθήνα: Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας.
- Σιμιτζής, Χ. Ι., 1994. *Πολυμερη*. Αθήνα: Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
- Φωτεινός, Δ. Ι., 2007. *Σημειώσεις του μαθήματος: Επιστήμη και τεχνολογία των Υγροκρυσταλικών υλικών*. Πάτρα: Πανεπιστήμιο Πατρών .

Κατάλογος σχημάτων

ΣΧΗΜΑ 1.2.1	ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΥΓΡΟΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΩΝ ΦΑΣΕΩΝ ΡΑΒΔΟΜΟΡΦΩΝ ΜΟΡΙΩΝ.	9
ΣΧΗΜΑ 1.2.2	ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΥΓΡΟΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΩΝ ΦΑΣΕΩΝ ΔΙΣΚΟΜΟΡΦΩΝ ΜΟΡΙΩΝ.....	10
ΣΧΗΜΑ 1.2.3	ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΔΟΜΕΣ ΣΤΙΣ ΟΠΟΙΕΣ ΜΠΟΡΟΥΝ ΝΑ ΑΥΤΟ-ΟΡΓΑΝΩΘΟΥΝ ΤΑ ΑΜΦΙΦΙΛΑ ΜΟΡΙΑ.	11
ΣΧΗΜΑ 1.2.4	ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΗΣ ΓΕΩΜΕΤΡΙΑΣ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΥΣΣΩΜΑΤΩΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΜΠΟΡΟΥΝ ΝΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΗΣΟΥΝ ΤΑ ΑΜΦΙΦΙΛΑ ΜΟΡΙΑ ΟΠΩΣ ΑΥΤΗ ΠΡΟΚΥΠΤΕΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΠΑΚΕΤΑΡΙΣΜΑΤΟΣ	15
ΣΧΗΜΑ 1.2.5	ΤΥΠΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΦΑΣΕΩΝ ΑΜΦΙΦΙΛΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΕΝΤΟΣ ΕΝΟΣ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΤΗ.....	16
ΣΧΗΜΑ 1.2.6	ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΦΑΣΕΩΝ ΠΟΥ ΔΗΜΙΟΥΡΓΟΥΝΤΑΙ ΠΡΟΟΔΕΥΤΙΚΑ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΕΝΟΣ ΤΥΠΙΚΟΥ ΑΜΦΙΦΙΛΟΥ ΜΟΡΙΟΥ	17
ΣΧΗΜΑ 2.2.1	ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ: (Α) ΓΡΑΜΜΙΚΑ, (Β) ΔΙΑΚΛΑΔΙΣΜΕΝΑ, (Γ) ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΜΕΝΑ ΚΑΙ (Δ) ΜΕ ΠΛΕΥΡΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ. 22	
ΣΧΗΜΑ 2.2.2	ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟΝ ΤΡΟΠΟ ΠΟΥ ΕΙΝΑΙ ΚΑΤΑΝΕΜΗΜΕΝΑ ΤΑ ΔΥΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΜΟΝΟΜΕΡΗ	23
ΣΧΗΜΑ 2.4.1	ΠΙΘΑΝΑ ΕΡΕΘΙΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ «ΕΞΥΠΝΩΝ» ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ.....	25
ΣΧΗΜΑ 2.4.2	ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΛΛΑΓΩΝ ΠΟΥ ΕΚΔΗΛΩΝΟΝΤΑΙ ΣΕ ΠΟΛΥΜΕΡΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΕΡΕΘΙΣΜΑ (Α) ΜΕΤΑΒΑΣΗ ΑΠΟ ΣΠΕΙΡΑ ΣΕ ΣΦΑΙΡΙΔΙΟ (COIL TO GLOBULE), (Β) ΔΙΟΓΚΩΣΗ–ΑΠΟΔΙΟΓΚΩΣΗ (SWELLING-DESWELLING), (C) ΜΙΚΥΛΛΙΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΣΥΣΤΑΔΙΚΟΥ ΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ ΜΕ ΜΙΑ ΑΠΟΚΡΙΣΙΜΗ ΣΥΣΤΑΔΑ.	27
ΣΧΗΜΑ 2.4.3	ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΦΑΣΕΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ, ΟΠΟΥ ΦΑΙΝΕΤΑΙ Η ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΑΝΩΤΕΡΗΣ ΚΑΙ ΚΑΤΩΤΕΡΗΣ ΚΡΙΣΙΜΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ. ΟΙ ΓΚΡΙΖΕΣ ΖΩΝΕΣ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟΥΝ ΣΕ ΔΙΑΦΑΣΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	29
ΣΧΗΜΑ 2.4.4	ΣΥΣΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΩΝ ΑΛΥΣΙΔΩΝ ΕΝΟΣ ΘΕΡΜΟΑΠΟΚΡΙΝΟΜΕΝΟΥ ΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗ ΤΗΣ LCST. ΤΑ ΜΟΡΙΑ ΤΟΥ ΝΕΡΟΥ «ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΟΝΤΑΙ» ΑΠΟ ΤΟ ΠΟΛΥΜΕΡΕΣ ΚΑΘΩΣ ΕΥΝΟΟΥΝΤΑΙ ΟΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΩΝ ΑΛΥΣΙΔΩΝ.	32
ΣΧΗΜΑ 3.2.1	ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΛΙΠΙΔΙΚΕΣ ΦΑΣΕΙΣ-ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΕΣ. I. ΠΛΑΚΟΕΙΔΕΙΣ-ΣΤΟΙΒΑΔΙΚΕΣ ΦΑΣΕΙΣ: (Α) L_c , (Β) L_b ; (C) L_b^{INT} , (D) L_b' , (E) P_b' , (F) L_a . II. ΜΥΚΗΛΙΑΚΕΣ ΦΑΣΕΙΣ: (G) M_I , (H) ΚΥΛΙΝΔΡΙΚΑ ΜΙΚΥΛΛΙΑ (TUBULES), (K) M_{II} (L) ΛΙΠΟΣΩΜΑ. III. ΜΗ-ΣΤΟΙΒΑΔΙΚΕΣ ΦΑΣΕΙΣ ΕΞΑΓΩΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΥΒΙΚΕΣ ΦΑΣΕΙΣ: (M) H_I , (N) H_{II} , (O) Q^M_{II} ,	38
ΣΧΗΜΑ 3.2.2	ΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΗ ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΥΡΙΑ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗ ΦΑΣΗΣ: ΠΑΡΑΤΗΡΟΥΝΤΑΙ ΕΜΦΑΝΩΣ Η “ΤΗΞΗ” ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΑΛΥΣΙΔΩΝ ΚΑΙ Η ΕΝΥΔΑΤΩΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΕΝΔΙΑΜΕΣΗΣ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ. ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΧΟΛΙΝΩΝ	39
ΣΧΗΜΑ 3.3.1	ΔΙΑΦΟΡΑ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ ΠΟΥ ΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΙΣ ΠΟΛΙΚΕΣ ΤΟΥΣ ΚΕΦΑΛΕΣ	41
ΣΧΗΜΑ 3.3.2	ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΩΝ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΤΟΥΣ ΣΧΗΜΑΤΟΣ. 42	
ΣΧΗΜΑ 3.4.1	ΤΟ ΜΟΡΙΟ ΤΗΣ ΔΙΠΑΛΜΙΤΟΪΛΟ-ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΧΟΛΙΝΗΣ (DPPC)	45
ΣΧΗΜΑ 3.5.1	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ % Κ.Β. ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΝΕΡΟΥ, ΣΤΙΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΜΕΤΑΒΑΣΕΩΣ ΦΑΣΗΣ ΤΩΝ ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ DPPC. ΜΕ ΠΡΑΣΙΝΟ Η ΥΠΟΜΕΤΑΠΤΩΣΗ, ΜΕ ΜΠΛΕ Η ΠΡΟΜΕΤΑΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΜΕ ΚΟΚΚΙΝΟ Η ΚΥΡΙΑ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗ.....	46

ΣΧΗΜΑ 3.6.1	ΤΥΠΙΚΟ ΘΕΡΜΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ ΔΙΠΑΛΜΙΤΟΪΛΟ-ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΧΟΛΙΝΗΣ (DPPC), ΟΠΟΥ ΔΙΑΚΡΙΝΟΝΤΑΙ ΤΡΕΙΣ ΕΝΔΟΘΕΡΜΕΣ ΚΟΡΥΦΕΣ. Η ΠΡΩΤΗ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΙ ΣΤΗΝ ΥΠΟΜΕΤΑΠΤΩΣΗ Η ΔΕΥΤΕΡΗ ΣΤΗΝ ΠΡΟΜΕΤΑΠΤΩΣΗ ΚΑΙ Η ΤΡΙΤΗ ΣΤΗΝ ΚΥΡΙΑ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗ.	48
ΣΧΗΜΑ 3.6.2	ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΗΣ ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΑΣ DPPC, ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΦΑΣΕΙΣ. ΣΤΗΝ ΜΕΣΑΙΑ ΣΤΗΛΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΕΤΑΙ Η ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΙΚΩΝ ΑΛΥΣΙΔΩΝ ΕΝΤΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΑΣ ΕΝΩ ΣΤΗΝ ΔΕΞΙΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΕΤΑΙ Η ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΩΝ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΤΗΣ	49
ΣΧΗΜΑ 3.6.3	ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΟΜΙΩΣΗ ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ: (Α) ΥΓΡΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΦΑΣΗ, (Β) ΦΑΣΗ ΓΕΛΗΣ (C) ΦΑΣΗ ΓΕΛΗΣ ΕΝΔΟΕΙΣΧΩΡΗΣΗΣ.	53
ΣΧΗΜΑ 3.6.4	ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΦΑΣΗΣ ΕΝΔΟΕΙΣΧΩΡΗΣΗΣ ΠΟΥ ΜΠΟΡΟΥΝ ΝΑ ΑΝΑΠΤΥΧΘΟΥΝ.	55
ΣΧΗΜΑ 4.4.1	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗΣ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑΣ ΣΑΡΩΣΗΣ (DSC).....	61
ΣΧΗΜΑ 4.5.1	ΤΥΠΙΚΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗΣ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑΣ ΣΑΡΩΣΗΣ . Η «ΕΝΔΟΘΕΡΜΗ» ΚΟΡΥΦΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΕΤΑΙ ΠΡΟΣ ΤΑ ΚΑΤΩ. ΤΟ Δ ΣΥΜΒΟΛΙΖΕΙ ΤΟ ΔΙΑΦΟΡΙΚΟ ΣΗΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΙΣΧΥ.....	63
ΣΧΗΜΑ 5.1.1.	ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΩΝ Α. ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ DPPC ΚΑΙ ΤΩΝ Β. ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΤΥΠΟΥ PNIPAM-B-ΡΑΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΛΕΤΗ.	68
ΣΧΗΜΑ 6.1.1	ΤΥΠΙΚΟ ΘΕΡΜΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ DPPC, ΚΑΙ ΟΙ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΑΣ	73
ΣΧΗΜΑ 6.1.2	ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΦΑΣΕΩΝ ΣΤΙΣ ΟΠΟΙΕΣ ΑΠΑΝΤΩΝΤΑΙ ΟΙ ΛΙΠΙΔΙΚΕΣ ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΕΣ ΤΗΣ DPPC ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ.	74
ΣΧΗΜΑ 6.2.1	ΚΑΜΠΥΛΕΣ DSC ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΜΑΝΣΗ ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ DPPC ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ Α. ΝΕΡΟ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΗPLC, Β. ΔΙΑΛΥΜΑ PBS, C. ΔΙΑΛΥΜΑ ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΡΗ 4.5. ΟΙ ΕΝΔΟΘΕΡΜΕΣ ΤΙΜΕΣ ΡΟΗΣ ΘΕΡΜΟΤΗΤΑΣ ΕΧΟΥΝ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΘΕΙ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΒΑΡΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.	75
ΣΧΗΜΑ 6.2.2	ΚΑΜΠΥΛΕΣ DSC ΘΕΡΜΑΝΣΗΣ-ΨΥΞΗΣ DPPC ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ Α. ΝΕΡΟ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΗPLC, Β. ΔΙΑΛΥΜΑ PBS, C. ΔΙΑΛΥΜΑ ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΡΗ 4.5.	77
ΣΧΗΜΑ 6.3.1	ΚΑΜΠΥΛΕΣ DSC ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΜΑΝΣΗ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΝΕΡΟ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΗPLC, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PNIPAM-B- ΡΑΑ _{50:50} . ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ DPPC:PNIPAM-B- ΡΑΑ _{50:50} Α. 9:0, Β. 9:0.01, C. 9:0.05 D. 9:0.1, Ε. 9:0.2 ΚΑΙ F. 9:0.3. ΟΙ ΕΝΔΟΘΕΡΜΕΣ ΤΙΜΕΣ ΡΟΗΣ ΘΕΡΜΟΤΗΤΑΣ ΕΧΟΥΝ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΘΕΙ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΒΑΡΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.	79
ΣΧΗΜΑ 6.3.2	ΚΑΜΠΥΛΕΣ DSC ΘΕΡΜΑΝΣΗΣ-ΨΥΞΗΣ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΝΕΡΟ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΗPLC, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PNIPAM-B- ΡΑΑ _{50:50} . ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ DPPC:PNIPAM-B- ΡΑΑ _{50:50} Α. 9:0.01, Β. 9:0.05, C.9:0.1 D. 9:0.2 ΚΑΙ Ε. 9:0.3.....	82
ΣΧΗΜΑ 6.3.3	ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΦΑΣΕΩΝ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΝΕΡΟ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΗPLC, ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{50:50} . ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΠΡΟΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗ ΦΑΣΗ ΓΕΛΗΣ L _B ' ΣΤΗ ΡΥΤΙΔΩΜΕΝΗ ΦΑΣΗ P _B ' (—■—), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΤΟΝΣΕΤ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΦΑΣΗ L _A (···▲···), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΚΥΡΙΑΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΦΑΣΗ L _A (—◆—), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ L _{A1} (—X—), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ L _{A1} (—X—).	83
ΣΧΗΜΑ 6.3.4	ΚΑΜΠΥΛΕΣ DSC ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΜΑΝΣΗ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PBS, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{50:50} . ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ DPPC:PNIPAM-B- ΡΑΑ _{50:50}	

	Α. 9:0, Β. 9:0.01, Γ. 9:0.05 Δ. 9:0.1, Ε. 9:0.2 ΚΑΙ Φ. 9:0.3. ΟΙ ΕΝΔΟΘΕΡΜΕΣ ΤΙΜΕΣ ΡΟΗΣ ΘΕΡΜΟΤΗΤΑΣ ΕΧΟΥΝ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΘΕΙ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΒΑΡΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.	86
ΣΧΗΜΑ 6.3.5	ΚΑΜΠΥΛΕΣ DSC ΘΕΡΜΑΝΣΗΣ-ΨΥΞΗΣ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PBS, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{50:50} . ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ DPPC:PNIPAM-B- ΡΑΑ _{50:50} Α. 9:0.01, Β. 9:0.05, Γ.9:0.1 Δ. 9:0.2 ΚΑΙ Ε. 9:0.3.	88
ΣΧΗΜΑ 6.3.6	ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΦΑΣΕΩΝ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PBS, ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{50:50} . ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΠΡΟΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗ ΦΑΣΗ ΓΕΛΗΣ L _{B'} ΣΤΗ ΡΥΤΙΔΩΜΕΝΗ ΦΑΣΗ P _{B'} (—■—), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΤΟΝΣΕΤ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΦΑΣΗ L _A (···▲···), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΚΥΡΙΑΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΦΑΣΗ L _A (—◆—), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ L _{A1} (—X—), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ L _{A1} (—X—).	89
ΣΧΗΜΑ 6.3.7	ΚΑΜΠΥΛΕΣ DSC ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΜΑΝΣΗ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΡΗ 4.5, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PNIPAM-B- ΡΑΑ _{70:30} . ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ DPPC:PNIPAM-B-ΡΑΑ _{50:50} Α. 9:0, Β. 9:0.01, Γ. 9:0.05 Δ. 9:0.1, Ε. 9:0.2 ΚΑΙ Φ. 9:0.3. ΟΙ ΕΝΔΟΘΕΡΜΕΣ ΤΙΜΕΣ ΡΟΗΣ ΘΕΡΜΟΤΗΤΑΣ ΕΧΟΥΝ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΘΕΙ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΒΑΡΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.	91
ΣΧΗΜΑ 6.3.8	ΚΑΜΠΥΛΕΣ DSC ΘΕΡΜΑΝΣΗΣ-ΨΥΞΗΣ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΡΗ 4.5, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{50:50} . ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ DPPC:PNIPAM-B- ΡΑΑ _{50:50} Α. 9:0.01, Β. 9:0.05, Γ.9:0.1 Δ. 9:0.2 ΚΑΙ Ε. 9:0.3.	93
ΣΧΗΜΑ 6.3.9	ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΦΑΣΕΩΝ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ 4.5, ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{50:50} . ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΠΡΟΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗ ΦΑΣΗ ΓΕΛΗΣ L _{B'} ΣΤΗ ΡΥΤΙΔΩΜΕΝΗ ΦΑΣΗ P _{B'} (—■—), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΤΟΝΣΕΤ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΦΑΣΗ L _A (···▲···), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΚΥΡΙΑΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΦΑΣΗ L _A (—◆—), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ L _{A1} (—X—), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ L _{A1} (—X—).	94
ΣΧΗΜΑ 6.4.1	ΚΑΜΠΥΛΕΣ DSC ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΜΑΝΣΗ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΝΕΡΟ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ HPLC, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PNIPAM- Β- ΡΑΑ _{70:30} . ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ DPPC:PNIPAM-B-ΡΑΑ/2 Α. 9:0, Β. 9:0.01, Γ. 9:0.05 Δ. 9:0.1, Ε. 9:0.2 ΚΑΙ Φ. 9:0.3. ΟΙ ΕΝΔΟΘΕΡΜΕΣ ΤΙΜΕΣ ΡΟΗΣ ΘΕΡΜΟΤΗΤΑΣ ΕΧΟΥΝ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΘΕΙ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΒΑΡΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.	98
ΣΧΗΜΑ 6.4.2	ΚΑΜΠΥΛΕΣ DSC ΘΕΡΜΑΝΣΗΣ-ΨΥΞΗΣ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΝΕΡΟ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ HPLC, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{70:30} . ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ DPPC:PNIPAM-B- ΡΑΑ _{70:30} Α. 9:0.01, Β. 9:0.05, Γ. 9:0.1 Δ. 9:0.2 ΚΑΙ Ε. 9:0.3.	100
ΣΧΗΜΑ 6.4.3	ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΦΑΣΕΩΝ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΝΕΡΟ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ HPLC, ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{70:30} . ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΠΡΟΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗ ΦΑΣΗ ΓΕΛΗΣ L _{B'} ΣΤΗ ΡΥΤΙΔΩΜΕΝΗ ΦΑΣΗ P _{B'} (—■—), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΤΟΝΣΕΤ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΦΑΣΗ L _A (···▲···), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΚΥΡΙΑΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΦΑΣΗ L _A (—◆—), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΓΕΛΗΣ L _S (···X···) ΠΟΥ ΕΜΦΑΝΙΖΕΤΑΙ ΩΣ ΟΜΟΣ ΣΤΗΝ ΚΥΡΙΑ ΚΟΡΥΦΗ.	101
ΣΧΗΜΑ 6.4.4	ΚΑΜΠΥΛΕΣ DSC ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΜΑΝΣΗ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PBS, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{70:30} . ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ DPPC:PNIPAM-B-ΡΑΑ _{70:30}	

Α. 9:0, Β. 9:0.01, Γ. 9:0.05 Δ. 9:0.1, Ε. 9:0.2 ΚΑΙ Φ. 9:0.3. ΟΙ ΕΝΔΟΘΕΡΜΕΣ ΤΙΜΕΣ ΡΟΗΣ ΘΕΡΜΟΤΗΤΑΣ ΕΧΟΥΝ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΘΕΙ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΒΑΡΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.	104
ΣΧΗΜΑ 6.4.5 ΚΑΜΠΥΛΕΣ DSC ΘΕΡΜΑΝΣΗΣ-ΨΥΞΗΣ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PBS, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{70:30} . ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ DPPC:PNIPAM-B-ΡΑΑ _{70:30} Α. 9:0.01, Β. 9:0.05, Γ. 9:0.1 Δ. 9:0.2 ΚΑΙ Ε. 9:0.3.....	106
ΣΧΗΜΑ 6.4.6 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΦΑΣΕΩΝ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PBS, ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{70:30} . ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΠΡΟΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗ ΦΑΣΗ ΓΕΛΗΣ L _{B'} ΣΤΗ ΡΥΤΙΔΩΜΕΝΗ ΦΑΣΗ P _{B'} (—■—), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΤΟΝΣΕΤ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΦΑΣΗ L _A (···▲···), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΚΥΡΙΑΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΦΑΣΗ L _A (—◆—), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ L _S (···Χ···) ΠΟΥ ΕΜΦΑΝΙΖΕΤΑΙ ΩΣ ΩΜΟΣ ΣΤΗΝ ΠΡΟΜΕΤΑΠΤΩΣΗ Η ΩΣ ΔΙΑΚΡΙΤΗ ΚΟΡΥΦΗ (—Χ—).	107
ΣΧΗΜΑ 6.4.7 ΚΑΜΠΥΛΕΣ DSC ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΜΑΝΣΗ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΡΗ 4.5, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{70:30} . ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ DPPC:PNIPAM-B-ΡΑΑ _{70:30} Α. 9:0, Β. 9:0.01, Γ. 9:0.05 Δ. 9:0.1, Ε. 9:0.2 ΚΑΙ Φ. 9:0.3. ΟΙ ΕΝΔΟΘΕΡΜΕΣ ΤΙΜΕΣ ΡΟΗΣ ΘΕΡΜΟΤΗΤΑΣ ΕΧΟΥΝ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΘΕΙ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΒΑΡΟΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.	110
ΣΧΗΜΑ 6.4.8 ΚΑΜΠΥΛΕΣ DSC ΘΕΡΜΑΝΣΗΣ-ΨΥΞΗΣ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΡΗ 4.5, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{70:30} . ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ DPPC:PNIPAM-B-ΡΑΑ _{70:30} Α. 9:0.01, Β. 9:0.05, Γ.9:0.1 Δ. 9:0.2 AND Ε. 9:0.3.....	111
ΣΧΗΜΑ 6.4.9 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΦΑΣΕΩΝ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΡΗ 4.5, ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{70:30} . ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΠΡΟΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗ ΦΑΣΗ ΓΕΛΗΣ L _{B'} ΣΤΗ ΡΥΤΙΔΩΜΕΝΗ ΦΑΣΗ P _{B'} (—■—), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΤΟΝΣΕΤ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΦΑΣΗ L _A (···▲···), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΚΥΡΙΑΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗ ΦΑΣΗ L _A (—◆—), ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΓΕΛΗΣ L _S (—Χ—).....	112
ΣΧΗΜΑ 6.5.1 ΘΕΡΜΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ (9:Χ) ΤΩΝ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΩΝ Α. PNIPAM-B-ΡΑΑ _{50:50} ΚΑΙ Β. PNIPAM-B-ΡΑΑ _{70:30} ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ: (—◆—) ΝΕΡΟ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ HPLC, (—■—) PBS, (—▲—) ΔΙΑΛΥΜΑ ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.	118

Κατάλογος πινάκων

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1	ΠΟΛΥΜΕΡΗ ΠΟΥ ΕΜΦΑΝΙΖΟΥΝ LCST ΣΕ ΕΥΡΟΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΩΝ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟ ΓΙΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ (SCHMALJOHANN, 2006).	30
ΠΙΝΑΚΑΣ 2.2	ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΟΥ ΡΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΙΣΤΩΝ, ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑΤΩΝ (SCHMALJOHANN, 2006). 33	
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1	ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΛΙΠΙΔΙΚΩΝ ΜΕΣΟΦΑΣΕΩΝ (MARSH , 1991).	36
ΠΙΝΑΚΑΣ 5.1	ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΚΥΚΛΩΝ ΘΕΡΜΑΝΣΗΣ-ΨΥΞΗΣ ΠΟΥ ΕΦΑΡΜΟΣΤΗΚΕ ΣΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ DPPC ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΠΟΛΟΙΠΩΝ ΜΕΙΚΤΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΟΥ-ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ.	71
ΠΙΝΑΚΑΣ 6.2.1	ΘΕΡΜΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΥΡΙΑΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΠΟΥ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΜΑΝΣΗ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΝΕΡΟ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ HPLC, ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PBS ΚΑΙ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΡΗ 4.5.	74
ΠΙΝΑΚΑΣ 6.3.1	ΘΕΡΜΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΥΡΙΑΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΠΟΥ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΜΑΝΣΗ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΝΕΡΟ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ HPLC, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΔΙΣΥΣΤΑΔΙΚΟΥ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{50:50}	78
ΠΙΝΑΚΑΣ 6.3.2	ΘΕΡΜΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΥΡΙΑΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΠΟΥ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΜΑΝΣΗ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PBS, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΔΙΣΥΣΤΑΔΙΚΟΥ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{50:50}	85
ΠΙΝΑΚΑΣ 6.3.3	ΘΕΡΜΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΥΡΙΑΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΠΟΥ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΜΑΝΣΗ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΡΗ 4.5, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΔΙΣΥΣΤΑΔΙΚΟΥ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{50:50}	90
ΠΙΝΑΚΑΣ 6.4.1	ΘΕΡΜΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΥΡΙΑΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΠΟΥ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΜΑΝΣΗ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΝΕΡΟ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ HPLC, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΔΙΣΥΣΤΑΔΙΚΟΥ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{70:30}	97
ΠΙΝΑΚΑΣ 6.4.2	ΘΕΡΜΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΥΣΑΣ ΚΟΡΥΦΗΣ ΠΟΥ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΜΑΝΣΗ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΝΕΡΟ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ HPLC, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΔΙΣΥΣΤΑΔΙΚΟΥ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{70:30}	97
ΠΙΝΑΚΑΣ 6.4.3	ΘΕΡΜΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΥΡΙΑΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΠΟΥ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΜΑΝΣΗ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PBS, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΔΙΣΥΣΤΑΔΙΚΟΥ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{70:30}	102
ΠΙΝΑΚΑΣ 6.4.4	ΘΕΡΜΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΥΣΑΣ ΚΟΡΥΦΗΣ ΠΟΥ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΜΑΝΣΗ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PBS, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΔΙΣΥΣΤΑΔΙΚΟΥ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{70:30}	103
ΠΙΝΑΚΑΣ 6.4.5	ΘΕΡΜΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΥΡΙΑΣ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΠΟΥ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΜΑΝΣΗ DPPC ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΡΗ 4.5, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΔΙΣΥΣΤΑΔΙΚΟΥ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PNIPAM-B-ΡΑΑ _{70:30}	108

ΠΙΝΑΚΑΣ 6.4.6	ΘΕΡΜΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΥΣΑΣ ΚΟΡΥΦΗΣ ΠΟΥ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΜΑΝΣΗ DPPC
	ΔΙΠΛΟΣΤΟΙΒΑΔΩΝ, ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΡΗ 4.5, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ
	ΔΙΣΥΣΤΑΔΙΚΟΥ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ ΡΝΙΡΑΜ-Β-ΡΑΑ70:30. 109