



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ» ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ
«ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες με
πολυ(ακρυλικό βουτυλεστέρα) ως υδρόφοβη
συστάδα: Σύνθεση και αυτο-οργανούμενες νανοδομές
σε υδατικά διαλύματα.**

**ΧΡΟΝΗ ΑΓΓΕΛΙΚΗ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ**

**ΑΘΗΝΑ
ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2019**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες με πολυ(ακρυλικό βουτυλεστέρα) ως υδρόφοβη συστάδα: Σύνθεση και αυτο-οργανούμενες νανοδομές σε υδατικά διαλύματα.

ΧΡΟΝΗ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

A.M.: 171010

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Ερμόλαος Ιατρού, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ερμόλαος Ιατρού, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Μαρίνος Πιτσικάλης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Αστέριος Πίσπας, Διευθυντής Ερευνών, Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 28/01/2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αμφίφιλα κατά συστάδες συμπολυμερή αποτελούν ένα ευρύ και σημαντικό αντικείμενο έρευνας για βιολογικές εφαρμογές, λόγω της αυτο-οργάνωσής τους σε μικκυλιακές δομές καθώς και των ιδιαίτερων φυσικοχημικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν όταν εισαχθούν σε κατάλληλο διαλύτη. Τα αποκρινόμενα σε ερεθίσματα αμφίφιλα συμπολυμερή παρουσιάζουν έντονο ενδιαφέρον ως προς την σύνθεση, τις ιδιότητες και τις εφαρμογές τους ως φορείς φαρμάκων και γονιδιακής θεραπείας.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία συντέθηκαν τα αμφίφιλα δισυσταδικά συμπολυμερή πολυ(ακρυλικός n-βουτυλεστέρας)-b-πολυ(ακρυλικός 2-διμεθυλάμινο αιθυλεστέρας, PnBA-b-PDMAEA και πολυ(ακρυλικός n-βουτυλεστέρας)-b-πολυ(ακρυλικός εστέρας της ολιγο αιθυλενογλυκόλης)), PnBA-b-POEGA με διαφορετικά μοριακά βάρη της πρώτης συστάδας μέσω της τεχνικής του πολυμερισμού RAFT (πολυμερισμός αντιστρεπτής-προσθήκης μεταφοράς αλυσίδας με απόσπαση). Πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις χημικής τροποποίησης για τα PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερή με σκοπό την μετατροπή τους σε δισυσταδικούς αμφίφιλους κατιοντικούς πολυηλεκτρολύτες.

Επιπροσθέτως, διεξήχθη η μελέτη ως προς το φυσικοχημικό και μοριακό τους χαρακτηρισμό όσο και της αυτο-οργάνωσής τους σε υδατικά μέσα. Χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές χαρακτηρισμού σκέδασης φωτός, φασματοσκοπικές τεχνικές, χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών και κρυογονική ηλεκτρονική μικροσκοπία διαπερατότητας. Οι ιδιότητες της αυτο-οργάνωσής τους μελετήθηκαν ως συνάρτηση μεταβολών στη θερμοκρασία, στο pH και στην ιοντική ισχύ για τα PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερή. Κατόπιν, τα χημικώς τροποποιημένα κατιοντικά πολυηλεκτρολυτικά συμπολυμερή συμπλέχθηκαν με μόρια DNA. Παρακολουθήθηκε η διαδικασία της σύμπλεξης και εξετάστηκαν οι ιδιότητες των συμπλόκων που σχηματίστηκαν προκειμένου να αναγνωρισθεί η χρήση τους για γονιδιακή θεραπεία.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Σύνθεση και χαρακτηρισμός πολυμερών

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες, πολυηλεκτρολύτες, νανοδομές πολυηλεκτρολυτικών συμπολυμερών, σύμπλεξη με DNA.

ABSTRACT

Amphiphilic block copolymers attract the scientific interest due to the unique property to self-assemble in aqueous solutions into micelles, vesicles etc which allows their utilization in biomedical applications. Stimuli-responsive amphiphilic block copolymers are an intense topic of investigation regarding the synthesis, properties and applications for drug and gene delivery vehicles.

In this thesis, ([poly(n-butyl acrylate)-b-poly(2-(dimethylamino) ethyl acrylate)], PnBA-b-PDMAEA, and ([poly(n-butyl acrylate)-b-poly(oligo ethylene glycol methyl ether acrylate)], PnBA-b-POEGA, were synthesized with different molecular weights of the hydrophobic block using the RAFT (reversible-addition fragmentation chain transfer polymerization) polymerization technique. The PDMAEA block was quaternized resulting to cationic diblock polyelectrolytes.

The molecular and physicochemical characterization, as well as their self-assembly behaviour in aqueous media was studied through light scattering and spectroscopy techniques, size exclusion chromatography and cryogenic transmission electron microscopy. Self-assembly properties were studied versus temperature, pH and ionic strength for PnBA-b-PDMAEA copolymers. The quaternized copolymers are utilized for complexation with DNA through electrostatic interactions. The formation, properties and applications of PnBA-b-PDMAEA/DNA polyplexes were determined for potential utilization as drug and gene delivery carriers.

SUBJECT AREA: Polymer synthesis and characterization

KEYWORDS: Amphiphilic block copolymers, polyelectrolytes, nanostructures of polyelectrolyte block copolymers, complexation with DNA.

**Αφιερωμένο στον παππού μου,
Ιωάννη Αγαπάκη**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών στα πλαίσια απόκτησης του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης στην Επιστήμη Πολυμερών.

Πρωταρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντά μου Δρ. Αστέριο Πίσπα, Διευθυντή Ερευνών του Ινστιτούτου Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών για τη συνεχή καθοδήγησή του και την αμέριστη βοήθεια του στη διεξαγωγή της ερευνητικής μου εργασίας, καθώς ήταν πάντα παρών στις δυσκολίες που προέκυπταν κατά την πορεία των πειραμάτων.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντά μου, Δρ. Ερμόλαο Ιατρού, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και τον Δρ. Μαρίνο Πιτσικάλη, καθώς και όλους του διδάσκοντες του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Επιστήμη Πολυμερών και Εφαρμογές της» για τις πολύτιμες γνώσεις που αποκόμισα παρακολουθώντας το πρόγραμμα.

Επίσης, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα Αθανάσιο Σκανδάλη για την αδιάκοπη συνεισφορά του και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου εργασίας καθώς και στις υποψήφιες διδάκτορες Βαρβάρα Χρυσοστόμου, Γιαούζη Δέσποινα και Μάρθα Καφετζή για τη βοήθειά τους και το έμπρακτο ενδιαφέρον τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της ερευνητικής μου εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ερευνητές και τα μέλη του Ινστιτούτου Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών για την ηθική τους υποστήριξη και την διασφάλιση ευχάριστου κλίματος συνεργασίας, που με βοήθησαν σημαντικά στην εξέλιξη και ολοκλήρωση της ερευνητικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια και τους ανθρώπους που με στήριξαν για την εμπιστοσύνη και την συμπαράσταση που μου έδειξαν όλη αυτήν την περίοδο. `

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	23
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	24
1.1 Αμφίφιλα συμπολυμερή	24
1.1.1 Μικκύλια Αμφίφιλων Συμπολυμερών	25
1.1.2 Παρασκευή Μικκυλίων από Αμφίφιλα Συμπολυμερή	26
1.1.3 Μορφολογία πολυμερικών νανοδομών	27
1.2 Χαρακτηρισμός μικκυλίων.....	31
1.3 Πολυηλεκτρολύτες	33
1.3.1 Αμφίφιλα Συμπολυμερή με Συστάδες Πολυηλεκτρολύτη.....	35
1.4 Αποκρίσιμα πολυμερή	35
1.5 pH-Αποκρινόμενα πολυμερή	36
1.5.1 Θερμοαποκρινόμενα πολυμερή	38
Η θερμοκρασία αποτελεί ένα ακόμη ερέθισμα στα αποκρίσιμα πολυμερικά συστήματα. Μια από τις μοναδικές ιδιότητες των θερμοευαίσθητων πολυμερών είναι η ύπαρξη μιας κρίσιμης θερμοκρασίας διάλυσης (Lower Critical Solution Temperature, LCST). [60]	38
1.5.2 Επίδραση ιοντικής ισχύος	40
1.6 Σύμπλεξη πολυμερών με DNA	40
1.7 Πολυμερισμός Αντιστρεπτής Προσθήκης-Μεταφοράς Αλυσίδας με Απόσπαση (RAFT).....	41
1.8 Σκοπός της εργασίας	45
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ	47
2.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC).....	47
2.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹ H-NMR).....	49
2.3 Φασματοσκοπία φθορισμού (FS)	50
2.4 Φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).....	52

2.5	Σκέδαση φωτός (LS).....	54
2.5.1	Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS).....	55
2.5.2	Στατική σκέδαση φωτός (SLS)	57
2.5.3	Ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός (ELS)	59
2.6	Κρυογονική ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (Cryo-TEM)	62
3.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	65
3.1	Υλικά και Αντιδραστήρια	65
3.2	Οργανολογία και τεχνικές χαρακτηρισμού	66
3.3	Σύνθεση Πολυμερών μέσω Τεχνικής Πολυμερισμού RAFT	68
3.3.1	Σύνθεση ομοπολυμερούς ακρυλικού η-βουτυλεστέρα (PnBA) ...	69
3.3.2	Σύνθεση PnBA-b-PDMAEA Συμπολυμερών	70
3.3.3	Σύνθεση PnBA-b-POEGA συμπολυμερών.....	71
3.4	Σύνθεση χημικά τροποποιημένων συμπολυμερών	71
3.4.1	Σύνθεση PnBA-b-Q ₁ PDMAEA συμπολυμερών με αντιδραστήριο CH ₃ I 72	
3.4.2	Σύνθεση PnBA-b-Q ₆ PDMAEA συμπολυμερών με αντιδραστήριο C ₆ H ₁₃ I 72	
3.5	Μέθοδοι παρασκευής και αυτο-οργάνωση μικκυλιακών δομών.....	73
3.5.1	Αυτο-οργάνωση των PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών σε υδατικά διαλύματα	74
3.5.2	Αυτο-οργάνωση των PnBA-b-POEGA συμπολυμερών σε υδατικά διαλύματα	74
3.5.3	Αυτο-οργάνωση των PnBA-b-Q ₁ PDMAEA και PnBA-b- Q ₆ PDMAEA συμπολυμερών σε υδατικά διαλύματα.....	75
3.6	Μελέτη της επίδρασης φυσικοχημικών παραμέτρων στα διαλύματα των συμπολυμερών.....	75
3.6.1	Μεταβολή του pH των διαλυμάτων των συμπολυμερών	75

3.6.2	Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας	76
3.6.3	Μελέτη της ιοντικής ισχύος.....	76
3.7	Μελέτες σύμπλεξης των συμπολυμερών με μόρια DNA.....	77
3.7.1	Σύμπλεξη των PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀ συμπολυμερών με DNA... ..	78
3.7.2	Σύμπλεξη των PnBA ₂₁ -b-Q ₁ PDMAEA ₇₉ μικκυλίων με DNA.....	78
3.7.3	Σύμπλεξη των PnBA ₃₃ -b-Q ₆ PDMAEA ₃₀ μικκυλίων με DNA.....	79
3.8	Μελέτη επίδρασης της ιοντικής ισχύος στα σύμπλοκα με μόρια DNA	80
3.8.1	Μελέτη επίδρασης ιοντικής ισχύος στα PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀ /DNA σύμπλοκα	80
3.8.2	Μελέτη επίδρασης ιοντικής ισχύος στα PnBA ₂₁ -b-Q ₁ PDMAEA ₇₉ /DNA σύμπλοκα.....	80
3.8.3	Μελέτη επίδρασης ιοντικής ισχύος στα PnBA ₃₃ -b-Q ₆ PDMAEA ₃₀ /DNA σύμπλοκα.....	81
4.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	82
4.1	Σύνθεση PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών.....	82
4.2	Μοριακός χαρακτηρισμός PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών	84
4.3	Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών..	86
4.3.1	Επίδραση του pH	87
4.3.2	Επίδραση της ιοντικής ισχύος	101
4.4	Σύμπλεξη PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀ συμπολυμερούς με DNA	102
4.4.1	Μελέτη επίδρασης ιοντικής ισχύος στα PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀ /DNA σύμπλοκα	106
4.5	Σύνθεση PnBA-b-POEGA συμπολυμερών	107
4.6	Μοριακός και φυσικοχημικός χαρακτηρισμός PnBA-b-POEGA συμπολυμερών	107
4.7	Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός PnBA-b-POEGA συμπολυμερών ..	110

4.8	Μελέτη επίδρασης φυσικοχημικών παραμέτρων στα PnBA-b-POEGA διαλύματα συμπολυμερών	113
4.8.1	Μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας	113
4.9	Σύνθεση και μοριακός χαρακτηρισμός PnBA-b-Q ₁ PDMAEA συμπολυμερών	114
4.10	Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός PnBA-b-Q ₁ PDMAEA συμπολυμερών	117
4.11	Μελέτη επίδρασης φυσικοχημικών παραμέτρων στα PnBA ₂₁ -b-Q ₁ PDMAEA ₇₉ διαλύματα συμπολυμερών	119
4.11.1	Μελέτη επίδρασης της ιοντικής ισχύος.....	119
4.12	Σύμπλεξη PnBA ₂₁ -b-Q ₁ PDMAEA ₇₉ με DNA.....	120
4.12.1	Μελέτη επίδρασης ιοντικής ισχύος στα PnBA ₂₁ -b-Q ₁ PDMAEA ₇₉ /DNA σύμπλοκα.....	124
4.13	Σύνθεση PnBA-b-Q ₆ PDMAEA συμπολυμερών	125
4.14	Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός PnBA-b-Q ₆ PDMAEA συμπολυμερών	127
4.15	Μελέτη επίδρασης φυσικοχημικών παραμέτρων στα PnBA-b-Q ₆ PDMAEA διαλύματα συμπολυμερών	130
4.15.1	Μελέτη επίδρασης της ιοντικής ισχύος.....	130
4.15.2	Μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας	131
4.16	Σύμπλεξη PnBA ₃₃ -b-Q ₆ PDMAEA ₃₀ με DNA.....	133
4.16.1	Μελέτη επίδρασης ιοντικής ισχύος στα PnBA-b-Q ₆ PDMAEA/DNA σύμπλοκα.....	136
5.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	138
6.	ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....	140
7.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	141
8.	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	143

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 4.1: Συγκριτικό χρωματογράφημα SEC του PnBA ομοπολυμερούς και του PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀ συμπολυμερούς.....	84
Σχήμα 4.2: Φάσμα ¹ H-NMR του συμπολυμερούς PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀ σε CDCl ₃	86
Σχήμα 4.3: Μετρήσεις R _h και έντασης I συναρτήσει μεταβολής pH για το συμπολυμερές PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀ στα τρία διαφορετικά πρωτόκολλα παρασκευής των διαλυμάτων τους.	89
Σχήμα 4.4: Διάγραμμα της έντασης του λόγου των σχετικών κορυφών I ₁ / I ₃ του πυρενίου συναρτήσει της συγκέντρωσης για το συμπολυμερές PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀	90
Σχήμα 4.5: Διάγραμμα της έντασης του λόγου των σχετικών κορυφών I ₁ / I ₃ του πυρενίου συναρτήσει της συγκέντρωσης για το συμπολυμερές PnBA ₇₃ -b-PDMAEA ₂₇	91
Σχήμα 4.6: Συγκριτικά διαγράμματα του PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀ συμπολυμερούς στα διαφορετικά pH σύμφωνα με το πρώτο πρωτόκολλο παρασκευής.....	93
Σχήμα 4.7: Συγκριτικά διαγράμματα του PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀ συμπολυμερούς στα διαφορετικά pH σύμφωνα με το δεύτερο πρωτόκολλο παρασκευής.....	93
Σχήμα 4.8: Συγκριτικά διαγράμματα του PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀ συμπολυμερούς στα διαφορετικά pH σύμφωνα με το τρίτο πρωτόκολλο παρασκευής.....	94
Σχήμα 4.9: Συγκριτικά διαγράμματα του PnBA ₇₃ -b-PDMAEA ₂₇ συμπολυμερούς στα διαφορετικά pH σύμφωνα με το τρίτο πρωτόκολλο παρασκευής.....	94
Σχήμα 4.10: Διάγραμμα εξάρτησης της R _h και της I από την επίδραση της ιοντικής ισχύος για το PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀ συμπολυμερές.....	101

Σχήμα 4.11: Μεταβολή της R_h , έντασης I και ζ-δυναμικού συναρτήσει του λόγου N/P για το σύμπλοκο PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀ /DNA.	103
Σχήμα 4.12: Διάγραμμα απόσβεσης φθορισμού και αντίστοιχων φασμάτων που περιγράφουν την αλληλεπίδραση EtBr/DNA με το σύμπλοκο PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀	104
Σχήμα 4.13: Φάσματα απορρόφησης υπεριώδους για το δείγμα PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀ /DNA σε αναλογίες N/P από 0.25 έως 4.....	105
Σχήμα 4.14: Διάγραμμα εξάρτησης της R_h και της I από την επίδραση της μεταβολής των λόγων N/P για το σύμπλοκο PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀ /DNA. ...	106
Σχήμα 4.15: Συγκριτικό χρωματογράφημα SEC του PnBA ομοπολυμερούς με 4.000 g/ml μοριακό βάρος και του PnBA ₃₀ -b-POEGA ₇₀ συμπολυμερούς. ...	108
Σχήμα 4.16: Συγκριτικό χρωματογράφημα SEC του PnBA ομοπολυμερούς με 7.800 g/ml μοριακό βάρος και του PnBA ₂₇ -b-POEGA ₇₃ συμπολυμερούς. ...	108
Σχήμα 4.18: Φάσμα ¹ H-NMR του συμπολυμερούς PnBA ₂₇ -b-POEGA ₇₃ σε CDCl ₃	110
Σχήμα 4.17: Φάσμα ¹ H-NMR του συμπολυμερούς PnBA ₃₀ -b-POEGA ₇₀ σε CDCl ₃	110
Σχήμα 4.19: Συγκριτικό διάγραμμα της έντασης του λόγου των σχετικών κορυφών I_1 / I_3 του πυρενίου συναρτήσει της συγκέντρωσης για τα PnBA-b-POEGA συμπολυμερή.	111
Σχήμα 4.20: Συγκριτικό διάγραμμα κατανομής μεγεθών για τα μικύλια PnBA-b-POEGA συμπολυμερή.	112
Σχήμα 4.21: Μεταβολή θερμοκρασίας συναρτήσει R_h και έντασης I για το PnBA-b-POEGA συμπολυμερές.	114

Σχήμα 4.22: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του συμπολυμερούς $\text{PnBA}_{21}\text{-b-Q}_1\text{PDMAEA}_{79}$ συμπολυμερούς σε Acetone-d_6	116
Σχήμα 4.23: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του συμπολυμερούς $\text{PnBA}_{42}\text{-b-Q}_1\text{PDMAEA}_{58}$ συμπολυμερούς σε Acetone-d_6	117
Σχήμα 4.24: Διάγραμμα της έντασης του λόγου των σχετικών κορυφών I_1 / I_3 του πυρενίου συναρτήσει της συγκέντρωσης για το $\text{PnBA}_{21}\text{-b-Q}_1\text{PDMAEA}_{79}$ συμπολυμερές.	118
Σχήμα 4.25: Διάγραμμα κατανομής μεγεθών του $\text{PnBA}_{21}\text{-b-Q}_1\text{PDMAEA}_{79}$ συμπολυμερούς.	118
Σχήμα 4.26: Μεταβολή της ιοντικής ισχύος συναρτήσει R_h και I για $\text{PnBA}_{21}\text{-b-Q}_1\text{PDMAEA}_{79}$ συμπολυμερές.....	120
Σχήμα 4.27: Μεταβολή της R_h , έντασης I και ζ-δυναμικού συναρτήσει του λόγου N/P για το σύμπλοκο $\text{PnBA}_{21}\text{-b-Q}_1\text{PDMAEA}_{79}/\text{DNA}$	121
Σχήμα 4.28: Διάγραμμα απόσβεσης φθορισμού και αντίστοιχων φασμάτων που περιγράφουν την αλληλεπίδραση EtBr/DNA με το σύμπλοκο $\text{PnBA}_{21}\text{-b-Q}_1\text{PDMAEA}_{79}/\text{DNA}$	123
Σχήμα 4.29: Φάσματα απορρόφησης υπεριώδους για το δείγμα $\text{PnBA}_{21}\text{-b-Q}_1\text{PDMAEA}_{79}/\text{DNA}$ σε αναλογίες N/P από 0.25 έως 4.....	124
Σχήμα 4.30: Διάγραμμα εξάρτησης της R_h και της I από την επίδραση της μεταβολής των λόγων N/P για το σύμπλοκο $\text{PnBA}_{21}\text{-b-Q}_1\text{PDMAEA}_{79}/\text{DNA}$	125
Σχήμα 4.31: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του συμπολυμερούς $\text{PnBA}_{21}\text{-b-Q}_1\text{PDMAEA}_{79}$ συμπολυμερούς σε Acetone-d_6	127
Σχήμα 4.32: Συγκριτικό διάγραμμα της έντασης του λόγου των κορυφών I_1 / I_3 του πυρενίου συναρτήσει της συγκέντρωσης για τα $\text{PnBA-b-Q}_6\text{PDMAEA}$ συμπολυμερή.....	128

Σχήμα 4.33: Συγκριτικό διάγραμμα κατανομής μεγεθών των PnBA-b-Q ₆ PDMAEA συμπολυμερών.	129
Σχήμα 4.35: Μεταβολή της ιοντικής ισχύος συναρτήσει R _h και I για PnBA ₆₆ -b-Q ₆ PDMAEA ₁₆ συμπολυμερές.....	131
Σχήμα 4.34: Μεταβολή της ιοντικής ισχύος συναρτήσει R _h και I για το PnBA ₃₃ -b-Q ₆ PDMAEA ₃₀ συμπολυμερές.	131
Σχήμα 4.37: Μεταβολή της θερμοκρασίας συναρτήσει R _h και I για PnBA ₆₆ -b-Q ₆ PDMAEA ₁₆ συμπολυμερές.....	132
Σχήμα 4.36: Μεταβολή της θερμοκρασίας συναρτήσει R _h και I για PnBA ₃₃ -b-Q ₆ PDMAEA ₃₀ συμπολυμερές.....	132
Σχήμα 4.38: Μεταβολή της R _h , έντασης I και ζ-δυναμικού συναρτήσει του λόγου N/P για το σύμπλοκο PnBA ₃₃ -b-Q ₆ PDMAEA ₃₀ /DNA.	134
Σχήμα 4.39: Διάγραμμα απόσβεσης φθορισμού και αντίστοιχων φασμάτων που περιγράφουν την αλληλεπίδραση EtBr/DNA με το σύμπλοκο PnBA ₃₃ -b-Q ₆ PDMAEA ₃₀ /DNA. Η γραμμοσκιασμένη περιοχή αντιστοιχεί σε αναλογίες που οδηγούν σταδιακά σε καταβύθιση των συμπλόκων.	135
Σχήμα 4.40: Φάσματα απορρόφησης υπεριώδους για το δείγμα PnBA ₃₃ -b-Q ₆ PDMAEA ₃₀ /DNA σε αναλογίες N/P από 0.25 έως 4.....	136
Σχήμα 4.41: Διάγραμμα εξάρτησης της R _h και της I από την επίδραση της μεταβολής των λόγων N/P για το σύμπλοκο PnBA ₃₃ -b-Q ₆ PDMAEA ₃₀ /DNA.	137

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: α) τυπικό ή τυχαίο συμπολυμέρες, β) εναλλασσόμενο συμπολυμερές, γ) ανδρομερές συμπολυμερές/συμπολυμερές κατά συστάδες, δ) ενοφθαλμισμένο συμπολυμερές.	24
Εικόνα 1.2: Σχηματική αναπαράσταση ενός σφαιρικού μικκυλίου.....	25
Εικόνα 1.3: Απεικόνιση σχηματισμού μικκυλίου από δισυσταδικό συμπολυμερές.	27
Εικόνα 1.4: Διάφορες γεωμετρίες συσταδικών συμπολυμερών σε επιλεκτικές συνθήκες διαλύματος.....	28
Εικόνα 1.5: Σχηματική αναπαράσταση σφαιρικών μικκυλίων AB συμπολυμερούς σε έναν εκλεκτικό για την A συστάδα διαλύτη για τα Μικκύλια hairy like στην πρώτη περίπτωση και τα μικκύλια crew-cut στην δεύτερη περίπτωση. Όπου R_c η ακτίνα του πυρήνα και L το πάχος της κορώνας.....	29
Εικόνα 1.6: Σχηματική αναπαράσταση ενός "σκωληκοειδούς" μικκυλίου.....	30
Εικόνα 1.7: Σχηματική αναπαράσταση ενός κυστιδίου-πολυμεροσώματος. ...	31
Εικόνα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση ενός πολυηλεκτρολύτη.	33
Εικόνα 1.9: Σχηματική αναπαράσταση εξυπνων αποκρίσιμων πολυμερών σε μεταβολές της θερμοκρασίας και του pH.	36
Εικόνα 1.10: Σχηματική αναπαράσταση δύο τύπων μικκυλίων ευαίσθητων στο pH. (A) αποσυναρμολόγηση μικκυλίων, (B) στοχευμένη απελευθέρωση φαρμάκου.	37
Εικόνα 1.11: Αναπαράσταση της μετάπτωσης φάσης που συνδέεται α) με την LCST και β) με την UCST.	39
Εικόνα 1.12: Δομικά χαρακτηριστικά των thiocarbonylthio CTAs και το ενδιάμεσο προϊόν που σχηματίζεται κατά την προσθήκη ριζών.....	43

Εικόνα 1.13: Μηχανισμός πολυμερισμού RAFT.	44
Εικόνα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση οργανολογίας SEC.	48
Εικόνα 2.2: Σχηματικό διάγραμμα φασματομέτρου NMR.....	50
Εικόνα 2.3: Διάγραμμα Jablonski.....	51
Εικόνα 2.4: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης φασματοσκοπίας φθορισμού.	52
Εικόνα 2.5: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού.....	54
Εικόνα 2.6: Σχηματικό διάγραμμα συσκευής Δυναμικής σκέδασης φωτός. ...	56
Εικόνα 2.7: Διάγραμμα Zimm.....	59
Εικόνα 2.8: Σχηματική απεικόνιση της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας και των επιμέρους επιπέδων που την αποτελούν.	60
Εικόνα 2.9: Σχηματική απεικόνιση της οργανολογίας ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός.....	61
Εικόνα 2.10: Προετοιμασία του δείγματος μέσω της διαδικασίας υαλοποίησης για την Cryo-TEM μικροσκοπία.....	63
Εικόνα 2.11: Σχηματική αναπαράσταση ενός Α) Ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, Β) του συστήματος υαλοποίησης του δείγματος και Γ) το στήριγμα του δείγματος για Cryo-TEM μικροσκοπία.	64
Εικόνα 3.1: Χημική δομή του AIBN απαρχητή, του αντιδραστηρίου μεταφοράς αλυσίδας CTA και του μονομερούς nBA.	69
Εικόνα 3.2: Χημική δομή του DMAEA μονομερούς.....	70
Εικόνα 3.3: Χημική δομή μονομερούς OEGA.....	71
Εικόνα 3.4: Αντίδραση τεταρτοταγοποίησης (Quaternization) τριτοταγούς αμίνης PDMAEA με CH ₃ I.	72

Εικόνα 3.5: Αντίδραση τεταρτοταγοποίησης (Quaternization) για το 25% τριτοταγούς αμίνης PDMAEA με C ₆ H ₁₃ I.....	73
Εικόνα 4.1: Συνθετική πορεία για την παρασκευή του ομοπολυμερούς PnBA.....	83
Εικόνα 4.2: Συνθετική πορεία για την παρασκευή του αμφίφιλου δισυσταδικού PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερούς.....	83
Εικόνα 4.3: Μικρογραφίες Cryo-TEM της μορφολογίας του PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀ συμπολυμερούς σε pH=3.....	97
Εικόνα 4.4: Μικρογραφίες Cryo-TEM της μορφολογίας του PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀ συμπολυμερούς σε pH=7.....	98
Εικόνα 4.5: Μικρογραφίες Cryo-TEM της μορφολογίας του PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀ συμπολυμερούς σε pH=10.....	99
Εικόνα 4.6: Συνθετική πορεία για τη παρασκευή του αμφίφιλου δισυσταδικού PnBA-b-POEGA.....	107
Εικόνα 4.7: Αντίδραση τεταρτοταγοποίησης της αμίνης του PDMAEA και σύνθεση του νέου PnBA-b-Q ₁ PDMAEA συμπολυμερούς.....	115
Εικόνα 4.8: Σχηματική απεικόνιση της συναρμογής των PnBA-b-QPDMAEA συμπολυμερών με το DNA προς σχηματισμό συμπλόκων.....	120
Εικόνα 4.9: Αντίδραση τεταρτοταγοποίησης της αμίνης του PDMAEA (25%) και σύνθεση του νέου PnBA-b-Q ₆ PDMAEA συμπολυμερούς.....	126

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 4.1: Μοριακά χαρακτηριστικά ομοπολυμερών PnBA μέσω SEC.	85
Πίνακας 4.2: Μοριακά χαρακτηριστικά PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών μέσω SEC.	86
Πίνακας 4.3: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων DLS, SLS, ELS, FS για τα PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερή στα διαφορετικά pH σύμφωνα με τα τρία πρωτόκολλα παρασκευής τους.....	96
Πίνακας 4.4: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων από Cryo-TEM και DLS για το PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀ συμπολυμερές.	100
Πίνακας 4.5: Μοριακά χαρακτηριστικά των PnBA-b-POEGA συμπολυμερών.	110
Πίνακας 4.6: Αποτελέσματα DLS, FS, ELS των PnBA-b-POEGA συμπολυμερών.	113
Πίνακας 4.7: Τα μοριακά βάρη και οι συστάσεις των συμπολυμερών PnBA-b-Q ₁ PDMAEA.....	116
Πίνακας 4.8: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων DLS, FS και ELS. ...	119
Πίνακας 4.9: Τα μοριακά βάρη και οι συστάσεις των συμπολυμερών PnBA-b-Q ₆ PDMAEA.....	127
Πίνακας 4.10: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων DLS, SLS, FS και ELS.	130
Πίνακας 6.1: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.	140
Πίνακας 7.1 Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους.	141

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματεύεται την σύνθεση νέων αμφίφιλων συμπολυμερών κατά συστάδες με πολυακρυλικό βουτυλεστέρα ως υδρόφοβη συστάδα με τη χρήση της τεχνικής του πολυμερισμού RAFT και την μελέτη των αυτο-οργανούμενων νανοδομών που σχηματίζουν σε υδατικά διαλύματα. Στο πρώτο κεφάλαιο δίνονται βασικές πληροφορίες για τα αμφίφιλα συμπολυμερή και τις νανοδομές που σχηματίζουν. Ακολουθεί, αναλυτική περιγραφή της μεθοδολογίας του πολυμερισμού RAFT και παρουσιάζεται ο σκοπός της εργασίας.

Στο δεύτερο κεφάλαιο αναπτύσσονται οι αρχές λειτουργίας και διατάξεις των τεχνικών ενόργανης ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη και τον χαρακτηρισμό των υλικών που παρασκευάστηκαν. Στο τρίτο κεφάλαιο περιλαμβάνεται η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη παρασκευή των συμπολυμερών καθώς και τον χαρακτηρισμό τους. Στο τέταρτο κεφάλαιο παρατίθενται η παρουσίαση και η συζήτηση των αποτελεσμάτων που εξήχθησαν, παρουσιάζοντας τα αντίστοιχα διαγράμματα, σχήματα, εικόνες και πίνακες για την ορθή ανάλυσή τους. Το τελευταίο κεφάλαιο αναφέρεται στα συμπεράσματα που εξάχθηκαν κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων και την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

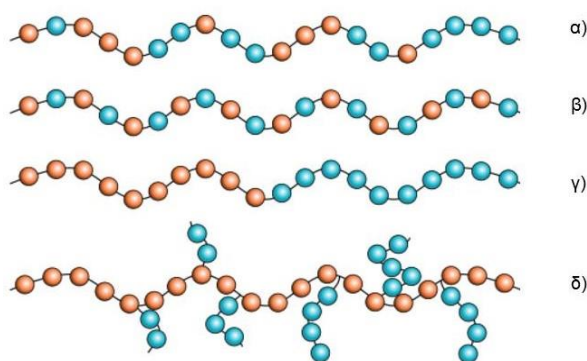
Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν στο Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, εκτός από τις μετρήσεις στη κρυογενική ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (Cryo-TEM) που εκτελέστηκαν από επιστημονικούς συνεργάτες σε εργαστήρια του Center of Polymer and Carbon Materials στο Zabrze της Πολωνίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αμφίφιλα συμπολυμερή

Τα πολυμερή χαρακτηρίζονται ως μόρια μεγάλου μεγέθους (μακρομόρια) και υψηλού μοριακού βάρους τα οποία αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες που ενώνονται μεταξύ τους με ομοιοπολικό δεσμό. Τα πολυμερή ανάλογα με την οργάνωση της κύριας αλυσίδας διαχωρίζονται σε ομοπολυμερή (homopolymers) και συμπολυμερή (copolymers). Ένα γραμμικό ομοπολυμερές περιλαμβάνει μόρια ενός είδους δομικών μονάδων, σε αντίθεση με ένα συμπολυμερές που εμπεριέχει δύο ή περισσότερα είδη δομικών μονάδων. Στην περίπτωση όπου δύο μονομερή πολυμεριστούν μαζί τότε είναι δυνατές οι ακόλουθες τέσσερις δευτερεύουσες στη δομή του προκύπτοντος συμπολυμερούς όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.1: τυπικό ή τυχαίο συμπολυμερές (random copolymer), εναλλασσόμενο συμπολυμερές (alternating copolymer), ανδρομερές συμπολυμερές ή συμπολυμερές κατά συστάδες (block copolymer) και ενοφθαλισμένο συμπολυμερές (graft copolymer). Όταν τα διαφορετικά είδη επαναλαμβανόμενων μονάδων εντοπίζονται σε διακριτές συστάδες κατά μήκος της πολυμερικής αλυσίδας το συμπολυμερές ονομάζεται δισυσταδικό (diblock copolymer). [1, 2]



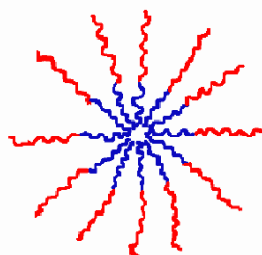
Εικόνα 1.1: α) τυπικό ή τυχαίο συμπολυμερές, β) εναλλασσόμενο συμπολυμερές, γ) ανδρομερές συμπολυμερές/συμπολυμερές κατά συστάδες, δ) ενοφθαλισμένο

Τα πολυμερή που αποτελούνται από μονομερικές ομάδες οι οποίες διαλύονται σε διαφορετικούς διαλύτες και έχουν μία υδρόφιλη και μία υδρόφοβη συστάδα ονομάζονται αμφίφιλα κατά συστάδες συμπολυμερή (amphiphilic copolymers). Τα αμφίφιλα συμπολυμερή παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον

τόσο στον τομέα της επιστήμης όσο και των εφαρμογών λόγω των ιδιαίτερων φυσικοχημικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν. [3] Η ασυμβατότητα των διαφορετικών συστάδων που απαρτίζουν ένα συμπολυμερές συμβάλλει στην αυτο-οργάνωση σε τήγματα και διαλύματα των πολυμερών αυτών. Η ιδιότητά τους αυτή οδηγεί στο σχηματισμό οργανωμένων δομών, συνήθως μικκυλίων σε διαλύματα, ανάλογα με τον διαλύτη στον οποίο είναι διαλυμένα. Τα αμφίφιλα κατά συστάδες συμπολυμερή έχουν ποικίλες εφαρμογές. Συνήθως χρησιμοποιούνται ως γαλακτωματοποιητές και ως τροποποιητές του ιξώδους σε βιομηχανικές και φαρμακευτικές εφαρμογές. Οι κολλοειδείς διασπορές που δημιουργούν βρίσκουν επίσης εφαρμογή στον τομέα της ελεγχόμενης μεταφοράς και αποδέσμευσης φαρμακευτικών ουσιών, της ανάπτυξης διαγνωστικών μέσων, της τροποποίησης επιφανειών, καθώς και σε γονιδιακές θεραπείες. [4]

1.1.1 Μικκύλια Αμφίφιλων Συμπολυμερών

Τα αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες (amphiphilic block copolymers) αποτελούν μία εξαιρετικά ενδιαφέρουσα κατηγορία πολυμερικών μακρομορίων, κυρίως λόγω της μοναδικής τους ικανότητας να αυτο-οργανώνονται σε διάλυμα όταν εισέρχονται σε έναν εκλεκτικό διαλύτη, δηλαδή έναν διαλύτη που είναι καλός μόνο για ένα από τα μονομερικά/πολυμερικά συστατικά. [5] Η ασυμβατότητα μεταξύ των συστάδων έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό συνήθως μικκυλίων κατά την διαλυτοποίηση των συμπολυμερών αυτών σε έναν εκλεκτικό διαλύτη.



Εικόνα 1.2: Σχηματική αναπαράσταση ενός σφαιρικού μικκυλίου.

Οι αδιάλυτες συστάδες συσσωματώνονται σχηματίζοντας έναν υδρόφοβο πυρήνα ο οποίος περιβάλλεται από τις διαλυτές συστάδες που αποτελούν την κορώνα, η οποία αποτρέπει την καθίζηση των συσσωμάτων και

σταθεροποιεί το σχηματιζόμενο νανοσωματίδιο στο διάλυμα. Η Εικόνα 1.2 αναπαριστά τέτοιου είδους συσσωματώματα. [6]

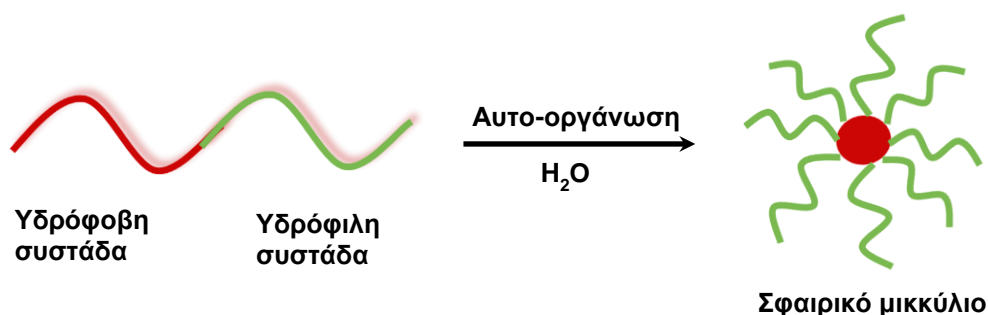
1.1.2 Παρασκευή Μικκυλίων από Αμφίφιλα Συμπολυμερή

Χαρακτηριστικό γνώρισμα του κάθε συστήματος συμπολυμερούς-διαλύτη για την μικκυλίωση των αμφίφιλων συμπολυμερών κατά συστάδες, σε αραιά διαλύματα εκλεκτικού διαλύτη για τη μία συστάδα, αποτελεί η κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση (Critical Micelle Concentration, CMC). Συγκεκριμένα όταν η συγκέντρωση του διαλύματος υπερβαίνει την τιμή αυτήν, τότε καθίσταται δυνατή η δημιουργία μικκυλίων. Σε συγκεντρώσεις μικρότερες της CMC στο διάλυμα υπάρχουν μόνο μοριακά διαλυμένες μεμονωμένες αλυσίδες (unimer chains) του συμπολυμερούς, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις συνυπάρχουν πολυμοριακά μικκύλια και μεμονωμένες αλυσίδες σε θερμοδυναμική ισορροπία μεταξύ τους. [7]

Υπάρχουν δύο διαδικασίες προετοιμασίας των μικκυλιακών διαλυμάτων. Η πρώτη διαδικασία εφαρμόζεται συνήθως σε συμπολυμερή με σχετικά μικρό μοριακό βάρος και μικρή σχετικά περιεκτικότητα στο αδιάλυτο συστατικό του συμπολυμερούς και περιλαμβάνει την αρχική διάλυση του αμφίφιλου συμπολυμερούς σε έναν εκλεκτικό διαλύτη (π.χ. νερό), δηλαδή έναν καλό διαλύτη για τη μια από δύο συστάδες. [8] Η Εικόνα 1.3 αναπαριστά την δημιουργία μικκυλιακών δομών από αυτήν την διαδικασία. Το διάλυμα βρίσκεται υπό ανάδευση για μεγάλο χρονικό διάστημα, θερμαίνεται ή υπόκειται σε κατεργασία εντός λουτρού υπερήχων. Η θερμοκρασία και η σύσταση του διαλύτη μεταβάλλονται, έτσι ώστε να προκληθεί ο σχηματισμός μικκυλίων. Ανάλογα με τις ιδιότητες του συστήματος συμπολυμερούς-διαλύτη, οι διαδικασίες αυτές πιθανόν να μην οδηγούν σε συνθήκες θερμοδυναμικής ισορροπίας στο διάλυμα. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελούν τα συμπολυμερή κατά συστάδες για τα οποία η συστάδα που σχηματίζει τον πυρήνα των μικκυλίων χαρακτηρίζεται από υψηλή θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g), π.χ. πολυστυρένιο. Σε αυτή τη περίπτωση τα χαρακτηριστικά των μικκυλίων, που θα ληφθούν θα αντανakλούν τη μορφολογία του συμπολυμερούς στη στερεά κατάσταση. Το διάλυμα θα είναι μία διασπορά σωματιδίων με μορφολογία όμοια με αυτή του αρχικού στερεού δείγματος,

παρά μία πραγματική ισορροπία μεταξύ ελεύθερων αλυσίδων συμπολυμερούς και μικκυλίων. [9]

Η δεύτερη διαδικασία βασίζεται στην διάλυση του συμπολυμερούς σε έναν μη εκλεκτικό διαλύτη, δηλαδή ένα κοινό καλό διαλύτη και για τις δυο συστάδες του συμπολυμερούς. Η παρασκευή μικκυλίων πραγματοποιείται με την αλλαγή του pH του διαλύματος, με μεταβολή της θερμοκρασίας ή με σταδιακή προσθήκη του εκλεκτικού διαλύτη. Στην τελευταία περίπτωση θα πρέπει να απομακρυνθεί ο κοινός καλός διαλύτης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με εξάτμιση του διαλύτη, εφόσον αυτός είναι πτητικός και ο εκλεκτικός διαλύτης έχει πολύ μεγαλύτερο σημείο ζέσεως. Προτιμώμενη μέθοδος παρασκευής μικκυλλιακών συστημάτων αποτελεί η σταδιακή αντικατάσταση του καλού διαλύτη με τον εκλεκτικό χρησιμοποιώντας μεμβράνες διαπίδυσης κυρίως σε υδατικά διαλύματα (dialysis), αφού εμποδίζει το σχηματισμό μεγάλων συσσωματωμάτων και επιτρέπει το σχηματισμό μικκυλίων από ασύμμετρα συμπολυμερή, δηλαδή συμπολυμερή που έχουν πολύ μεγάλο ποσοστό ως προς το αδιάλυτο συστατικό. [7]

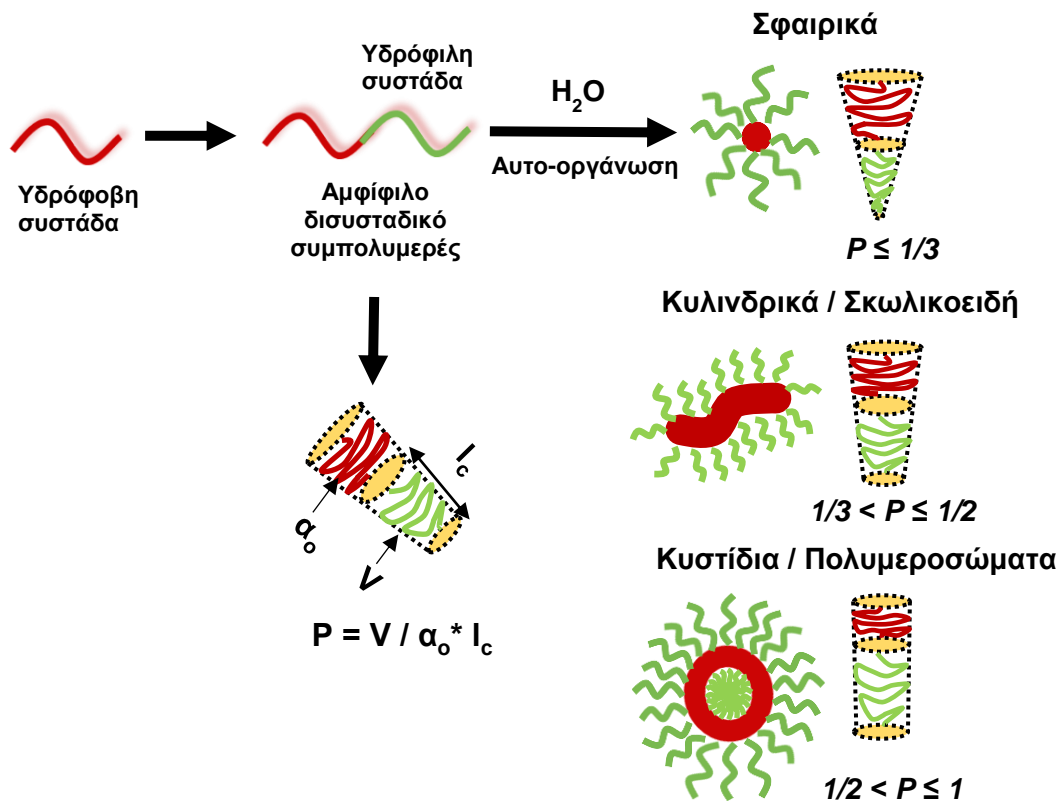


Εικόνα 1.3: Απεικόνιση σχηματισμού μικκυλίου από δισυσταδικό συμπολυμερές.

1.1.3 Μορφολογία πολυμερικών νανοδομών

Διαλύοντας ένα αμφίφιλο συσταδικό συμπολυμερές μέσα σε νερό και πάνω από την CMC ξεκινά η αυτο-οργάνωσή του σε ποικίλες νανοδομές, όπως σφαιρικά ή κυλινδρικά μικκύλια, σκωλικοειδή μικκύλια, πολυμεροσώματα κ.α σύμφωνα με την Εικόνα 1.4. [7, 10-19] Τα υδρόφοβα τμήματα της αλυσίδας συσσωματώνονται σε έναν υδρόφοβο πυρήνα, αφού είναι ενεργειακά οικονομικότερο από το να διαταχθεί νερό γύρω από τμήματα υλικού από όπου απωθείται ("hydrophobic effect"). Τα υδρόφιλα τμήματα διατάσσονται εξωτερικά του υδρόφοβου πυρήνα (κορώννα). Σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου

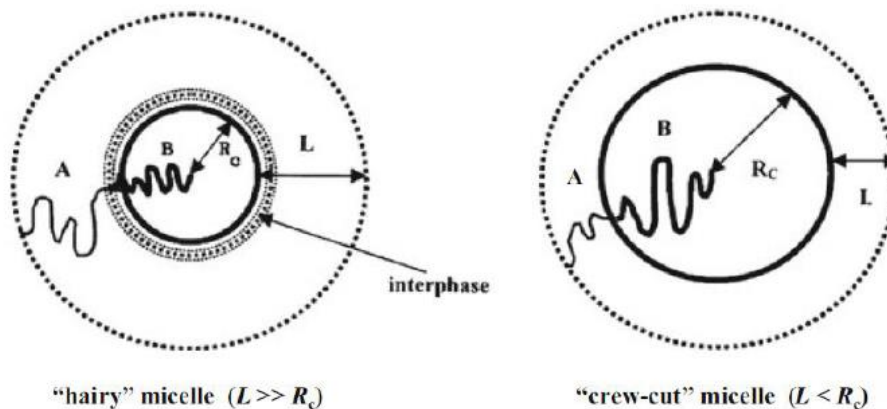
με τα μόρια νερού, πράγμα ενεργειακά προτιμητέο από τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση που θα επέφερε απωστικές δυνάμεις μεταξύ γειτονικών blocks. Η ισορροπία μεταξύ των δυνάμεων αυτών οδηγεί σε διαφορετικές γεωμετρίες μικκυλίων που εξαρτώνται από τη συγκέντρωση πολυμερούς και την αναλογία μάζας υδρόφοβων και υδρόφιλων ομάδων. Ορίζεται το αδιάστατο μέγεθος της παραμέτρου στοίβαξης, p (packing parameter): αν α_0 η διεπιφάνεια υδρόφοβων-υδρόφιλων blocks, l_c το μήκος του υδρόφιλου και v ο όγκος του, τότε: $p = V/\alpha_0 \cdot l_c = \text{Μοριακή Μάζα υδρόφοβου τμήματος} / \text{Μοριακή Μάζα υδρόφιλου τμήματος}$ και προκύπτει ένας γενικός κανόνας: για $\frac{1}{2} < p \leq 1$ έχουμε σχηματισμό μεμβράνης (διπλοστιβάδα), για $\frac{1}{3} < p \leq \frac{1}{2}$ κυλινδρικά μικκύλια, ενώ για $p \leq \frac{1}{3}$ αυτο-οργανώνονται σφαιρικά μικκύλια. [20]



Εικόνα 1.4: Διάφορες γεωμετρίες συσταδικών συμπολυμερών σε επιλεκτικές συνθήκες διαλύματος.

1.1.3.1 Σφαιρικά Μικκύλια

Η αυτο-οργάνωση ενός κλασσικού αμφίφιλου δισυσταδικού συμπολυμερούς AB οδηγεί σε δυο διαφορετικές μικκυλιακές δομές που παρουσιάζονται σχηματικά στην Εικόνα 1.5. Όταν οι αδιάλυτες συστάδες B που αποτελούν τον πυρήνα είναι μικρότερες από τις διαλυτές συστάδες A δημιουργούνται μικκύλια μικρότερου σε μέγεθος με συμπαγή πυρήνα και μεγαλύτερη σε μέγεθος κορώνας. Η ακτίνα R_c του κελύφους είναι μικρότερη από το πάχος L της κορώνας. Στην περίπτωση αυτή περιλαμβάνονται δομές όπως “μαλλιαρά” (hairy), “αστεροειδή” (star-like) ή “πυρήνα- κελύφους” (core-shell micelles) μικκύλια. Αντίθετα, όταν οι αδιάλυτες συστάδες B είναι μεγαλύτερες από τις διαλυτές A, τα μικκύλια που σχηματίζονται διαθέτουν ένα μεγάλο και συμπαγή πυρήνα και μια μικρή και εκτεταμένη κορώνα όπου ισχύει $L < R_c$. Σε αυτή τη περίπτωση χρησιμοποιείται ο όρος “crew-cut” micelles για να τα περιγράψει. [4, 7]

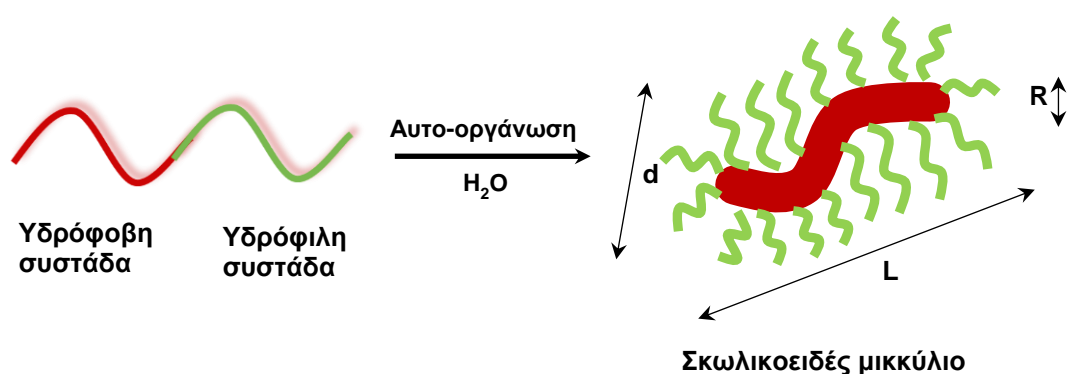


Εικόνα 1.5: Σχηματική αναπαράσταση σφαιρικών μικκυλίων AB συμπολυμερούς σε έναν εκλεκτικό για την A συστάδα διαλύτη για τα Μικκύλια hairy like στην πρώτη περίπτωση και τα μικκύλια crew-cut στην δεύτερη περίπτωση. Όπου R_c η ακτίνα του πυρήνα και L το πάχος της κορώνας.

1.1.3.2 Κυλινδρικά Μικκύλια

Τα κυλινδρικά μικκύλια που συχνά αναφέρονται και ως “σκωλικοειδή” (worm-like), “ραβδόμορφα” (rod-like) ή ακόμα και “νηματοειδή” μικκύλια (thread-like micelles) αποτελούν μία ακόμα ενδιαφέρουσα μορφολογία μικκυλιακών δομών. [21] Μια σχηματική αναπαράσταση ενός “σκωλικοειδούς” μικκυλίου παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.6.

Τα σκωλικοειδή μικκύλια έχουν κλασική μονοδιάστατη δομή, όπου το μήκος τους είναι αρκετές φορές μεγαλύτερο από την διάμετρο της διατομής τους. Παράλληλα, παρουσιάζουν πλούσιο δομικό πολυμορφισμό, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να είναι άκαμπτα ή λεπτά και εύκαμπτα. [16] Τα μικρά σε μήκος και άκαμπτα μικκύλια ορίζονται ως κυλινδρικά ή ραβδόμορφα, ενώ αυτά που είναι μεγάλου μήκους και λεπτά και εύκαμπτα ονομάζονται νηματοειδή μικκύλια. Τέλος, λόγω της κυλινδρικής τους δομής, τα μικκύλια αυτά επιδεικνύουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για εφαρμογές στο πεδίο της νανοτεχνολογίας και της ιατρικής και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς φαγο-μιμητικών φαρμάκων και μικροπόρων (micropore delivery agents). [22]



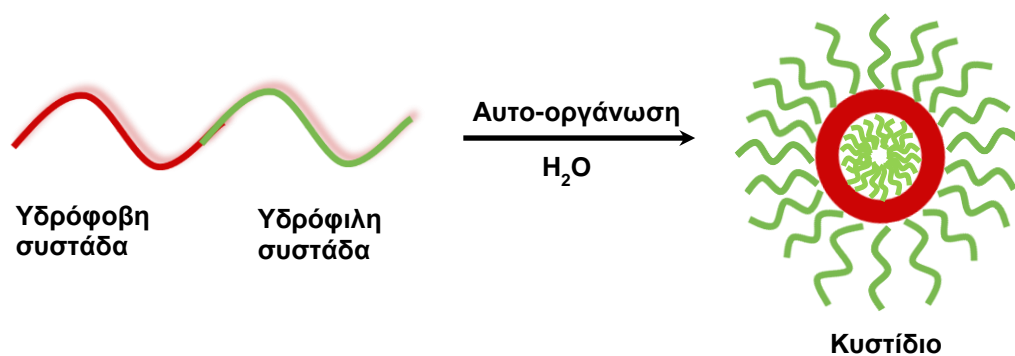
Εικόνα 1.6: Σχηματική αναπαράσταση ενός "σκωληκοειδούς" μικκυλίου.

1.1.3.3 Πολυμεροσώματα-Κυστίδια

Πολυμεροσώματα ή αλλιώς πολυμερικά κυστίδια είναι δομές που αποτελούνται από αμφίφιλα συσταδικά συμπολυμερή που αυτο-οργανώνονται έτσι ώστε στο εσωτερικό και το εξωτερικό της κύστης να είναι υδρόφιλα, ενώ στον ενδιάμεσο χώρο παρουσιάζουν υδροφοβική συμπεριφορά όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.7. [20]

Τα κυστίδια αποτελούν μια αρκετά ενδιαφέρουσα κατηγορία μακρομοριακής αυτο-οργάνωσης, λόγω της ομοιότητας που παρουσιάζουν με βιολογικές κυτταρικές μεμβράνες. Έχουν την ικανότητα να ελέγχουν το μέγεθός τους, ανάλογα με τις αλληλεπιδράσεις που δέχονται από το περιβάλλον. Η ευελιξία ως προς τις ιδιότητες μεμβράνης που παρουσιάζουν, τα καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμα σε (βιο)ηλεκτρονικές και καταλυτικές εφαρμογές, ακόμα και σε ιατρικές θεραπείες. Ακόμη, τα πολυμεροσώματα εμφανίζουν ενισχυμένη

σταθερότητα και σκληρότητα, μειωμένη διαπερατότητα, περιορισμένη κινητικότητα των αλυσίδων εντός της μεμβράνης και αντίσταση στη διάλυση. Επιπλέον, οι ενισχυμένες μηχανικές ιδιότητες των μεμβρανών των πολυμερικών κυστιδίων είναι αποτέλεσμα της διαπλοκής και αλληλοδιείσδυσης που συμβαίνουν μεταξύ των υδρόφοβων αλυσίδων μέσα στη μεμβράνη. [16, 21]



Εικόνα 1.7: Σχηματική αναπαράσταση ενός κυστιδίου-πολυμεροσώματος.

Η μακρομοριακή αρχιτεκτονική και η χημική σύνθεση των αμφίφιλων συμπολυμερών που σχηματίζουν τα πολυμεροσώματα είναι πιθανόν να είναι απλή ή σπανίως πιο περίπλοκη δίνοντας στα πολυμεροσώματα τις σημαντικές ιδιότητές τους. Για παράδειγμα, ένα συμπολυμερές τύπου AB αποτελεί την πιο απλή αρχιτεκτονική για τη πλειοψηφία των πολυμερικών κυστιδίων που δημιουργούνται από πολυμερή όπως τα PEO-PPO, PS-PAA, PS-PEO, PBD-PAA, PB-PEO and P2VP-PEO. [23]

Η μορφολογία των πολυμεροσωμάτων επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία ιονισμένων ομάδων ή ομάδων που δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου, από τις συνθήκες του διαλύματος (pH, θερμοκρασία, συγκέντρωση), από την παρουσία πρόσθετων (οξέα, βάσεις, άλατα, επιφανειοδραστικές ουσίες), καθώς επίσης και από τη μέθοδο παρασκευής τους. Για το λόγο αυτόν, τα πολυμερικά κυστίδια έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως φορείς χορήγησης φαρμάκων και γονιδιακής θεραπείας, ιατρικών απεικονιστικών, διάγνωσης και θεραπείας καρκίνου, κ.α. [24, 25]

1.2 Χαρακτηρισμός μικκυλίων

Οι μικκυλιακές δομές εμφανίζουν ορισμένα χαρακτηριστικά μεγέθη και ορισμένες παραμέτρους που αναφέρονται παρακάτω [6]:

- Κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση (CMC)
- Κρίσιμη μικκυλιακή θερμοκρασία (CMT)
- Ολικό μέγεθος του μικκυλίου (γυροσκοπική ακτίνα του μικκυλίου – R_g)
- Διαστάσεις του πυρήνα (R_c -η ακτίνα του πυρήνα του μικκυλίου) και του κελύφους (L -το πάχος του κελύφους του μικκυλίου)
- Υδροδυναμική ακτίνα του μικκυλίου – R_h
- Λόγος R_g/R_h που δίνει πληροφορίες για το σχήμα του μικκυλίου
- Φαινόμενο (apparent) μοριακό βάρος κατά βάρος του μικκυλίου $M_{w,app}$
- Αριθμός συσσωμάτωσης (N_w : ο αριθμός των πολυμερικών αλυσίδων ανά μικκύλιο)

Ο χαρακτηρισμός των αμφίφιλων μικκυλιακών δομών καθίσταται δυνατός μέσω της χρήσης διαφόρων πειραματικών τεχνικών. Τεχνικές μικροσκοπίας, όπως η μικροσκοπία ηλεκτρονικής διέλευσης (Transmission Electron Microscopy-TEM) [26], η κρυογονική ηλεκτρονική μικροσκοπία διαπερατότητας (cryo-TEM) [27], η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) [28] και η μικροσκοπία ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM) [29] παρέχουν σημαντικές πληροφορίες τόσο για το σχήμα όσο και για το μέγεθος των μικκυλίων στον πραγματικό χώρο.

Τεχνικές σκέδασης, όπως η σκέδαση νετρονίων και ακτίνων Χ σε μικρές γωνίες (SANS και SAXS), αλλά και η δυναμική και στατική σκέδαση φωτός (DLS και SLS), αποτελούν χρήσιμα πειραματικά εργαλεία καθώς η χρήση τους είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη για τη μελέτη των μικκυλιακών συστημάτων *in situ*. Μέσω των μετρήσεων σκέδασης εξάγονται σημαντικές παράμετροι του συστήματος, συμπεριλαμβανομένων της ακτίνας του πυρήνα, της ακτίνας του μικκυλίου, του μοριακού βάρους του μικκυλίου, μέσω του οποίου υπολογίζεται ο αριθμός συσσωμάτωσης, καθώς και της υδροδυναμικής και της γυροσκοπικής ακτίνας του μικκυλίου. Η υδροδυναμική ακτίνα εξάγεται επίσης μέσω μετρήσεων ιξωδομετρίας, οι οποίες παρέχουν το εσωτερικό ιξώδες του συστήματος. [30]

Φασματοσκοπικές μετρήσεις φθορισμού (Fluorescence spectroscopy-FS) χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της κρίσιμης μικκυλιακής συγκέντρωσης και την διερεύνηση της δυναμικής των αλυσίδων. Πραγματοποιείται είτε με ελεύθερους φθορίζοντες ιχνηθέτες, όπως είναι το

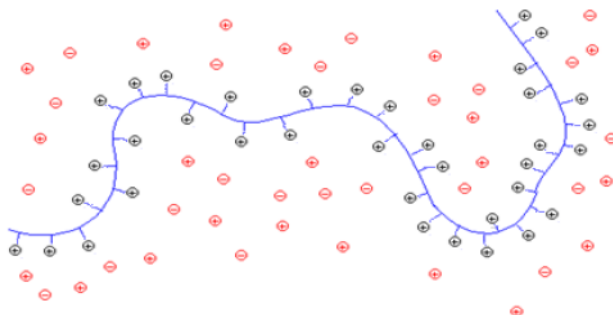
πυρένιο, είτε με ομοιοπολικά συνδεδεμένες στις πολυμερικές αλυσίδες φθορίζουσες ομάδες. Το πυρένιο είναι έντονα υδρόφοβο και έχει πολύ μικρή διαλυτότητα στο νερό. Είναι ένας φθορίζων ιχνηθέτης αποτελούμενος από τέσσερις συμπυκνωμένους βενζολικούς δακτυλίους με υψηλή συμμετρία χημικής δομής. Εκπέμπει φως με φωτοδιέγερση στα 334 nm και χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση της πολικότητας του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται διαλυμένο. Η διαλυτότητα του πυρενίου στο νερό είναι αρκετά περιορισμένη, αλλά μπορεί να αυξηθεί σημαντικά σε λιγότερο πολικό περιβάλλον, όπως σε υδατικά διαλύματα μικκυλίων, αφού ως υδρόφοβη ουσία μπορεί να εισχωρήσει στο εσωτερικό των πυρήνων των μικκυλίων. [31]

Η Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance spectroscopy $^1\text{H-NMR}$), χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της σύστασης και την ταυτοποίηση της χημικής δομής του συμπολυμερούς. [31]

Τεχνικές όπως η υπερφυγοκέντρωση και η Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (size exclusion chromatography-SEC) παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την κατανομή του μεγέθους και του βάρους των μικκυλίων καθώς και με την ισορροπία των μεμονωμένων αλυσίδων στο διάλυμα. [31]

1.3 Πολυηλεκτρολύτες

Με τον όρο πολυηλεκτρολύτες αναφέρονται τα πολυμερικά μακρομόρια που φέρουν μεγάλο αριθμό ιοντιζόμενων ομάδων. Οι ομάδες αυτές δίστανται σε διάλυμα υπό συγκεκριμένες συνθήκες, με αποτέλεσμα το μακρομόριο να καθίσταται άκρως φορτισμένο, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.8. [32] Οι πολυηλεκτρολύτες διαχωρίζονται σε ασθενείς και ισχυρούς ανάλογα με τον βαθμό διάστασής τους. Κατά τη διαλυτοποίηση σ' ένα υδατικό μέσο, οι



Εικόνα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση ενός πολυηλεκτρολύτη.

ιονιζόμενες ομάδες των ισχυρών πολυηλεκτρολυτών δίστανται πλήρως, ενώ στην περίπτωση των ασθενών πολυηλεκτρολυτών υπάρχει μερική διάσταση. Ωστόσο, οι ομάδες των ασθενών πολυηλεκτρολυτών δίστανται πλήρως κατά την εξουδετέρωση, δηλαδή την αλλαγή του pH του διαλύματος. Ως εκ τούτου, οι ασθενείς πολυηλεκτρολύτες δεν είναι πλήρως φορτισμένοι σε διάλυμα και το συνολικό τους φορτίο μπορεί να μεταβληθεί συναρτήσει του pH, της συγκέντρωσης, των αντισταθμιστικών ιόντων και της ιοντικής ισχύος. [31]

Οι πολυηλεκτρολύτες διαχωρίζονται σε δυο κατηγορίες, τόσο όσον αφορά τον τρόπο σύνθεσής τους: στους φυσικούς π.χ DNA και στους χημικά συντεθειμένους πολυηλεκτρολύτες, όσο και σε σχέση με την ηλεκτροχημική τους συμπεριφορά σε πολυοξέα, πολυβάσεις και πολυαμφολύτες. Τα πολυοξέα έχουν στην αλυσίδα τους ομάδες ηλεκτρολυτών, όπως -COOH και SO_3H τα οποία διαχωρίζονται σε πολυανιόντα και θετικά φορτισμένα πρωτόνια (H^+). Στις πολυβάσεις οι ομάδες ηλεκτρολυτών μπορεί να είναι -NH_2 όπου με την πρόσληψη ενός πρωτονίου μετατρέπονται σε πολυκατιόντα. Οι πολυαμφολύτες περιέχουν τόσο όξινες όσο και βασικές ομάδες και είναι θετικά φορτισμένοι σε χαμηλό pH και αρνητικά φορτισμένοι σε υψηλό pH. [33]

Η διαμόρφωση ενός πολυμερούς σε διάλυμα επηρεάζεται από την αρχιτεκτονική του μακρομορίου και τη συνάφεια με το διαλύτη. Στην περίπτωση των πολυηλεκτρολυτών η παρουσία των φορτίων παίζει σημαντικό ρόλο, καθώς οι ιδιότητες των πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων καθορίζονται κυρίως από τις ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις του συστήματος. Επομένως, οι φορτισμένες αλυσίδες των πολυηλεκτρολυτών υιοθετούν περισσότερο εκτεταμένες διαμορφώσεις, συγκριτικά με τις ουδέτερες πολυμερικές αλυσίδες, λόγω των ηλεκτροστατικών απώσεων μεταξύ των φορτισμένων τμημάτων της αλυσίδας. Εάν αυξηθεί η ιοντική ισχύς του διαλύματος μέσω της προσθήκης άλατος επέρχεται η προάσπιση των φορτίων και η εξασθένηση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων του συστήματος, με αποτέλεσμα οι πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες να μεταβαίνουν σε λιγότερο εκτεταμένες διαμορφώσεις (polyelectrolyte effect). [34]

Μία από τις σημαντικότερες ιδιότητες των πολυηλεκτρολυτών είναι η διαλυτότητά τους στο νερό. Επιπρόσθετα, μπορούν να προσδώσουν φορτίο σε ουδέτερα σωματίδια, καθιστώντας δυνατή τη διασπορά τους σε υδατικό διάλυμα. Παρ' όλα αυτά, εκτός από τον υδροφιλικό χαρακτήρα των

πολυηλεκτρολυτών, η εντροπική συνεισφορά των αντισταθμιστικών ιόντων στην ελεύθερη ενέργεια ανάμιξης του πολυμερούς με το διαλύτη αποτελεί εξίσου ένα σημαντικό γνώρισμα των πολυηλεκτρολυτών. Η διαλυτότητα στο νερό σε συνδυασμό με την τάση που έχουν οι πολυηλεκτρολύτες να διασυνδέονται με αντίθετα φορτισμένους πολυηλεκτρολύτες και να σχηματίζουν σύμπλοκα, έχει οδηγήσει στην παρασκευή “έξυπνων” υλικών που χρησιμοποιούνται σαν μεταφορείς φαρμακευτικών ουσιών στον ανθρώπινο οργανισμό. Χρησιμοποιούνται επίσης, στην κατασκευή εμφυτευμάτων με αυξανόμενη βιοσυμβατότητα και στη δημιουργία μεμβρανών για διάλυση και διήθηση. [35]

1.3.1 Αμφίφιλα Συμπολυμερή με Συστάδες Πολυηλεκτρολύτη

Τα αμφίφιλα κατά συστάδες συμπολυμερή με συστάδες πολυηλεκτρολύτες αποτελούν ένα αρκετά ενδιαφέρον αντικείμενο έρευνας λόγω των ιδιαίτερων φυσικοχημικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν. Συνδυάζουν τα δομικά χαρακτηριστικά των πολυηλεκτρολυτών, των αμφίφιλων συμπολυμερών και των επιφανειοδραστικών ουσιών, γεγονός που τους προσδίδει αρκετά μοναδικές και ασυνήθιστες ιδιότητες και πολλές δυνατότητες εξειδικευμένου σχεδιασμού. Η αυτο-οργάνωση των πολυηλεκτρολυτικών συμπολυμερών σε υδατικό διάλυμα, επηρεάζεται από πλήθος εξωτερικών παραμέτρων, όπως το pH, η θερμοκρασία και η αλατότητα, οι οποίες σχετίζονται με διάφορες τεχνολογικές-βιολογικές διεργασίες και εφαρμογές. [36]

Η πολυηλεκτρολυτική κορώνα των μικκυλιακών δομών αντιστοιχεί σε κολλοειδή σωματίδια, των οποίων οι ιδιότητες εξαρτώνται από το βαθμό διάστασης των φορτισμένων ομάδων, το pH, τη συγκέντρωση του άλατος στο διάλυμα και τις πολικές αλληλεπιδράσεις του συστήματος. Οι λόγοι αυτοί έχουν αποτελέσει το κίνητρο για τη μελέτη αυτών των συστημάτων και έχουν οδηγήσει στη διεξαγωγή πολυπληθών θεωρητικών και πειραματικών μελετών [37, 38] όπως αυτές που έχουν δημοσιευτεί από τους Förster, Abetz και Müller. [36]

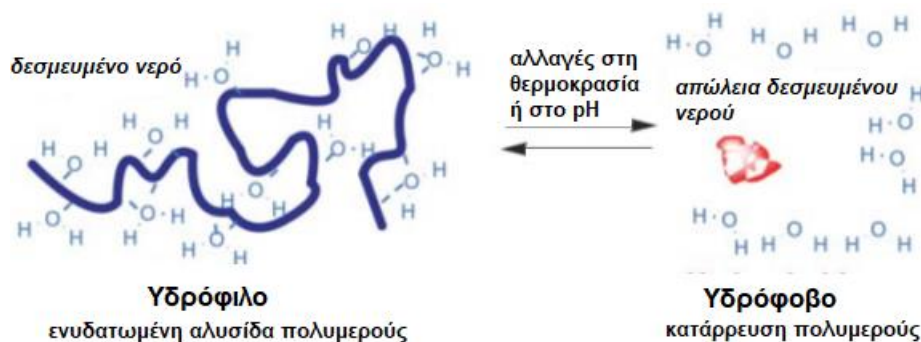
1.4 Αποκρίσιμα πολυμερή

Τα αποκρίσιμα πολυμερή επιδεικνύουν μεγάλες, και άμεσες φυσικές ή χημικές αντιστρεπτές αλλαγές στην διαμόρφωσή τους ως απόκριση σε εξωτερικά

ερεθίσματα. [39-41] Αυτό το γεγονός τα καθιστά ευρέως γνωστά και επιθυμητά σε βιομηχανίες χρωμάτων, καλλυντικών, στον καθαρισμό νερού καθώς και στο πεδίο της βιοϊατρικής. [42, 43]

Υπάρχουν πολλά διαφορετικά ερεθίσματα που ρυθμίζουν την απόκριση των πολυμερών και μπορούν να ταξινομηθούν είτε ως χημικά, είτε ως φυσικά ερεθίσματα. Τα χημικά ερεθίσματα, όπως το pH, η ιοντική ισχύς, αλλάζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων. Τα φυσικά ερεθίσματα, όπως η θερμοκρασία, το ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο και η μηχανική τάση, επηρεάζουν τους θερμοδυναμικούς παράγοντες και μεταβάλλουν τις μοριακές αλληλεπιδράσεις.

Αυτό μπορεί να σημαίνει αλλαγή στη διαμόρφωση, στη διαλυτότητα ή την διαφοροποίηση της ισορροπίας υδροφιλικότητας/υδροφοβικότητας, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.9, που τελικά μπορεί να οδηγήσει στην αποδέσμευση ενός βιοδραστικού μορίου, δηλαδή ενός φαρμάκου. Ορισμένα πολυμερικά συστήματα συνδυάζουν απόκριση σε δυο ή περισσότερα ερεθίσματα. [42-45]

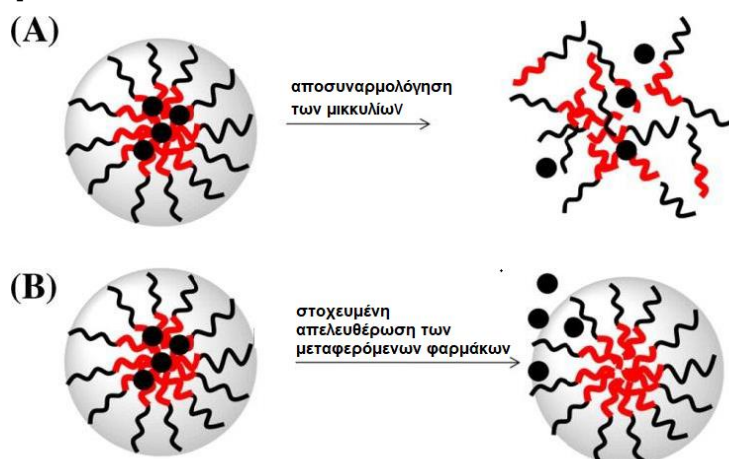


Εικόνα 1.9: Σχηματική αναπαράσταση εξυπνων αποκρίσιμων πολυμερών σε μεταβολές της θερμοκρασίας και του pH.

1.5 pH-Αποκρινόμενα πολυμερή

Τα πολυμερή που εμφανίζουν ευαισθησία στο pH αποτελούνται από μονομερή που μπορούν να ιονιστούν, δηλαδή να δώσουν ή να λάβουν πρωτόνια σε απόκριση με τη μεταβολή του pH. Καθώς το pH αλλάζει, ο βαθμός ιονισμού του πολυμερούς μεταβάλλεται γύρω από μια συγκεκριμένη τιμή pH, που ονομάζεται pKa. Αυτή η γρήγορη αλλαγή στο συνολικό φορτίο της αλυσίδας προκαλεί μεταβολή του υδροδυναμικού όγκου των πολυμερικών αλυσίδων. [46]

Η μετάβαση από συρρικνωμένη σε εκτεταμένη διαμόρφωση ερμηνεύεται από την οσμωτική πίεση, που προκαλούν τα αντισταθμιστικά ιόντα των φορτίων των αλυσίδων. [47] Σε περιβάλλον με κατάλληλο pH, η πρωτονίωση / αποπρωτονίωση του πολυμερούς μπορεί να προκαλέσει τόσο αποσυναρμολόγηση των μικκυλίων ή και διάσπαση σύνδεσης μεταξύ του πολυμερούς και των θεραπευτικών παραγόντων, όσο και στοχευμένη απελευθέρωση των μεταφερόμενων φαρμάκων όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.10. [48, 49]



Εικόνα 1.10: Σχηματική αναπαράσταση δύο τύπων μικκυλίων ευαίσθητων στο pH. (A) αποσυναρμολόγηση μικκυλίων, (B) στοχευμένη απελευθέρωση φαρμάκου.

Υπάρχουν δυο είδη αποκρινόμενων στο pH πολυηλεκτρολυτών: τα ασθενή πολυοξέα και οι ασθενείς πολυβάσεις. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα που εμφανίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές των pH-αποκρίσιμων οξέων είναι το πολυακρυλικό οξύ PAA [50] και το πολυμεθακρυλικό οξύ PMMA. [51] Το PAA είναι ένα ασθενές πολυοξύ, το οποίο είναι ουδέτερο σε χαμηλό pH, ενώ ιονίζεται σε υψηλό pH. Ένα ακόμα παράδειγμα ασθενών πολυοξέων είναι pH-ευαίσθητα πολυμερή που φέρουν ομάδες σουλφοναμιδίου και έχουν ποικίλες τιμές pKa στην περιοχή pH από 3 ως 11. [52, 53]

Αντίθετα, pH-αποκρίσιμες πολυβάσεις, όπως η 4-βινυλοπυριδίνη (PVP), ο πολυ(ακρυλικός εστέρας της διμεθυλοαμινοαιθανόλης) (PDMAEA), ο πολυ(μεθακρυλικός εστέρας της διμεθυλοαμινοαιθανόλης) (PDMAEMA) και ο πολυ(μεθακρυλικός εστέρας της διαιθυλοαμινοαιθανόλης) (PDEAEMA), είναι πρωτονιωμένοι σε χαμηλό pH και αποπρωτονιωμένοι σε υψηλό pH. [49, 54] Πιο συγκεκριμένα η αμινομάδα των PDMAEA είναι μερικώς φορτισμένη θετικά

σε ουδέτερο ή ελαφρώς αλκαλικό περιβάλλον και φορτίζεται πλήρως θετικά σε όξινο περιβάλλον. Οι μεγαλύτερες υδρόφοβες ομάδες του PDMAEA το καθιστούν συνολικά πιο υδρόφοβο και προκαλούν ισχυρότερες υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις σε υψηλό pH. Τα PDMAEA, PDMAEMA και το PDEAEMA καταβυθίζονται σε $pH > 8$ λόγω της πλήρους αποπρωτονίωσης των αμινοομάδων. [55]

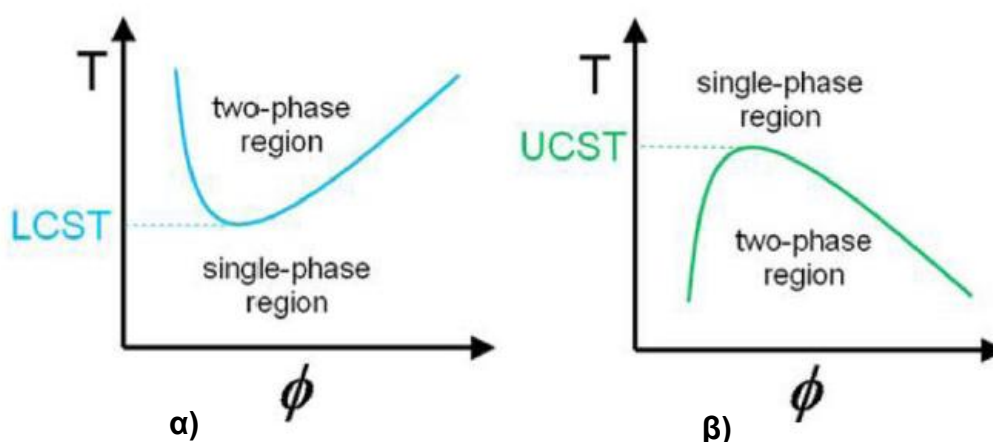
Πρόσφατα ο Monteiro και οι συνεργάτες του σχεδίασαν ένα καινοτόμο φορέα γονιδιακής θεραπείας που περιλαμβάνει τη συστάδα του PDMAEA, ο οποίος έχει την ικανότητα να απελευθερώνει γενετικό υλικό χωρίς κάποια βοήθεια εξωτερικού ερεθίσματος. Αυτό επιτυγχάνεται μέσα από την αυτο-υδρόλυση και την αυτο-αποικοδόμηση του συγκεκριμένου πολυμερούς. Τέτοιες αυτοκαταλυόμενες διαδικασίες του PDMAEA δημιουργούν PAA και DMAEA τα οποία δεν προκαλούν καμία τοξικότητα στα υγιή κύτταρα και με αυτό τον τρόπο μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλές βιολογικές εφαρμογές δεσμεύοντας ισχυρά μόρια DNA, siRNA κ.α, δημιουργώντας έτσι σύμπλοκα. [56, 57] Το PDMAEA πολυμερές, χρησιμοποιήθηκε επίσης για την μελέτη σύμπλεξης του P(DMAEA-b-(ImPAA-co-BA)) συμπολυμερούς με siRNA [58] αλλά και με pDNA. [59]

Η ρύθμιση του κατάλληλου κρίσιμου pH^* , στο οποίο παρατηρούνται αντιστρεπτές μεταβολές στη διαμόρφωση των αλυσίδων, είναι ένας σημαντικός παράγοντας στις εφαρμογές των pH-αποκρίσιμων πολυμερών. Η περιοχή pH, στην οποία παρατηρείται μια αντιστρεπτή μεταβολή της φάσης μπορεί να ρυθμιστεί με δυο τρόπους, είτε επιλέγοντας πολυοξέα και πολυβάσεις των οποίων τα pK συμπίπτουν με εκείνη την περιοχή pH, είτε με ενσωμάτωση ενός υδρόφοβου τμήματος στην πολυμερική αλυσίδα του πολυοξέος ή της πολυβάσης με αποτέλεσμα το pK να συμπίπτει με το pH^* . Η δεύτερη περίπτωση έχει μελετηθεί συστηματικά αλλάζοντας το ποσοστό του υδρόφοβου τμήματος στην πολυμερική αλυσίδα.

1.5.1 Θερμοαποκρινόμενα πολυμερή

Η θερμοκρασία αποτελεί ένα ακόμη ερέθισμα στα αποκρίσιμα πολυμερικά συστήματα. Μια από τις μοναδικές ιδιότητες των θερμοευαίσθητων πολυμερών είναι η ύπαρξη μιας κρίσιμης θερμοκρασίας διάλυσης (Lower Critical Solution Temperature, LCST). [60]

Η LCST είναι η θερμοκρασία στην οποία η φάση του πολυμερούς και του διαλύματος αλλάζουν ασυνεχώς σύμφωνα με τη σύστασή τους. Σε υδατικά μέσα, πολυμερή που έχουν LCST σημαίνει ότι είναι διαλυτά στο νερό σε χαμηλή θερμοκρασία, ενώ με την άνοδο της θερμοκρασίας, παύουν να είναι διαλυτά και παρατηρείται διαχωρισμός φάσεων. Ο διαχωρισμός φάσεων ως αποτέλεσμα μεταβολής της θερμοκρασίας οφείλεται στην διαφοροποίηση διαμοριακών και ενδομοριακών δυνάμεων, καθώς με την θέρμανση του διαλύματος του πολυμερούς προάγονται οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων, με αποτέλεσμα την συσσωμάτωσή τους και την θόλωση του αρχικά διαυγούς διαλύματος. [40] Αν το φαινόμενο του διαχωρισμού φάσεων λαμβάνει χώρα με την μείωση της θερμοκρασίας, τότε το υδατικό σύστημα χαρακτηρίζεται από εμφάνιση ανώτερης κρίσιμης θερμοκρασίας διαλύματος (Upper Critical Solution Temperature, UCST). [61] Στην Εικόνα 1.11 παρουσιάζεται η αναπαράσταση φάσης που συνδέεται με την κρίσιμη θερμοκρασία διάλυσης και την ανώτερη κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος.



Εικόνα 1.11: Αναπαράσταση της μετάπτωσης φάσης που συνδέεται α) με την LCST και β) με την UCST.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα θερμοαποκρινόμενων πολυμερών με LCST συμπεριφορά είναι πολυμερή που βασίζονται στα μονομερή του Ν-ισοπροπυλακρυλαμίδιου (NIPAM), Ν,Ν-διαιθυλακρυλαμίδιου (DEAM), Ν-Ν-διμέθυλαμινεστέρας (DMAEMA), μέθυλο βινυλαιθέρα (MVE) και Ν-βινυλοκαπρολακτάμης (NVCa). Τυπικά συστήματα με UCST βασίζονται σε συνδυασμό ακρυλαμίδιου (AAm) και ακρυλικού οξέος (AAc). Επίσης,

υπάρχουν συμπολυμερή κατά συστάδες με ενδιαφέρουσες εφαρμογές π.χ. PEO-b-PPO. [45, 49]

1.5.2 Επίδραση ιοντικής ισχύος

Η επίδραση της ιοντικής ισχύος στο σύστημα πολυμερούς-διαλύτη μπορεί να επιφέρει αλλαγές στο μέγεθος των πολυμερικών μικκυλίων, στη διαλυτότητα του πολυμερούς και στην κινητική απόσβεσης φθορισμού των χρωμοφόρων που είναι δεσμευμένες. [62] Η προσθήκη αλάτων στο σύστημα πολυμερούς-διαλύτη μπορεί να επηρεάσει τη θέση της μετάπτωσης φάσης καθώς διαταράσσεται η δομή ενυδάτωσης γύρω από τις πολυμερικές αλυσίδες με αποτέλεσμα την μείωση της θερμοκρασίας διαχωρισμού φάσεων. [40] Αυτή η δράση εξαρτάται από το είδος των ιόντων και περιγράφεται από τις σειρές Hofmeister. [63] Ειδικότερα, λόγω του ανταγωνισμού των πολυμερικών μορίων με τα ιόντα του άλατος για τα μόρια νερού που απαιτούνται για την επιδιαιλύτωσή τους, η διαλυτότητα μειώνεται σύμφωνα με το φαινόμενο εξαλάτωσης (salting out effect). Σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων τα μόρια του νερού που είναι διαθέσιμα για την διαλύτωση των πολυμερών δεν είναι αρκετά καθώς η πλειονότητά τους συνδέεται ισχυρά με τα άλατα. Έτσι, οι αλληλεπιδράσεις πολυμερούς-πολυμερούς υπερτερούν των αλληλεπιδράσεων πολυμερούς-νερού, οπότε σχηματίζονται συσσωματώματα με αποτέλεσμα την καταβύθιση των πολυμερικών μορίων. [64]

1.6 Σύμπλεξη πολυμερών με DNA

Η όλο και εξελισσόμενη και πολλά υποσχόμενη γονιδιακή θεραπεία αποτελεί μία εναλλακτική προσέγγιση στη θεραπεία επίκτητων ασθενειών. [65] Βασίζεται στην εισαγωγή θεραπευτικών γονιδίων σε στοχευμένα κύτταρα προκειμένου να παραχθούν βιοενεργοί παράγοντες οι οποίοι θα αντικαταστήσουν τα ελαττωματικά γονίδια ή θα παύσουν την ανεπιθύμητη γονιδιακή έκφραση. Η μη ιογενής γονιδιακή θεραπεία, έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της χρήσης ιογενών φορέων, όπως η ασφάλεια, το μικρό κόστος παραγωγής και ο σωστός μακρομοριακός σχεδιασμός για τη μεταφορά του DNA. Ανάμεσα στους μη ιογενείς φορείς περιλαμβάνονται οι κατιοντικοί πολυηλεκτρολύτες, οι οποίοι μειώνουν τον ανοσογονικό κίνδυνο και προσφέρουν τη δυνατότητα σχεδιασμού

μακρομοριακών δομών για την απόκτηση εξατομικευμένων υλικών. Τα πολυκατιόντα σχηματίζουν σύμπλοκα με τα νουκλεϊκά οξέα προκειμένου να μεταφέρουν DNA στα κύτταρα. Τα νανοσωματίδια των συμπλόκων καταστέλλουν την αποικοδόμηση του DNA κατά τη μεταφορά του στον πυρήνα και μεταγενέστερα το απελευθερώνουν. [66-70] Επομένως, η σύμπλεξη μεταξύ πολυηλεκτρολυτικών πολυμερών και βιομακρομοριών καθιστά δυνατή την ανάπτυξη λειτουργικών βιολογικών νανοϋλικών και βιο-οργανικών υβριδίων, με ενδεχόμενη χρήση σε συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων, σε γονιδιακή θεραπεία και άλλα. [71-74]

Παραδείγματα κατιοντικών μακρομορίων που έχουν χρησιμοποιηθεί σαν μεταφορείς γενετικού υλικού είναι η χιτοσίνη και οι πολυαιθυλενοϊμίμες. [75] Η σύμπλεξη των πολυηλεκτρολυτών με DNA σε υδατικό μέσο είναι αποτέλεσμα των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αντίθετων φορτίων των δυο ειδών μακρομορίων. Η διαδικασία της σύμπλεξης καθώς και η δομή των σχηματιζόμενων συμπλόκων επηρεάζονται από πλήθος παραμέτρων, με σημαντικότερες την αναλογία μεταξύ των δύο συστατικών, τη συγκέντρωση και την ιοντική ισχύ του διαλύματος. Το μοριακό βάρος, η πυκνότητα του φορτίου, η ακαμψία και η υδροφοβικότητα της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της σύμπλεξης, καθώς και η διαμόρφωση και η επιφανειακή κατανομή φορτίου του μακρομορίου. [75]

1.7 Πολυμερισμός Αντιστρεπτής Προσθήκης-Μεταφοράς Αλυσίδας με Απόσπαση (RAFT)

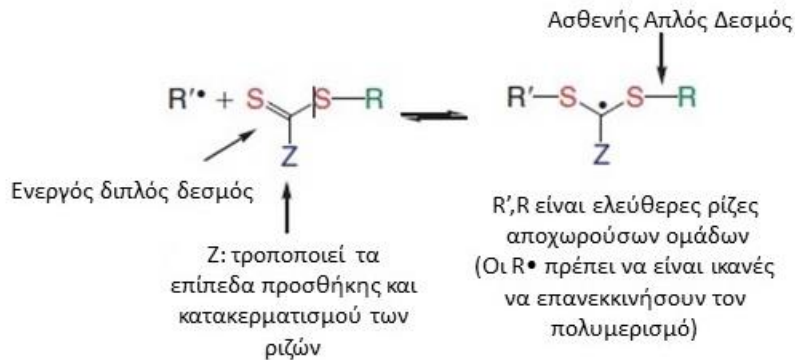
Ο πολυμερισμός αντιστρεπτής προσθήκης-μεταφοράς αλυσίδας με απόσπαση (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer, RAFT) είναι ένας μηχανισμός ζωντανού/ελεγχόμενου ριζικού πολυμερισμού. Συγκαταλέγεται σαν μία πολυχρηστική τεχνική για την σύνθεση πολύπλοκων πολυμερικών αρχιτεκτονικών καθώς διεξάγεται χρησιμοποιώντας ως διαλύτη νερό, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και χωρίς την ανάγκη για χρήση προστατευτικών ομάδων. Επιπλέον, η ενσωμάτωση λειτουργικών μονομερών και η επιλογή του κατάλληλου μέσου μεταφοράς αλυσίδας (Chain Transfer Agent, CTA) επιτρέπει την εύκολη τροποποίηση των πλευρικών ή ακραίων ομάδων μετά τον πολυμερισμό.

Ο πολυμερισμός RAFT βασίζεται σε μια σειρά αντιδράσεων αντιστρεπτής μεταφοράς αλυσίδας, έτσι ώστε να είναι ελεγχόμενος. Εφόσον ο RAFT αποτελεί έναν ριζικό πολυμερισμό που διεξάγεται με την παρουσία ενός CTA, το στάδιο της έναρξης μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας παραδοσιακούς απαρχητές, όπως αζωενώσεις, υπεροξειδία, οξειδοαναγωγικά συστήματα έναρξης, φωτοαπαρχητές και ακτινοβολία γ .

Η πρόδρομη ρίζα I^\bullet πιστεύεται ότι προστίθεται στο μονομερές πριν από την προσθήκη του CTA, λόγω της υψηλής σχετικής συγκέντρωσης του μονομερούς σε σχέση με το CTA. Ωστόσο, αυτή η υπόθεση μπορεί να αποδειχθεί εσφαλμένη σε περιπτώσεις όπου η συγκέντρωση του μονομερούς είναι χαμηλή ή τα CTAs έχουν υψηλή ενεργότητα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η συγκέντρωση του απαρχητή είναι χαμηλότερη σε σχέση με αυτή του CTA, έτσι ώστε να διασφαλίζεται ότι η έναρξη της πλειοψηφίας των αλυσίδων γίνεται από θραύσματα CTA (R^\bullet), επειδή οι αλυσίδες που συμπληρώνονται από τον απαρχητή έχουν αρνητικές επιπτώσεις στον έλεγχο του μοριακού βάρους του τελικού πολυμερούς.

Επίσης, λόγω της εκθετικής αποσύνθεσης των συμβατικών θερμικών απαρχητών, δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες καθ' όλη τη διάρκεια του πολυμερισμού, γεγονός που είναι πιθανό να οδηγήσει σε διμοριακό τερματισμό. Η συνεχής παραγωγή ριζών έχει επίσης το πλεονέκτημα ότι μπορεί να αντικαταστήσει ρίζες που χάθηκαν σε τυχόν αντιδράσεις τερματισμού και βοηθά στη διατήρηση του ρυθμού πολυμερισμού σε σταθερά επίπεδα. Μετά την αντίδραση την αρχικής ρίζας I^\bullet με το μονομερές, που έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μίας διαδιδόμενης ολιγομερικής αλυσίδας (P_n^\bullet), το CTA αντιδρά με την P_n^\bullet για να δώσει μια ενδιάμεση ρίζα. Αυτή η ενδιάμεση ρίζα, αν έχει γίνει σωστή επιλογή CTA, θρυμματίζεται και δημιουργείται ένα νέο είδος ρίζας R^\bullet . Τα δομικά χαρακτηριστικά της ενδιάμεσης ρίζας καθώς και του CTA αναπαρίστανται στην Εικόνα 1.12.

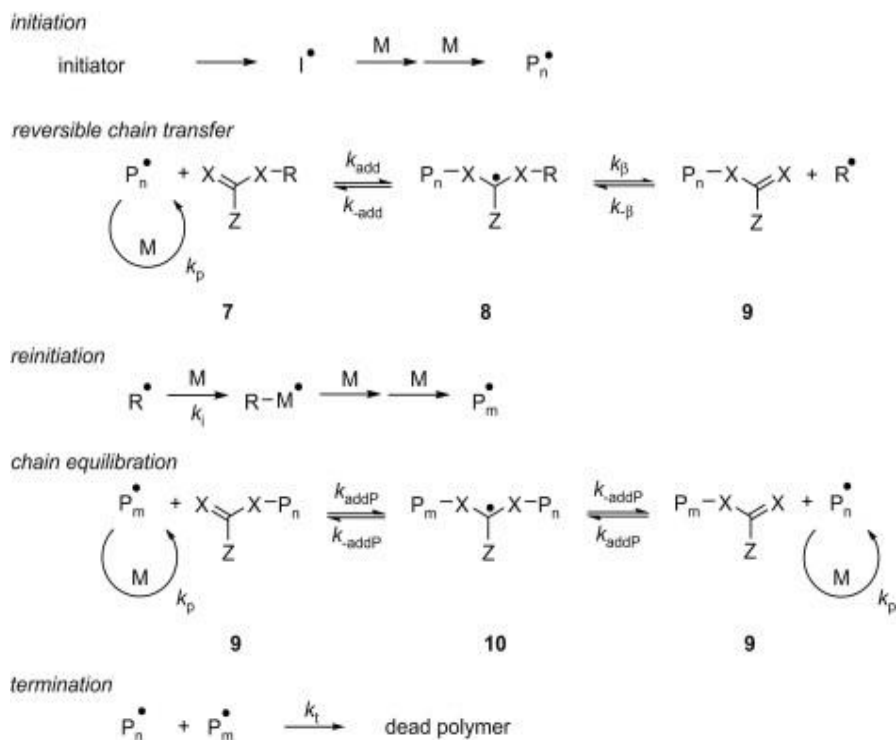
Το στάδιο προ-ισορροπία (pre-equilibrium) ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται ώστε όλα τα θραύσματα R^\bullet να προσθέσουν μονομερικές μονάδες για να σχηματιστούν διαδιδόμενες αλυσίδες P_m^\bullet και διέπεται από τις τέσσερις σταθερές k_{add} , k_{-add} , k_β και $k_{-\beta}$



Εικόνα 1.12: Δομικά χαρακτηριστικά των thiocarbonylthio CTAs και το ενδιάμεσο προϊόν που σχηματίζεται κατά την προσθήκη ριζών.

Για να επιτευχθούν στενές κατανομές μοριακών βαρών το στάδιο προ-ισορροπίας πρέπει να ολοκληρωθεί νωρίς για όλες τις αλυσίδες, έτσι ώστε να μπουν στο στάδιο κυρίως ισορροπίας την ίδια στιγμή. Αυτό είναι ανάλογο με άλλα συστήματα ζωντανού πολυμερισμού, στα οποία υποτίθεται ότι η έναρξη συμβαίνει ποσοτικά και ακαριαία. Όταν ολοκληρωθεί το στάδιο προ-ισορροπίας, ο πολυμερισμός μπαίνει στο στάδιο της κυρίως ισορροπίας. Αυτό το στάδιο περιλαμβάνει την εκφυλιστική μεταφορά της ακραίας μεταφερόμενης ομάδας του CTA πχ. την ομάδα θειοκαρβόνυλοθειο (thiocarbonylthio) ανάμεσα στις διαδιδόμενες αλυσίδες, μέσω του σχηματισμού και της απόσπασης μιας ενδιάμεσης ρίζας. Η ανταλλαγή μεταξύ των ενεργών και αδρανών αλυσίδων επιτυγχάνεται με την άμεση απόσπαση της ενδιάμεσης ρίζας προς τις δύο κατευθύνσεις, επιτρέποντας την ελεγχόμενη προσθήκη μονομερών σε κάθε αλυσίδα με τις ίδιες πιθανότητες. Η μεγαλύτερη κατανάλωση μονομερούς συμβαίνει κατά τη διάρκεια της κυρίως ισορροπίας και ο αριθμός των προστιθέμενων μονομερών μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται η αντίδραση. Όπως σε όλες τις τεχνικές ζωντανού ριζικού πολυμερισμού, ο RAFT στοχεύει στον περιορισμένο αριθμό των μη αντιστρεπτών αντιδράσεων τερματισμού, ελαχιστοποιώντας την συγκέντρωση ριζών που είναι διαθέσιμες για τερματισμό κάθε στιγμή. Ωστόσο, οι αντιδράσεις τερματισμού λαμβάνουν χώρα εξαιτίας της σύζευξης των ελευθέρων ριζών και η δυσαναλογία μπορεί να συσχετιστεί άμεσα με την αρχική συγκέντρωση του απαρχητή. Όταν ο αρχικός τρόπος τερματισμού είναι διμοριακός συνδυασμός (bimolecular combination), ο αριθμός των νεκρών αλυσίδων δημιουργείται με το μισό των αλυσίδων να προέρχονται από τον απαρχητή. Στην περίπτωση

όπου η ανακατανομή (disproportionation) είναι ο κυρίαρχος τρόπος τερματισμού, ο αριθμός των νεκρών αλυσίδων δημιουργείται με τον συνολικό αριθμό των αλυσίδων που προέρχονται από τον απαρχητή. Ο μηχανισμός πολυμερισμού RAFT απεικονίζεται στην Εικόνα 1.13.



Εικόνα 1.13: Μηχανισμός πολυμερισμού RAFT.

Τα δύο πιο σημαντικά κριτήρια ώστε να υπάρχει έλεγχος του μοριακού βάρους σε έναν πολυμερισμό RAFT είναι η επιλογή του κατάλληλου CTA για τον πολυμερισμό του επιθυμητού μονομερούς και η επαρκώς υψηλότερη συγκέντρωση CTA σε σχέση με αυτή του απαρχητή. Σύμφωνα με τον μηχανισμό RAFT, οι πιθανές πηγές παραγωγής πολυμερικών αλυσίδων είναι δύο: τα θραύσματα του απαρχητή και η αποχωρούσα ομάδα του CTA (R•). Έτσι, το θεωρητικό μέσο μοριακό βάρος κατ' αριθμό $\langle M_n \rangle$ μπορεί να προσδιοριστεί σύμφωνα με την εξίσωση:

$$M_{n,th} = \frac{[M]_0 M_{MW} \rho}{[CTA]_0 + 2f[I]_0(1 - e^{-k_d t})} + CTA_{MW} \quad (1.6.1)$$

Όπου $[M]_0$ η αρχική συγκέντρωση μονομερούς, M_{MW} το μοριακό βάρος του μονομερούς, ρ είναι η μετατροπή του μονομερούς, $[CTA]_0$ η αρχική συγκέντρωση του CTA, f η αποδοτικότητα του απαρχητή, $[I]_0$ η αρχική

συγκέντρωση του απαρχητή, k_d η σταθερά ρυθμού αποσύνθεσης του απαρχητή και CTA_{MW} είναι το μοριακό βάρος του αντιδραστηρίου μεταφοράς.

Σε έναν καλά σχεδιασμένο πολυμερισμό RAFT, με υψηλή συγκέντρωση CTA σε σχέση με τον απαρχητή, το ποσοστό των αλυσίδων που προέρχονται από τον απαρχητή είναι μικρότερο του 5% και έτσι οι όροι που αντιστοιχούν σε αυτές τις αλυσίδες μπορούν να παραληφθούν και η εξίσωση να πάρει τη μορφή:

$$M_{n,th} = \frac{[M]_0 M_{MW\rho}}{[CTA]_0} + CTA_{MW} \quad (1.6.2)$$

με αποτέλεσμα η σχέση μοριακού βάρους και μετατροπής του μονομερούς να είναι γραμμική επιτρέποντας καλά καθορισμένα μοριακά βάρη με μικρές τιμές κατανομής μοριακών βαρών.

Η αποτελεσματικότητα του CTA εξαρτάται από το επιλεγμένο μονομερές και καθορίζεται από τις ιδιότητες της αποχωρούσας ομάδας R καθώς και της ομάδας Z η οποία καθορίζει την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση του διπλού δεσμού του CTA με αποτέλεσμα την τροποποίηση της σταθερότητας των ενδιάμεσων ριζών. Προκειμένου να θεωρείται κατάλληλο το CTA πρέπει να περιέχεται σε αυτόν ένας ενεργός διπλός δεσμός C=S ώστε η k_{add} να παραμένει υψηλή ενώ οι ενδιάμεσες ρίζες πρέπει να αποσπώνται εύκολα. Αυτό σημαίνει πώς η σταθερά k_b πρέπει να είναι υψηλή, ο δεσμός S-R ασθενής στο ενδιάμεσο στάδιο και να μην πραγματοποιούνται παράπλευρες αντιδράσεις. Τέλος οι ελεύθερες ρίζες που έχουν αποσπαστεί πρέπει να είναι ικανές να επανεκκινήσουν τον πολυμερισμό, δηλαδή η k_i να είναι επαρκώς μεγαλύτερη από την k_p . [76-80]

1.8 Σκοπός της εργασίας

Πρωταρχικός σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η επιτυχής σύνθεση δύο διαφορετικών καινοτόμων αμφίφιλων δισυσταδικών συμπολυμερών με τη χρήση της τεχνικής του πολυμερισμού RAFT. Οι συστάδες που απάρτιζαν τα συγκεκριμένα αμφίφιλα συμπολυμερή αφορούσαν τον πολυακρυλικό βουτυλεστέρα (PnBA) ως την υδρόφοβη κοινή συστάδα και δύο διαφορετικά είδη υδρόφιλης συστάδας. Η πολυηλεκτρολυτική υδρόφιλη συστάδα του πολυ(ακρυλικού εστέρα της διμεθυλοαμινοαιθανόλης) (PDMAEA) αφορούσε το πρώτο είδος συμπολυμερούς και ο πολυ(ακρυλικός εστέρας της

ολιγο αιθυλενογλυκόλης) (POEGA) περιλάμβανε το δεύτερο υδρόφιλο είδος συμπολυμερούς αντίστοιχα.

Στη συνέχεια τα PnBA-b-PDMAEA δισυσταδικά συμπολυμερή μετατράπηκαν σε συμπολυμερή του τύπου PnBA-b-Q₁PDMAEA και PnBA-b-Q₆PDMAEA με τις αντιδράσεις τεταρτοταγοποίησης της τριτοταγούς αμινομάδας της συστάδας του PDMAEA χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά αντιδραστήρια. Με αυτόν τον τρόπο η PDMAEA συστάδα μετατράπηκε από ασθενή κατιοντικό πολυηλεκτρολύτη σε ισχυρό κατιοντικό πολυηλεκτρολύτη.

Ακολούθησε η μελέτη των PnBA-b-POEGA και PnBA-b-PDMAEA συστημάτων καθώς και των παραγώγων τους που προέκυψαν από την τεταρτοταγοποίηση της αμίνης του PDMAEA σε δομικό και μοριακό επίπεδο. Διερευνήθηκε η συμπεριφορά της αυτο-οργάνωσής τους όταν βρεθούν σε υδατικά μέσα και η εξάρτησή τους από τη μεταβολή φυσικοχημικών παραμέτρων του διαλύματος όπως η θερμοκρασία, το pH και η ιοντική ισχύ.

Τέλος, λόγω των επιπλέων ιδιοτήτων που προσέδωσαν στα PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερή οι τροποποιήσεις της τριτοταγούς αμίνης σε τεταρτοταγή, μελετήθηκε η δυνατότητα σύμπλεξης των πολυηλεκτρολυτικών συμπολυμερών PnBA-b-PDMAEA, PnBA-b-Q₁PDMAEA PnBA-b-Q₆PDMAEA με μόρια DNA προκειμένου να διερευνηθεί αν τα συστήματα αυτά μπορούν να δράσουν ως φορείς γονιδίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ

2.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)

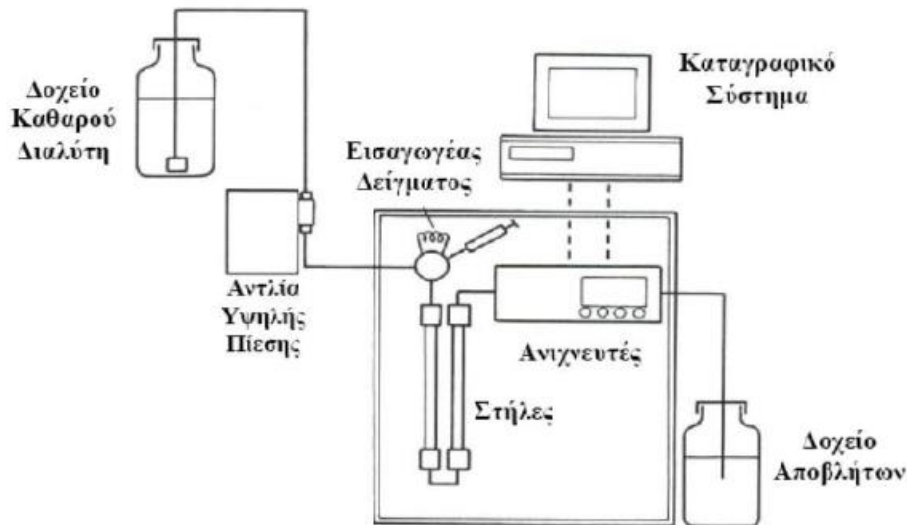
Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (size exclusion chromatography, SEC) ή χρωματογραφία διαπερατότητας μέσω πηκτής (gel permeation chromatography, GPC), αποτελεί σήμερα μια από τις δυναμικότερες μεθόδους χαρακτηρισμού των πολυμερών, τόσο σε εργαστηριακή, όσο και σε βιομηχανική κλίμακα. Βασίζεται στον διαχωρισμό των μακρομοριακών αλυσίδων βάσει του μεγέθους τους και προσδίδει την δυνατότητα εύρεσης οποιασδήποτε μέσης τιμής μοριακού βάρους και κατανομής μοριακών βαρών. Η ευρεία χρήση της εξηγείται από την σχετική απλότητα της μεθόδου, τη ταχύτητα με την οποία πραγματοποιούνται οι αναλύσεις και την δυνατότητα διασύνδεσης με ιξωδομετρία τριχοειδούς σωλήνα ή με φωτόμετρα σκέδασης φωτός laser για τη λήψη περισσότερων πληροφοριών σχετικά με τα μοριακά χαρακτηριστικά των πολυμερών που αναλύονται. [81]

Ουσιαστικά, πρόκειται για μία τεχνική υγρής χρωματογραφίας όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.1, η οποία είναι προσαρμοσμένη για την ανάλυση μεγαλομορίων. Ο διαχωρισμός των διαφόρων μοριακών βαρών γίνεται στις στήλες, οι οποίες περιέχουν πορώδες υλικό. Οι πόροι έχουν περίπου ίδιο μέγεθος με την περιοχή μεγεθών των μακρομορίων. Στις ιδανικές στήλες, ο διαχωρισμός οφείλεται μόνο στο μοριακό μέγεθος και δεν υπάρχει κανενός άλλου είδους αλληλεπίδραση μεταξύ πορώδους υλικού και μακρομορίων. Ο μηχανικός διαχωρισμός (αποκλεισμός λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης/αποκλεισμού) επιτρέπει στα μεγαλύτερα μόρια να περάσουν μέσα από ένα μικρό ποσοστό πόρων, ενώ τα μικρότερα περνάνε από τους περισσότερους πόρους. Κατά συνέπεια οι πολυμερικές αλυσίδες διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους, αφού τα μεγαλύτερα εκκλούνται πρώτα, επειδή διανύουν μικρότερη απόσταση μέσα στις στήλες διαχωρισμού. [82]

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση των μορίων που εκκλούνται χωρίζονται στους:

- Ανιχνευτές μάζας (διαφορικό διαθλασίμετρο, πυκνόμετρο)
- Ειδικοί Ανιχνευτές (ανιχνευτές απορρόφησης)

- Ανιχνευτές ευαίσθητοι σε μοριακή μάζα (φωτόμετρο σκέδασης φωτός λέιζερ)



Εικόνα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση οργάνολογίας SEC.

Το πακεταριστικό υλικό των στηλών που προτιμάται είναι από πολυστυρένιο και όχι από ανόργανες ύλες, επειδή έτσι δεν δημιουργούνται δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις, οι οποίες θα οδηγούσαν σε δευτερογενείς διαδικασίες κατανομής και θα οδηγούσαν σε αύξηση του όγκου έκλουσης με μειωμένα μοριακά βάρη αγνώστων δειγμάτων.

Η χρωματογραφία SEC είναι μια σχετική μέθοδος προσδιορισμού MB διότι απαιτεί βαθμονόμηση για τη μετατροπή της κατανομής όγκων έκλουσης σε κατανομή MB. Η βαθμονόμηση γίνεται με πρότυπα, μονοδιάσπαρτα πολυμερή, των οποίων τα MB είναι γνωστά από μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός και οσμωμετρίας. Για να εφαρμοστεί αυτή η μέθοδος θα πρέπει το άγνωστο δείγμα να έχει την ίδια χημική σύσταση και αρχιτεκτονική με τα πρότυπα δείγματα με τα οποία έγινε η βαθμονόμηση. Στην περίπτωση μειγμάτων ομοπολυμερών, συμπολυμερών και διακλαδισμένων ομοπολυμερών ή συμπολυμερών πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν ότι: για δεδομένο μοριακό βάρος ο όγκος ενός διακλαδισμένου ομοπολυμερούς είναι μικρότερος από του αντίστοιχου γραμμικού και σε ένα συμπολυμερές ο μερικός μοριακός όγκος M_i/V_h είναι διαφορετικός για κάθε μία από τις επαναλαμβανόμενες μονάδες. Σε αυτή την περίπτωση θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί η παγκόσμια καμπύλη βαθμονόμησης:

$$\log[\eta]M_w=f(V_e) \quad (2.1.1)$$

όπου $[\eta]$ το εσωτερικό ιξώδες του εκάστοτε προτύπου στο φέροντα διαλύτη και στη θερμοκρασία λειτουργίας του οργάνου της SEC, το γινόμενο $[\eta]M_w$ είναι ανάλογο του υδροδυναμικού όγκου του πολυμερούς V_e . [83, 84]

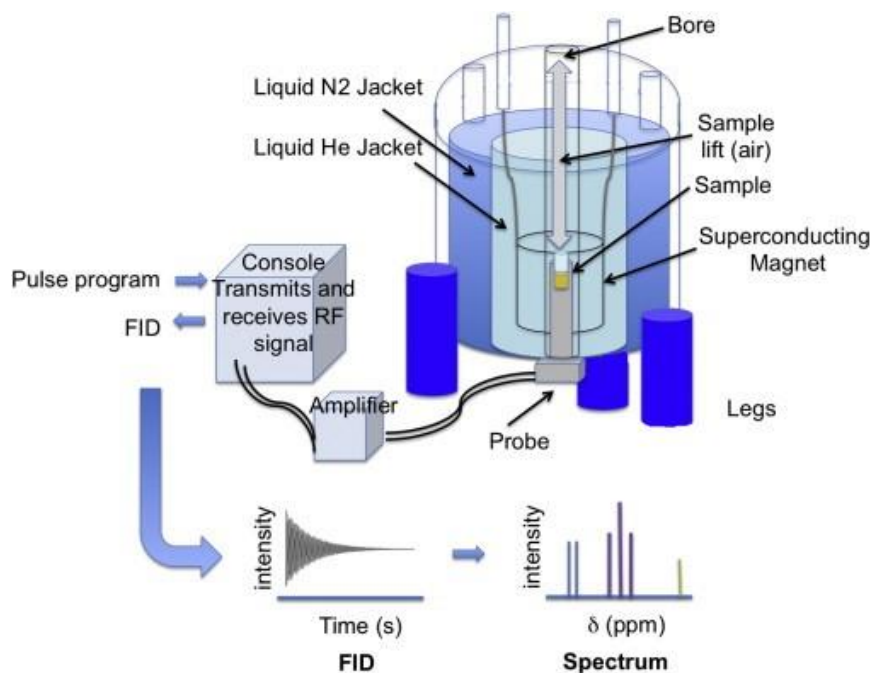
2.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) αποτελεί την πιο χρήσιμη και ισχυρή τεχνική ταυτοποίησης χημικών μορίων, προσδιορίζει τον αριθμό και το είδος των ατόμων σε ένα μόριο, καθώς και τον τρόπο σύνδεσής τους. Παρέχει ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για τη σύσταση των δομικών μονάδων και τη στερεοχημική διαμόρφωση των μορίων [2].

Για τον προσδιορισμό των δομών πολύπλοκων οργανικών ενώσεων η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται συνήθως σε συνδυασμό με άλλα είδη φασματοσκοπίας και χημικής ανάλυσης. Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται για την μελέτη μιας μεγάλης ποικιλίας πυρήνων, όπως ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P . Οι πυρήνες πρωτονίου (^1H) και άνθρακα (^{13}C), θεωρούνται οι χρησιμότεροι, αφού το υδρογόνο και ο άνθρακας αποτελούν τα κύρια συστατικά των οργανικών ενώσεων. Η σημαντικότερη και συνηθέστερη χρήση του NMR στα πολυμερή είναι η εύρεση της σύστασης συμπολυμερών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχει αναλογικότητα μεταξύ του σήματος και του αριθμού των πυρήνων που δημιουργούν το σήμα αυτό [84].

Ένα σχηματικό διάγραμμα ενός φασματομέτρου δίνεται στην Εικόνα 2.2. Τα κύρια μέρη στην οργανολογία ενός φασματομέτρου NMR είναι τα εξής [85]:

- Ένας σταθερός μαγνήτης με ευαίσθητο ελεγκτή για την παραγωγή μαγνητικού πεδίου ακριβείας
- Μια γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων η οποία εκπέμπει σε σταθερή συχνότητα
- Ένας ανιχνευτής για τη μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος, ενέργειας RF
- Ένας υπολογιστής για τη σχεδίαση του γραφήματος των ευρημάτων του ανιχνευτή συναρτήσει του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου.



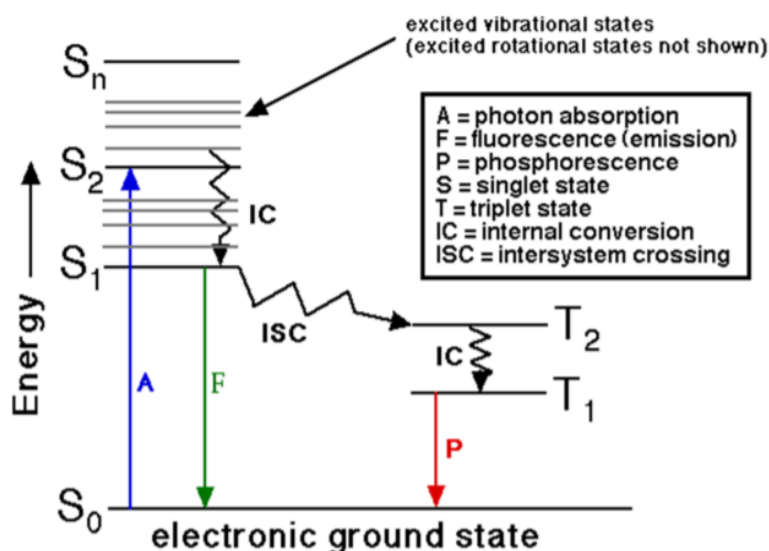
Εικόνα 2.2: Σχηματικό διάγραμμα φασματομέτρου NMR.

2.3 Φασματοσκοπία φθορισμού (FS)

Η φασματοσκοπία φθορισμού (Fluorescence Spectroscopy, FS), επιτρέπει την ανίχνευση συστατικών πολύπλοκων δομών, με εξαιρετική ευαισθησία και εκλεκτικότητα. Όταν ένα μόριο που βρίσκεται στη θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση αλληλεπιδρά με ακτινοβολία κατάλληλης συχνότητας, το μόριο απορροφά την ακτινοβολούμενη ενέργεια και διεγείρεται μεταπίπτοντας σε υψηλότερη ενεργειακή στάθμη. Κατά την διέγερση το μόριο αποβάλλει την απορροφημένη ενέργεια είτε υπό μορφή θερμότητας, είτε μέσω εκπομπής ακτινοβολίας επιστρέφοντας στη θεμελιώδη κατάσταση. Η αποδιέγερση του μορίου μέσω εκπομπής ακτινοβολίας, ονομάζεται φωταύγεια και όταν συμβαίνει σε σύντομο χρονικό διάστημα (10^{-9} - 10^{-6} s) από τη στιγμή της διέγερσης, χαρακτηρίζεται ως φθορισμός. Ο φθορισμός είναι αποτέλεσμα μιας διαδικασίας τριών σταδίων που συμβαίνει σε συγκεκριμένα μόρια που ονομάζονται μόρια χρωμοφόρου φθορισμού (fluorophore) ή φθορίζουσες χρωστικές (fluorescent dyes). Το φαινόμενο του φθορισμού απεικονίζεται στο διάγραμμα Jablonski. [86]

Σύμφωνα με το Διάγραμμα Jablonski της Εικόνας 2.3, σε πρώτο στάδιο, το φωτόνιο ενέργειας $h\nu_{EX}$ που παρέχεται από μία εξωτερική πηγή ακτινοβολίας απορροφάται από το μόριο που βρίσκεται στη θεμελιώδη ηλεκτρονιακή

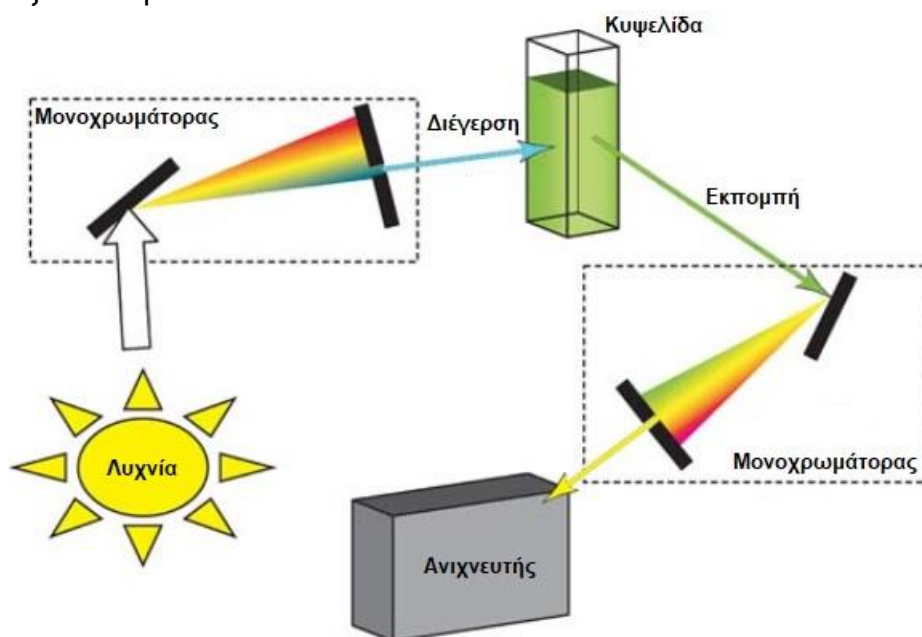
κατάσταση S_0 και μεταβαίνει στη πρώτη διεγερμένη ηλεκτρονιακή απλή κατάσταση S_1 . Κάθε ηλεκτρονιακή κατάσταση διαχωρίζεται σε επιμέρους δονητικά επίπεδα και η μετάβαση συνήθως πραγματοποιείται στο υψηλότερο ενεργειακά δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης κατάστασης S_1 . Σε δεύτερο στάδιο, κατά τη διέγερση το μόριο χάνει ενέργεια λόγω των αλλαγών της διαμόρφωσης του ή των συγκρούσεων με τα μόρια του περιβάλλοντος του και μεταπίπτει στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης κατάστασης S_1 . Η διαδικασία αυτή καλείται δονητική επαναφορά. Τέλος, σε τρίτο στάδιο το μόριο αποδιεγείρεται μεταπίπτοντας από το χαμηλότερο ενεργειακά δονητικό επίπεδο της κατάστασης S_1 στη θεμελιώδη κατάσταση S_0 με παράλληλη εκπομπή ακτινοβολίας ενέργειας $h\nu_{EM}$.



Εικόνα 2.3: Διάγραμμα Jablonski.

Η πειραματική διάταξη φθορισμομετρίας διαθέτει ως πηγή ακτινοβολίας μία λυχνία ξένου η οποία παρέχει ακτινοβολία στην περιοχή 250-700 nm. Μέσω ενός μονοχρωμάτορα διέγερσης πραγματοποιείται η ανάλυση της πολυχρωματικής ακτινοβολίας με τη χρήση διπλού φράγματος περίθλασης και παραγωγή μονοχρωματικής ακτινοβολίας. Η μονοχρωματική ακτινοβολία κατευθύνεται στην κυψελίδα του δείγματος και η εκπεμπόμενη ακτινοβολία ανιχνεύεται στις 90° , ώστε να ελαχιστοποιηθεί η ανίχνευση της ακτινοβολίας διέγερσης (παράσιτη ακτινοβολία). Η ακτινοβολία εκπομπής, μετά τη διέλευση

από ένα μονοχρωμάτορα εκπομπής μονού φράγματος περίθλασης, φθάνει στον ανιχνευτή ο οποίος είναι ένας φωτοπολλαπλασιαστής που καταγράφει την ένταση της ακτινοβολίας και παρέχει τα δεδομένα σε έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Στην είσοδο και την έξοδο κάθε μονοχρωμάτορα υπάρχουν σχισμές διέλευσης ακτινοβολίας μεταβλητού εύρους, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη ρύθμιση της ευαισθησίας και της διακριτικής ικανότητας της τεχνικής.[87, 88] Η σχηματική αναπαράσταση της διάταξης παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.4.



Εικόνα 2.4: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης φασματοσκοπίας φθορισμού.

2.4 Φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

Η φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) βασίζεται στην αλληλεπίδραση της ύλης με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Οι μετρήσεις απορρόφησης βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στον ποσοτικό προσδιορισμό μιας μεγάλης ποικιλίας ανόργανων και οργανικών ουσιών. Οι απορροφήσεις ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή του υπεριώδους-ορατού τμήματος του φάσματος είναι αποτέλεσμα των ενεργειακών μεταβολών στην ηλεκτρονική δομή των μορίων. Όταν πολυχρωματική ακτινοβολία περάσει μέσα από κάποια ουσία ή διάλυμα γίνεται εκλεκτική απορρόφηση εκείνων των συχνοτήτων που οδηγούν σε κατάσταση υψηλότερης εσωτερικής ενέργειας των μορίων. Η μονοχρωματική ακτινοβολία διέρχεται από διάλυμα ικανό να την απορροφήσει τότε η ισχύς της ακτινοβολίας ελαττώνεται προοδευτικά κατά

μήκος της διαδρομής. Η ελάττωση της ισχύος εξαρτάται από την συγκέντρωση της ουσίας που την απορροφά και από την απόσταση που διένυσε η δέσμη μέσα στο διάλυμα. [81] Οι σχέσεις αυτές εκφράζονται με τον νόμο των Lambert-Beer και διατυπώνονται με τη μορφή:

$$A = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) = -\log T = \epsilon bc \quad (2.4.1)$$

όπου ϵ είναι ο συντελεστής γραμμομοριακής απορροφητικότητας, b το μήκος της οπτικής διαδρομής στην κυψελίδα, c η συγκέντρωση ενός αναλύτη, P_0 και P οι εντάσεις της προσπίπτουσας και εξερχόμενης δέσμης αντίστοιχα, T η διαπερατότητα ίση με P/P_0 .

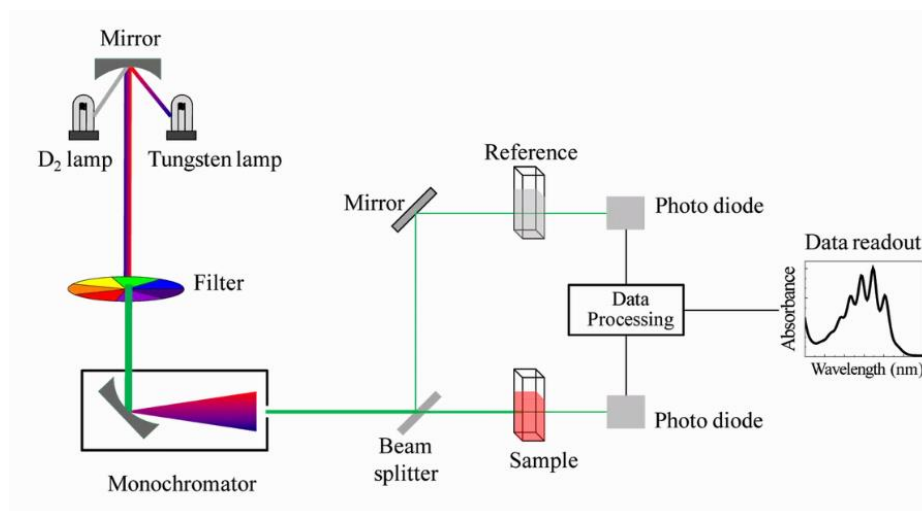
Στην πράξη χρησιμοποιείται πάντοτε η καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης λόγω της αδυναμίας υπολογισμού της c από την παραπάνω εξίσωση (2.4.1). Η κλίση της καμπύλης αναφοράς, που αναφέρεται και ως διάγραμμα του νόμου του Beer, ισούται με ϵb ή ab και απ' αυτή μπορεί να υπολογιστεί η τιμή της ϵ ή a (b είναι γνωστό).

Η απορρόφηση ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας προκαλεί μεταπτώσεις ηλεκτρονίων εξωτερικών στοιβάδων. Το μόριο απορροφά φως με αποτέλεσμα την διέγερση των ηλεκτρονίων σθένους από την βασική στην διεγερμένη κατάσταση. Υπάρχουν τρεις τύποι ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων κατά την απορρόφηση ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας: οι μεταπτώσεις π , σ και n ηλεκτρονίων, οι μεταπτώσεις d και f ηλεκτρονίων και οι μεταπτώσεις μεταφοράς φορτίου. Στην περίπτωση των μεταλλικών ιόντων παρατηρούνται μεταπτώσεις d ηλεκτρονίων.

Η περιοχή υπεριώδους εκτείνεται για μήκη κύματος μεταξύ 100nm έως 400nm και η περιοχή ορατού μεταξύ 400 και 800nm. Οι μετρήσεις γίνονται στην περιοχή του ορατού φάσματος (400-800nm περίπου) και στο εγγύς υπεριώδες (200-400nm), έχοντας υπόψη ότι στο άπω υπεριώδες απορροφά τόσο το ατμοσφαιρικό οξυγόνο όσο και το υλικό της κυψελίδας (χαλαζίας ή άμορφο SiO_2). [89]

Ένα φασματοφωτόμετρο UV-Vis αποτελείται κυρίως από μία φωτεινή πηγή, ένα ρυθμιστή έντασης της ακτινοβολίας, έναν επιλογέα μήκους κύματος

(μονοχρωμάτορας ή φίλτρο), έναν ανιχνευτή της ακτινοβολίας και τέλος ένα καταγραφέα/υπολογιστή όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.5.



Εικόνα 2.5: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού.

2.5 Σκέδαση φωτός (LS)

Οι τεχνικές της σκέδασης φωτός χρησιμοποιούνται ευρέως για τη μελέτη πολυμερικών διαλυμάτων και παρέχουν σημαντικές πληροφορίες αναφορικά με τις στατικές και θερμοδυναμικές ιδιότητες των πολυμερικών μορίων στο διάλυμα. Τα είδη των τεχνικών σκέδασης φωτός που χρησιμοποιούνται κατά κόρον αναφέρονται ως Δυναμική, Στατική και Ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός (DLS, SLS, ELS). Η εφαρμογή των μεθόδων αυτών παρουσιάζει αλματώδη ανάπτυξη όσον αφορά τον υπολογισμό του μεγέθους των σωματιδίων και τις διαστάσεις τους χωρίς αναφορά σε πρότυπα/standards (βαθμονόμηση) καθώς και την εύρεση του απόλυτου μέσου μοριακού βάρους κατά βάρος M_w . Βασίζεται στην μέτρηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από το διάλυμα σε διάφορες κατευθύνσεις σε σχέση με την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Γενικά, όταν μια δέσμη φωτός προσπέσει σε ένα κolloειδές διάλυμα ένα μέρος της ακτινοβολίας διέρχεται μέσα από το διάλυμα και το υπόλοιπο σκεδαάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις. Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας εξαρτάται από το μέγεθος των παραγόμενων διπόλων εντός του μορίου. Όσο μεγαλύτερη η πολωσιμότητα του μορίου, τόσο μεγαλύτερα τα παραγόμενα δίπολα και τόσο μεγαλύτερη η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Στην περίπτωση διαλυμάτων μακρομορίων η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι πολύ μεγαλύτερη από εκείνη των διαλυμάτων των “μικρών” μορίων. Γενικά, πρόκειται

για μία γρήγορη μέθοδο, μη καταστρεπτική για το δείγμα με καλύτερη κατανόηση του συστήματος δίνοντας πληροφορίες και για τις αλληλεπιδράσεις πολυμερούς-διαλύτη, A₂. [90]

2.5.1 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)

Η δυναμική σκέδαση φωτός μετράει τις διακυμάνσεις της έντασης του σκεδαζόμενου σήματος με τον χρόνο. Οι διακυμάνσεις της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι αποτέλεσμα της κίνησης Brown των μορίων στο διάλυμα και εξαρτώνται από το μέγεθος και την ταχύτητα των μορίων στο διάλυμα. Ο χρόνος είναι μικρός και λόγω του φαινομένου Doppler παρατηρείται μια μικρή μεταβολή μεταξύ της συχνότητας της προσπίπτουσας και της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. [91]

Η μεταβολή της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε σχέση με το χρόνο περιγράφεται από μία χρονική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης. Σύμφωνα με τη μέθοδο των αθροισμάτων η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης περιγράφεται με ένα πολυώνυμο, συνήθως 2^{ης} ή 3^{ης} τάξης και από τους συντελεστές του πολυωνύμου προκύπτουν ο συντελεστής διάχυσης (1^{ος} cumulant) και η πολυδιασπορά μεγέθους του συστήματος (2^{ος} cumulant). Αντίθετα, με ανάλυση μέσω του προγράμματος CONTIN η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης έχει σαν αποτέλεσμα μία πληθώρα πιθανών λύσεων όπου οι περίπλοκες απορρίπτονται ως λιγότερο πιθανές να υπάρξουν σε πραγματικά συστήματα. Έτσι, η προκύπτουσα λύση δεν είναι μοναδική και για αυτό θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψη όλες οι λύσεις που προτείνει το πρόγραμμα. Η ανάλυση μέσω του προγράμματος CONTIN οδηγεί στον προσδιορισμό της συνάρτησης κατανομής μεγεθών των σωματιδίων στο διάλυμα. [92]

Γενικά μία συνάρτηση αυτοσυσχέτισης μεταξύ δύο σφαιρικών σωμάτων που δεν αλληλεπιδρούν έχει τη μορφή [93]:

$$G_{(2)}(t) = \langle I_{(0)}I_{(t)} \rangle = A + Be^{-\Gamma t} = A + Be^{Dq^2t} \quad (2.4.1.1)$$

όπου A και B είναι πειραματικές σταθερές, Γ είναι η ταχύτητα που φθίνει η συνάρτηση, D είναι ο μεταφορικός συντελεστής διάχυσης και q είναι το διάνυσμα σκέδασης το οποίο ορίζεται ως:

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin(\theta/2) \quad (2.4.1.2)$$

όπου, n_0 ο δείκτης διάθλασης του δείγματος, λ το μήκος κύματος του λέιζερ που ακτινοβολεί το δείγμα και θ η γωνία που τοποθετείται ο ανιχνευτής σε σχέση με την κυψελίδα που περιέχει το δείγμα.

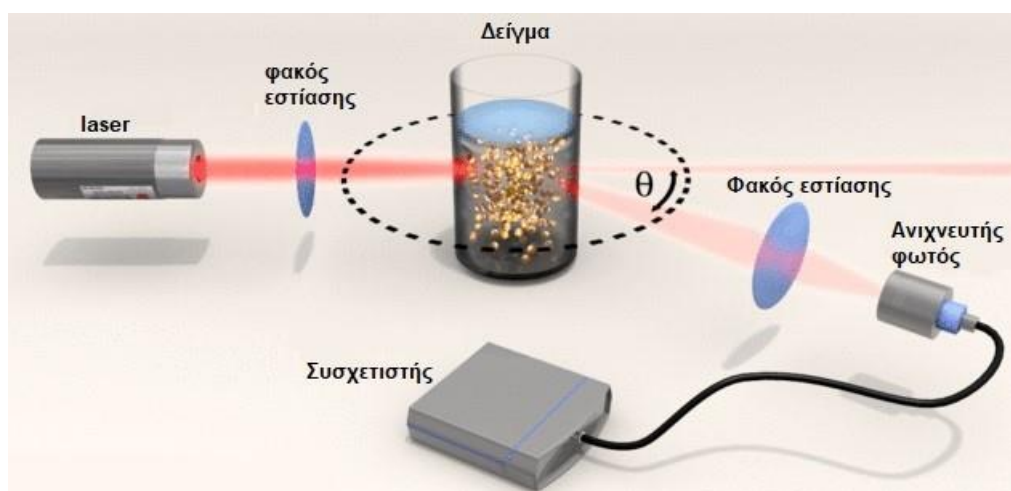
Ο μεταφορικός συντελεστής διάχυσης, D περιγράφει την δυσκολία κίνησης ενός σώματος μέσα σε ένα διάλυμα, και είναι αντιστρόφως ανάλογος του μεγέθους του πολυμερούς (ή νανοσωματιδίου) και συγκεκριμένα της υδροδυναμικής ακτίνας.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad (2.4.1.3)$$

όπου, k η σταθερά Boltzmann, T η απόλυτη θερμοκρασία, η το ιξώδες του διαλύματος και R_h η υδροδυναμική ακτίνα του πολυμερούς.

Ο υπολογισμός της υδροδυναμικής ακτίνας από τη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης προκύπτει έπειτα από ανάλυση από κάποιο μαθηματικό αλγόριθμο. Δύο τέτοιοι αλγόριθμοι που χρησιμοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά για την παραπάνω ανάλυση είναι η μέθοδος των αθροισμάτων και οι τεχνικές κανονικοποίησης μέσω του προγράμματος CONTIN.

Η δυναμική σκέδαση φωτός προσδίδει πολλές πληροφορίες για τις ιδιότητες των πολυμερικών μορίων σε διάλυμα. Πρόκειται για μία γρήγορη αυτοματοποιημένη και απόλυτη μέθοδο προσδιορισμού R_h και D_t . [94] Η τυπική διάταξη για την μέτρηση των σωματιδίων με δυναμική σκέδαση φωτός παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.6.



Εικόνα 2.6: Σχηματικό διάγραμμα συσκευής δυναμικής σκέδασης φωτός.

2.5.2 Στατική σκέδαση φωτός (SLS)

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

$$R_\theta = \frac{d^2 I_s}{V f I_0} \quad (2.4.2.1)$$

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

Η στατική σκέδαση φωτός αφορά είτε διαλύματα με μικρά σωματίδια διαστάσεων $R < \lambda/20$ είτε μεγαλύτερα σωματίδια διαστάσεων $R > \lambda/20$. Τα μικρών διαστάσεων πολυμερικά αυτά μόρια κατανέμονται τυχαία στο χώρο (κίνηση Brown) και σε μεγάλες αποστάσεις μεταξύ τους, οπότε η συνεισφορά κάθε μορίου στην ένταση σκέδασης μπορεί να θεωρηθεί ανάλογη του αριθμού τους. Η κίνηση αυτή δημιουργεί περιοχές με διαφορετική συγκέντρωση οι οποίες έχουν διαφορετικές τιμές διηλεκτρικής σταθεράς. Αν οι διαστάσεις των σωματιδίων είναι συγκρίσιμες του λ τότε τα σκεδαζόμενα φωτεινά κύματα από τα διάφορα σημεία του σωματιδίου φτάνουν στο σημείο παρατήρησης σημαντικά εκτός φάσης οδηγώντας σε εξασθένηση (φαινόμενο συμβολής) του σκεδαζόμενου φωτός. Τα μόρια βρίσκονται σε κοντινές αποστάσεις, οπότε η ακτινοβολία που σκεδάζεται από κάθε μόριο αλληλεπιδρά με εκείνη που προέρχεται από άλλα μόρια. Η πιθανότητα για καταστρεπτική συμβολή αυξάνεται και το φαινόμενο αυτό μειώνει την ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας.

Η περιγραφή του φαινομένου αυτού μπορεί να γίνει μέσω της θεωρίας των διακυμάνσεων Einstein-Smoluchowski, η οποία λαμβάνει υπόψη τις τοπικές διακυμάνσεις της διηλεκτρικής σταθεράς, οι οποίες προέρχονται από διακυμάνσεις πυκνότητας σε ένα καθαρό υγρό και/ή από διακυμάνσεις συγκέντρωσης σε ένα διάλυμα. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η συνεισφορά των διακυμάνσεων συγκέντρωσης στη σκέδαση εκφράζεται μέσω της σχέσης [95]:

$$\Delta R_\theta = R_{\theta, \text{διαλύματος}} - R_{\theta, \text{διαλύτη}} \quad (2.4.2.2)$$

Όπως φαίνεται στη σχέση (2.4.2.1), ο λόγος R_{θ} εξαρτάται από τη γεωμετρία της πειραματικής διάταξης όπου η τιμή του μας δίνει τον απόλυτο λόγο R_{θ} . Ύστερα από την κανονικοποίηση του ως προς πρότυπους διαλύτες όπως το τολουόλιο, η εξίσωση παίρνει την εξής μορφή:

$$R_{\theta} = R_T \frac{n_o^2 I_s}{n_T^2 I_{s,T}} \quad (2.4.2.3)$$

όπου R_T ο λόγος Rayleigh του τολουολίου, n_o^2 και n_T^2 οι δείκτες διάθλασης του διαλύτη και του τολουολίου και I_s και $I_{s,T}$ οι εντάσεις της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας του διαλύματος και του τολουολίου, αντίστοιχα.

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

$$\frac{Kc}{\Delta R_{\theta}} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{1}{3} R_g^2 q^2\right) + 2A_2c \quad (2.4.2.4)$$

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

$$q = \frac{4\pi n_o}{\lambda} \sin(\theta/2) \quad (2.4.2.5)$$

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

$$K = \frac{4\pi^2 n_o^2}{\lambda^4 N_A} \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \quad (2.4.2.6)$$

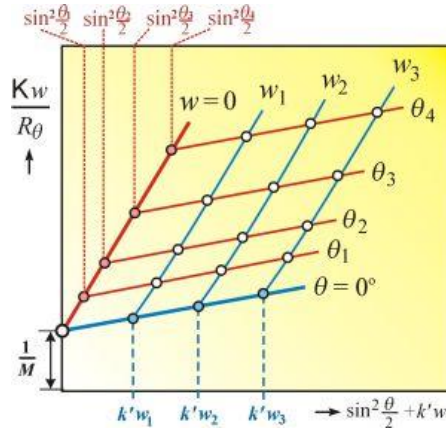
όπου N_A ο αριθμός του Avogadro και dn/dc ο διαφορικός δείκτης διάθλασης.

Με τη βοήθεια της εξίσωσης (2.4.2.4) για μετρήσεις σε πολλαπλές γωνίες θ και συγκεντρώσεις c προκύπτει το διάγραμμα Zimm (Εικόνα 2.7). Από το διάγραμμα αυτό με διπλή προέκταση των μετρούμενων τιμών του λόγου $Kc/\Delta R_{\theta}$ σε μηδενική γωνία σκέδασης και μηδενική συγκέντρωση, εξάγεται το μοριακό βάρος M_w ως το αντίστροφο της κοινής τεταγμένης επί της αρχής, ενώ ο συντελεστής A_2 και η γυροσκοπική ακτίνα R_g υπολογίζονται από τις κλίσεις των ευθειών για $\theta = 0$ και $c = 0$, αντίστοιχα. [96]

Η παράμετρος dn/dc αποτελεί το μέτρο της μεταβολής του δείκτη διάθλασης του διαλύματος συναρτήσει της αύξησης της συγκέντρωσης του

πολυμερούς, είναι χαρακτηριστική του κάθε συστήματος πολυμερούς-διαλύτη και μετράται με τη χρήση διαφορικών διαθλασιμέτρων.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, στην περίπτωση συμπολυμερών κατά συστάδες ο διαφορικός δείκτης διάθλασης του διαλύματος $(dn/dc)_{ολικό}$ μπορεί να υπολογιστεί ως σταθμισμένος μέσος όρος των διαφορικών δεικτών διάθλασης $(dn/dc)_1$ και $(dn/dc)_2$ των επιμέρους συστατικών, ως εξής:



Εικόνα 2.7: Διάγραμμα Zimm.

$$\left(\frac{dn}{dc}\right)^2 = w_1 \left(\frac{dn}{dc}\right)_1 + w_2 \left(\frac{dn}{dc}\right)_2 \quad (2.4.2.7)$$

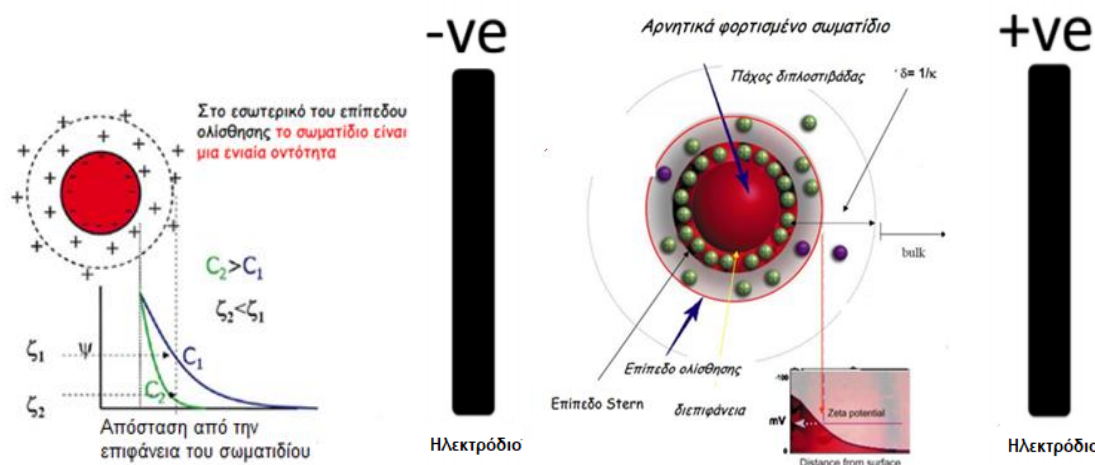
όπου w_1 και w_2 τα κλάσματα βάρους των δύο συστατικών. [84, 97]

2.5.3 Ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός (ELS)

Η ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός ή αλλιώς το ηλεκτροκινητικό δυναμικό χαρακτηρίζεται ως το δυναμικό ολίσθησης/διάτμησης ενός κολλοειδούς σωματιδίου που κινείται υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Το ηλεκτρικό δυναμικό μιας επιφάνειας εκφράζει το ηλεκτροστατικό δυναμικό στο επίπεδο ολίσθησης και αποτελεί την κινητήρια δύναμη ώστε να φέρει μία θετικά φορτισμένη μονάδα από το άπειρο στην επιφάνεια χωρίς κανενός είδους επιτάχυνση. Το ηλεκτροκινητικό δυναμικό αντικατοπτρίζει τη διαφορά δυναμικού μεταξύ του ηλεκτρικού διπλού στρώματος των ηλεκτροφορητικά κινητών σωματιδίων και του στρώματος διασποράς γύρω από αυτά στο επίπεδο ολίσθησης. Όταν ένα φορτισμένο σωματίδιο ή μακρομόριο βρεθεί σε περιβάλλον πολικού διαλύτη, τα επιφανειακά φορτία του σωματιδίου αλληλεπιδρούν με τα ιόντα του διαλύτη μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό γύρω από το σωματίδιο μίας ηλεκτρικής

διπλοστοιβάδας (Electrical Double Layer, EDL), η οποία καλείται και στοιβάδα Debye. Η διπλοστοιβάδα αυτή αποτελείται κυρίως από ιόντα αντίθετου φορτίου ως προς το επιφανειακό φορτίο του σωματιδίου, των οποίων η συγκέντρωση μειώνεται καθώς αυξάνεται η απόσταση από την επιφάνεια του φορτίου. Ως αποτέλεσμα, το δυναμικό της διπλοστοιβάδας παρουσιάζει εκθετική μείωση συναρτήσει της απόστασης από την επιφάνεια του σωματιδίου. [98, 99]

Η διπλοστοιβάδα μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από δύο τμήματα όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.8, μια εσωτερική περιοχή, η οποία περιλαμβάνει ιόντα δεσμευμένα σχετικά ισχυρά με τη φορτισμένη επιφάνεια και ονομάζεται στοιβάδα Stern (Stern Layer), και μια εξωτερική (διαχυτική) περιοχή που δημιουργείται από διάχυση ασθενέστερα συνδεδεμένων ιόντων του μίγματος και ονομάζεται στοιβάδα Gouy-Chapman. Στο διάχυτο στρώμα υπάρχει ένα νοητό όριο μέσα στο οποίο ιόντα και μόρια διαλύτη αλληλεπιδρούν αρκετά ισχυρά με τη φορτισμένη επιφάνεια του σωματιδίου ώστε σχηματίζουν μια σταθερή οντότητα με το σωματίδιο. Το όριο αυτό ονομάζεται επίπεδο ολίσθησης (Slipping plane). [100]



Εικόνα 2.8: Σχηματική απεικόνιση της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας και των επιμέρους επιπέδων που την αποτελούν.

Στις μετρήσεις του ζ δυναμικού ένα μέρος από το δείγμα του κολλοειδούς τοποθετείται σε μία κυψελίδα με ένα ηλεκτρόδιο στις δύο εισόδους της και εφαρμόζεται τάση στα ηλεκτρόδιά της. Στο δείγμα προσπίπτει μια δέσμη μονοχρωματικής ακτινοβολίας (Laser) και η σκεδαζόμενη από το διάλυμα ακτινοβολία συλλέγεται από έναν ανιχνευτή (Εικόνα 2.9). Όσο μεγαλύτερη είναι η ταχύτητα των σωματιδίων του κολλοειδούς, η οποία εξαρτάται από το φορτίο

τους, τόσο μεγαλύτερη θα είναι η μεταβολή στη συχνότητα της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (φαινόμενο Doppler). Ένας διαχωριστής (splitter) χρησιμοποιείται ώστε ένα μέρος της ακτινοβολίας που εκπέμπει το Laser να φτάνει απευθείας στον ανιχνευτή χωρίς να προσπίπτει πάνω στο δείγμα. Συσχετίζοντας τις δύο διαφορετικές ακτινοβολίες που φτάνουν στον ανιχνευτή (προσπίπτουσα και σκεδαζόμενη) προσδιορίζεται η μετατόπιση Doppler, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ταχύτητας των σωματιδίων. [101]

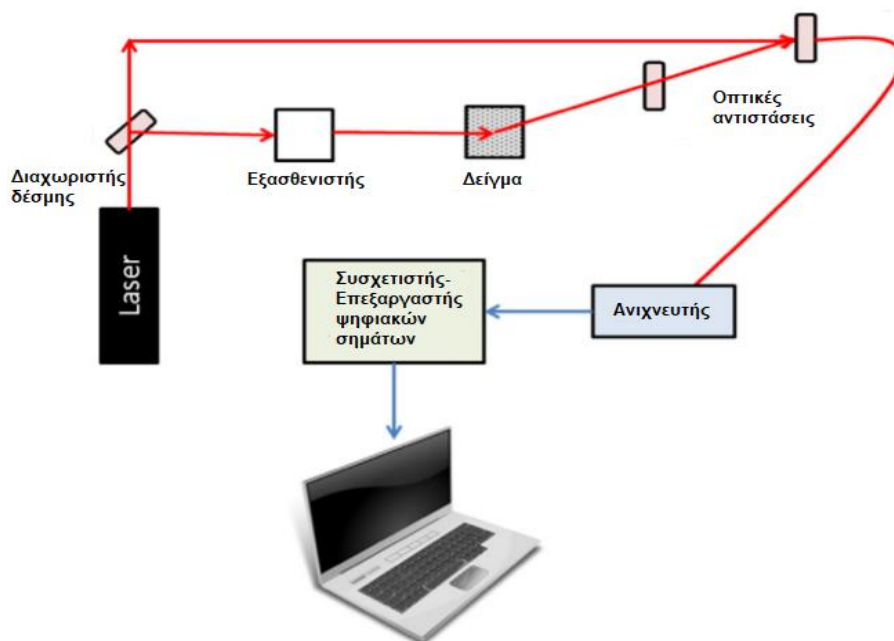
Η εξίσωση που συνδέει την ταχύτητα του σωματιδίου, το ιξώδες και τη διηλεκτρική σταθερά του διαλύτη με το ζ-δυναμικό είναι η εξίσωση Smoluchowski [102]:

$$\zeta = \frac{\eta}{\epsilon} U_e \quad (2.4.3.1)$$

Όπου η είναι το ιξώδες, ϵ η διηλεκτρική σταθερά του μέσου και U_e η ηλεκτροφορητική κινητικότητα (electrophoretic mobility) των σωματιδίων, που εκφράζεται ως:

$$U_e = \frac{u}{V} u \quad (2.4.3.2)$$

όπου, u η ταχύτητα του σωματιδίου, V η εφαρμοζόμενη τάση και L η απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων. Από τις παραπάνω σχέσεις (2.4.3.1) και (2.4.3.2) προκύπτει το ζ-δυναμικό των σωματιδίων.



Εικόνα 2.9: Σχηματική απεικόνιση της οργάνολογίας ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός.

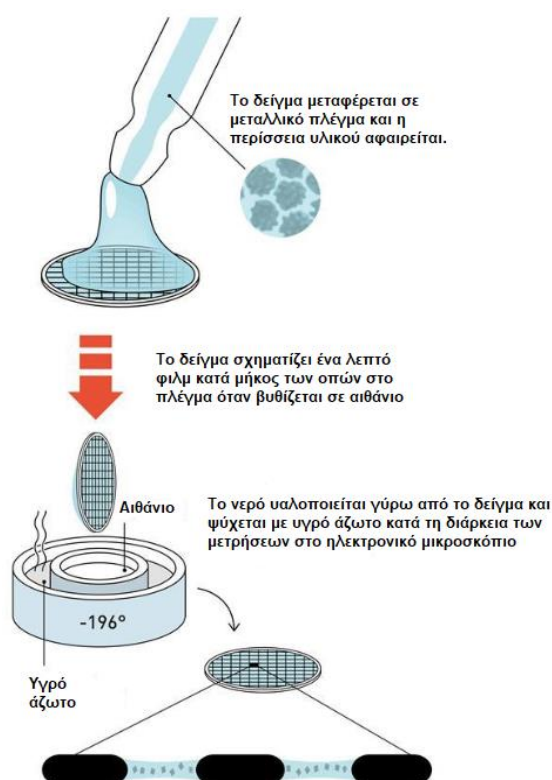
2.6 Κρυογονική ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (Cryo-TEM)

Η κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία (Cryo-EM) είναι ένας τύπος ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης που επιτρέπει στο εξεταζόμενο δείγμα να παρατηρηθεί σε κρυογονικές θερμοκρασίες. [103] Μετά από χρόνια βελτίωσης, το κρυο-ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχει γίνει ένα πολύτιμο εργαλείο για την προβολή και τη μελέτη των δομών διαφόρων βιολογικών μορίων. Η κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία περιλαμβάνει πληθώρα πειραματικών μεθόδων οι οποίες βασίζονται στην αρχή της απεικόνισης ευαίσθητων στην ακτινοβολία δειγμάτων σε ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης. Μπορεί να εφαρμοστεί για τη μελέτη του μεγέθους, του σχήματος και της εσωτερικής δομής των νανοσωματιδιακών φορέων καθώς και της συνολικής κολλοειδούς σύνθεσης των αντίστοιχων διασπορών.

Κατά την προετοιμασία του δείγματος απαιτείται αυστηρός έλεγχος της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος καθ'όλη την διάρκεια του πειράματος. Ο εξειδικευμένος εξοπλισμός της cryo-TEM μικροσκοπίας περιέχει συχνά ένα περιβαλλοντικό θάλαμο που επιτρέπει την προετοιμασία του δείγματος σε καθορισμένη υγρασία. Για την κρυο-παρασκευή, οι συγκεντρώσεις δείγματος που συνιστώνται είναι περίπου 1-2 mg / ml. Το μέγεθος των σωματιδίων στο δείγμα θα πρέπει να βρίσκεται στην χαμηλότερη περιοχή νανομέτρων, δεδομένου ότι τα μεγάλα σωματίδια είναι πιθανόν να απομακρυνθούν από το φιλμ κατά τη διάρκεια του στυπώματος. Αναλυτικά η προετοιμασία του δείγματος περιγράφεται και απεικονίζεται παρακάτω μέσω της Εικόνας 2.10.

Αρχικά 2-5 μl περίπου ρίχνονται με μια πιπέτα στο θάλαμο παρασκευής, μετά τη στερέωση του πλέγματος. Η περίσσεια του δείγματος αφαιρείται με ταχεία στύπωση με διηθητικό χαρτί αφήνοντας ένα λεπτό διασταυρωμένο φιλμ κατά μήκος των οπών του πλέγματος στο δείγμα το οποίο στη συνέχεια βυθίζεται αμέσως σε υγρό αιθάνιο. Απαιτείται πολύ υψηλός ρυθμός ψύξης για την υαλοποίηση του δείγματος ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός κρυσταλλικού πάγου. Το υγροποιημένο αιθάνιο που έχει ψυχθεί σε θερμοκρασία υγρού αζώτου χρησιμοποιείται ως κοινό κρυογόνο για την υαλοποίηση των cryo-TEM δειγμάτων. Μετά από την κατάψυξη, το δείγμα πρέπει να διατηρείται σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (π.χ. -175 ° C) προκειμένου να αποφευχθεί η μετάβαση φάσης του υαλοποιημένου νερού σε κρυσταλλικό πάγο. Κατά την ψύξη, το

πλέγμα με το υαλοποιημένο δείγμα απομακρύνεται από το δοχείο με το υγρό αιθάνιο και η περίσσεια του αιθανίου συτπώνεται με ένα κομμάτι διηθητικού χαρτιού. Το δείγμα μεταφέρεται ενδιάμεσα σε υγρό άζωτο και εισάγεται μέσα στο κρύο συγκρατητήρα κρουφορίας χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα προφυκτικά εργαλεία. Στη συνέχεια, ο ψυχρός φορέας μεταφέρεται γρήγορα και εισάγεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Πρέπει να ληφθεί μέριμνα ώστε να αποφευχθεί η επαφή με την ατμοσφαιρική υγρασία, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μόλυνση με τον κυβικό πάγο σε ψυχόμενα τμήματα του κρύου συγκρατητήρα, του υαλοποιημένου δείγματος ή της μονάδας μεταφοράς. [104]

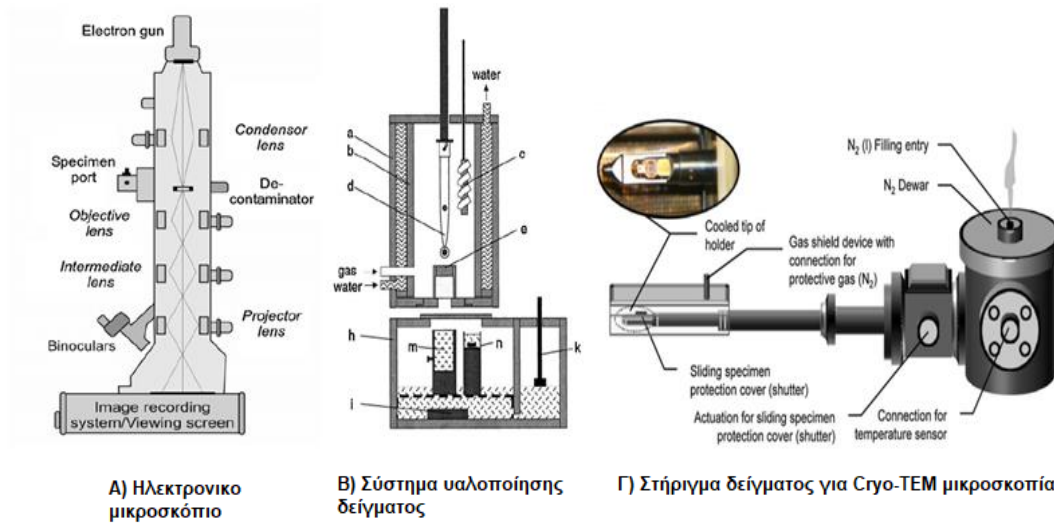


Εικόνα 2.10: Προετοιμασία του δείγματος μέσω της διαδικασίας υαλοποίησης για την Cryo-TEM μικροσκοπία.

Στο σύστημα υαλοποίησης δείγματος για την Cryo-TEM μικροσκοπία όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.11 περιλαμβάνονται: (a) και (b) σωλήνες από ακρυλικό γυαλί που σχηματίζουν το διπλό τοίχωμα του θαλάμου, (c) στήριγμα εξισορρόπησης δείγματος, (d) πλέγμα δείγματος στερεωμένο με τσιμπιδάκια, (e) τεμάχια ακρυλικού γυαλιού πάνω στα οποία μπορεί να τεντωθεί το διηθητικό χαρτί για την σύτπωση της περίσσειας του δείγματος, (h) κιβώτιο πολυστυρενίου (θάλαμος ψύξης) με δύο δοχεία (m, n), (i) αντίσταση για την

ήπια θέρμανση του υγρού αζώτου για παραγωγή ροή αζώτου και (κ) Πυλώνα πολυστυρενίου με ξυλίνη σχάρα για την ένδειξη της στάθμης του αζώτου.

Συμφωνα με την Εικόνα 2.11, το δείγμα βυθίζεται στο δοχείο γεμάτο με κρυογόνο (m) όπου φαίνεται στην άνω του θέση αλλά μπορεί να χαμηλώσει μετά τη βύθιση του, αφαιρώντας με αυτόν τον τρόπο το υαλοποιημένο δείγμα από το κρυογόνο, το οποίο διοχετεύεται. Το δείγμα τοποθετείται στο δεύτερο δοχείο (n) γεμάτο με υγρό άζωτο περιέχοντας το μετατοπισμένο κιβώτιο μεταφοράς.[27, 105]



Εικόνα 2.11: Σχηματική αναπαράσταση ενός A) Ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, B) του συστήματος υαλοποίησης του δείγματος και Γ) το στήριγμα του δείγματος για Cryo-TEM μικροσκοπία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Υλικά και Αντιδραστήρια

Κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν διάφορα υλικά και αντιδραστήρια. Τα μονομερή που χρησιμοποιήθηκαν είναι ο ακρυλικός n-βουτυλεστέρας (n-butyl acrylate, nBA), ο ακρυλικός εστέρας της διμεθυλοαμινοαιθανόλης (n-Dimethylamino ethyl acrylate, DMAEA) και ο ακρυλικός εστέρας της ολιγοαιθυλενογλυκόλης (oligoethylene glycol) methyl ether acrylate, OEGA) με μοριακό βάρος $M_w = 480$ g/ml. Τα μονομερή προτού πολυμεριστούν περάστηκαν από στήλη τρεις φορές για την απομάκρυνση των σταθεροποιητών (Inhibitor removers) που περιείχαν χρησιμοποιώντας ρητίνες της Sigma Aldrich με Cas number 311340 και 311332 αντίστοιχα. Το αντιδραστήριο μεταφοράς αλυσίδας που χρησιμοποιήθηκε ήταν το 2-(δωδεκυλθειοκαρβονυλοθειο)-2-μεθυλοπροπανικό οξύ (2-(dodecylthiocarbonothioylthio)-2-methylpropionic acid, DDMAT) και ο απαρχητής ήταν το Αζωδισισοβουτυρονιτρίλιο (2,2-Azobis(isobutyronitrile), AIBN) της Sigma Aldrich. Κατά τις αντιδράσεις τεταρτοταγοποίησης της αμινομάδας του PDMAEA χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια Μεθυλοϊωδιδίο (methyl iodide, CH_3I) και Ιωδοεξάνιο (iodohexane, $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{I}$) αντίστοιχα. Για τη φασματοσκοπία φθορισμού (FS) από την Sigma Aldrich χρησιμοποιήθηκε πυρένιο (Pyrene) ως ιχνηθέτης καθώς και Βρωμιούχο αιθίδιο ως φθορίζουσα βαφή της διπλής έλικας του DNA (Ethidium bromide, EtBr). Το DNA που χρησιμοποιήθηκε για τις μελέτες σύμπλεξης ήταν από σπέρμα σολωμού σε νηματοειδή μορφή (Salmon testes DNA, 113 ζεύγη βάσεων). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν από την Sigma Aldrich κατά την πορεία των πειραμάτων ήταν το τετραϋδροφουράνιο (tetrahydrofuran, THF), το κανονικό εξάνιο (n-Hexane), το 1,4-διοξάνιο (1,4 dioxane), το οποίο περάστηκε από μοριακά κόσκινα, η Μεθανόλη (methanol, CH_3OH), το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (deuterated chloroform, CDCl_3) και η δευτεριωμένη ακετόνη (deuterated acetone, CD_3COCD_3).

3.2 Οργανολογία και τεχνικές χαρακτηρισμού

Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (SEC)

Τα μοριακά βάρη και οι κατανομές μοριακών βαρών των πολυμερών προσδιορίστηκαν με τη χρήση χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών, χρησιμοποιώντας ένα όργανο Waters System, αποτελούμενο από μια ισοκρατική αντλία Waters 1515, ένα σετ από τρεις στήλες διαχωρισμού μεικτής σύστασης μ -Styragel (εύρος πόρων 10^2 με 10^6 Å), έναν ανιχνευτή δείκτη διάθλασης Waters 2414 (θερμοστατημένος στους 40°C) και κατευθυνόμενο από το λογισμικό Breeze. Η κινητή φάση είναι τετραϋδροφουράνιο, το οποίο περιέχει 5% τριαιθυλαμίνη με ρυθμό ροής 1 mL/min στους 30°C . Η βαθμονόμηση του οργάνου έγινε με πρότυπα δείγματα πολυστυρενίου με στενές κατανομές μοριακών βαρών και μέσα μοριακά βάρη στο εύρος 1.200 έως 929.000 g/mol. Τα δείγματα ήταν ήδη διαλυμένα στην κινητή φάση σε συγκεντρώσεις της κλίμακας των 2 - 4 mg /mL.

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$)

Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ ελήφθησαν από ένα φασματόμετρο Bruker AC 300 FT-NMR. Οι χημικές μετατοπίσεις παρουσιάζονται σε ppm με σημείο αναφοράς το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS). Η προετοιμασία των δειγμάτων για τις μετρήσεις $^1\text{H-NMR}$ ήταν η εξής: διάλυση 10mg δείγματος σε 0,7mL δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ή δευτεριωμένη ακετόνη και εισαγωγή του διαλύματος στα σωληνάκια NMR (NMR tubes). Η ανάλυση των φασμάτων NMR έγινε με χρήση του λογισμικού MestReNova της εταιρίας MestRelabs.

Φασματοσκοπία Φθορισμού (FS)

Για τον προσδιορισμό της κρίσιμης μικκυλιακής συγκέντρωσης (CMC) των συμπολυμερών και την μελέτη σύμπλεξης των πολυμερικών συστημάτων με DNA χρησιμοποιήθηκε φθορισμόμετρο NanoLog, με μία δίοδο λέιζερ ως πηγή διέγερσης (NanoLED, 440 nm, εύρος παλμού 100 ps) και έναν ανιχνευτή UV TBX-PMT series (250-850 nm) από την Horiba Jobin Yvon. Η προετοιμασία των μικκυλιακών διαλυμάτων για μέτρηση της CMC είχε ως εξής: Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων κυμαίνονταν σε εύρος 10^{-9} - 10^{-3} g /mL και η ιχνηθέτηση των διαλυμάτων αυτών έγινε με την προσθήκη διαλύματος πυρενίου συγκέντρωσης 1 mM σε αναλογία 1 μL / mL. Τα δείγματα παρέμειναν

σε ηρεμία για 24 ώρες, ώστε να γίνει εγκλωβισμός του πυρενίου στον υδρόφοβο πυρήνα των μικκυλίων. Ύστερα αφού μετρήθηκαν, έγινε αποτίμηση του λόγου των κορυφών I_1 / I_3 σε σχέση με τη συγκέντρωση πολυμερούς. Για την μελέτη της σύμπλεξης με DNA εξετάστηκε ο φθορισμός του EtBr σε διάφορες N/P αναλογίες. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε $\lambda_{excitation} = 535$ nm και η εκπομπή παρατηρήθηκε σε $\lambda_{emission} = 620$ nm.

Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)

Τα φάσματα UV-Vis καταγράφηκαν από ένα φασματοφωτόμετρο Perkin–Elmer (Lambda 19) UV-Vis. Χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες χαλαζία, στις οποίες τοποθετούνταν 3mL από το προς μέτρηση διάλυμα/δείγμα.

Δυναμική και Στατική Σκέδαση Φωτός (DLS, SLS)

Οι μετρήσεις Δυναμικής Σκέδασης φωτός πραγματοποιήθηκαν με το ALV/CGS-3 Compact Goniometer System (ALV GmbH, Germany) όργανο, εξοπλισμένο με ένα λέιζερ JDS Uniphase 22mW He–Ne, που λειτουργεί στα 632,8 nm, συνδεδεμένο με έναν ψηφιακό συσχετιστή φωτονίων 288 καναλιών ALV-5000/EPP multi-tau και μία ηλεκτρονική μονάδα σκέδασης φωτός ALV/LSE-5003 για έλεγχο της σταδιακής κίνησης του γωνιομέτρου και έλεγχο του διακόπτη ακραίας θέσης. Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας και οι συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης μετρήθηκαν στις 90°. Οι συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης καταγράφηκαν πέντε φορές και αναλύθηκαν με τη μέθοδο αθροισμάτων και τον αλγόριθμο CONTIN, ο οποίος παρέχει τις κατανομές για την φαινόμενη υδροδυναμική ακτίνα με χρήση αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης με τη βοήθεια της σχέσης Stokes – Einstein.

Οι μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός πραγματοποιήθηκαν με το ίδιο όργανο σε γωνιακό εύρος 30° - 150°, λαμβάνοντας μέτρηση ανά 10 μοίρες. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων για τον υπολογισμό της γυροσκοπικής ακτίνας έγιναν με τη χρήση της προσέγγισης Guinier 2ης τάξης στις περισσότερες περιπτώσεις.

Έγιναν μετρήσεις σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πολυμερούς οι οποίες προέκυψαν με αραιώση ενός αρχικού διαλύματος υψηλότερης συγκέντρωσης. Πριν τη μέτρηση όλα τα διαλύματα διηθήθηκαν με υδρόφιλο φίλτρο πορώδους 0,45μm.

Ηλεκτροφορητική Σκέδαση Φωτός (ELS)

Το ζ-δυναμικό μετρήθηκε σε σύστημα της εταιρίας Malvern (Nano Zeta Sizer) εξοπλισμένο με ένα λέιζερ He-Ne 4 mW μήκους κύματος $\lambda=633\text{nm}$ και μία φωτοδίοδο ως ανιχνευτή. Οι ηλεκτροκινητικές μετρήσεις για τον προσδιορισμό της κινητικότητας και των τιμών ζ η των κολλοειδών, πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της τεχνικής LDV (Laser Doppler Velocimetry) και με την προσέγγιση κατά Smoluchowski. Οι καταγγεγραμμένες τιμές ζ η είναι η μέση τιμή 100 μετρήσεων.

Κρυογονική Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Μετάδοσης (Cryo-TEM)

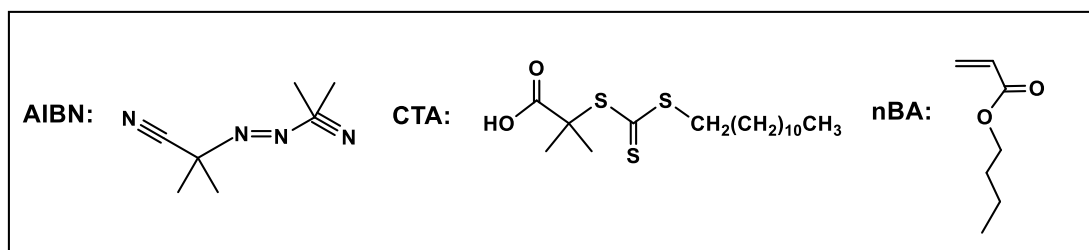
Οι εικόνες κρυογονικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας μετάδοσης ελήφθησαν χρησιμοποιώντας ένα Tecnai F20 TWIN μικροσκόπιο της εταιρείας FEI, ΗΠΑ χρησιμοποιώντας δυναμικό επιτάχυνσης 200kV. Οι εικόνες καταγράφηκαν σε κάμερα Eagle 4k HS της ίδιας εταιρείας και επεξεργάστηκαν με λογισμικό TIA. Η παρασκευή του δείγματος ξεκίνησε με υαλοποίηση των υδατικών διαλυμάτων σε grids με τρυπητή μεμβράνη άνθρακα (Quantifoil R 2/2, Quantifoil Micro Tools GmbH, Germany). Πριν από τη χρήση, χρησιμοποιήθηκε Femto καθαριστικό πλάσματος (Diener Electronic, Γερμανία) στα grids για 30 δευτερόλεπτα σε πλάσμα οξυγόνου. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης, μία αυτοματοποιημένη συσκευή στύπωσης Vitrobot Mark IV της εταιρείας FEI, ΗΠΑ και ένας κρύος συγκρατητήρας της εταιρείας Gatan Inc., USA. Οι ληφθείσες εικόνες αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό ImageJ.

3.3 Σύνθεση Πολυμερών μέσω Τεχνικής Πολυμερισμού RAFT

Στη παρούσα ερευνητική εργασία, συντέθηκαν δύο συστήματα αμφίφιλων δισυσταδικών συμπολυμερών με τη χρήση της τεχνικής του πολυμερισμού RAFT, αποτελούμενα από τη κοινή υδρόφοβη συστάδα του πολυακρυλικού βουτυλεστέρα (PnBA), της δεύτερης υδρόφιλης συστάδας του πολυακρυλικού εστέρα της διμεθυλοαμινοαιθανόλης (PDMAEA) καθώς και της υδρόφιλης συστάδας του ακρυλικού εστέρα της ολιγοαιθυλενογλυκόλης (POEGA) αντίστοιχα. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την σύνθεσή τους περιγράφεται παρακάτω.

3.3.1 Σύνθεση ομοπολυμερούς ακρυλικού n-βουτυλεστέρα (PnBA)

Συντέθηκαν δύο PnBA ομοπολυμερή διαφορετικών μοριακών βαρών 4.100 και 7.800 g/ml αντίστοιχα. Η διαδικασία σύνθεσης που ακολουθήθηκε είναι ίδια και για τα δύο ομοπολυμερή και διαφέρει μόνο στις απαιτούμενες ποσότητες. Οι συνθήκες πολυμερισμού για τη σύνθεση του ομοπολυμερούς PnBA, επιλέχθηκαν από τα δεδομένα της βιβλιογραφίας. [106] Μία τυπική διαδικασία πολυμερισμού RAFT για τη σύνθεση ομοπολυμερούς nBA με 4.000 μοριακό βάρος περιγράφεται ως εξής: σε μια σφαιρική 25mL φιάλη με ένα μαγνητικό αναδευτήρα προσθέθηκαν, το μονομερές ακρυλικού n-βουτυλεστέρα nBA (1g), το αντιδραστήριο μεταφοράς αλυσίδας 2-(δωδεκυλθειοκαρβονυλοθειο)-2-μεθυλοπροπανικό οξύ (DDMAT) (0,045 g, 0,125 mmol), ο απαρχητής αζωδιισοβουτυρονιτρίλιο (AIBN) (0,091 g, 0,25 mmol) και ο διαλύτης 1,4-διοξάνιο (5mL). Στη συνέχεια έγινε απαέρωση του διαλύματος με συνεχή ροή αερίου αζώτου, διαδικασία που διήρκησε για 15 λεπτά. Μετά το τέλος της απαέρωσης η σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο στη θερμοκρασία των 70 °C. Ο πολυμερισμός διήρκησε 6 ώρες, το τελικό διάλυμα ψύχθηκε στους -20 °C και εκτέθηκε στην ατμόσφαιρα. Ακολούθησε, καταβύθιση του ομοπολυμερούς σε δεκαπλάσια περίσσεια μεθανόλης, ώστε να απομακρυνθεί το μονομερές που δεν είχε αντιδράσει. Τελικά, το προϊόν ομοπολυμερούς ξηράνθηκε σε κλίβανο κενού για 48 ώρες (απόδοση: 90%) με την πρόθεση να χρησιμοποιηθεί ως μακρο-CTA για την έναρξη πολυμερισμού των μονομερών DMAEA και OEGA αντίστοιχα. Η χημική δομή του μονομερούς nBA, του απαρχητή AIBN και του αντιδραστηρίου μεταφοράς αλυσίδας CTA απεικονίζονται στην Εικόνα 3.1.

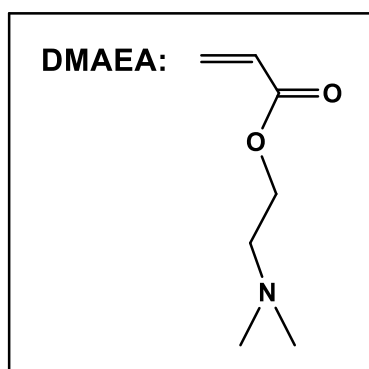


Εικόνα 3.1: Χημική δομή του AIBN απαρχητή, του αντιδραστηρίου μεταφοράς αλυσίδας CTA και του μονομερούς nBA.

3.3.2 Σύνθεση PnBA-b-PDMAEA Συμπολυμερών

Συντέθηκαν τα δισυσταδικά PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερή με διαφορετική αναλογία σε PnBA, το οποίο αποτελεί την υδρόφοβη συστάδα του αμφίφιλου συμπολυμερούς. Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση των συμπολυμερών περιλαμβάνει την τεχνική πολυμερισμού RAFT και περιγράφεται παρακάτω.

Αρχικά, έγινε καθαρισμός του μονομερούς από του παρεμποδιστές του οποίους περιείχε (μονομεθυλαιθέρας της υδροκινόνης) με τη χρήση της κατάλληλης ρητίνης υπό έντονη ανάδευση για περίπου δεκαπέντε λεπτά. Έπειτα σε σφαιρική φιάλη προστέθηκαν κατάλληλες ποσότητες από PnBA (ως αντιδραστήριο μεταφοράς αλυσίδας), AIBN (ως απαρχητής), PDMAEA (ως μονομερές) και 1,4 διοξάνιο (ως διαλύτης πολυμερισμού). Η χημική δομή του μονομερούς απεικονίζεται στην Εικόνα 3.2. Η αναλογία CTA / απαρχητή (σε mol) που χρησιμοποιήθηκε ήταν PnBA / AIBN = 5. Στη συνέχεια, έγινε απαέρωση του διαλύματος με τη χρήση αερίου αζώτου για περίπου 15 λεπτά. Μετά το τέλος της απαέρωσης η σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο στη θερμοκρασία των 70°C. Η αντίδραση του πολυμερισμού είχε διάρκεια 7 ωρών. Μετά το πέρας των 7 ωρών, έγινε καταβύθιση του προϊόντος της αντίδρασης σε δεκαπλάσια περίσσεια n-εξανίου και παρατηρήθηκε ότι το πολυμερές δεν καταβυθιζόταν όσο αυξανόταν το ποσοστό της υδρόφοβης συστάδας του PnBA. Έτσι, έγινε εξάτμιση του μίγματος κανονικού εξανίου-1,4 διοξανίου με τη χρήση του περιστροφικού εξατμιστήρα. Έπειτα έγινε συλλογή του πολυμερούς και τοποθέτησή του στον φούρνο κενού για 48 ώρες.

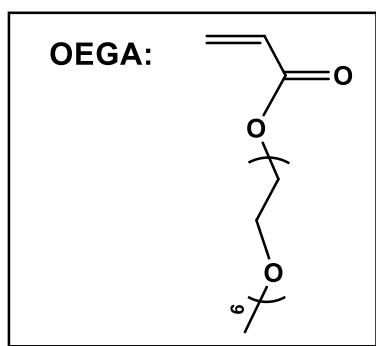


Εικόνα 3.2: Χημική δομή του DMAEA μονομερούς.

3.3.3 Σύνθεση PnBA-b-POEGA συμπολυμερών

Τα αμφίφιλα PnBA-b-POEGA συμπολυμερή με διαφορετική αναλογία σε PnBA, το οποίο αποτελεί την υδρόφοβη συστάδα του αμφίφιλου συμπολυμερούς, συντέθηκαν με τη χρήση της τεχνικής του πολυμερισμού RAFT.

Αρχικά, έγινε καθαρισμός του μονομερούς από τους παρεμποδιστές τους οποίους περιείχε με τη χρήση της κατάλληλης ρητίνης υπό έντονη ανάδευση για περίπου δεκαπέντε λεπτά. Έπειτα σε σφαιρική φιάλη προστέθηκαν κατάλληλες ποσότητες από PnBA (ως αντιδραστήριο μεταφοράς αλυσίδας), AIBN (ως απαρχητής), POEGA (ως μονομερές) και 1,4 διοξάνιο (ως διαλύτης πολυμερισμού). Η χημική δομή του μονομερούς απεικονίζεται στην Εικόνα 3.3. Η αναλογία CTA / απαρχητή (σε mol) που χρησιμοποιήθηκε είναι PnBA / AIBN = 5. Στη συνέχεια, έγινε απαέρωση του διαλύματος με τη χρήση αερίου αζώτου για περίπου 15 λεπτά. Μετά το τέλος της απαέρωσης η σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο στη θερμοκρασία των 70°C. Η αντίδραση του πολυμερισμού είχε διάρκεια 24 ωρών. Μετά το πέρας των 24 ωρών, έγινε καταβύθιση του προϊόντος της αντίδρασης σε δεκαπλάσια περίσσεια κανονικού εξανίου και τοποθέτηση του στον φούρνο κενού για 48 ώρες.



Εικόνα 3.3: Χημική δομή μονομερούς POEGA.

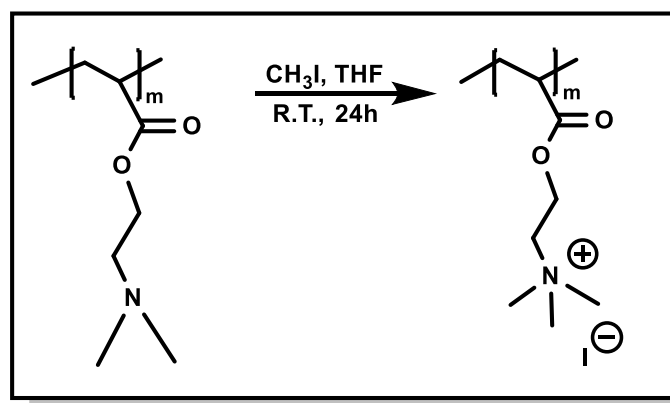
3.4 Σύνθεση χημικά τροποποιημένων συμπολυμερών

Στα συντιθέμενα PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερή με διαφορετική αναλογία της συστάδας του PnBA, πραγματοποιήθηκε μετατροπή της τριτοταγούς αμίνης της συστάδας του PDMAEA σε τεταρτοταγή με τη χρήση διαφόρων αντιδραστηρίων. Η αντίδραση μετατροπής της αμίνης βιβλιογραφικά αναφέρεται με τον όρο quaternization. [107] Σκοπός είναι η δημιουργία πολυηλεκτρολυτών, όπου με τη φορτισμένη θετικά αμινομάδα τροποποιούνται και οι ιδιότητες των συμπολυμερών.

3.4.1 Σύνθεση PnBA-b-Q₁PDMAEA συμπολυμερών με αντιδραστήριο CH₃I

Στα PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερή, ο ασθενής κατιοντικός πολυηλεκτρολύτης PDMAEA υπέστη μετατροπή της τριτοταγούς αμινομάδας του σε τεταρτοταγή, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4 μέσω αντιδράσεων χημικής τροποποίησης, καθιστώντας έτσι τη συστάδα του PDMAEA σε ισχυρό κατιοντικό πολυηλεκτρολύτη Q₁PDMAEA με τη χρήση του αντιδραστηρίου CH₃I.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε προκειμένου να μετατραπεί η τριτοταγής αμινομάδα σε τεταρτοταγή είναι παρόμοια με αυτή που αναφέρεται στη βιβλιογραφία. [108] Η αντίδραση που έλαβε χώρα για την τεταρτοταγοποίηση της αμινομάδας του PDMAEA πραγματοποιήθηκε σε μια σφαιρική φιάλη, όπου περιείχε αραιό διάλυμα (2% w/v) του πολυμερούς σε τετραϋδροφουράνιο (THF) και υπό μέτρια ανάδευση προστέθηκε σε περίσσεια το CH₃I (moles αμίνης/ moles CH₃I = 1/2). Η αντίδραση διήρκησε 24 ώρες υπό συνεχή ανάδευση και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά το πέρας των 24 ωρών ο διαλύτης απομακρύνθηκε με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα συλλέχθηκε σε ξηρή σχεδόν μορφή και τοποθετήθηκε στο φούρνο κενού για ξήρανση.



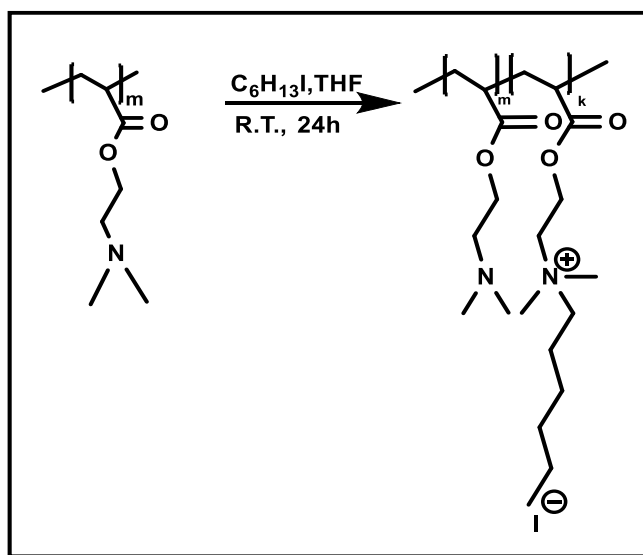
Εικόνα 3.4: Αντίδραση τεταρτοταγοποίησης (Quaternization) τριτοταγούς αμίνης PDMAEA με CH₃I.

3.4.2 Σύνθεση PnBA-b-Q₆PDMAEA συμπολυμερών με αντιδραστήριο C₆H₁₃I

Τα PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερή μετατράπηκαν εξίσου σε ισχυρούς κατιοντικούς πολυηλεκτρολύτες χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο C₆H₁₃I

μέσω των αντιδράσεων χημικής τροποποίησης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.5, καθιστώντας τα συστήματα αυτά περισσότερο υδρόφοβα.

Η αντίδραση τεταρτοταγοποίησης βασίστηκε στην υπάρχουσα βιβλιογραφία [109] και έλαβε χώρα για το 25% των αμινομάδων του PDMAEA. Πραγματοποιήθηκε σε μια σφαιρική φιάλη, όπου περιείχε αραιό διάλυμα (2% w/v) του πολυμερούς σε τετραϋδροφουράνιο (THF) και υπό μέτρια ανάδευση προστέθηκε το C₆H₁₃I αντιδραστήριο (moles αμίνης/ moles C₆H₁₃I = 4). Η αντίδραση διήρκησε 24 ώρες υπό συνεχή ανάδευση και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά το πέρας των 24 ωρών ο διαλύτης απομακρύνθηκε με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα συλλέχθηκε σε ξηρή σχεδόν μορφή και τοποθετήθηκε στο φούρνο κενού για ξήρανση.



Εικόνα 3.5: Αντίδραση τεταρτοταγοποίησης (Quaternization) για το 25% τριτοταγούς αμίνης PDMAEA με C₆H₁₃I.

3.5 Μέθοδοι παρασκευής και αυτο-οργάνωση μικκυλιακών δομών

Τα αμφίφιλα συμπολυμερή που παρουσιάστηκαν παραπάνω μελετήθηκαν τόσο σε μοριακό επίπεδο όσο και βάσει της ικανότητάς τους να αυτο-οργανώνονται σε υδατικά διαλύματα σχηματίζοντας νανο-συσσωματώματα. Επιπρόσθετα, διερευνήθηκε η επίδραση των φυσικοχημικών παραμέτρων στη μορφολογία των νανοδομών. Τα PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερή εμφανίζουν διαφορετική συμπεριφορά όταν διαλύονται σε υδατικά μέσα σε σχέση με τα PnBA-b-Q₁PDMAEA και τα PnBA-b-Q₆PDMAEA, λόγω των μόνιμα θετικά φορτισμένων τεταρτοταγών αμινομάδων και για το λόγο αυτό μελετώνται και οι

τρεις κατηγορίες συμπολυμερών. Παρακάτω θα αναφερθούν τα διαφορετικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν ανάλογα με τις ιδιότητες του κάθε συμπολυμερούς.

3.5.1 Αυτο-οργάνωση των PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών σε υδατικά διαλύματα

Το συμπολυμερές PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ διαλυτοποιήθηκε κατευθείαν σε νερό χωρίς τη χρήση οργανικού διαλύτη. Για τις μετρήσεις DLS χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά πρωτόκολλα παρασκευής των διαλυμάτων με διαφορετικά pH που αναφέρονται ως εξής:

1^ο Πρωτόκολλο: Απευθείας διάλυση του στερεού πολυμερούς στον εκλεκτικό διαλύτη H₂O με pH = 3, 7 και 10. Το υδατικό διάλυμα με pH = 3 προετοιμάστηκε χρησιμοποιώντας HCL 0,1M και το διάλυμα με pH = 10 προσθέτωντας NaOH 0,1M αντίστοιχα.

2^ο Πρωτόκολλο: Απευθείας διάλυση του στερεού πολυμερούς στον εκλεκτικό διαλύτη H₂O με pH = 7 από το οποίο προετοιμάστηκαν τα διαλύματα με pH = 3 με την προσθήκη HCL 0,1M και με pH = 10 με την προσθήκη NaOH 0,1M αντίστοιχα.

3^ο Πρωτόκολλο: Απευθείας διάλυση του στερεού πολυμερούς στον εκλεκτικό διαλύτη H₂O με pH = 3 από το οποίο προετοιμάστηκαν τα διαλύματα με pH = 7 και pH = 10 με την προσθήκη NaOH 0,1M αντίστοιχα.

Έπειτα τα δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία όλη τη νύχτα προκειμένου να επέλθει δυναμική ισορροπία. Τα διαλύματα του PnBA₂₇-b-PDMAEA₇₃ συμπολυμερούς για τις μετρήσεις DLS παρασκευάστηκαν σύμφωνα με το τρίτο πρωτόκολλο.

3.5.2 Αυτο-οργάνωση των PnBA-b-POEGA συμπολυμερών σε υδατικά διαλύματα

Τα συμπολυμερή PnBA και POEGA διαλυτοποιήθηκαν κατευθείαν σε νερό χωρίς τη χρήση οργανικού διαλύτη. Το πρωτόκολλο παρασκευής τους είναι κοινό με το προαναφερθέν σύστημα δισυσταδικού συμπολυμερούς. Τα δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία όλη τη νύχτα προκειμένου να επέλθει δυναμική

ισορροπία και ύστερα μελετήθηκε η επίδραση του συστήματος στη θερμοκρασία.

3.5.3 Αυτο-οργάνωση των PnBA-b-Q₁PDMAEA και PnBA-b-Q₆PDMAEA συμπολυμερών σε υδατικά διαλύματα

Τα ισχυρά κατιοντικά συμπολυμερή με τροποποιημένη την αμινομάδα της πρώτης συστάδας από τριτοταγή σε τεταρτοταγή αυτο-οργανώνονται σε μικκύλια με την απευθείας διάλυση στερεού πολυμερούς σε υδατικό μέσο. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες επίδρασης της ιοντικής ισχύος και παρατηρήθηκαν μεγαλύτερα μεγέθους μικκύλια στην περίπτωση του PnBA-b-Q₆PDMAEA συμπολυμερούς με το C₆H₁₃I αντιδραστήριο, το οποίο προσέδωσε αυξημένο υδρόφοβο χαρακτήρα στο σύστημα.

3.6 Μελέτη της επίδρασης φυσικοχημικών παραμέτρων στα διαλύματα των συμπολυμερών

Τα υδατικά διαλύματα των συμπολυμερών μετά την αυτο-οργάνωσή τους σε μικκυλιακές δομές μελετήθηκαν ως προς την εξάρτηση των μικκυλιακών χαρακτηριστικών τους από μια σειρά φυσικοχημικών παραμέτρων του διαλύματος. Τα συμπολυμερή PnBA-b-PDMAEA και τα παράγωγα τους με διαφορετική αναλογία της συστάδας του PnBA (PnBA-b-Q₁PDMAEA και PnBA-b-Q₆PDMAEA) αναμένονται, λόγω της χημικής δομής τους και την υπάρχουσα βιβλιογραφία σε ανάλογα συστήματα συμπολυμερών, να είναι αποκρίσιμα σε μεταβολές του pH και της ιοντικής ισχύος. [110-113] Επίσης, μελετήθηκε και η επίδραση της θερμοκρασίας στα PnBA-b-Q₆PDMAEA συμπολυμερή. Στα επόμενα υποκεφάλαια αναλύονται οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν για τη μελέτη της επίδρασης των παραμέτρων αυτών ως προς την συμπεριφορά των μικκυλίων.

3.6.1 Μεταβολή του pH των διαλυμάτων των συμπολυμερών

Η επίδραση της μεταβολής του pH στις ιδιότητες των νανοσωματιδίων που σχηματίζονται ως συνέπεια της αυτο-οργάνωσης του δισυσταδικού συμπολυμερούς PnBA-b-PDMAEA με διαφορετικές αναλογίες της συστάδας του PnBA σε υδατικά διαλύματα εξετάστηκε με τις τεχνικές DLS, SLS και FS.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Cryo-TEM για την ανίχνευση δομικών και μορφολογικών αλλαγών που επιφέρει η μεταβολή του pH.

Αρχικά, παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 5.0×10^{-4} g/mL σύμφωνα με τα τρία προαναφερθέντα πρωτόκολλα και μελετήθηκαν με DLS και SLS. Όλα τα δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία για 15 λεπτά ώστε να επέλθει ισορροπία και έπειτα μετρήθηκαν. Οι μετρήσεις DLS και SLS πραγματοποιήθηκαν υπό γωνία 90° . Προκειμένου να διεξαχθούν οι μετρήσεις FS, παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 1.0×10^{-3} g/mL σε pH 3 και 10 και 1.0×10^{-4} σε pH = 7. Η τροποποίηση του pH από 7 σε 3 και από 7 σε 10 έγινε με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω μαζί με τα προαναφερθέντα πρωτόκολλα παρασκευής. Στην περίπτωση της FS τεχνικής, η ρύθμιση του pH έγινε πριν την διεξαγωγή των μετρήσεων ώστε να καταστεί δυνατή η προσθήκη πυρενίου (σε αναλογία 1 μ L / 1 mL) που δρά σαν ιχνηθέτης. Τα δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία για 24 ώρες και έπειτα μετρήθηκαν.

3.6.2 Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας

Με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης των μεταβολών της θερμοκρασίας στις ιδιότητες των PnBA-b-POEGA και PnBA-b-Q₆PDMAEA συμπολυμερών διεξήχθησαν μετρήσεις της DLS και SLS με γωνία μέτρησης 90° , συγκέντρωση διαλύματος της τάξης των 10^{-4} g/ml και σε pH=7. Η θερμοκρασία αυξανόταν σταδιακά από τους 25°C έως τους 55°C ανά 10°C και το διάλυμα παρέμενε σε κάθε θερμοκρασία 15 λεπτά, πριν από τη μέτρηση, προκειμένου να επιτευχθεί εξισορρόπηση. Μετά τη μέγιστη θερμοκρασία, η θερμοκρασία επαναφερόταν στους 25°C για να μελετηθεί η αντιστρεπτικότητα τους συστήματος.

3.6.3 Μελέτη της ιοντικής ισχύος

Η επίδραση της ιοντικής ισχύος των PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών και των παραγώγων τους (PnBA-b-Q₁PDMAEA και PnBA-b-Q₆PDMAEA) μελετήθηκε με σταδιακή προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων υδατικού διαλύματος NaCl 1M έτσι ώστε να επιτευχθούν 9 διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος στο μίγμα:

C_{NaCl}: 0.01M, 0.02M, 0.03M, 0.056M, 0.1M, 0.2M, 0.33M, 0.43M και 0.5M

Η κάθε προσθήκη πραγματοποιούνταν στο ίδιο διάλυμα ανά 15 λεπτά. Μετά από 15 λεπτά από τη προσθήκη, το διάλυμα μελετήθηκε με DLS και SLS στις 90°, σε αρχική συγκέντρωση διαλύματος της τάξης των 10^{-3} g/ml και σε pH=7.

3.7 Μελέτες σύμπλεξης των συμπολυμερών με μόρια DNA

Με σκοπό τη διερεύνηση χρήσης των PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀, PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉ και PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀ συμπολυμερών ως φορείς γονιδιακής θεραπείας πραγματοποιήθηκαν μελέτες σύμπλεξης των συμπολυμερών αυτών με μόρια DNA (οι δείκτες που απαρτίζουν τις συστάδες των συμπολυμερών θα αναφέρονται ως το ποσοστό σύστασης της κάθε συστάδας, υπολογισμένοι από την ¹H-NMR φασματοσκοπία).

Παρασκευάστηκαν τα αντίστοιχα στοκ διαλύματα πολυμερών και DNA σε διαλύτη NaCl 0,01M κρατώντας σταθερή τη συγκέντρωση του πολυμερούς για όλα τα δείγματα των διάφορων αναλογιών. Η συγκέντρωση του DNA μεταβάλλεται ανάλογα με την σύσταση του συμπολυμερούς και το ποσοστό του σε PDMAEA. Βάση του ποσοστού (% κ.β) του πολυμερούς υπολογίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος DNA που θα παρασκευαστεί καθώς και τα moles του πολυμερούς και του DNA. Μέσω των moles υπολογίζεται ο λόγος N/P ο οποίος ορίζεται ως ο λόγος των φορτισμένων αλυσίδων της αμίνης που είναι διαθέσιμες για πιθανή ηλεκτροστατική σύζευξη με τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεοτίδια (φωσφορικές ομάδες) του μορίου του DNA. Παρασκευάστηκαν διαλύματα πολυμερών και DNA έξι διαφορετικών N/P αναλογιών και για τα τρία συστήματα. Η ανάμιξη πραγματοποιήθηκε προσθέτοντας σε κάθε διάλυμα πολυμερούς με όγκο 1ml διαφορετικές ποσότητες DNA και το κάθε διάλυμα πολυμερούς – DNA αραιώθηκε με διαλύτη NaCl 0,01M. Όλα τα διαλύματα είχαν τελικό όγκο 10ml. Τα διαλύματα αφέθηκαν σε ηρεμία για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ώστε η συναρμογή του DNA με την ομάδα της αμίνης του PDMAEA να είναι σε ισορροπία.

Οι ιδιότητες των συμπλόκων που παρασκευάστηκαν, μελετήθηκαν με ευρεία γκάμα τεχνικών όπως: DLS, SLS, ELS, UV-Vis, FS. Οι μελέτες απόσβεσης φθορισμού FS του βρωμιούχου αιθιδίου εφαρμόστηκαν προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα των ομάδων της αμίνης να σχηματίζει

σύμπλοκα με μόρια DNA, εξετάστηκε ο φθορισμός του βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide, EtBr) σε διάφορες N/P αναλογίες. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε $\lambda_{excitation} = 535 \text{ nm}$ και η εκπομπή παρατηρήθηκε σε $\lambda_{emission} = 620 \text{ nm}$.

Τέλος, εξετάστηκε πως επιδρά η αύξηση της ιοντικής ισχύος στις ιδιότητες των συμπλόκων της αμίνης με μόρια DNA. Η αρχική συγκέντρωση άλατος στα σύμπλοκα είναι NaCl 0,01M. Με σταδιακή προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων υδατικού διαλύματος NaCl 1M, επιτεύχθηκαν οι προαναφερθείσες διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος σε κάθε δείγμα.

3.7.1 Σύμπλεξη των PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερών με DNA

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύμπλεξη των PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερών με DNA αναφέρθηκε προηγουμένως. Σύμφωνα με την διαδικασία αυτή, παρασκευάστηκε διάλυμα πολυμερούς συγκέντρωσης $5.0 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$ σε διαλύτη NaCl 0,01M και αρχικό διάλυμα DNA $2.0 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$ στον ίδιο διαλύτη.

Οι ιδιότητες των PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπλόκων που παρασκευάστηκαν, μελετήθηκαν με τις προαναφερθείσες τεχνικές. Οι μελέτες απόσβεσης φθορισμού FS του βρωμιούχου αιθιδίου εφαρμόστηκαν προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα των ομάδων του PDMAEA να σχηματίζει σύμπλοκα με μόρια DNA, εξετάστηκε ο φθορισμός του βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide, EtBr) σε διάφορες N/P αναλογίες. Παρασκευάστηκε διάλυμα DNA συγκέντρωσης $1.0 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$, στο οποίο προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο σε αναλογία $[EB] = [P] / 4$ (κατά mol) και διάλυμα πολυμερούς συγκέντρωσης $5.0 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$. Έπειτα, το διάλυμα του DNA τιτλοδοτήθηκε με το διάλυμα του πολυμερούς ξεκινώντας από λόγο N/P ίσο με 0.25 καταλήγοντας σε N/P ίσο με 8 όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

3.7.2 Σύμπλεξη των PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉ μικκυλίων με DNA

Διερευνώντας την χρήση των κατιοντικών PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉ συμπολυμερών ως φορείς γονιδιακής θεραπείας πραγματοποιήθηκαν εξίσου μελέτες σύμπλεξης των συμπολυμερών αυτών με μόρια DNA. Σύμφωνα με την προαναφερθείσα διαδικασία σύμπλεξης που αναλύθηκε παραπάνω,

παρασκευάστηκε διάλυμα πολυμερούς συγκέντρωσης 1.0×10^{-3} g/mL σε διαλύτη NaCl 0,01M και αρχικό διάλυμα DNA 2.0×10^{-4} g/mL στον ίδιο διαλύτη.

Οι ιδιότητες των PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉ συμπλόκων που παρασκευάστηκαν, μελετήθηκαν με τις προαναφερθείσες τεχνικές. Οι μελέτες απόσβεσης φθορισμού FS του βρωμιούχου αιθιδίου εφαρμόστηκαν προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα των ομάδων του Q₁PDMAEA να σχηματίζει σύμπλοκα με μόρια DNA, εξετάστηκε ο φθορισμός του βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide, EtBr) σε διάφορες N/P αναλογίες. Παρασκευάστηκε διάλυμα DNA συγκέντρωσης 1.0×10^{-4} g/mL, στο οποίο προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο σε αναλογία $[EB] = [P] / 4$ (κατά mol) και διάλυμα πολυμερούς συγκέντρωσης 1.0×10^{-3} g/mL. Έπειτα, το διάλυμα του DNA τιτλοδοτήθηκε με το διάλυμα του πολυμερούς ξεκινώντας από λόγο N/P ίσο με 0.25 καταλήγοντας σε N/P ίσο με 8 όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

3.7.3 Σύμπλεξη των PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀ μικκυλίων με DNA

Η πιθανή χρήση των κατιοντικών PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀ συμπολυμερών ως φορείς γονιδιακής θεραπείας μελετήθηκε επίσης με σύμπλεξη των συμπολυμερών αυτών με μόρια DNA. Σύμφωνα με την προαναφερθείσα διαδικασία σύμπλεξης που αναλύθηκε παραπάνω, παρασκευάστηκε διάλυμα πολυμερούς συγκέντρωσης 1.0×10^{-3} g/mL σε διαλύτη NaCl 0,01M και αρχικό διάλυμα DNA 2.0×10^{-4} g/mL στον ίδιο διαλύτη.

Οι ιδιότητες των PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀ συμπλόκων που παρασκευάστηκαν, μελετήθηκαν με τις προαναφερθείσες τεχνικές. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η κινητική του συστήματος η οποία μελετήθηκε μέσω της επανάληψης μετρήσεων DLS στα PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀ σύμπλοκα ύστερα από 15 ημέρες. Οι μελέτες απόσβεσης φθορισμού FS του βρωμιούχου αιθιδίου εφαρμόστηκαν προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα των ομάδων του Q₆PDMAEA να σχηματίζει σύμπλοκα με μόρια DNA, εξετάστηκε ο φθορισμός του βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide, EtBr) σε διάφορες N/P αναλογίες. Παρασκευάστηκε διάλυμα DNA συγκέντρωσης 1.0×10^{-4} g/mL, στο οποίο προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο σε αναλογία $[EB] = [P] / 4$ (κατά mol) και διάλυμα πολυμερούς συγκέντρωσης 1.0×10^{-3} g/mL. Έπειτα, το διάλυμα του

DNA τιτλοδοτήθηκε με το διάλυμα του πολυμερούς ξεκινώντας από λόγο N/P ίσο με 0.25 καταλήγοντας σε N/P ίσο με 4 όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

3.8 Μελέτη επίδρασης της ιοντικής ισχύος στα σύμπλοκα με μόρια DNA

Η επίδραση της ιοντικής ισχύος στα PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀, PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉ και PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀ σύμπλοκα με DNA εξετάστηκε με τη προσθήκη NaCl 1M σε έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος στο κάθε δείγμα. Με αρχική συγκέντρωση άλατος των συμπλόκων 0,01M NaCl πραγματοποιήθηκαν οι εξής προσθήκες:

C_{NaCl}: 0.01M, 0.02M, 0.03M, 0.056M, 0.1M, 0.2M, 0.33M, 0.43M και 0.5M

Για τις μετρήσεις επίδρασης της ιοντικής ισχύος επιλέχθηκαν διαλύματα δυο διαφορετικών λόγων N/P για την κάθε σειρά συμπλόκων. Επιλέχθηκαν αυτά που εμφάνιζαν μεγαλύτερη σταθερότητα με το πέρασ του χρόνου. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις DLS στις 90°.

3.8.1 Μελέτη επίδρασης ιοντικής ισχύος στα PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ /DNA σύμπλοκα

Μελετήθηκε η επίδραση της ιοντικής ισχύος στα PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀/DNA σύμπλοκα με τις παραπάνω προσθήκες NaCl 1M μέσω της προαναφερθείσας διαδικασίας. Για τις μετρήσεις της DLS στις 90° επιλέχθηκαν οι λόγοι N/P = 1 και N/P = 0.5 ως οι πιο σταθεροί με το πέρασ του χρόνου.

3.8.2 Μελέτη επίδρασης ιοντικής ισχύος στα PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉ /DNA σύμπλοκα

Η επίδραση της ιοντικής ισχύος στα PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉/DNA σύμπλοκα μελετήθηκε εξίσου με τις παραπάνω προσθήκες NaCl 1M μέσω της προαναφερθείσας διαδικασίας. Για τις μετρήσεις της DLS στις 90° επιλέχθηκαν οι λόγοι N/P = 2 και N/P = 0.5 ως οι πιο σταθεροί με το πέρασ του χρόνου.

3.8.3 Μελέτη επίδρασης ιοντικής ισχύος στα PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀/DNA σύμπλοκα

Η αποκρισσιμότητα των PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀/DNA συμπλόκων σε ιοντική ισχύ μελετήθηκε επίσης με τις παραπάνω προσθήκες NaCl 1M μέσω της προαναφερθείσας διαδικασίας. Για τις μετρήσεις της DLS στις 90° επιλέχθηκαν οι λόγοι N/P = 0.5 και N/P = 0.25 ως οι πιο σταθεροί με το πέρασ του χρόνου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο παρόν κεφάλαιο παρατίθενται τα αποτελέσματα από τη σύνθεση, το μοριακό και φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών, των παραγώγων τους με τροποποιημένη την πρώτη συστάδα του PDMAEA (PnBA-b-Q₁PDMAEA και PnBA-b-Q₆PDMAEA) και των PnBA-b-POEGA συμπολυμερών με διαφορετική αναλογία της συστάδας του PnBA.

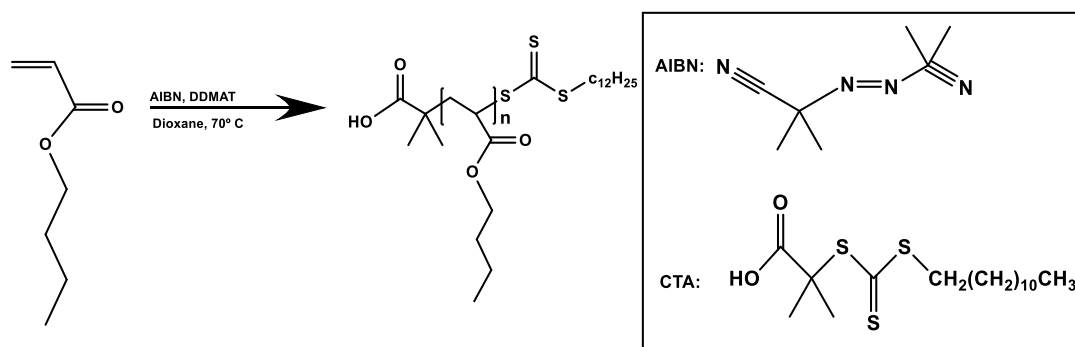
Μελετήθηκαν οι ιδιότητες των συμπολυμερών αυτών και η αυτοοργάνωσή τους σε υδατικά μέσα. Ακολούθως, προσδιορίστηκαν μια σειρά φυσικοχημικών παραμέτρων οι οποίες επηρεάζουν την ικανότητα αυτοοργάνωσης των PnBA-b-PDMAEA, PnBA-b-Q₁PDMAEA και PnBA-b-Q₆PDMAEA συμπολυμερών, προσδίδοντάς τους νέες ιδιότητες. Οι παράμετροι αφορούν την εξάρτηση των συστημάτων αυτών από τη μεταβολή του pH, της θερμοκρασίας και της ιοντικής ισχύος. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν μελέτες σύμπλεξης των συστημάτων αυτών με μόρια DNA προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα χρήσης τους ως φορείς γονιδίων. Αναλύονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων σύμπλεξης των πολυμερών με DNA καθώς και η εξάρτηση των συμπλόκων αυτών από την ιοντική ισχύ.

Οι τεχνικές ενόργανης ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν για το χαρακτηρισμό των συμπολυμερών αποτελούν αυτές της Χρωματογραφίας Αποκλεισμού Μεγεθών (SEC), Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (¹H-NMR), Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis), Φασματοσκοπία Φθορισμού (FS), Στατική, Δυναμική και Ηλεκτροφορητική Σκέδαση Φωτός (DLS, SLS, ELS) και Κρυογενικής Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διέλευσης (Cryo-TEM) για τη μελέτη της μορφολογίας του PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερούς.

4.1 Σύνθεση PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών

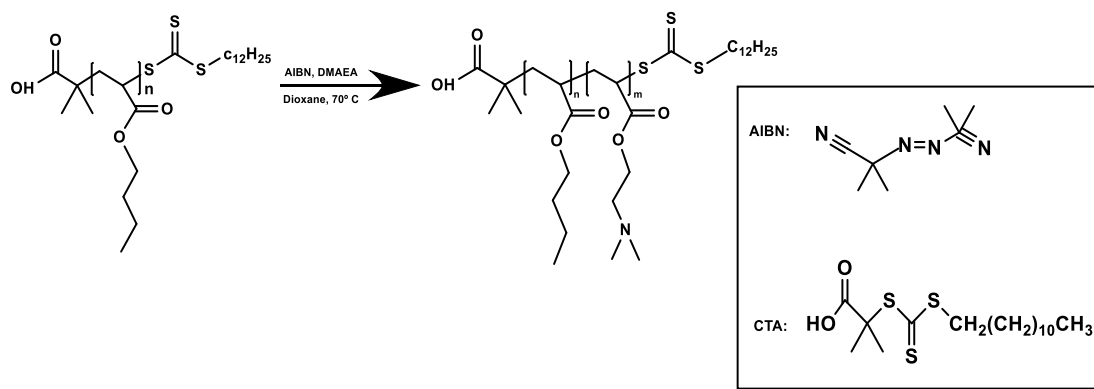
Για τη σύνθεση του αμφίφιλου δισυσταδικού PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερούς συντέθηκε πρώτα το PnBA ομοπολυμερές με την τεχνική του πολυμερισμού RAFT ώστε να χρησιμοποιηθεί ως μάκρο-CTA για να ξεκινήσει τον πολυμερισμό του PDMAEA, χρησιμοποιώντας ως απαρχητή το αζωδισισοβουτυρονιτρίλιο, ως CTA το 2-(δωδεκυλθειοκαρβονυλοθειο)-2-

μεθυλοπροπανικό οξύ και ως διαλύτη το 1,4-διοξάνιο. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 70°C για 7 ώρες, όπως περιγράφεται στην Εικόνα 4.1.



Εικόνα 4.1: Συνθετική πορεία για την παρασκευή του ομοπολυμερούς PnBA.

Συντέθηκαν δύο PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερή μέσω της τεχνικής RAFT με διαφορετικό μοριακό βάρος της συστάδας του PnBA και διαφορετική κατά βάρος αναλογία PnBA / PDMAEA (Πίνακας 4.1). Το ομοπολυμερές PnBA χρησιμοποιήθηκε ως μακρο-CTA, με AIBN ως απαρχητή και 1,4 διοξάνιο ως διαλύτη. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 70°C για 7 ώρες, όπως περιγράφεται στην Εικόνα 4.2.



Εικόνα 4.2: Συνθετική πορεία για την παρασκευή του αμφίφιλου δισυσταδικού PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερούς.

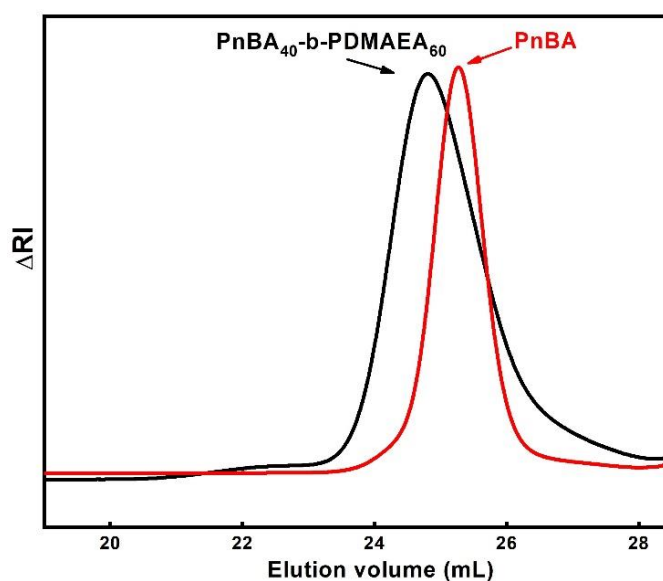
Τελικά συντέθηκαν δύο δισυσταδικά συμπολυμερή PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερή διαφορετικού μοριακού βάρους της συστάδας του PnBA. Τα διαλύματα των πολυμερών ήταν ομογενή καθ' όλη τη διάρκεια των

πολυμερισμών και τα συμπολυμερή ήταν σε στερεά μορφή με υφή που άλλαζε σε σχέση με τη σύσταση.

4.2 Μοριακός χαρακτηρισμός PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών

Τα μοριακά βάρη και οι κατανομές μοριακών βαρών των δισυσταδικών PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών με διαφορετική αναλογία της συστάδας του PnBA που συντέθηκαν προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC). Από τα χρωματογραφήματα και την ανάλυσή τους διαπιστώθηκε ο επιτυχής πολυμερισμός με χρήση της τεχνικής RAFT για τη σύνθεση των PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών καθώς και ο επιτυχής έλεγχος του μοριακού βάρους των πολυμερών που συντέθηκαν, γεγονός που επιτεύχθηκε μέσω των συνθηκών πολυμερισμού που επιλέχθηκαν. Οι κατανομές μοριακών βαρών είναι μικρές και οι τιμές τους ικανοποιητικές, εντός του εύρους που επιβάλλει το θεωρητικό υπόβαθρο και η πρακτική εφαρμογή της τεχνικής πολυμερισμού RAFT.

Στο παρακάτω Σχήμα 4.1 παρουσιάζεται ένα τυπικό συγκριτικό χρωματογράφημα SEC του ομοπολυμερούς PnBA και του PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερούς που συντέθηκε από το παραπάνω ομοπολυμερές. Τα μοριακά βάρη των πολυμερών που συντέθηκαν καθώς και οι κατανομές μοριακών βαρών βρίσκονται στο Πίνακα 4.1 για τα ομοπολυμερή PnBA και στο συγκεντρωτικό Πίνακα 4.2 για τα συμπολυμερή PnBA-b-PDMAEA.



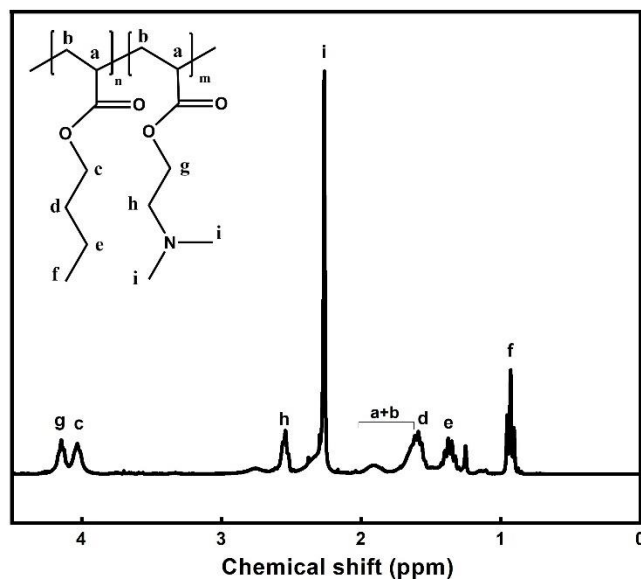
Σχήμα 4.1: Συγκριτικό χρωματογράφημα SEC του PnBA ομοπολυμερούς και του PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερούς.

Πίνακας 4.1: Μοριακά χαρακτηριστικά ομοπολυμερών PnBA μέσω SEC.

Δείγμα ομοπολυμερούς	M_w (x10³ g/mol) (SEC)	M_w / M_n (SEC)	Percent yield %
PnBA	4.1	1,10	90
PnBA	7.8	1,27	85

Η ταυτοποίηση της χημικής δομής και ο προσδιορισμός της σύστασης των PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία ¹H-NMR. Ένα τυπικό φάσμα ¹H-NMR για το δισυσταδικό PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερές δίνεται στο Σχήμα 4.2 μαζί με την αποτίμηση των κορυφών του φάσματος σε σχέση με τις δομικές μονάδες των συμπολυμερών.

Στο παραπάνω ενδεικτικό φάσμα του Σχήματος 4.2 PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερούς παρατηρούνται διαφορές ως προς το πλάτος και την ένταση το κορυφών, γεγονός που οφείλεται στη διαφορετική σύσταση των μονομερικών μονάδων που αποτελούν το συμπολυμερές. Οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές της κάθε συστάδας χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό τον υπολογισμό της σύστασης. Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκαν τα -CH₃ υδρογόνα του μεθυλίου (f κορυφή σχήματος) που αντιστοιχούν στη συστάδα του PnBA και εμφανίζονται στα 0,9 ppm [106] και τα -CH₃ υδρογόνα των δύο μεθυλίων (i κορυφή σχήματος) που αντιστοιχούν στη συστάδα του PDMAEA και εμφανίζονται στα 2,26 ppm. [56] Στη συνέχεια, για την εύρεση της σύστασης της κάθε συστάδας διαιρέθηκε το εμβαδόν της κάθε κορυφής με τον αριθμό των υδρογόνων που αντιστοιχούν σε αυτή και ο αριθμός που προέκυψε πολλαπλασιάστηκε με το μοριακό βάρος της αντίστοιχης μονομερικής μονάδας. Έτσι, η κατά βάρος σύσταση κάθε συστάδας προέκυψε διαιρώντας τον παραπάνω αριθμό με το άθροισμα αυτών και για τις δύο κορυφές. Οι πειραματικές τιμές για τα πολυμερή που συντέθηκαν βρίσκονται καταγεγραμμένες στο συγκεντρωτικό Πίνακα 4.3. και συμφωνούν με τις στοιχειομετρικά υπολογιζόμενες, γεγονός που αποδεικνύει τον έλεγχο στην διαδικασία πολυμερισμού για τα συγκεκριμένα συστήματα μονομερών.



Σχήμα 4.2: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του συμπολυμερούς $\text{PnBA}_{40}\text{-b-PDMAEA}_{60}$ σε CDCl_3 .

Πίνακας 4.2: Μοριακά χαρακτηριστικά PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών μέσω SEC.

Συμπολυμερές	M_w (g/mol) (SEC)	M_w PnBA (g/mol)	M_w / M_n (SEC)	Σύσταση %wt PnBA ($^1\text{H-NMR}$)	Σύσταση %wt PDMAEA ($^1\text{H-NMR}$)	Percent yield %
$\text{PnBA}_{40}\text{-b-PDMAEA}_{60}$	9.800	4.000	1,33	40	60	55
$\text{PnBA}_{73}\text{-b-PDMAEA}_{27}$	11.600	7.800	1,42	73	27	70

4.3 Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών

Τα υδατικά διαλύματα των PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών παρασκευάστηκαν με απευθείας διάλυσή τους σε απεσταγμένο νερό χωρίς τη χρήση οργανικού διαλύτη, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στα καινοτόμα αυτά συμπολυμερή που παρασκευάστηκαν μελετήθηκε σε υδατικά διαλύματα (σε $\text{pH}=3, 7$ και 10) η ικανότητά τους να αυτο-οργανώνονται σε νανοδομές αποκρινόμενα σε αλλαγές του pH , της ιοντικής ισχύος και της θερμοκρασίας. Τα πρωτόκολλα παρασκευής των υδατικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρθηκαν αναλυτικά στο Κεφάλαιο 3 (Υποκεφάλαιο 3.5.1) όσον αφορά τις μετρήσεις της τεχνικής DLS. Τα διαλύματα των πολυμερών μετρήθηκαν την επόμενη από την ημέρα παρασκευής τους με σκοπό την επίτευξη ισορροπίας.

4.3.1 Επίδραση του pH

Η μελέτη επίδρασης του pH στη συμπεριφορά των διαλυμάτων των δισυσταδικών PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών πραγματοποιήθηκε μέσω των τεχνικών DLS, SLS, ELS, FS και Cryo-TEM.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το PDMAEA ομοπολυμερές αποτελεί μια ασθενή πολυβάση και συμπεριφέρεται ως αποκρινόμενος κατιοντικός πολυηλεκτρολύτης, λόγω της ισορροπίας μεταξύ πρωτονίωσης-αποπρωτονίωσης της αμινομάδας, η οποία εξαρτάται από τη μεταβολή του pH. Σε ουδέτερα pH, αποτελεί ένα υδρόφιλο ομοπολυμερές, λόγω της μερικής πρωτονίωσης των αμινομάδων, όπου τα σωματίδια που υπάρχουν στο διάλυμα είναι σε μορφή ελεύθερων αλυσίδων (unimers). Με την αύξηση του pH σε βασικές τιμές (9 και άνω) συμβαίνει πλήρης αποπρωτονίωση των αμινομάδων με αποτέλεσμα τη μείωση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και το σχηματισμό συσσωματωμάτων. Η μείωση του pH σε όξινες τιμές έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη πρωτονίωση των αμινομάδων του PDMAEA, με τις ηλεκροστατικές αλληλεπιδράσεις και την υδροφιλικότητα να αυξάνονται. Συνεπώς, σε όξινα pH το PDMAEA είναι περισσότερο διαλυτό από ότι σε βασικές τιμές pH και άρα αναμένονται σωματίδια μικρότερης μάζας. [56, 114-116]

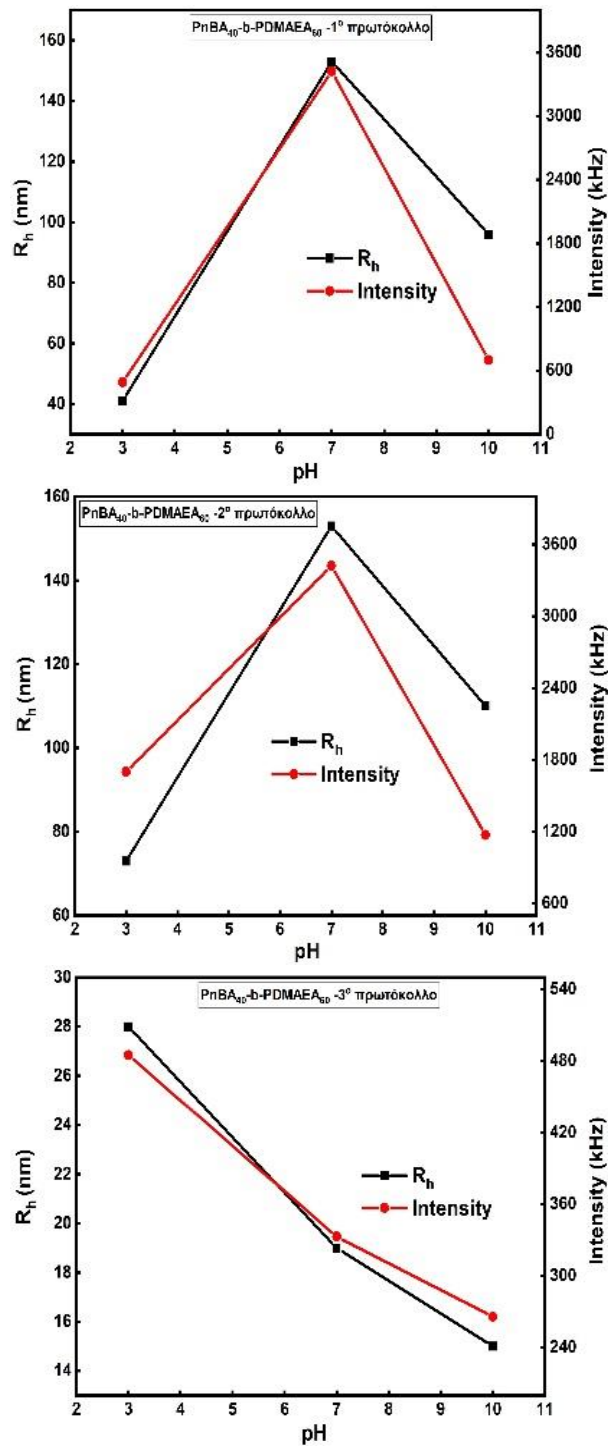
Σε συμπολυμερή που περιέχουν ως συστάδα το PDMAEA, αναμένεται εξίσου εξάρτηση των ιδιοτήτων των συσσωματωμάτων που σχηματίζει το συμπολυμερές σε υδατικά μέσα, ανάλογα με τη μεταβολή του pH. Ειδικότερα, πιστεύεται να κυριαρχεί η ίδια τάση στη συμπεριφορά ανάλογα με την πρωτονίωση-αποπρωτονίωση των αμινομάδων.[49, 110, 111] Παράλληλα, στην περίπτωση των συμπολυμερών η εξάρτηση από το pH επηρεάζεται και από άλλες παραμέτρους, όπως το μοριακό βάρος του συμπολυμερούς (και στην περίπτωση του ομοπολυμερούς υπάρχει εξάρτηση στη μεταβολή του pH από το μοριακό βάρος), τη συγκέντρωση του στο υδατικό διάλυμα (και στην περίπτωση του ομοπολυμερούς υπάρχει εξάρτηση στη μεταβολή του pH από το μοριακό βάρος), τη χημική του σύσταση, την αρχιτεκτονική του πολυμερούς και τις υδρόφοβες συστάδες εάν υπάρχουν. [117]

Παρακάτω μελετάται η επίδραση της μεταβολής του pH στη συμπεριφορά των συμπολυμερών PnBA-b-PDMAEA, τα οποία αυτο-

οργανώνονται σε υδατικά διαλύματα. Η επίδραση του pH εξετάστηκε μέσω της DLS στις 90°, σε συγκέντρωση της τάξης των 5×10^{-4} g/ml, στην θερμοκρασία των 25°C για τρεις διαφορετικές τιμές pH ~ 3, 7 και 10 στα διαφορετικά πρωτόκολλα.

Στο Σχήμα 4.3 παρατίθεται η μεταβολή του pH συναρτήσει της υδροδυναμικής ακτίνας και της έντασης σκεδάσεως για το διάλυμα του συμπολυμερούς PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀. Από το διάγραμμα παρατηρείται ότι με τη μεταβολή του pH υπάρχει και μεταβολή στην ένταση και στην ακτίνα. Σύμφωνα με το πρώτο και δεύτερο πρωτόκολλο παρασκευής φαίνεται ότι υπάρχει αύξηση της ακτίνας και της έντασης από pH 3 σε 7 και μετέπειτα μείωση των δύο παραμέτρων από 7 σε 10. Στο τρίτο πρωτόκολλο παρατηρείται σταδιακή μείωση της ακτίνας και της έντασης από pH 3 σε 7 και 10.

Είναι διακριτή η επίδραση του pH στα συστήματα αυτά λόγω των ιδιοτήτων της συστάδας του PDMAEA που αναλύθηκαν παραπάνω. Παρατηρείται η ίδια συμπεριφορά στα διαλύματα των PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερών μεταξύ του πρώτου και δεύτερου πρωτοκόλλου καθώς από pH 7 σε pH 3 και 10, η ακτίνα και η ένταση μειώνονταν απότομα. Συγκεκριμένα οι διαστάσεις μειώθηκαν έως και 120 nm σε όξινο (πιο διαλυτό) pH περιβάλλον. Το τρίτο πρωτόκολλο φανέρωσε σταδιακή μείωση της ακτίνας της τάξης των 13 νανομέτρων και της έντασης από pH 3 σε 7 και 10.

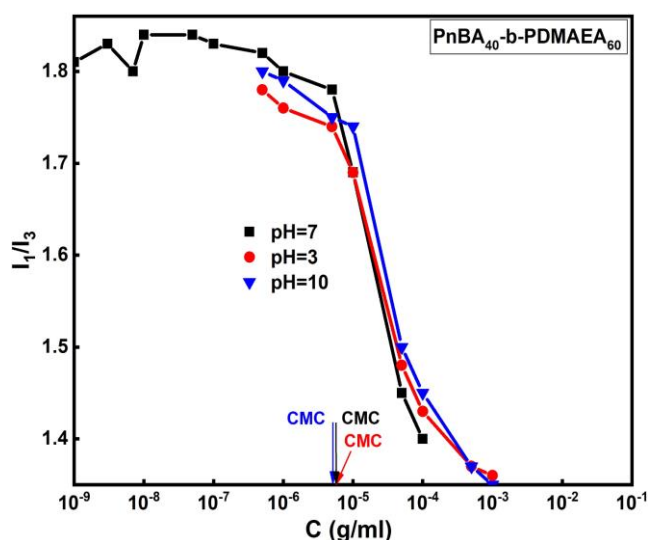


Σχήμα 4.3: Μετρήσεις R_h και έντασης I συναρτήσει μεταβολής pH για το συμπολυμερές $PnBA_{40}$ - b - $PDMAEA_{60}$ στα τρία διαφορετικά πρωτόκολλα παρασκευής των διαλυμάτων τους.

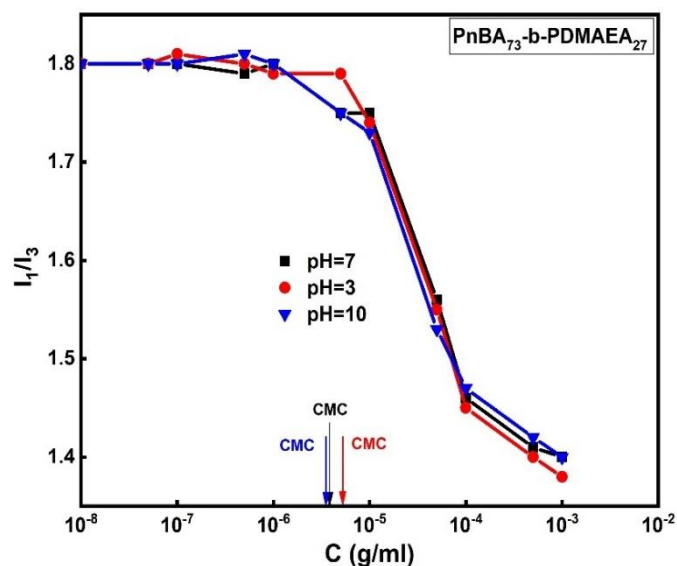
Τα υδατικά διαλύματα των $PnBA$ - b - $PDMAEA$ συμπολυμερών με $pH=3$, 7 και 10 διερευνήθηκαν μέσω της FS προκειμένου να προσδιοριστεί η κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση (CMC) σε κάθε διάλυμα διαφορετικού pH . Για τον προσδιορισμό των CMC χρησιμοποιήθηκε ως ιχνηθέτης το πυρένιο, γιατί

αποτελεί υδρόφοβη ένωση με μικρή διαλυτότητα στο νερό, που μπορεί όμως να αυξηθεί σημαντικά σε λιγότερο πολικό περιβάλλον, αφού ως υδρόφοβη ουσία μπορεί να εισχωρήσει στο εσωτερικό των υδρόφοβων περιοχών των συσσωματωμάτων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η CMC ορίζεται ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο σημείο που ο λόγος των σχετικών εντάσεων της πρώτης και τρίτης κορυφής που εμφανίζονται στο φάσμα εκπομπής του πυρενίου I_1/I_3 αρχίζει να μειώνεται. [118] Ο λόγος I_1/I_3 είναι πολύ ευαίσθητος στις μεταβολές πολικότητας του διαλύτη. Αύξηση του υδρόφοβου συστατικού σημαίνει ότι μεγαλύτερο ποσοστό πυρενίου θα εγκλωβιστεί στα συσσωματώματα καθώς ανιχνεύει την ύπαρξη υδρόφοβου μικροπεριβάλλοντος και άρα αναμένεται ο λόγος I_1/I_3 να έχει τιμή 1.0-1.3 που αντιπροσωπεύει υδρόφοβο μικροπεριβάλλον. [87]

Συγκριτικά FS διαγράμματα των PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών με διαφορετική αναλογία σε PnBA και σε διαφορετικές τιμές του pH φαίνονται στα Σχήματα 4.4. και 4.5 αντίστοιχα. Προκειμένου να διεξαχθούν οι μετρήσεις FS, παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 1.0×10^{-3} g/mL σε pH 3 και 10 και 1.0×10^{-4} σε pH = 7. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων κυμαίνονταν σε εύρος 10^{-3} - 10^{-8} g /mL για όλα τα διαφορετικά pH διαλύματα των δύο συμπολυμερών εκτός του pH=7 διαλύματος του PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερούς, όπου το εύρος των συγκεντρώσεων που μετρήθηκε ήταν μεταξύ 10^{-4} - 10^{-9} mg /mL.



Σχήμα 4.4: Διάγραμμα της έντασης του λόγου των σχετικών κορυφών I_1 / I_3 του πυρενίου συναρτήσει της συγκέντρωσης για το συμπολυμερές PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀.



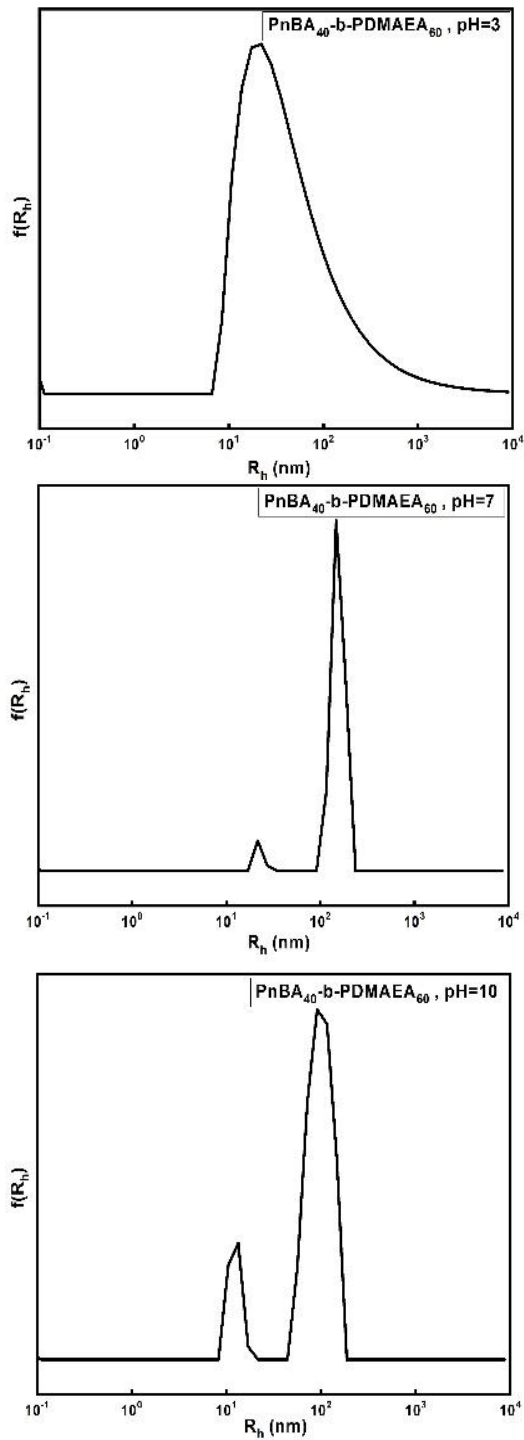
Σχήμα 4.5: Διάγραμμα της έντασης του λόγου των σχετικών κορυφών I_1 / I_3 του πυρενίου συναρτήσει της συγκέντρωσης για το συμπολυμερές PnBA₇₃-b-PDMAEA₂₇.

Παρατηρούνται εμφανώς τα πλατώ στα Σχήματα 4.4. και 4.5 σε χαμηλές συγκεντρώσεις, όπου δεν εμφανίζονται μικκύλια, οι περιοχές μετάβασης σε ενδιάμεσες συγκεντρώσεις, καθώς και τα πλατώ σε υψηλές συγκεντρώσεις. Οι CMC προσδιορίζονται από το πρώτο σημείο καμπής. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αναμένεται η μείωση της CMC με την αύξηση του ποσοστού της υδρόφοβης συστάδας. Το πιο υδρόφοβο σύστημα (με αυξημένο μοριακό βάρος της συστάδας του PnBA) που απεικονίζεται στο Σχήμα 4.5 αποτελεί ένα τέτοιο παράδειγμα. Όλες οι τιμές CMC βρίσκονται στον συγκεντρωτικό Πίνακα 4.3.

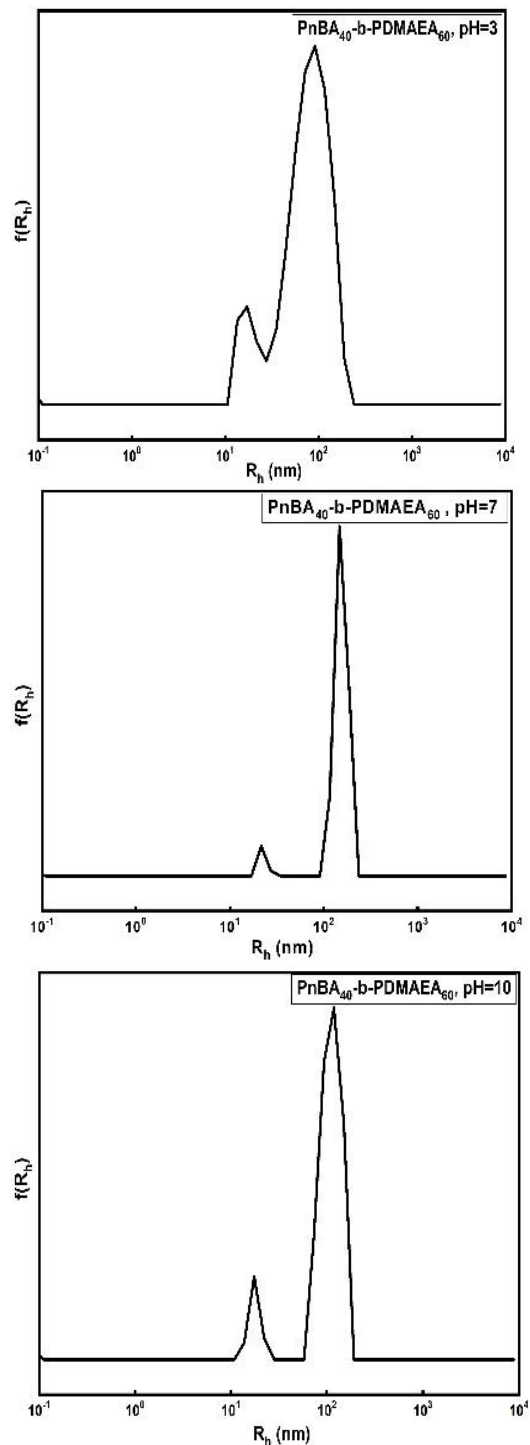
Μετρήσεις για τον προσδιορισμό της φαινόμενης υδροδυναμικής ακτίνας (R_h) και του δείκτη πολυδιασποράς (PDI) των πολυμερικών συσσωματωμάτων πραγματοποιήθηκαν μέσω της τεχνικής DLS. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές γωνίες σε pH=3, 7 και 10 σύμφωνα με τα τρία πρωτόκολλα παρασκευής που αναφέρθηκαν στο Κεφάλαιο 3 (Υποκεφάλαιο 3.5.1) και σε κατάλληλη συγκέντρωση 5×10^{-4} g/ml για το PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερές και σε 10^{-4} g/ml συγκέντρωση για το PnBA₇₃-b-PDMAEA₂₇ συμπολυμερές, έτσι ώστε η θολότητα των δειγμάτων με την αλλαγή του pH να επιτρέπει την διέλευση της δέσμης του λέιζερ. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη χρήση του αλγόριθμου CONTIN και τη μέθοδο αθροισμάτων. Στα συγκριτικά Σχήματα 4.6, 4.7, 4.8 παρατίθενται διαγράμματα κατανομής μεγεθών των PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερών (CONTIN) σε διαφορετικά pH και στα τρία πρωτόκολλα παρασκευής τους στις 90°. Στο

Σχήμα 4.9 παρουσιάζεται τυπικό συγκριτικό διαγράμμα του PnBA₇₃-b-PDMAEA₂₇ συμπολυμερούς (CONTIN) στα διαφορετικά pH σύμφωνα με το 3^ο πρωτόκολλο παρασκευής.

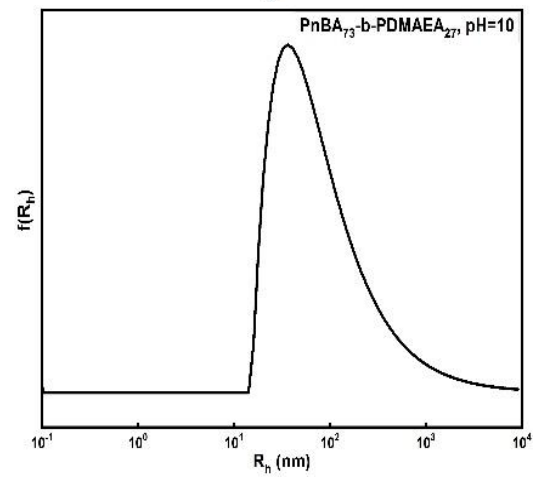
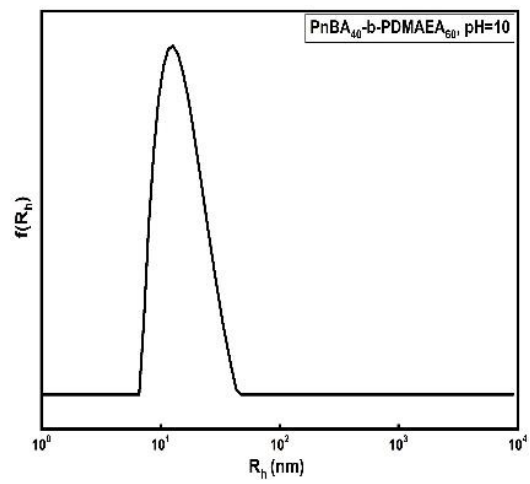
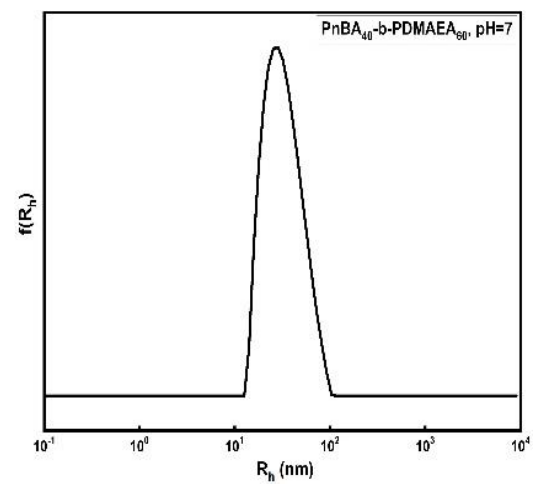
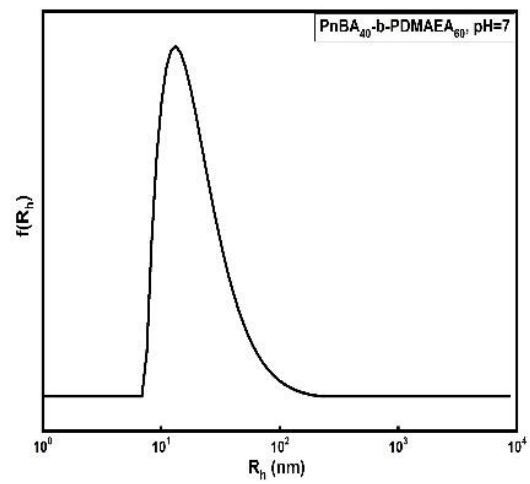
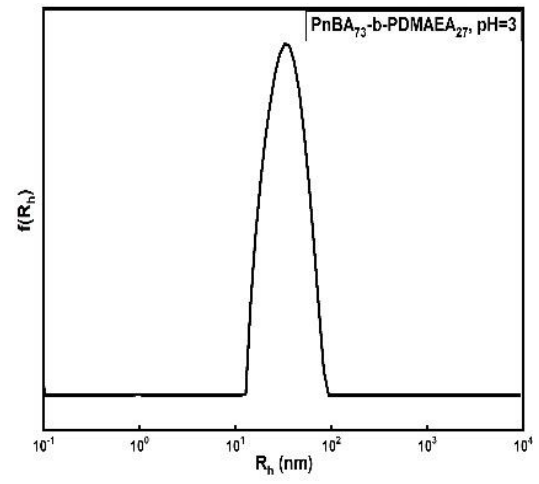
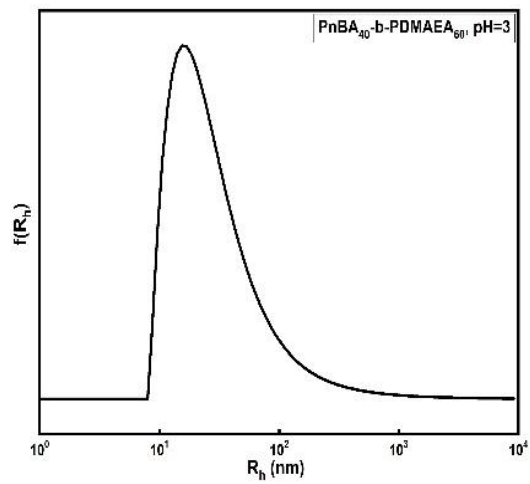
Το σύστημα επηρεάζεται ισχυρά από τα τρία πρωτόκολλα παρασκευής των διαλυμάτων όπως φαίνεται από τα Σχήματα 4.6, 4.7 και 4.8 με τα διαφορετικά pH. Στην περίπτωση του 3^{ου} πρωτοκόλλου παρατηρείται μία μόνο κορυφή με σχετικά πιο πλατιές κατανομές μεγέθους. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι όλες οι αλυσίδες συμμετέχουν στο σχηματισμό νανοδομών των συμπολυμερών και αυτό πρέπει να οφείλεται στον ισχυρά υδρόφοβο χαρακτήρα της συστάδας PnBA. Ακόμη, παρατηρήθηκε γωνιακή εξάρτηση του μεγέθους.



Σχήμα 4.6: Συγκριτικά διαγράμματα του PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερούς στα διαφορετικά pH σύμφωνα με το πρώτο πρωτόκολλο παρασκευής.



Σχήμα 4.7: Συγκριτικά διαγράμματα του PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερούς στα διαφορετικά pH σύμφωνα με το δεύτερο πρωτόκολλο παρασκευής.



Σχήμα 4.8: Συγκριτικά διαγράμματα του PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερούς στα διαφορετικά pH σύμφωνα με το τρίτο πρωτόκολλο παρασκευής.

Σχήμα 4.9: Συγκριτικά διαγράμματα του PnBA₇₃-b-PDMAEA₂₇ συμπολυμερούς στα διαφορετικά pH σύμφωνα με το τρίτο πρωτόκολλο παρασκευής.

Μέσω της τεχνικής SLS υπολογίσθηκε η γυροσκοπική ακτίνα (R_g) προκειμένου να συγκεντρώσουμε πληροφορίες για τη μορφολογία και το σχήμα των συμπολυμερών. Ο λόγος της γυροσκοπικής ακτίνας R_g προς την υδροδυναμική ακτίνα R_h (R_g/R_h), μπορεί να μας δώσει σημαντικά συμπεράσματα για τη μορφολογία των αυτό-οργανούμενων νανοσωματιδίων που έχουν σχηματιστεί. [4] Οι τιμές του λόγου R_g / R_h που λαμβάνονται για το PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερές σύμφωνα με το πρώτο πρωτοκόλλο παρασκευής των διαλυμάτων με διαφορετικά pH ανήκει στο εύρος τιμών 0.8-1.65 γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη σφαιρικής μορφολογίας με διαφορετική εσωτερική κατανομή μονομερών. Για τα PnBA₇₃-b-PDMAEA₂₇ συμπολυμερή οι τιμές του λόγου R_g / R_h που λαμβάνονται είναι γύρω στο 1 και απαντώνται συνήθως σε σφαιρικά μικκύλια (core-shell micelles) ή κυστίδια. [119] Οι τιμές των παραμέτρων που εξάγονται από τις μεθόδους DLS και SLS αναφέρονται στο συγκεντρωτικό Πίνακα 4.3.

Μέσω της ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός (ELS) προσδιορίστηκε το ζ-δυναμικό. Για το PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερές η τιμή του είναι θετική και οφείλεται στη μερική πρωτονίωση της συστάδας του PDMAEA σε pH=7. Σε pH=3, η τιμή είναι εξίσου θετική, λόγω της πρωτονίωσης του PDMAEA σε όξινα pH ενώ σε pH=10 η τιμή του είναι αρνητική, λόγω της αποπρωτονίωσης του PDMAEA σε βασικά pH. Η απόκριση των συμπολυμερών σε μεταβολές του pH θα συζητηθεί αναλυτικότερα στην επόμενη υποενότητα.

Στο Πίνακα 4.3 παρουσιάζεται εξίσου το μήκος της εκτεταμένης αλυσίδας των PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών παρέχοντας μας πληροφορίες για τις διαστάσεις των σωματιδίων. Οι μικρές τιμές του μήκους της μιας αλυσίδας σε σχέση με τις διαστάσεις που προσδιορίζονται από τη σκέδαση φωτός δηλώνουν την ύπαρξη υπερμοριακών δομών.

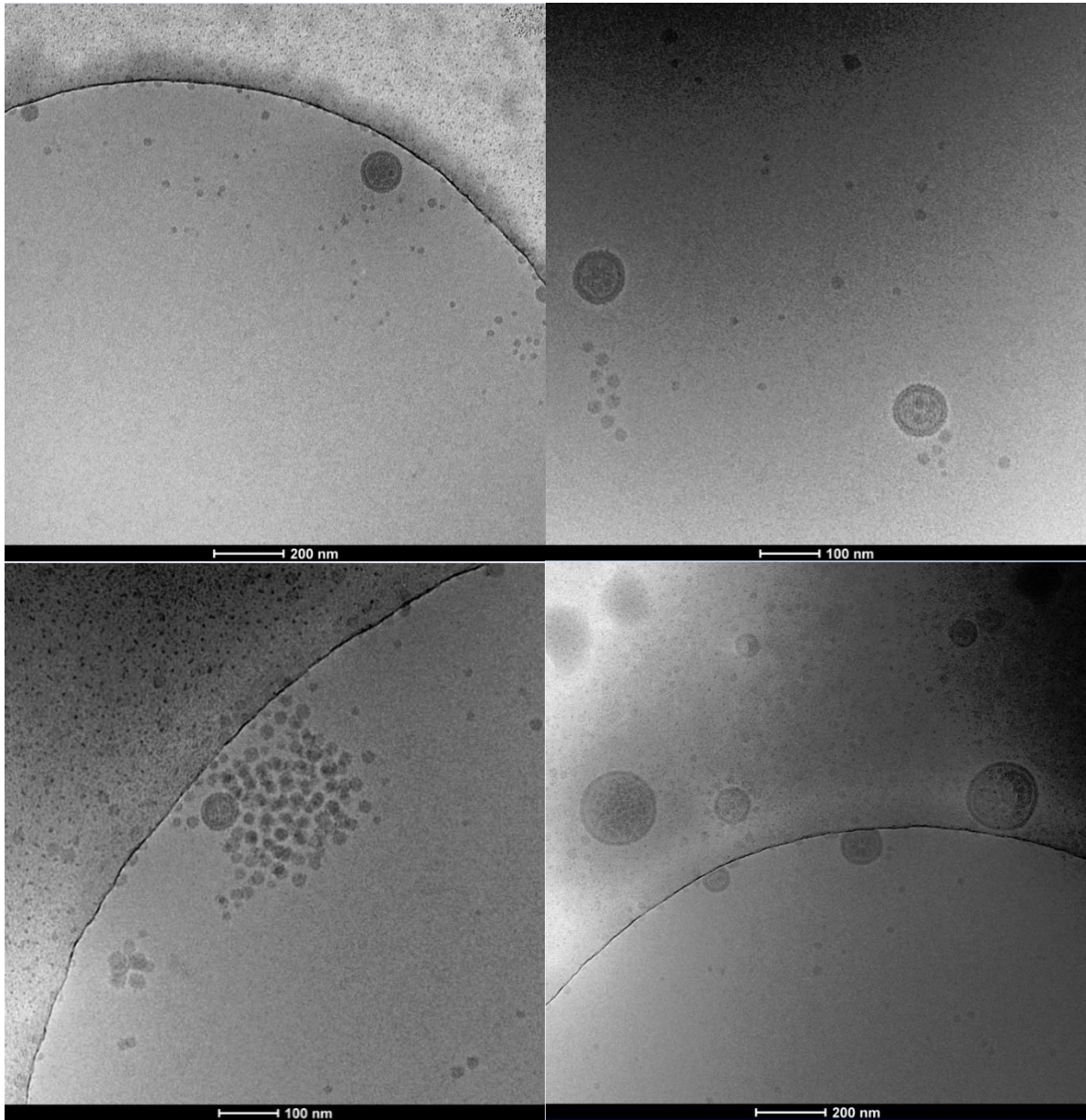
Πίνακας 4.3: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων DLS, SLS, ELS, FS για τα PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερή στα διαφορετικά pH σύμφωνα με τα τρία πρωτόκολλα παρασκευής τους.

Δείγμα	Πρωτόκολλο	pH	R _h (nm)	PDI	R _g (nm)	R _{h0} (nm)	R _g /R _{h0}	CMC (x10 ⁻⁶ g/ml)	ζ _p (mV)	L (nm)
PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀	1 ^ο	3	41	0,453	-			5,5	+45	18
		7	153	0,321	195	242	0,8	5,3	+18	
		10	96	0,484	209	127	1,65	5,1	-70	
	2 ^ο	3	73	0,357	-			5,5	+45	
		7	153	0,321	-			5,3	+18	
		10	110	0,365	-			5,1	-70	
	3 ^ο	3	28	0,4	-			5,5	+45	
		7	19	0,371	-			5,3	+18	
		10	15	0,275	-			5,1	-70	
PnBA ₇₃ -b-PDMAEA ₂₇	3 ^ο	3	33	0,246	-			5,3	+1	22
		7	32	0,233	35	34	1,03	3,7	+15	
		10	77	0,414	127	122	1,04	3,5	-42	

Για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη μορφολογία των PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερών, έγινε λήψη και ανάλυση εικόνων στα διαφορετικά pH μέσω της τεχνικής της Cryo-TEM μικροσκοπίας. Στη συνέχεια παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες χαρακτηριστικές εικόνες Cryo-TEM (Εικόνα 4.3, Εικόνα 4.4, Εικόνα 4.5). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε κατάλληλη συγκέντρωση 5 x 10⁻³ g/ml.

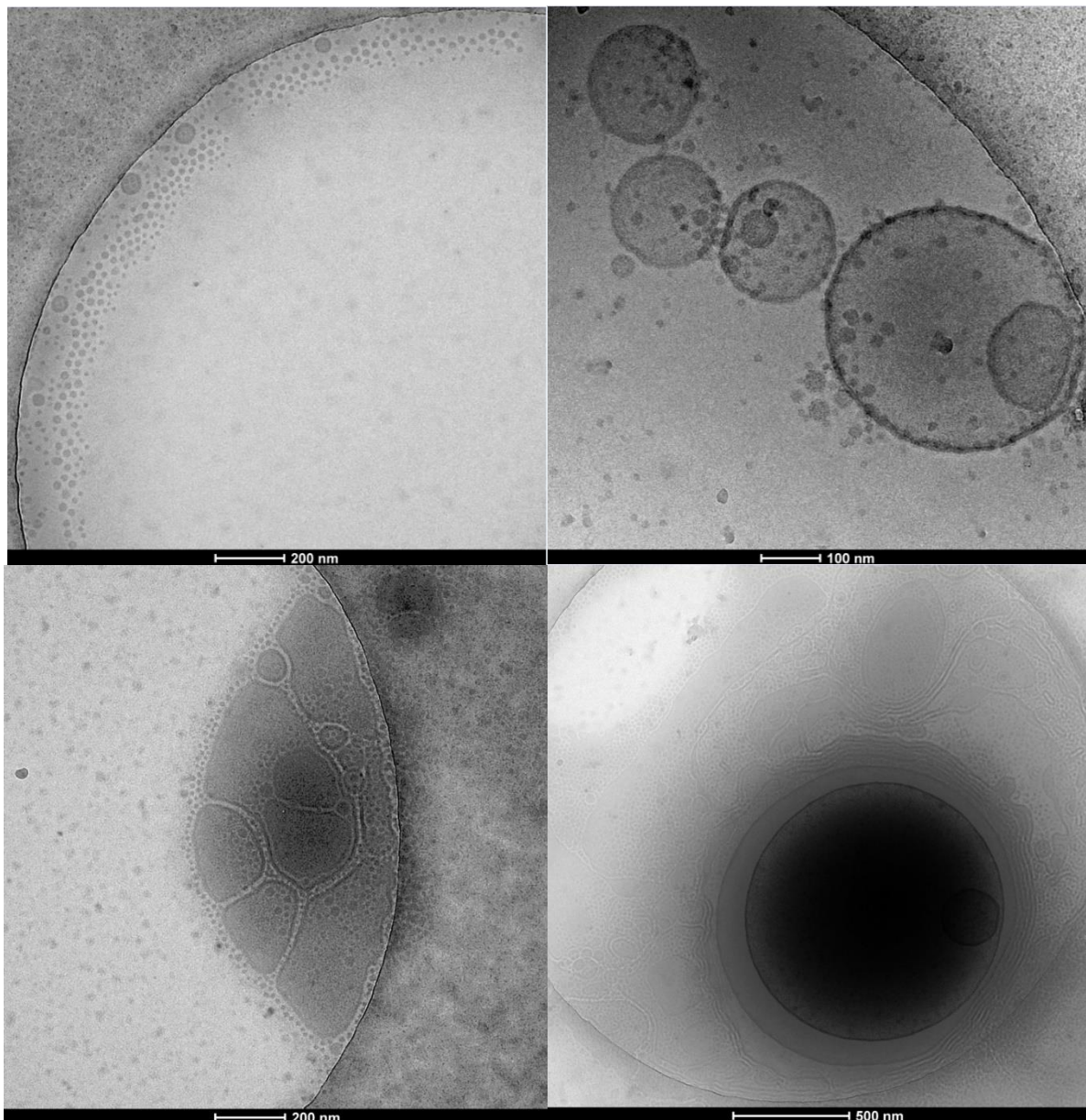
1° πρωτόκολλο

pH=3



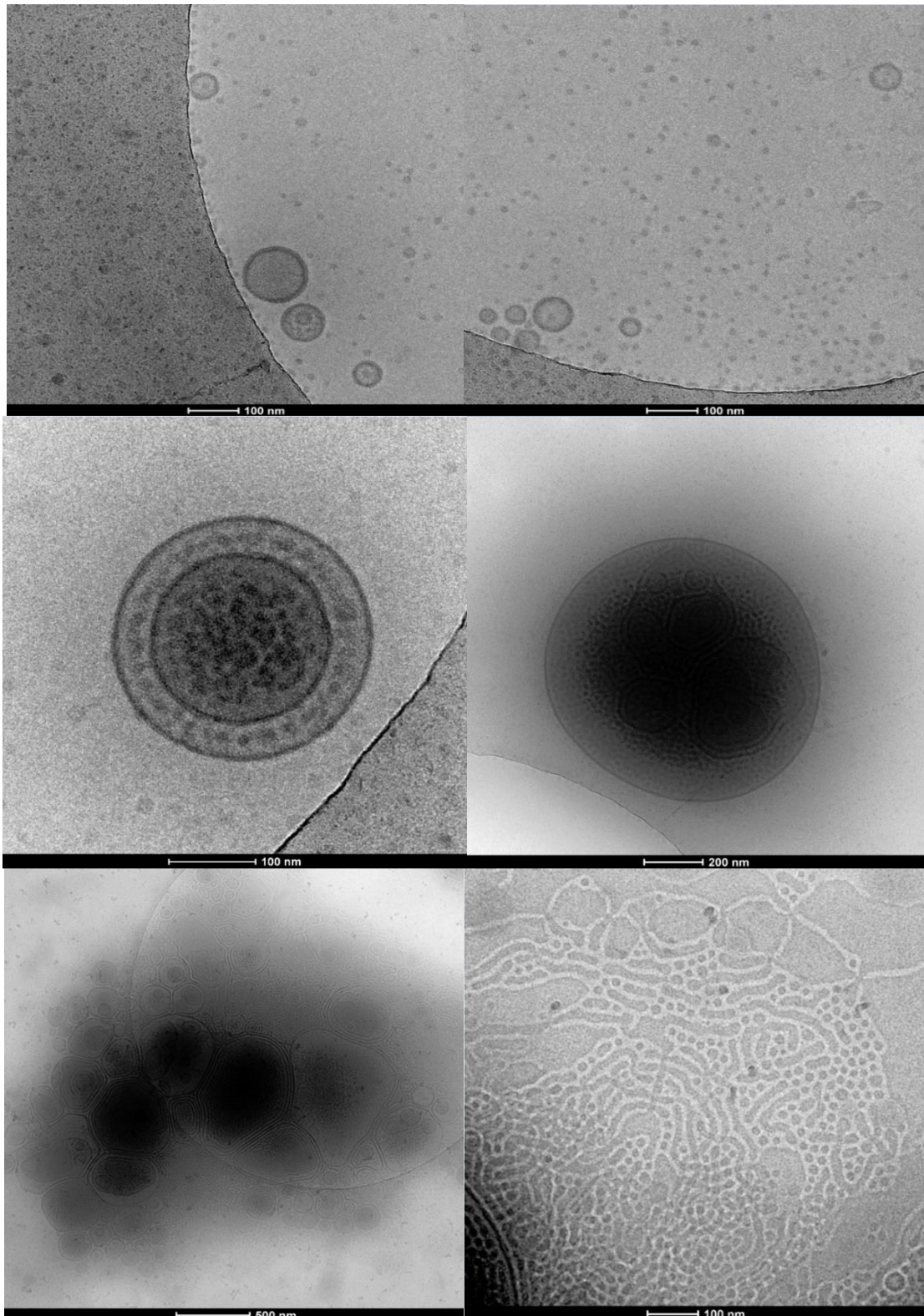
Εικόνα 4.3: Μικρογραφίες Cryo-TEM της μορφολογίας του PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερούς σε pH=3.

pH=7



Εικόνα 4.4: Μικρογραφίες Cryo-TEM της μορφολογίας του PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερούς σε pH=7.

pH=10



Εικόνα 4.5: Μικρογραφίες Cryo-TEM της μορφολογίας του PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερούς σε pH=10.

Από τις μικρογραφίες Cryo-TEM του PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερούς συμπεραίνουμε την ύπαρξη ποικίλλων μορφολογιών σε περιβάλλοντα με διαφορετικό pH. Αυτό είναι άλλη μία ένδειξη της απόκρισης του συστήματος στα διαφορετικά pH σε υδατικά διαλύματα. Παρατηρούνται σφαιρικές δομές σε όλα τα pH καθώς και απλές και πολυμορφικές μορφολογίες κυστιδίων: το ένα κυστίδιο μέσα στο άλλο, ύπαρξη μικρών μορίων και δευτερογενών κυστιδίων στο εσωτερικό τους ή και γύρω από αυτό, κυστίδια ενωμένα μεταξύ τους, μεγάλα κυστίδια, πολυστρωματικά κυστίδια, το ένα να επικαλύπτει το άλλο καθώς και σκωλικοειδούς μορφής μικκύλια (pH=10).

Σύμφωνα με όσα γνωρίζουμε από τη μέχρι τώρα βιβλιογραφία, αξιοσημείωτη νέα μορφολογία κυστιδίου παρατηρείται σε pH=7 και 10, όπου περιλαμβάνει μία καλά οργανωμένη μεμβράνη η οποία περιβάλλει μικρά σφαιρικά σωματίδια στο εξωτερικό υδρόφιλο μέρος της και μία ενδιάμεση μεμβράνη, η οποία περικλύει είτε μικρά σφαιρικά σωματίδια είτε κυστίδια στο εσωτερικό υδρόφοβο πυρήνα της.

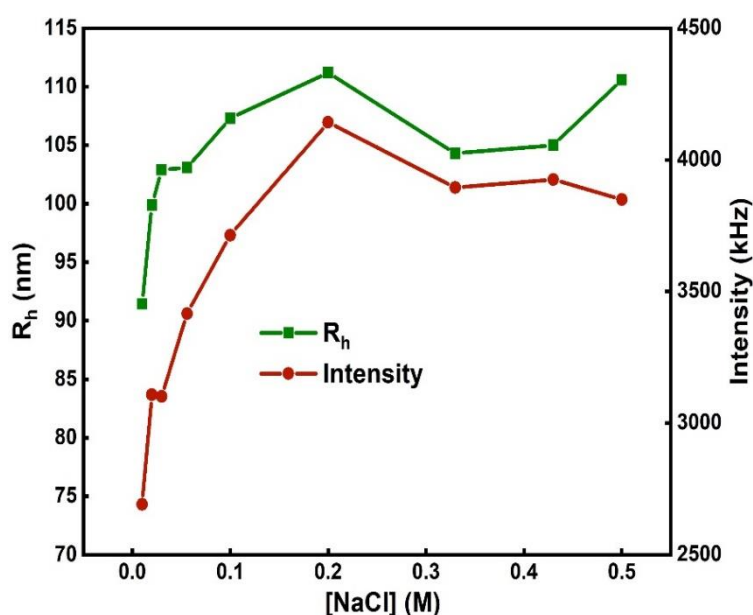
Παρακάτω παρατίθεται συγκριτικός Πίνακας 4.4 για την μέση διάμετρο των νανοδομών, όπως αυτή μετρήθηκε από τις μικρογραφίες Cryo-TEM και από την τεχνική DLS. Παρατηρείται ότι οι τιμές των διαμέτρων από το Cryo-TEM είναι εμφανώς μικρότερες στο pH=3 από τις τιμές του DLS. Οι διαφορές στις τιμές μεταξύ των δύο τεχνικών έγκειται στο γεγονός ότι στις μετρήσεις DLS γίνεται υπολογισμός της υδροδυναμικής διαμέτρου, η οποία περιλαμβάνει και τον όγκο του διαλύτη που ενυδατώνει τα σωματίδια. Αντίθετα, η διάμετρος που υπολογίζεται από το TEM είναι η διάμετρος των παρατηρούμενων δομών που παρουσιάζουν αντίθεση. Σε οποιαδήποτε περίπτωση οι διαφορές που παρατηρήθηκαν θεωρούνται μικρές.

Πίνακας 4.4: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων από Cryo-TEM και DLS για το PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερές.

Δείγμα	pH	D _h (nm) (DLS)	D _h (nm) (TEM)
PnBA ₄₀ -b-PDMAEA ₆₀	3	82	66
	7	306	293
	10	192	188

4.3.2 Επίδραση της ιοντικής ισχύος

Η μελέτη της ιοντικής ισχύος στα υδατικά διαλύματα των PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερών πραγματοποιήθηκε με προσθήκη NaCl 1M. Πραγματοποιήθηκαν εννέα προσθήκες (από 0.01 M έως 0.5 M) διαφορετικών συγκεντρώσεων άλατος στο υδατικό διάλυμα και μέσω της τεχνικής DLS μετρήθηκαν οι μεταβολές της έντασης και της ακτίνας R_h με την αύξηση της αλατότητας του διαλύματος. Οι μετρήσεις έγιναν υπό γωνία 90°, συγκέντρωση διαλύματος της τάξης των 5×10^{-4} g/ml με pH 7 και σε θερμοκρασία 25°C. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.10.



Σχήμα 4.10: Διάγραμμα εξάρτησης της R_h και της I από την επίδραση της ιοντικής ισχύος για το PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερές.

Έχει παρατηρηθεί ότι η προσθήκη άλατος επιτρέπει το σχηματισμό νανοδομών σε υψηλότερο βαθμό πρωτονίωσης εξαιτίας της προάσπισης των φορτίων. Επιπλέον, η υψηλότερη συγκέντρωση άλατος έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερες υδροδυναμικές ακτίνες R_h , οφειλόμενες στον υψηλότερο βαθμό συσσωμάτωσης των μικκυλίων, λόγω της προάσπισης των φορτίων. Στο διάλυμα του PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερούς με μεγαλύτερο ποσοστό σε PDMAEA σε σχέση με το PnBA, άρα και πιο μεγάλη κορώνα παρατηρήθηκε αύξηση της μάζας και των διαστάσεων του συμπολυμερούς καθώς αυξάνεται η ιοντική ισχύς ωστόσο οι τιμές τους παραμένουν σχετικά σταθερές δηλώνοντας έτσι την επίτευξη ισορροπίας όσον αφορά τη δευτερογενή συσσωμάτωση που παρατηρείται.

Λόγω των ιδιοτήτων που έχουν συζητηθεί για τη συστάδα του PDMAEA και εξαιτίας της σύστασης του πολυμερούς η συμπεριφορά του συμπολυμερούς εξαρτάται από τη συστάδα του PDMAEA και η αλλαγή στη διαμόρφωση των αλυσίδων του, κάνει ορατή τη συρρίκνωση και την συσσωμάτωση των μικκυλίων.

Συμπερασματικά, από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται πως το σύστημα PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ ανταποκρίνεται σε μεταβολές της ιοντικής ισχύος σε υδατικά διαλύματα, ωστόσο καθοριστικό παράγοντα αποτελεί η σύσταση του πολυμερούς στην αποκρινόμενη σε μεταβολές συστάδα του PDMAEA.

4.4 Σύμπλεξη PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερούς με DNA

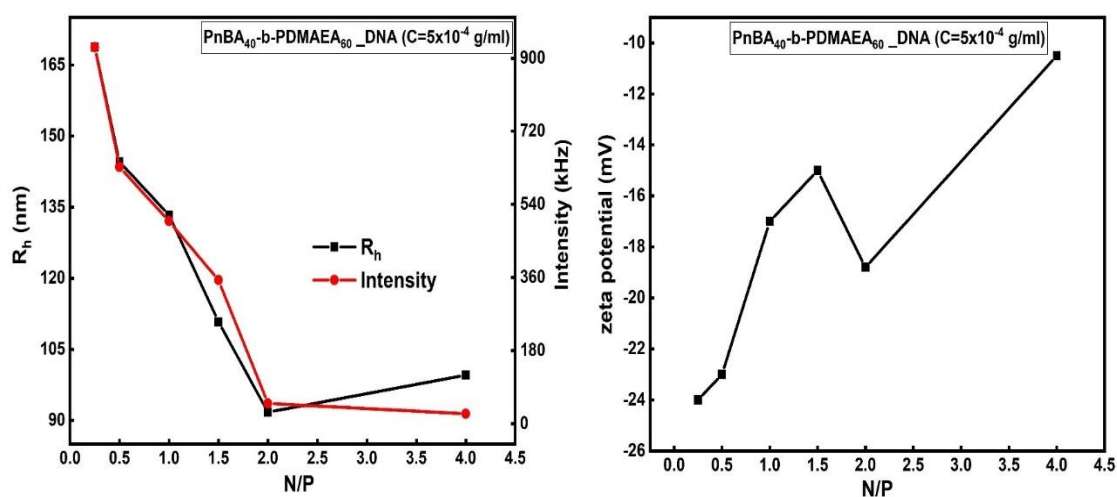
Πραγματοποιήθηκαν μελέτες για την πιθανή χρήση του PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερούς ως φορέα γονιδιακής θεραπείας μέσω σύμπλεξης μορίων DNA στη μερικώς θετικά φορτισμένη επιφάνεια της κορώνας PDMAEA των συμπολυμερών. Η πιθανή σύμπλεξη του μερικώς φορτισμένου θετικά συμπολυμερούς με μόρια DNA θα συγκριθεί με τα χημικώς τροποποιημένα-κατιοντικά συμπολυμερή που θα αναλυθούν στα επόμενα κεφάλαια. Η συναρμογή του DNA με το πολυμερές πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές αναλογίες του λόγου N/P. Μεταβάλλοντας το λόγο των διαθέσιμων για ηλεκτροστατική σύζευξη μερικώς φορτισμένων αμινομάδων με τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεοτίδια (φωσφορικές ομάδες) του μορίου του DNA μελετήθηκε η πιθανή σύμπλεξη του συστήματος, μέσω τεχνικών DLS, ELS, SLS, FS και UV-Vis.

Τα διαλύματα πολυμερούς – συμπλόκου έγιναν σε συγκέντρωση άλατος 0,01 NaCl. Στο παρακάτω Σχήμα 4.11 παρουσιάζονται η επίδραση της μεταβολής του λόγου N/P στην ακτίνα R_h και στην ένταση σκεδάσεως I μέσω της τεχνικής DLS και η επίδραση της μεταβολής του λόγου N/P στο ζ-δυναμικό μέσω της τεχνικής ELS αντίστοιχα για το PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερές. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.11, καθώς αυξάνεται ο λόγος N/P η ένταση και η ακτίνα μειώνονται. Με άλλα λόγια, παρατηρείται ο σχηματισμός συμπλόκων μικρότερης μάζας και μεγέθους με τη διαδοχική προσθήκη πολυμερούς. Αυτό αιτιολογείται και στα παρακάτω αποτελέσματα ELS όπου φανερώνεται το

φορτίο που φέρουν οι αλυσίδες σε όλους τους λόγους N/P. Γενικά, το συγκεκριμένο συμπολυμερές αναμένεται να έχει τέτοια συμπεριφορά καθώς η μερικώς θετικά φορτισμένη αμινομάδα της συστάδας του PDMAEA δεν έχει υποστεί κάποιου είδους χημική τροποποίηση. Έτσι, μερικές αλυσίδες PDMAEA δεν φέρουν αρκετό θετικό φορτίο και κατ'επέκταση δεν είναι ικανές να συμπλεχθούν και να δεσμεύσουν ισχυρά τις αρνητικές φωσφορικές ομάδες του DNA.

Μέσω μετρήσεων ELS προσδιορίστηκε η τιμή του ζ-δυναμικού για όλες τις αναλογίες φορτίων N/P. Παρατηρείται ότι σε όλες τιμές N/P τα σωματίδια είναι φορτισμένα αρνητικά, κάτι που συνάδει με την εγκόλπωση των μικκυλίων από μόρια DNA. Σε χαμηλούς λόγους N/P επιδεικνύουν μεγαλύτερες αρνητικές τιμές λόγω της παρουσίας περισσότερων φωσφορικών ομάδων του DNA.

Επιπλέον από SLS μετρήσεις προσδιορίστηκε κατά προσέγγιση η μορφολογία των μικκυλίων με τη σύμπλεξη του DNA στις διαφορετικές αναλογίες N/P. Οι τιμές R_g/R_h που προσκομίστηκαν για το συγκεκριμένο δείγμα κυμαίνονται γύρω στο 1. Συνεπώς παρατηρείται μια τάση να δημιουργούνται σφαιρικές νανοδομές με ιδιαίτερη κατανομή αλυσίδων στο εσωτερικό τους (ίσως και κυστίδια) με τη περίσσεια των φωσφορικών ομάδων.



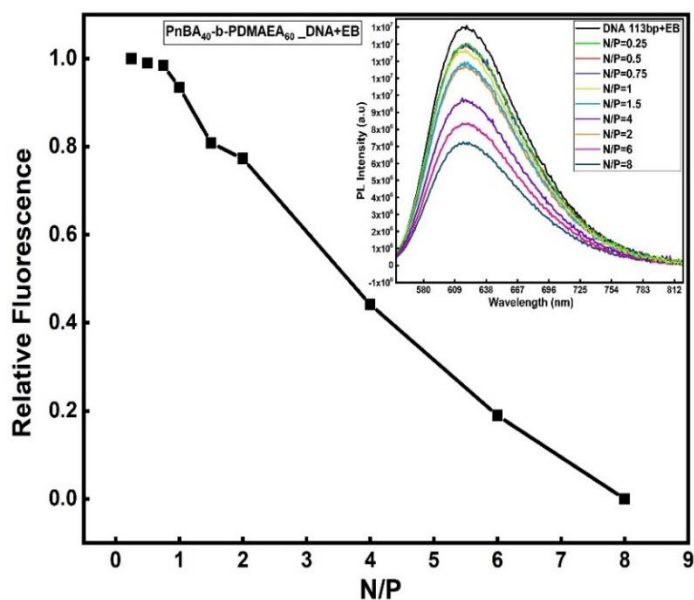
Σχήμα 4.11: Μεταβολή της R_h , έντασης I και ζ-δυναμικού συναρτήσει του λόγου N/P για το σύμπλοκο PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀/DNA.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μελέτες FS του βρωμιούχου αιθιδίου. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια φθορίζουσα ένωση που αλληλεπιδρά με το DNA παρεμβάλλοντας ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων και λόγω της παρεμβολής του

παρουσιάζει έντονο φθορισμό. Κατά τη σύμπλεξη όμως του DNA με το πολυμερές το παρεμβαλλόμενο βρωμιούχο αιθίδιο εκτοπίζεται από τη διπλή έλικα του DNA και η ένταση φθορισμού μειώνεται, υποδηλώνοντας την ικανότητα του πολυμερούς να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με το DNA. Γενικά, η τεχνική FS του βρωμιούχου αιθιδίου χρησιμοποιείται κατά κόρον στη μελέτη συστημάτων σύμπλεξης με DNA, καθώς μέσω του φάσματος φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου καταγράφεται η ικανότητα σχηματισμού συμπλόκων ως αποτέλεσμα των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του πολυμερούς και του γενετικού υλικού. [73, 120]

Στο Σχήμα 4.12 παρατίθεται το διάγραμμα απόσβεσης φθορισμού, καθώς και τα αντίστοιχα φάσματα για το σύμπλοκο EtBr/DNA υπό αλληλεπίδραση με το PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερές σε διαφορετικούς λόγους N/P.

Οι μετρήσεις FS πραγματοποιούνται αμέσως μετά την παρασκευή των συμπλόκων και άρα οι δομές αυτές μπορεί να μην είναι δομές ισορροπίας. Στο Σχήμα 4.12 φαίνεται ξεκάθαρα μία πολύ αργή μείωση της έντασης φθορισμού, η οποία ίσως δεν είναι ικανή για την συμπλοκοποίηση με DNA, κάτι που επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα των προηγούμενων μετρήσεων.

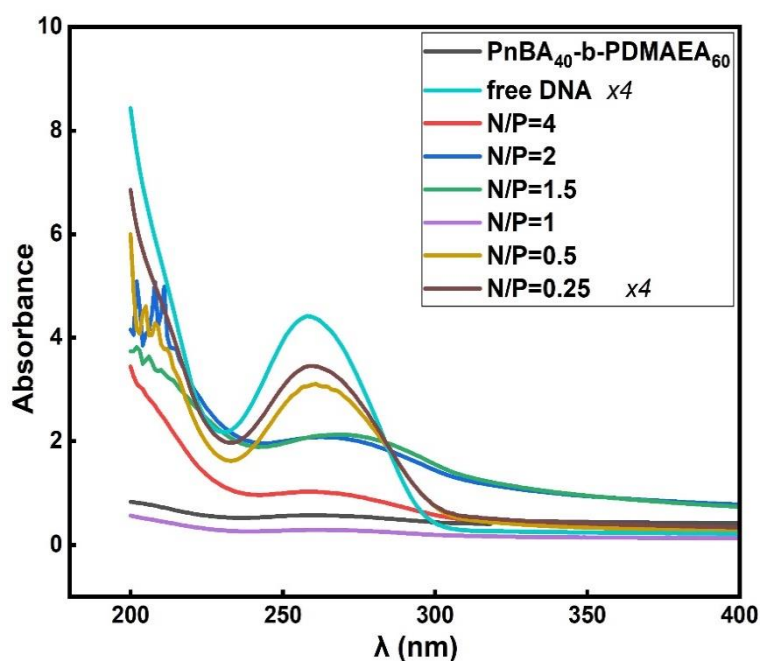


Σχήμα 4.12: Διάγραμμα απόσβεσης φθορισμού και αντίστοιχων φασμάτων που περιγράφουν την αλληλεπίδραση EtBr/DNA με το σύμπλοκο PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀.

Η τεχνική της UV-vis είναι επίσης μια μέθοδος που χρησιμοποιείται συχνά κατά τη μελέτη σύμπλεξης πολυμερών με μόρια DNA. Οι μελέτες στο

ορατό υπεριώδες προσφέρουν πληροφορίες για το είδος της αλληλεπίδρασης μεταξύ του DNA και του πολυμερούς και ειδικότερα για αλλαγές στη διαμόρφωση και στην κατάσταση σύμπλεξης του DNA, αφού παρακολουθείται η απορρόφηση των βάσεων του νουκλεϊκού οξέος. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το μη δεσμευμένο DNA παρουσιάζει χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης λ_{\max} , η ένταση της οποίας μειώνεται και εμφανίζεται μια νέα κορυφή σε μικρότερα μήκη κύματος όταν αυτό συμπλέκεται με κατιοντικά πολυμερή που αποδίδεται στο συμπλεγμένο DNA. Προκειμένου να καθορισθεί το λ_{\max} του μη δεσμευμένου DNA διαλύθηκε ποσότητα DNA σε διάλυμα NaCl 0.01 M. Με τον τρόπο αυτό βρέθηκε το λ_{\max} του ελεύθερου DNA να είναι στα 260 nm. [120]

Στο Σχήμα 4.13 παρατίθεται τα φάσματα απορρόφησης του δείγματος PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀/DNA σε αναλογίες N/P από 0.25 έως 4, όπου δεν παρατηρείται κάποια είδους σύμπλεξη με τις αρνητικές φωσφορικές ομάδες του DNA στην περίπτωση του μερικώς φορτισμένου PDMAEA, κάτι που επιβεβαιώνει εξίσου όλα τα αποτελέσματα των προηγούμενων μετρήσεων.

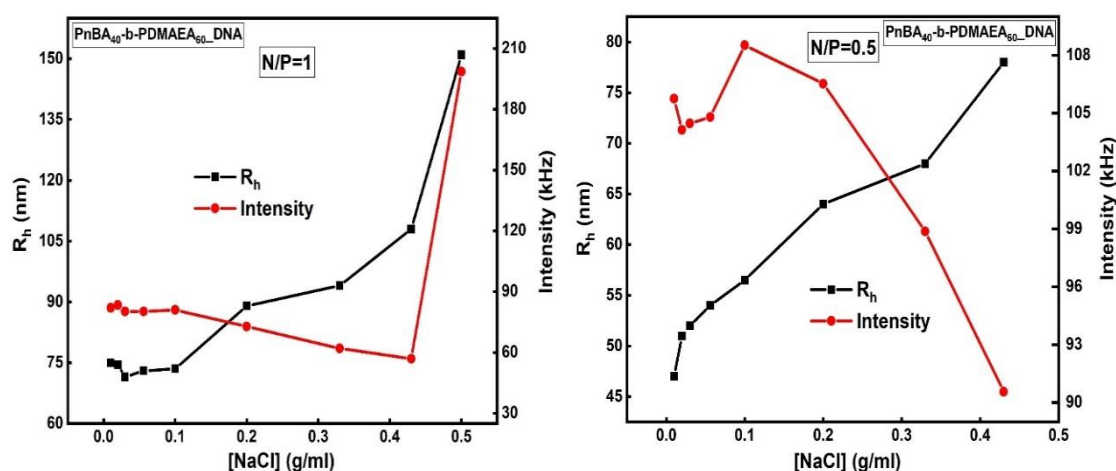


Σχήμα 4.13: Φάσματα απορρόφησης υπεριώδους για το δείγμα PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀/DNA σε αναλογίες N/P από 0.25 έως 4.

4.4.1 Μελέτη επίδρασης ιοντικής ισχύος στα PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀/DNA σύμπλοκα

Τα σύμπλοκα PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀/DNA με διαφορετικούς λόγους N/P μελετήθηκαν και ως προς την επίδραση που έχει η αύξηση της ιοντικής ισχύος στη συμπεριφορά τους στο διάλυμα. Στα υδατικά διαλύματα PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀/DNA συγκέντρωσης 0,01M NaCl πραγματοποιήθηκαν 6 προσθήκες NaCl 1M συγκεντρώσεων από 0,01M (αρχική συγκέντρωση) έως 0,5M και στη συνέχεια μέσω της τεχνικής DLS μετρήθηκαν οι μεταβολές της έντασης και της ακτίνας R_h με την αύξηση της αλατότητας του διαλύματος. Οι μετρήσεις έγιναν σε γωνία 90°, αρχική συγκέντρωση διαλύματος της τάξης των 5 x 10⁻⁴ g/ml, pH = 7 και σε θερμοκρασία 25°C.

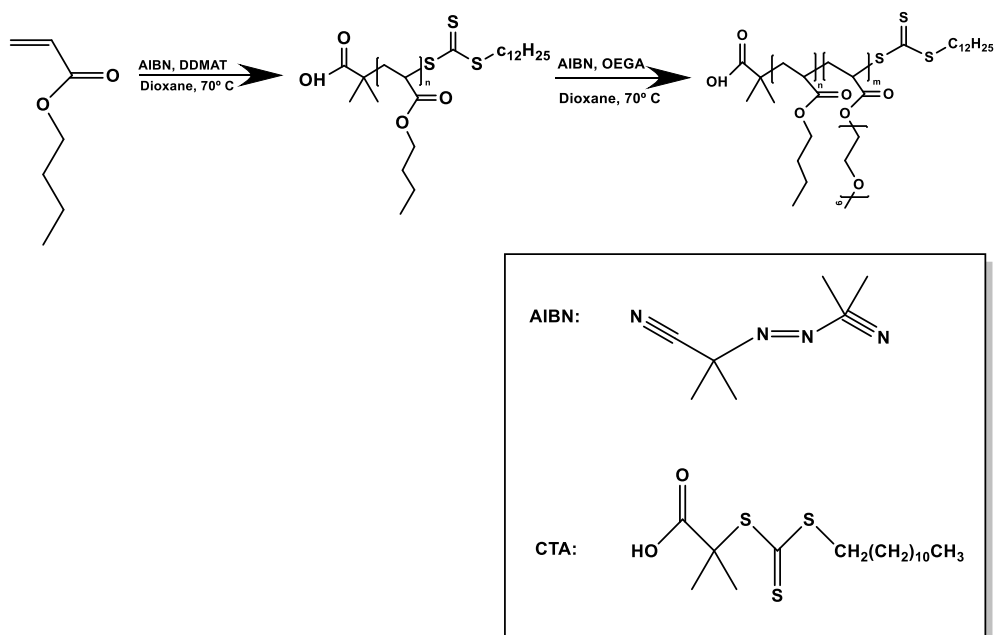
Για τις μετρήσεις επίδρασης της ιοντικής ισχύος επιλέχθηκαν διαλύματα δυο διαφορετικών λόγων N/P για την κάθε σειρά συμπλόκων από αυτά που εμφάνιζαν μεγαλύτερη σταθερότητα με το πέρασμα του χρόνου. Στο Σχήμα 4.14 παρουσιάζονται οι μεταβολές έντασης και ακτίνας R_h με την αύξηση της ιοντικής ισχύος του συμπλόκου PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀/DNA για τους λόγους φορτίων N/P = 1 και N/P = 0,5. Από τα διαγράμματα και για τους δυο λόγους φορτίων, παρατηρείται ότι με την αύξηση της ιοντικής ισχύος μειώνεται η μάζα και αυξάνονται οι διαστάσεις των συμπλόκων. Η μείωση της έντασης σηματοδοτεί τη μείωση του συμπλόκου σε μάζα συνεπώς και την αποσύνθεσή του. Με την αύξηση της ακτίνας φαίνεται ότι απελευθερώνονται τα φορτία που ήταν αρχικά συμπλεγμένα μιας και το σύστημα τώρα είναι πιο διαλυτό και μπορεί να εγκλωβίσει περισσότερο νερό.



Σχήμα 4.14: Διάγραμμα εξάρτησης της R_h και της I από την επίδραση της μεταβολής των λόγων N/P για το σύμπλοκο PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀/DNA.

4.5 Σύνθεση PnBA-b-POEGA συμπολυμερών

Συντέθηκαν δύο αμφίφιλα δισυσταδικά PnBA-b-POEGA συμπολυμερή μέσω της τεχνικής RAFT με διαφορετικό μοριακό βάρος της συστάδας του PnBA (Πίνακας 4.1). Το PnBA ομοπολυμερές συντέθηκε πρώτα (Κεφάλαιο 4-Υποκεφάλαιο 4.1) ώστε να χρησιμοποιηθεί ως μακρο-CTA για να ξεκινήσει τον πολυμερισμό του POEGA, χρησιμοποιώντας ως AIBN το αζωδισισοβουτυρονιτρίλιο, ως CTA το 2-(δωδεκυλθειοκαρβονυλοθειο)-2-μεθυλοπροπανικό οξύ και ως διαλύτη το 1,4-διοξάνιο. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 70°C για 24 ώρες όπως περιγράφεται στην Εικόνα 4.6. Τα διαλύματα των πολυμερών ήταν ομογενή καθ' όλη τη διάρκεια των πολυμερισμών και τα συμπολυμερή ήταν σε στερεά μορφή με υφή που άλλαζε σε σχέση με τη σύσταση.

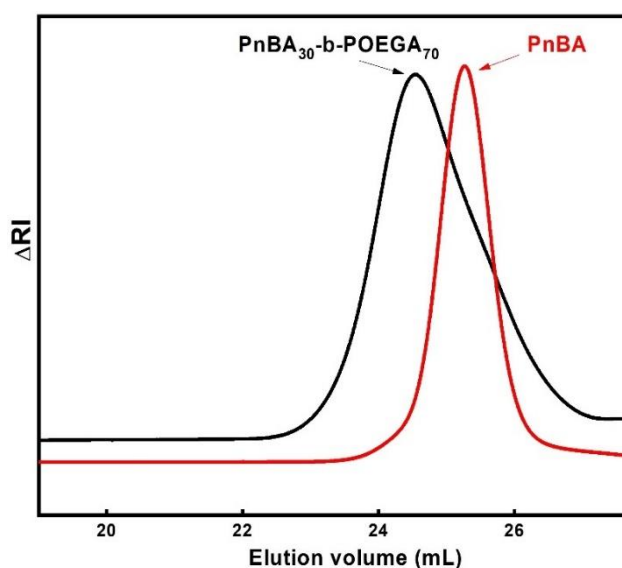


Εικόνα 4.6: Συνθετική πορεία για τη παρασκευή του αμφίφιλου δισυσταδικού PnBA-b-POEGA.

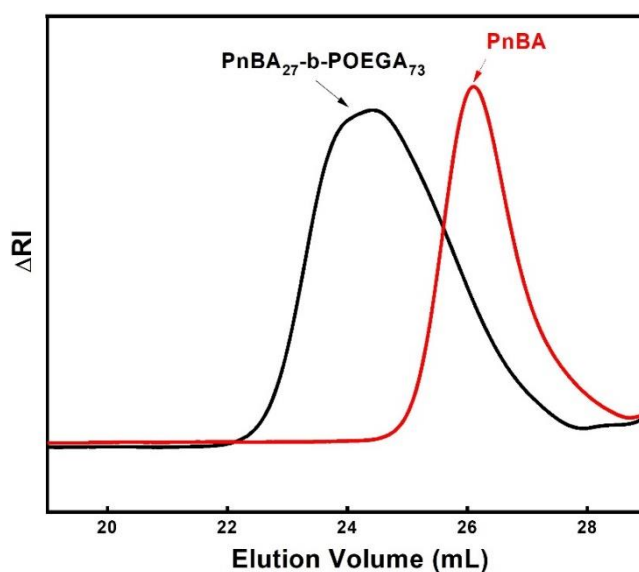
4.6 Μοριακός και φυσικοχημικός χαρακτηρισμός PnBA-b-POEGA συμπολυμερών

Τα μοριακά βάρη και οι κατανομές μοριακών βαρών των πολυμερών που συντέθηκαν προσδιορίστηκαν με την τεχνική SEC. Χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα SEC των ομοπολυμερών PnBA και PnBA-b-POEGA συμπολυμερών παρουσιάζονται στα παρακάτω Σχήματα 4.15 και 4.16

αντίστοιχα. Από τα χρωματογράφημα και την ανάλυσή τους, διαπιστώνουμε τον επιτυχή έλεγχο του μοριακού βάρους των πολυμερών που συντέθηκαν, γεγονός που επιτεύχθηκε μέσω των συνθηκών πολυμερισμού που επιλέχθηκαν. Επίσης, οι τιμές των κατανομών των μοριακών βαρών είναι ικανοποιητικές, όπως επιβάλλει το θεωρητικό υπόβαθρο της τεχνικής πολυμερισμού RAFT και συμφωνούν με τα αναφερόμενα στη σχετική βιβλιογραφία. Τα αποτελέσματα βρίσκονται στο Πίνακα 4.5 για τα PnBA-b-POEGA συμπολυμερή.



Σχήμα 4.15: Συγκριτικό χρωματογράφημα SEC του PnBA ομοπολυμερούς με 4.000 g/ml μοριακό βάρος και του PnBA₃₀-b-POEGA₇₀ συμπολυμερούς.

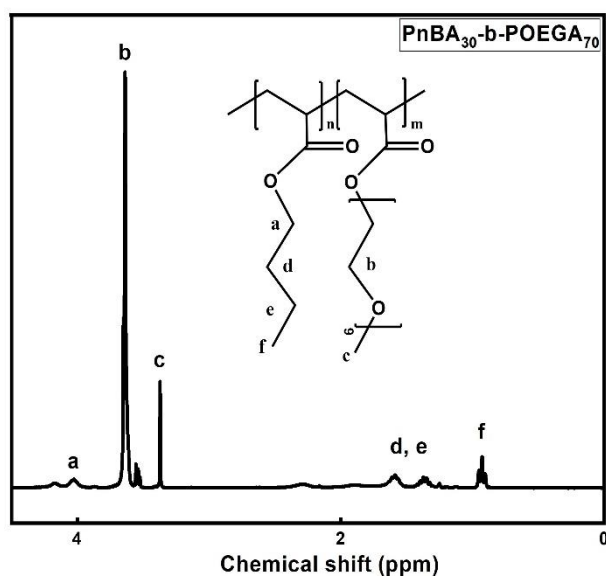


Σχήμα 4.16: Συγκριτικό χρωματογράφημα SEC του PnBA ομοπολυμερούς με 7.800 g/ml μοριακό βάρος και του PnBA₂₇-b-POEGA₇₃ συμπολυμερούς.

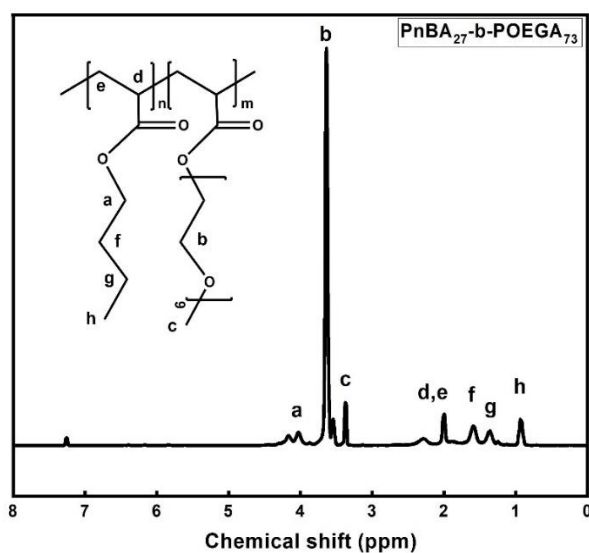
Η ταυτοποίηση της χημικής δομής και ο προσδιορισμός της σύστασης των PnBA-b-POEGA συμπολυμερών πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$. Τα αντιπροσωπευτικά φάσματα $^1\text{H-NMR}$ για τα δισυσταδικά PnBA-b-POEGA συμπολυμερή δίνονται στο Σχήμα 4.17 και 4.18 αντίστοιχα μαζί με την αποτίμηση των κορυφών των φασμάτων σε σχέση με τις δομικές μονάδες των συμπολυμερών.

Στα παρακάτω $^1\text{H-NMR}$ φάσματα των PnBA-b-POEGA συμπολυμερών δεν παρατηρούνται τόσο σημαντικές διαφορές ως προς το πλάτος και την ένταση το κορυφών, γεγονός που οφείλεται στην περίπου ίδια σύσταση των μονομερικών μονάδων που αποτελούν τα συμπολυμερή. Παρατηρούνται κάποιες καινούριες κορυφές στην περίπτωση του δεύτερου συμπολυμερούς με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος σε PnBA, οι οποίες ανήκουν στην πλευρική αλυσίδα του PnBA σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές της κάθε συστάδας χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό τον υπολογισμό της σύστασης. Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκαν τα $-\text{CH}_3$ υδρογόνα που αντιστοιχούν στη συστάδα του PnBA και εμφανίζονται στα 0,9 ppm [106] και τα $-\text{CH}_2$ υδρογόνα των δύο μεθυλιών επί 9 που αντιστοιχούν στη συστάδα του POEGA και εμφανίζονται στα 3.63 ppm [121, 122]. Στη συνέχεια, για την εύρεση της σύστασης της κάθε συστάδας διαιρέθηκε το εμβαδόν της κάθε κορυφής με τον αριθμό των υδρογόνων που αντιστοιχούν σε αυτή και ο αριθμός που προέκυψε πολλαπλασιάστηκε με το μοριακό βάρος της αντίστοιχης μονομερικής μονάδας. Έτσι, η κατά βάρος σύσταση κάθε συστάδας προέκυψε διαιρώντας τον παραπάνω αριθμό με το άθροισμα αυτών και για τις δύο κορυφές.

Οι πειραματικές τιμές για τα πολυμερή που συντέθηκαν βρίσκονται καταγεγραμμένες στο συγκεντρωτικό Πίνακα 4.5. και συμφωνούν με τις στοιχειομετρικά υπολογιζόμενες, γεγονός που αποδεικνύει τον σχετικό έλεγχο στην διαδικασία πολυμερισμού για τα συγκεκριμένα συστήματα μονομερών. Η σχετικά αυξημένη τιμή πολυδιασποράς ειδικότερα για το συμπολυμερές PnBA₂₇-b-POEGA₇₃ πρέπει να οφείλεται στα χαρακτηριστικά του πολυμερισμού του μακρομονομερούς OEGA.



Σχήμα 4.18: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του συμπολυμερούς $\text{PnBA}_{30}\text{-b-POEGA}_{70}$ σε CDCl_3 .



Σχήμα 4.17: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του συμπολυμερούς $\text{PnBA}_{27}\text{-b-POEGA}_{73}$ σε CDCl_3 .

Πίνακας 4.5: Μοριακά χαρακτηριστικά των PnBA-b-POEGA συμπολυμερών.

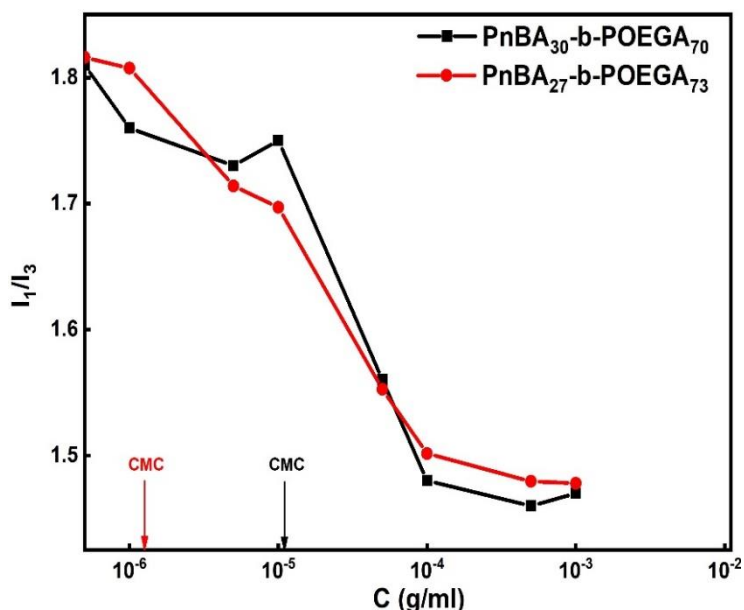
Δείγμα συμπολυμερούς	M_w (g/mol) (SEC)	M_w PnBA (g/mol)	M_w / M_n (SEC)	Σύσταση %wt PnBA ($^1\text{H-NMR}$)	Σύσταση %wt POEGA ($^1\text{H-NMR}$)
$\text{PnBA}_{30}\text{-b-POEGA}_{70}$	12.900	4.000	1,29	30	70
$\text{PnBA}_{27}\text{-b-POEGA}_{73}$	28.600	7.800	1,47	27	73

4.7 Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός PnBA-b-POEGA συμπολυμερών

Τα υδατικά διαλύματα των PnBA-b-POEGA συμπολυμερών με διαφορετική αναλογία σε PnBA παρασκευάστηκαν με απευθείας διάλυσή τους σε

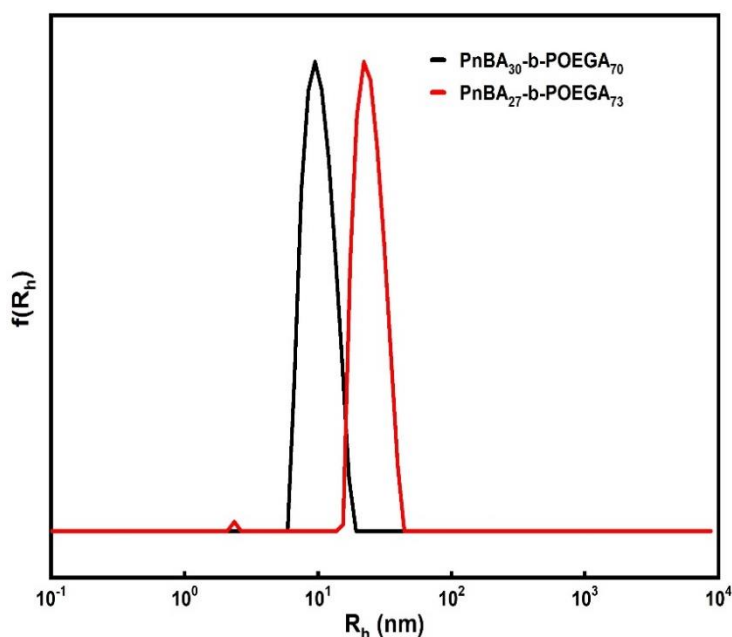
απεσταγμένο νερό χωρίς τη χρήση οργανικού διαλύτη, λόγω της μικρής τους περιεκτικότητας σε PnBA. Στα δισυσταδικά αυτά αμφίφιλα συμπολυμερή που παρασκευάστηκαν μελετήθηκε η ικανότητά τους να αυτο-οργανώνονται σε μικκύλια όταν διαλύονται σε υδατικά μέσα. Τα διαλύματα των πολυμερών μετρήθηκαν την επόμενη από την ημέρα παρασκευής τους με σκοπό την επίτευξη ισορροπίας.

Ο προσδιορισμός της CMC έγινε με την τεχνική της FS, εγκλωβίζοντας πυρένιο στον πυρήνα των μικκυλίων ως ιχνηθέτη. Η σημασία της CMC συζητήθηκε στο Υποκεφάλαιο 4.3.1. Προκειμένου να διεξαχθούν οι μετρήσεις FS, παρασκευάστηκαν αρχικά διαλύματα συγκέντρωσης 1.0×10^{-3} g/mL σε pH = 7. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων κυμαίνονταν σε εύρος 10^{-8} - 10^{-3} g/mL για τα διαλύματα των δύο συμπολυμερών. Στο συγκριτικό διάγραμμα του Σχήματος 4.19 για τα PnBA-b-POEGA συμπολυμερή, παρατηρείται καθαρά η μείωση της CMC με την αύξηση του ποσοστού της υδρόφοβης συστάδας, όπως αναμένεται και από τη βιβλιογραφία. [118] Μέχρι να φανούν οι περιοχές μετάβασης από την τιμή συγκέντρωσης 10^{-5} και μετά, δεν εμφανίζονται μικκύλια. Τελικά, παρατηρούνται πλατώ και στα δύο συμπολυμερή σε υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ τα πλατώ σε μικρές συγκεντρώσεις δεν είναι ιδιαίτερα εμφανή τουλάχιστον για την περίπτωση του PnBA₂₇-b-POEGA₇₃ (γεγονός που ίσως να σχετίζεται και με τη μεγαλύτερη πολυδιασπορά του συγκεκριμένου συμπολυμερούς).



Σχήμα 4.19: Συγκριτικό διάγραμμα της έντασης του λόγου των σχετικών κορυφών I_1 / I_3 του πυρενίου συναρτήσει της συγκέντρωσης για τα PnBA-b-POEGA συμπολυμερή.

Για τον προσδιορισμό της R_h και του PDI των πολυμερικών μικκυλίων έγιναν μετρήσεις DLS και παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 1.0×10^{-3} g/mL σε $pH = 7$. Παρακάτω στο Σχήμα 4.20 παρατίθεται συγκριτικό διάγραμμα κατανομής μεγεθών των πολυμερικών μικκυλίων για τα δύο συμπολυμερή (CONTIN). Παρατηρείται αύξηση της R_h στην περίπτωση που έχουμε το συντιθέμενο μεγαλύτερου μοριακού βάρους PnBA κάτι που δηλώνει την αύξηση του συνολικού μοριακού βάρους του PnBA₂₇-b-POEGA₇₃ συμπολυμερούς.



Σχήμα 4.20: Συγκριτικό διάγραμμα κατανομής μεγεθών για τα μικκύλια PnBA-b-POEGA συμπολυμερή.

Μέσω της τεχνικής της (ELS) προσδιορίστηκε το ζ-δυναμικό για τα PnBA-b-POEGA συμπολυμερή. Οι τιμές του παρουσιάζονται ασθενώς αρνητικές, πιθανόν λόγω της ομάδας καρβοξυλίου που υπάρχει στο CTA ή την προσρόφηση OH^- , και συγκεντρώνονται στον Πίνακα 4.6.

Στο Πίνακα 4.6 παρουσιάζεται εξίσου το μήκος της εκτεταμένης αλυσίδας των PnBA-b-POEGA συμπολυμερών παρέχοντας μας πληροφορίες για τις διαστάσεις των σωματίδιων. Οι μικρές τιμές του μήκους της μιας αλυσίδας είναι παραπλήσιες σε σχέση με τις διαστάσεις που παρουσιάζονται για την υδροδυναμική ακτίνα από τη σκέδαση φωτός και δηλώνουν την ύπαρξη σφαιρικών μικκυλίων μορφολογίας πυρήνα-κελύφους.

Πίνακας 4.6: Αποτελέσματα DLS, FS, ELS των PnBA-b-POEGA συμπολυμερών.

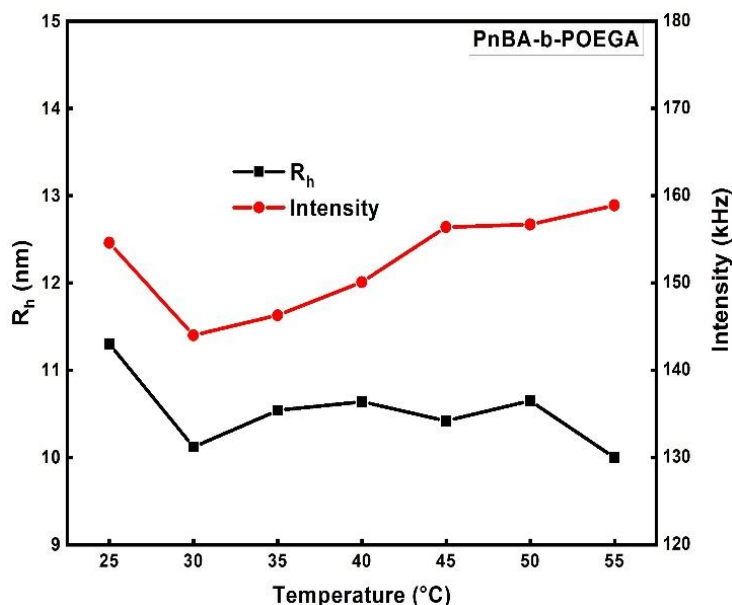
Δείγμα	R_h (nm)	PDI	CMC	ζ_p (mV)	L (nm)
PnBA ₃₀ -b-POEGA ₇₀	10	0,121	1,09 x 10 ⁻⁵	-1	12
PnBA ₂₇ -b-POEGA ₇₃	24	0,147	1,26 x 10 ⁻⁶	-7	25

4.8 Μελέτη επίδρασης φυσικοχημικών παραμέτρων στα PnBA-b-POEGA διαλύματα συμπολυμερών

4.8.1 Μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας

Τα υδατικά διαλύματα του PnBA₃₀-b-POEGA₇₀ συμπολυμερούς μελετήθηκαν μέσω δυναμικής σκέδασης φωτός με σκοπό τον προσδιορισμό της πιθανής επίδρασης της θερμοκρασίας στην αυτο-οργάνωσή τους, παρόλο που δε χαρακτηρίζονται ως θερμοαποκρινόμενα, όπως της συγγενούς συστάδας του PDEGMA, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [122-124]. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στις 90°, σε συγκέντρωση της τάξης των 10⁻³ g/ml, pH=7 και σε ένα εύρος θερμοκρασιών των 25° C - 55° C.

Οι παράμετροι που προσδιορίστηκαν από τη μεταβολή της θερμοκρασίας ήταν η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας των σωματιδίων του διαλύματος και κατ' επέκταση η υδροδυναμική ακτίνα. Παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας το συμπολυμερές εμφάνισε μικρή αύξηση της έντασης και μικρή μείωση της υδροδυναμικής ακτίνας. Στο Σχήμα 4.21 παρουσιάζεται η μικρή εξάρτηση του διαλύματος του πολυμερούς PnBA-b-POEGA σε υδατικό μέσο από τη θερμοκρασία όσον αφορά τις τιμές της υδροδυναμικής ακτίνας και της έντασης σκεδάσεως. Με τη μεταβολή από τους 25°C έως τους 55°C είναι ορατή η μικρή αύξηση της έντασης που σημαίνει αύξηση της μάζας σωματιδίων και η ελάχιστη μείωση της ακτίνας, λόγω της συρρίκνωσης των αλυσίδων και την τάση του συστήματος προς συσσωμάτωση. Γενικά τα συγκεκριμένα μικκύλια μπορούν να θεωρηθούν σταθερά ως προς τη θερμοκρασία.

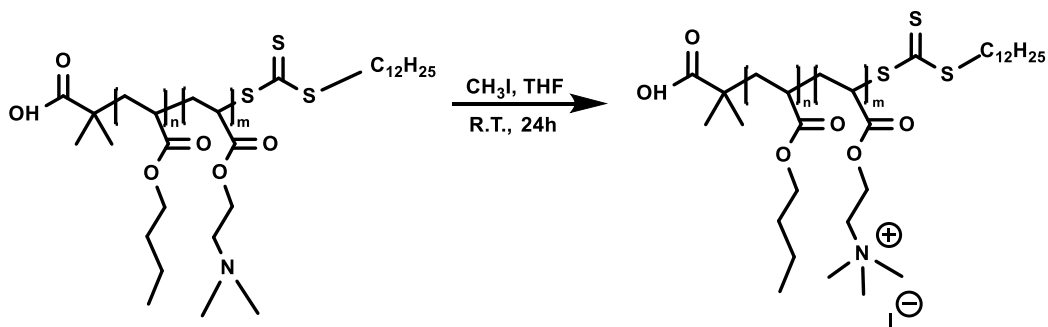


Σχήμα 4.21: Μεταβολή θερμοκρασίας συναρτήσει R_h και έντασης I για το PnBA-b-POEGA συμπολυμερές.

4.9 Σύνθεση και μοριακός χαρακτηρισμός PnBA-b-Q₁PDMAEA συμπολυμερών

Στα συμπολυμερή PnBA-b-PDMAEA που συντέθηκαν πραγματοποιήθηκε μετατροπή της τριτοταγούς αμίνης της συστάδας του PDMAEA με αντιδραστήριο CH₃I. Σε διάλυμα πολυμερούς σε THF υπό ανάδευση προστέθηκε περίσσεια CH₃I και η τριτοταγής αμίνη μετατράπηκε σε τεταρτοταγές άλας αμμωνίου. Στην περίπτωση αυτή το PDMAEA μετατρέπεται σε έναν ισχυρό κατιοντικό πολυηλεκτρολύτη. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες. Στην Εικόνα 4.7 απεικονίζεται η αντίδραση τεταρτοταγοποίησης της αμίνης και η δημιουργία του νέου συμπολυμερούς.

Με την προσθήκη του CH₃I στο διάλυμα του πολυμερούς σε THF και με την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το διάλυμα άλλαξε εμφάνιση ως προς το χρώμα και τη μορφή του. Από διαυγές μετατράπηκε σε κίτρινο και ως προς τη μορφή παρατηρήθηκε ο σχηματισμός γέλης. Η αλλαγή στην εμφάνιση ως προς το χρώμα οφείλεται στο CH₃I και ως προς τη μορφή πηκτώματος στο ότι με την τεταρτοταγοποίηση της αμίνης το πολυμερές παύει πια να είναι διαλυτό στο THF. Ανάλογα με την αύξηση της σύστασης του συμπολυμερούς σε PDMAEA η αλλαγή στην εμφάνιση είναι ακόμα πιο έντονη.



Εικόνα 4.7: Αντίδραση τεταρτοταγοποίησης της αμίνης του PDMAEA και σύνθεση του νέου PnBA-b-Q₁PDMAEA συμπολυμερούς.

Η σύσταση και το μοριακό βάρος των συμπολυμερών με τροποποιημένη την αμινομάδα από τριτοταγή σε τεταρτοταγή προσδιορίστηκε από το μοριακό βάρος και τις κατά βάρος συστάσεις των συμπολυμερών PnBA-b-PDMAEA που υπολογίστηκαν από τα φάσματα ¹H-NMR και από SEC. Οι τιμές αυτές βρίσκονται καταγεγραμμένες στο Πίνακα 4.7 και τα φάσματα ¹H-NMR παρουσιάζονται παρακάτω.

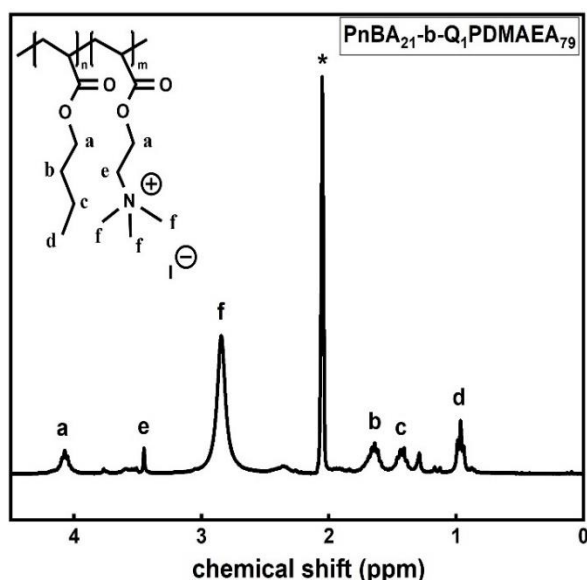
Το ποσοστό της σύστασης που αντιστοιχεί στη δεύτερη συστάδα του PDMAEA πολλαπλασιάζεται με το μοριακό βάρος του συμπολυμερούς και προκύπτει το μοριακό βάρος της συστάδας του PDMAEA. Έπειτα, διαιρώντας το μοριακό βάρος του PDMAEA με το μοριακό βάρος της μονομερικής του μονάδας προκύπτουν οι δομικές μονάδες της συστάδας του PDMAEA στο συμπολυμερές. Θεωρώντας ότι η αντίδραση τεταρτοταγοποίησης έχει πραγματοποιηθεί στο 100% σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τότε στην αμινομάδα κάθε δομικής μονάδας PDMAEA θα έχει ενσωματωθεί ένα μεθύλιο του CH₃I και το ιώδιο ως αντισταθμιστικό ιόν. Συνεπώς, προσθέτοντας το μοριακό βάρος της μονομερικής ομάδας του PDMAEA με το μοριακό βάρος του CH₃I, το άθροισμα που προκύπτει πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των δομικών μονάδων του PDMAEA του συμπολυμερούς. Ο αριθμός που προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό είναι το μοριακό βάρος της συστάδας του Q₁PDMAEA. Επιπλέον, από τη κατά βάρος σύσταση του NMR του συμπολυμερούς και το μοριακό του βάρος, υπολογίζεται το μοριακό βάρος της συστάδας του PnBA το οποίο θα παραμείνει ίδιο μετά την αντίδραση. Το μοριακό βάρος του Q₁PDMAEA και του PnBA προστίθενται και προκύπτει το μοριακό βάρος του

νέου συμπολυμερούς. Το ποσοστό της σύστασής υπολογίζεται μέσω του μοριακού βάρους της Q₁PDMAEA συστάδας και του PnBA-b- Q₁PDMAEA.

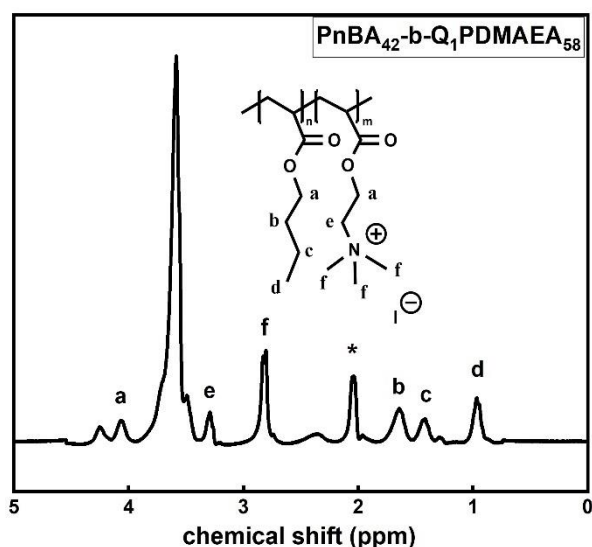
Στα παρακάτω Σχήματα 4.22 και 4.23 παρουσιάζονται ενδεικτικά φάσματα ¹H-NMR των PnBA-b-Q₁PDMAEA συμπολυμερών ύστερα από τις αντιδράσεις χημικής τροποποίησης, στα οποία παρατηρούνται διαφορές ως προς το πλάτος και την ένταση το κορυφών, γεγονός που οφείλεται στη διαφορετική σύσταση των μονομερικών μονάδων που αποτελούν το συμπολυμερές. Οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές της κάθε συστάδας χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό τον υπολογισμό της σύστασης. Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκαν τα –CH₃ υδρογόνα του μεθυλίου που αντιστοιχούν στη συστάδα του PnBA και εμφανίζονται στα 0,9 ppm [106] και τα –CH₃ υδρογόνα των τριών μεθυλίων που αντιστοιχούν στη συστάδα του Q₁PDMAEA και εμφανίζονται περίπου στα 2,84 ppm. [111]

Πίνακας 4.7: Τα μοριακά βάρη και οι συστάσεις των συμπολυμερών PnBA-b-Q₁PDMAEA.

Δείγμα συμπολυμερούς	M _w PnBA (g/mol) SEC	M _w PnBA-b-Q ₁ PDMAEA (g/mol)	M _w QPDMAEA (g/mol)	% wt PnBA	% wt QPDMAEA
PnBA ₂₁ -b-Q ₁ PDMAEA ₇₉	4.000	12.500	9.400	21	79
PnBA ₄₂ -b-Q ₁ PDMAEA ₅₈	7.800	15.300	6.600	42	58



Σχήμα 4.22: Φάσμα ¹H-NMR του συμπολυμερούς PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉ συμπολυμερούς σε Acetone-d₆.

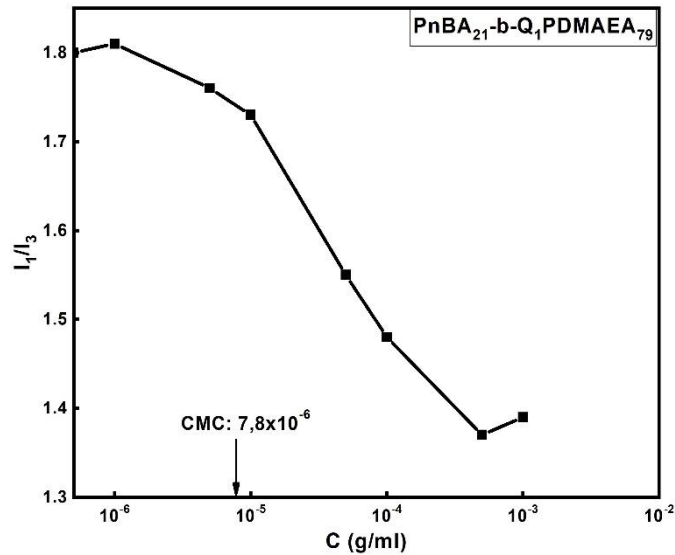


Σχήμα 4.23: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του συμπολυμερούς $\text{PnBA}_{42}\text{-b-Q}_1\text{PDMAEA}_{58}$ συμπολυμερούς σε Acetone-d_6 .

4.10 Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός $\text{PnBA-b-Q}_1\text{PDMAEA}$ συμπολυμερών

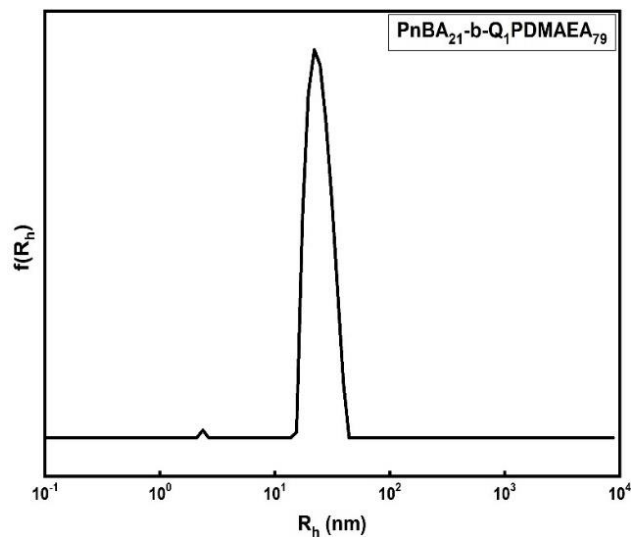
Ο προσδιορισμός της CMC των πολυμερικών μικκυλίων των τροποποιημένων $\text{PnBA-b-Q}_1\text{PDMAEA}$ συμπολυμερών πραγματοποιήθηκε μέσω της τεχνικής FS. Για τις μετρήσεις ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τον προσδιορισμό της CMC των PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών σε κατάλληλη συγκέντρωση $1.0 \times 10^{-3} \text{ g/ml}$.

Ένα χαρακτηριστικό διάγραμμα της κατηγορίας των τροποποιημένων συμπολυμερών φαίνεται στο Σχήμα 4.24. Από το παρακάτω διάγραμμα και τον Πίνακα 4.8 παρατηρείται ότι η CMC του $\text{PnBA}_{21}\text{-b-Q}_1\text{PDMAEA}_{79}$ συμπολυμερούς έχει αυξηθεί κατά δύο τάξεις μεγέθους σε σύγκριση με το διάλυμα του συμπολυμερούς $\text{PnBA}_{40}\text{-b-PDMAEA}_{60}$. Αυτό είναι αναμενόμενο, διότι αυξάνεται η διαλυτότητα, λόγω των φορτισμένων αλυσίδων. Οι ιδιότητες των υδατικών διαλυμάτων των $\text{PnBA}_{21}\text{-b-Q}_1\text{PDMAEA}_{79}$ συμπολυμερών μετρήθηκαν σε διαφορετικές γωνίες, σε συγκέντρωση $1.0 \times 10^{-3} \text{ g/ml}$ και παρουσιάζονται εξίσου στον Πίνακα 4.8.



Σχήμα 4.24: Διάγραμμα της έντασης του λόγου των σχετικών κορυφών I_1 / I_3 του πυρενίου συναρτήσει της συγκέντρωσης για το PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉ συμπολυμερές.

Στο Σχήμα 4.25 δίνεται ενδεικτικό διάγραμμα DLS των πολυμερικών μικκυλίων του PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉ συμπολυμερούς στις 90°. Στο PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉ διάλυμα παρατηρείται έντονα μείωση της ακτίνας και της έντασης σκεδάσεως σε σύγκριση με το διάλυμα του PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀, διότι αυξάνεται η διαλυτότητα του συμπολυμερούς, λόγω των φορτισμένων αμινομάδων του PDMAEA. Τα αποτελέσματα της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, της υδροδυναμικής ακτίνας και του δείκτη πολυδιασποράς του PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉ συμπολυμερούς μετρήθηκαν σε διαφορετικές γωνίες, σε συγκέντρωση 1.0×10^{-3} g/ml και παρουσιάζονται εξίσου στον Πίνακα 4.8.



Σχήμα 4.25: Διάγραμμα κατανομής μεγεθών του PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉ συμπολυμερούς.

Μέσω της τεχνικής ELS προσδιορίστηκε το ζ-δυναμικό του PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉ συμπολυμερούς του οποίου η τιμή του είναι θετική και οφείλεται στην τροποποίηση της αμινομάδας μέσω των αντιδράσεων χημικής τροποποίησης από μερικώς θετικά φορτισμένη αμινομάδα σε μόνιμα θετικά φορτισμένη. Η τιμή του επιφανειακού φορτίου βρίσκεται στον συγκεντρωτικό Πίνακα 4.8.

Πίνακας 4.8: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων DLS, FS και ELS.

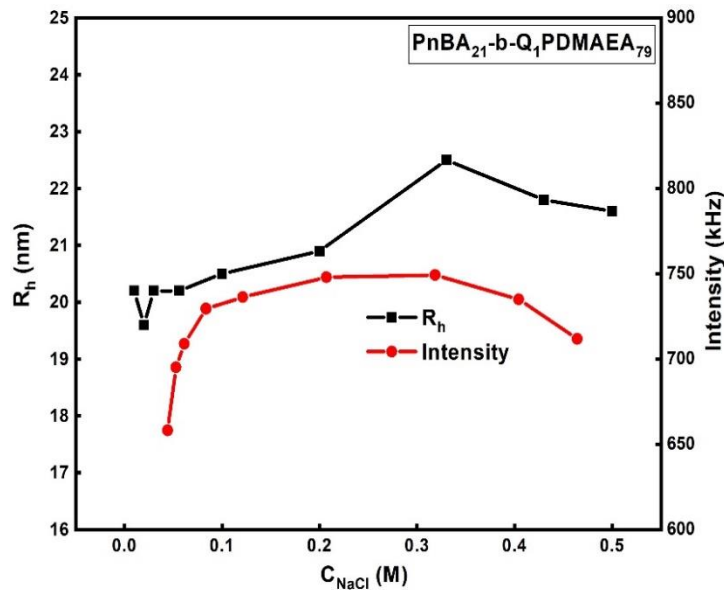
Δείγμα	Intensity (kHz) (DLS)	R _h (nm) (DLS)	PDI (DLS)	CMC (FS)	ζ _{pot} (mV) (ELS)
PnBA ₂₁ -b-Q ₁ PDMAEA ₇₉	637	21	0,241	7,8 x 10 ⁻⁶	+43

4.11 Μελέτη επίδρασης φυσικοχημικών παραμέτρων στα PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉ διαλύματα συμπολυμερών

4.11.1 Μελέτη επίδρασης της ιοντικής ισχύος

Η μελέτη της ιοντικής ισχύος στα υδατικά διαλύματα των PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉ συμπολυμερών πραγματοποιήθηκε με προσθήκη NaCl 1M ακολουθώντας ακριβώς την ίδια διαδικασία που πραγματοποιήθηκε για το PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀. Μέσω της τεχνικής της DLS μετρήθηκαν οι μεταβολές της έντασης και της ακτίνας R_h με την αύξηση της αλατότητας του διαλύματος. Οι μετρήσεις έγιναν σε γωνία 90°, συγκέντρωση διαλύματος 10⁻³ g/ml, pH=7 και σε θερμοκρασία 25°C.

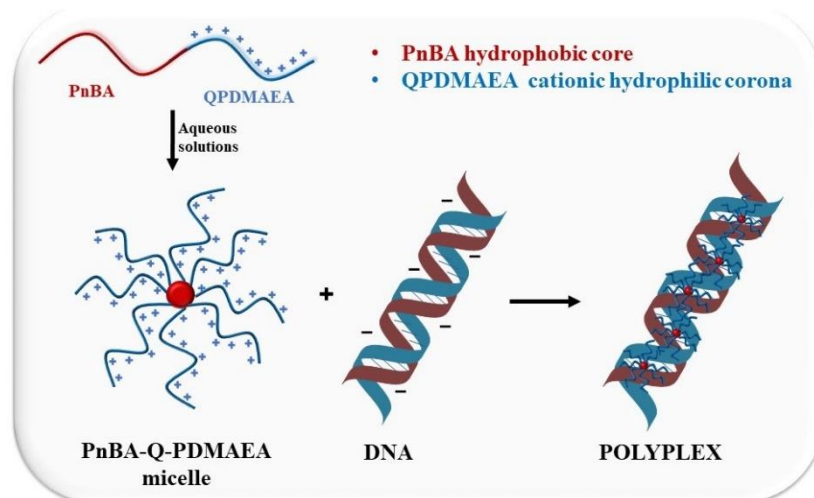
Παρακολουθώντας το Σχήμα 4.26, τα μικκύλια έδειξαν να μη συρρικνώνονται και να παρουσιάζουν σταθερές τιμές της R_h με την αύξηση της ιοντικής ισχύος, ίσως λόγω ηλεκτροστατικών απωθητικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υδρόφιλων αλυσίδων, που δεν αφήνουν να συρρικνωθεί η υδρόφιλη κορώνα.



Σχήμα 4.26: Μεταβολή της ιοντικής ισχύος συναρτήσει R_h και I για $PnBA_{21}$ - b - $Q_1PDMAEA_{79}$ συμπολυμερές.

4.12 Σύμπλεξη $PnBA_{21}$ - b - $Q_1PDMAEA_{79}$ με DNA

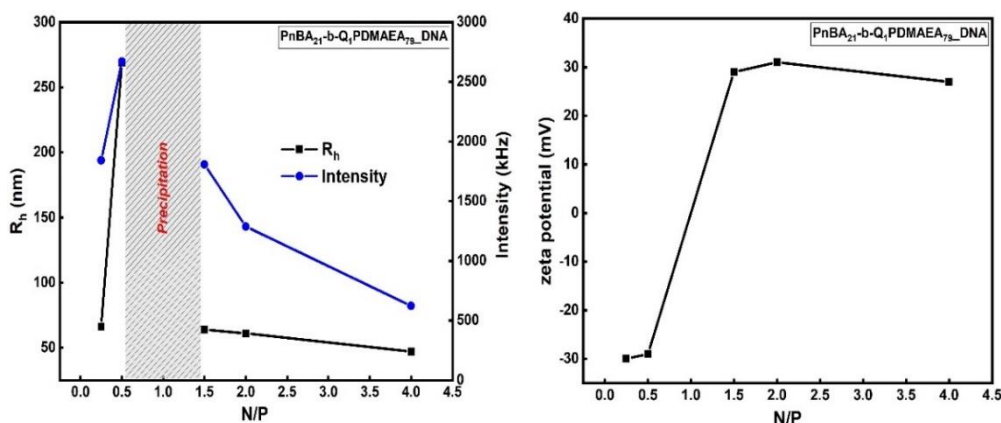
Οι κατιοντικοί πολυηλεκτρολύτες συμπλέκονται με μόρια DNA προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως φορείς γονιδιακής θεραπείας, όπως αναλύθηκε παραπάνω στην περίπτωση του $PnBA_{40}$ - b - $PDMAEA_{60}$ /DNA. Η σύμπλεξη των μορίων γίνεται μέσω της ηλεκτροστατικής σύζευξης των θετικά φορισμένων αμινομάδων του πολυμερούς και των αρνητικά φορισμένων φωσφορικών ομάδων του DNA. Στην παρακάτω Εικόνα 4.8 παρουσιάζεται η σχηματική απεικόνιση της συναρμογής των κατιοντικών συμπολυμερών με το DNA προς σχηματισμό συμπλόκων.



Εικόνα 4.8: Σχηματική απεικόνιση της συναρμογής των $PnBA$ - b - $QPDMMAEA$ συμπολυμερών με το DNA προς σχηματισμό συμπλόκων.

Πραγματοποιήθηκαν μελέτες για την χρήση του PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉ συμπολυμερούς ως φορέα γονιδιακής θεραπείας μέσω σύμπλεξης μορίων DNA στην θετικά φορτισμένη επιφάνεια της κορώνας Q₁PDMAEA των συμπολυμερών. Η συναρμογή του DNA με το κατιοντικό πολυμερές πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές αναλογίες του λόγου N/P. Μεταβάλλοντας το λόγο των διαθέσιμων για ηλεκτροστατική σύζευξη των θετικά φορτισμένων αμινομάδων με τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεοτίδια (φωσφορικές ομάδες) του μορίου του DNA μελετήθηκε η σύμπλεξη του συστήματος, μέσω τεχνικών DLS, ELS, SLS, FS και UV-Vis.

Τα διαλύματα πολυμερούς – συμπλόκου έγιναν σε συγκέντρωση άλατος 0,01 NaCl. Στο παρακάτω Σχήμα 4.27 παρουσιάζονται η επίδραση της μεταβολής του λόγου N/P στην ακτίνα R_h και στην ένταση σκεδάσεως I μέσω της τεχνικής DLS και η επίδραση της μεταβολής του λόγου N/P στο ζ-δυναμικό μέσω της τεχνικής ELS αντίστοιχα για το PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉/DNA συμπολυμερές. Παρατηρείται παρόμοια συμπεριφορά με το PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀/DNA καθώς η ένταση και η ακτίνα μειώνονται με αύξηση του λόγου N/P. Με άλλα λόγια, παρατηρείται σχηματισμός συμπλόκων με μικρότερη μάζα και διαστάσεις με την αύξηση της αναλογίας σε συμπολυμερές. Στο Σχήμα 4.27 για το διάλυμα συμπλόκου - πολυμερούς παρατηρείται ότι για τον λόγο φορτίων N/P γύρω στη τιμή 1 εμφανίζεται καθίζηση. Αυτό οφείλεται στο ότι το DNA που βρίσκεται γύρω από τη κορώνα και ο μικρός σε μέγεθος πυρήνας του PnBA, το κάνουν να μπορεί να προσπελάσει τα φορτία που βρίσκονται κοντά στον πυρήνα με αποτέλεσμα την πλήρη εξουδετέρωση των φορτίων με αποτέλεσμα το σύμπλοκο να καταβυθίζεται.

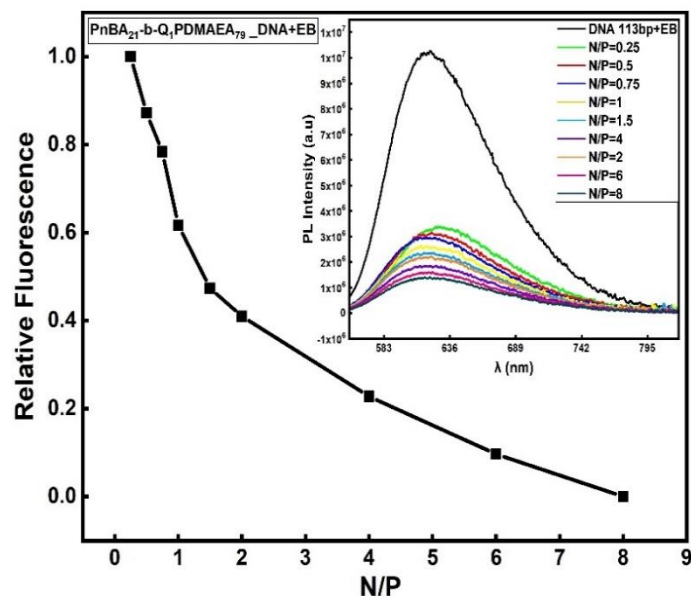


Σχήμα 4.27: Μεταβολή της R_h, έντασης I και ζ-δυναμικού συναρτήσει του λόγου N/P για το σύμπλοκο PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉/DNA.

Μέσω μετρήσεων ELS προσδιορίστηκε η τιμή του ζ-δυναμικού για όλες τις αναλογίες φορτίων N/P. Παρατηρείται ότι σε χαμηλές τιμές N/P τα σωματίδια είναι φορτισμένα αρνητικά, λόγω της παρουσίας περισσότερων φωσφορικών ομάδων του DNA και φορτισμένα θετικά σε μεγαλύτερους λόγους N/P καθώς υπερισχύουν οι θετικά φορτισμένες αμινομάδες.

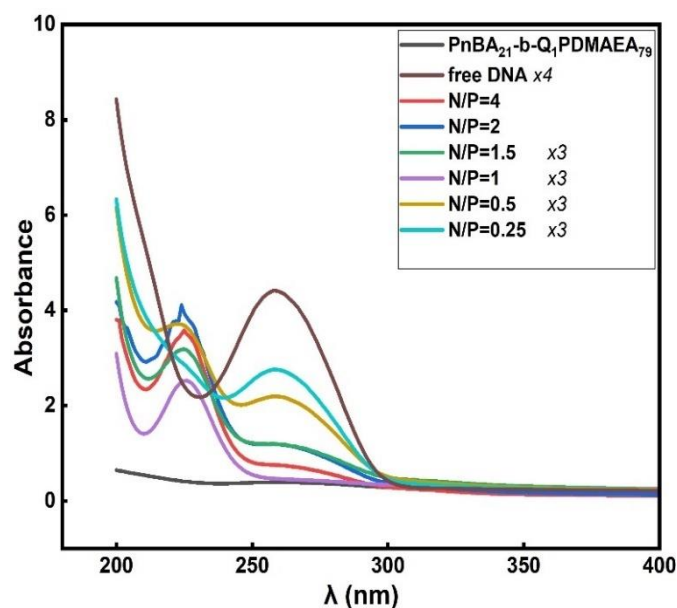
Επιπλέον από μετρήσεις SLS προσδιορίστηκε κατά προσέγγιση η μορφολογία των νανοδομών με τη σύμπλεξη του DNA στις διαφορετικές αναλογίες N/P. Οι τιμές R_g/R_h που προσκομίστηκαν για το συγκεκριμένο δείγμα κυμαίνονται γύρω στο 1, αφήνοντας την υποψία για μορφολογίες κυστιδίων χωρίς να αποκλείονται σφαιρικές μορφολογίες με ιδιαίτερη κατανομή μάζας σε αυτές.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μελέτες FS του βρωμιούχου αιθιδίου, όπως αναλύθηκε με την περίπτωση του PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀/DNA συμπλόκου. [73, 120] Στο Σχήμα 4.28 παρατίθεται το διάγραμμα απόσβεσης φθορισμού, καθώς και τα αντίστοιχα φάσματα για το σύμπλοκο EtBr/DNA υπό αλληλεπίδραση με το PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉ συμπολυμερές σε διαφορετικούς λόγους N/P. Οι μετρήσεις FS πραγματοποιούνται αμέσως μετά τη παρασκευή των συμπλόκων και άρα οι δομές αυτές μπορεί να μην είναι δομές ισορροπίας. Παρατηρείται έντονη συμπλοκοποίηση/αλληλεπίδραση με το DNA με γρηγορότερο ρυθμό αποσυγκόλλησης των μορίων του EB σε σχέση με το PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀/DNA συμπλόκο που μελετήθηκε προηγουμένως. Υπάρχει μία γρηγορότερη μείωση της έντασης φθορισμού σε σχέση με το PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀/DNA συμπλόκο, η οποία δηλώνει ικανή σύμπλεξη με DNA, κάτι που επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα των προηγούμενων μετρήσεων.



Σχήμα 4.28: Διάγραμμα απόσβεσης φθορισμού και αντίστοιχων φασμάτων που περιγράφουν την αλληλεπίδραση EtBr/DNA με το σύμπλοκο PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉/DNA.

Η τεχνική της UV-vis χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη σύμπλεξης του κατιοντικού πολυμερούς με μόρια DNA. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το μη δεσμευμένο DNA παρουσιάζει χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης λ_{max} , η ένταση της οποίας μειώνεται και εμφανίζεται μια νέα κορυφή σε μικρότερα μήκη κύματος όταν αυτό συμπλέκεται με κατιοντικά πολυμερή που αποδίδεται στο συμπλεγμένο DNA. Η ύπαρξη και των δυο κορυφών οφείλεται μάλλον στην ταυτόχρονη παρουσία δεσμευμένου και μη συμπλεγμένου DNA [120]. Στο Σχήμα 4.29 παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης του δείγματος PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉/DNA σε αναλογίες N/P από 0.25 έως 4, όπου παρατηρείται σύμπλεξη με τις αρνητικές φωσφορικές ομάδες του DNA σε όλους τους λόγους N/P εκτός των 0.5 και 0,25 σε $\lambda=260\text{nm}$, όπου έχουμε περίσσεια φωσφορικών ομάδων και φαίνεται να υπάρχει ελεύθερο DNA. Οι λόγοι N/P=0,25, 0,5, 1, 1,5 και του DNA αραιώθηκαν σε διάλυμα NaCl 0.01 M προκειμένου να επέλθει απορρόφηση κάτω του 4 και να προσδιοριστεί η τιμή του $\lambda_{max}=260\text{ nm}$.



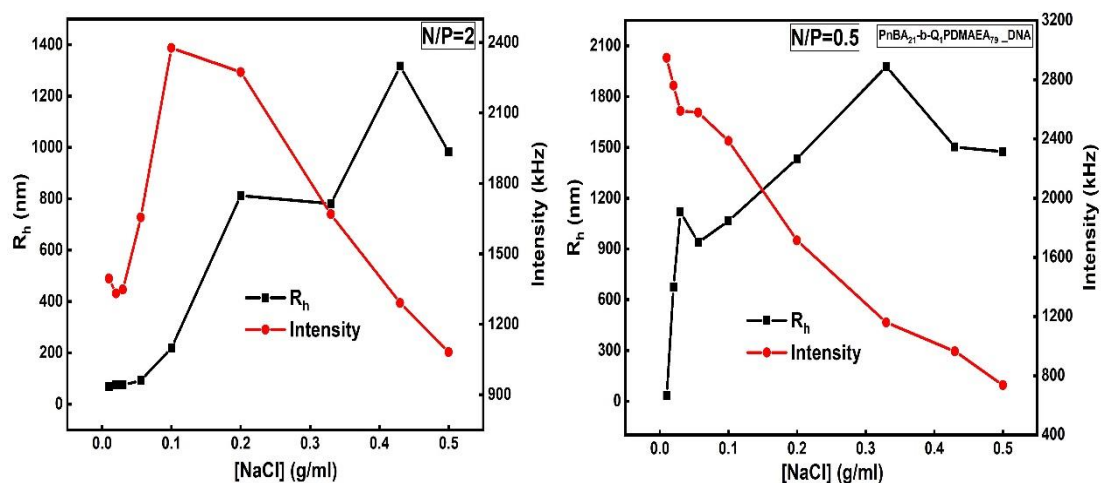
Σχήμα 4.29: Φάσματα απορρόφησης υπεριώδους για το δείγμα PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉/DNA σε αναλογίες N/P από 0.25 έως 4.

4.12.1 Μελέτη επίδρασης ιοντικής ισχύος στα PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉/DNA σύμπλοκα

Τα κατιοντικά σύμπλοκα μελετήθηκαν με διαφορετικούς λόγους N/P ως προς την επίδραση που έχει η αύξηση της ιοντικής ισχύος στη συμπεριφορά τους στο διάλυμα ακολουθώντας την ίδια διαδικασία που αναλύθηκε στην περίπτωση του PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀/DNA συμπλόκου. Οι μετρήσεις έγιναν σε γωνία 90°, αρχική συγκέντρωση διαλύματος της τάξης των 10⁻³ g/ml, pH = 7 και σε θερμοκρασία 25°C.

Για τις μετρήσεις επίδρασης της ιοντικής ισχύος επιλέχθηκαν διαλύματα δυο διαφορετικών λόγων N/P για την κάθε σειρά συμπλόκων από αυτά που εμφάνιζαν μεγαλύτερη σταθερότητα με το πέρασμα του χρόνου. Στο Σχήμα 4.30 παρουσιάζονται οι μεταβολές έντασης και ακτίνας R_h με την αύξηση της ιοντικής ισχύος του συμπλόκου για τους λόγους φορτίων N/P = 2 και N/P = 0,5. Από τα διαγράμματα και για τους δυο λόγους φορτίων, παρατηρείται παρόμοια συμπεριφορά με το προαναφερθέν σύμπλοκο PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀/DNA. Με την αύξηση της ιοντικής ισχύος μειώνεται η μάζα και αυξάνονται οι διαστάσεις. Η μείωση της έντασης σηματοδοτεί τη μείωση του συμπλόκου σε μάζα συνεπώς και την αποσύνθεσή του. Με την αύξηση της ακτίνας φαίνεται ότι

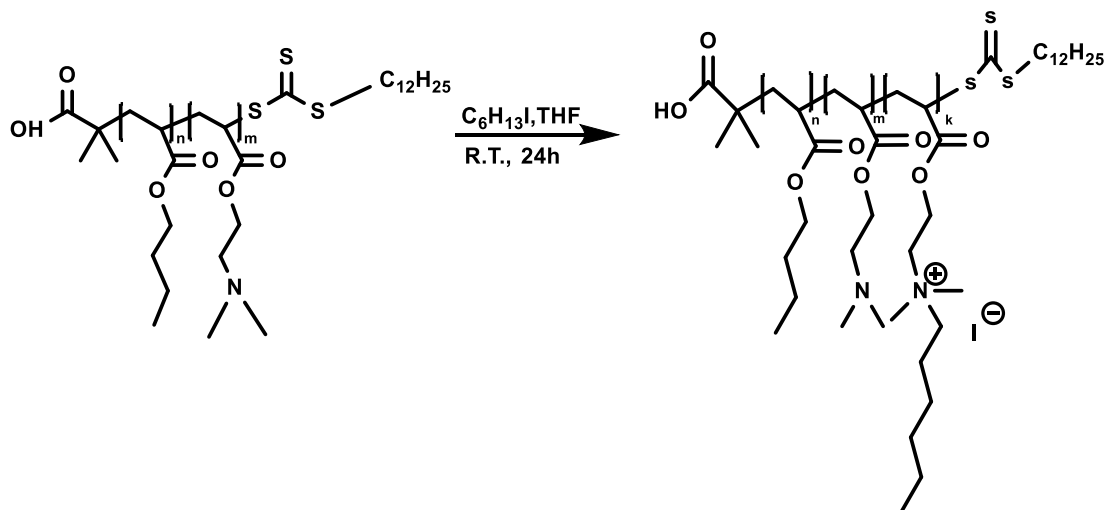
απελευθερώνονται τα φορτία που ήταν αρχικά συμπλεγμένα μιας και το σύστημα τώρα είναι πιο διαλυτό και μπορεί να εγκλωβίσει περισσότερο νερό.



Σχήμα 4.30: Διάγραμμα εξάρτησης της R_h και της I από την επίδραση της μεταβολής των λόγων N/P για το σύμπλοκο PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉/DNA.

4.13 Σύνθεση PnBA-b-Q₆PDMAEA συμπολυμερών

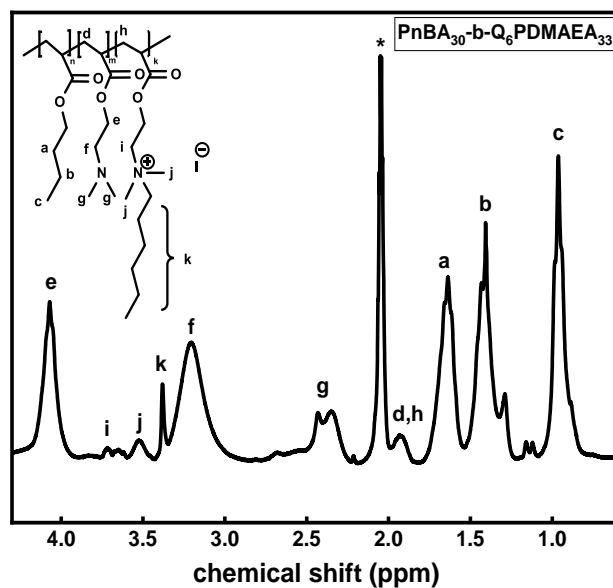
Στα συμπολυμερή PnBA-b-PDMAEA που συντέθηκαν πραγματοποιήθηκε 25% μετατροπή της τριτοταγούς αμίνης της συστάδας του PDMAEA με το αντιδραστήριο C₆H₁₃I. Σε διάλυμα πολυμερούς σε THF υπό ανάδευση προστέθηκε περίσσεια C₆H₁₃I και η τριτοταγής αμίνη μετατράπηκε σε τεταρτοταγές άλας αμμωνίου. Στη περίπτωση αυτή το σύστημα έχει πιο υδρόφοβο χαρακτήρα από το PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉ και το PDMAEA από έναν ασθενή μετατρέπεται σε έναν ισχυρό κατιοντικό πολυηλεκτρολύτη. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες. Στην Εικόνα 4.9 απεικονίζεται η αντίδραση τεταρτοταγοποίησης της αμίνης και η δημιουργία του νέου συμπολυμερούς.



Εικόνα 4.9: Αντίδραση τεταρτοταγοποίησης της αμίνης του PDMAEA (25%) και σύνθεση του νέου PnBA-b-Q₆PDMAEA συμπολυμερούς.

Με την προσθήκη του $C_6H_{13}I$ στο διάλυμα του πολυμερούς σε THF και με την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το διάλυμα άλλαξε εμφάνιση ως προς τη μορφή του καθώς προστέθηκαν έξι άνθρακες στην πλευρική αλυσίδα του συμπολυμερούς και το διάλυμα φάνηκε αρκετά πιο πηκτό. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός γέλης εξαιτίας της τεταρτοταγοποίησης της αμίνης, όπου το πολυμερές παύει πια να είναι διαλυτό στο THF.

Η σύσταση και το μοριακό βάρος των συμπολυμερών με τροποποιημένη την αμινομάδα από τριτοταγή σε τεταρτοταγή προσδιορίστηκε από το μοριακό βάρος και τις κατά βάρος συστάσεις των συμπολυμερών PnBA-b-PDMAEA που υπολογίστηκαν από τα φάσματα 1H -NMR και από SEC όπως ακριβώς αναλύθηκε παραπάνω στη σύνθεση των PnBA-b-Q₁PDMAEA συμπολυμερών. Οι τιμές αυτές βρίσκονται καταγεγραμμένες στο Πίνακα 4.9. Ένα ενδεικτικό φάσμα του Σχήματος 4.31 για το PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀ συμπολυμερές δίνεται παρακάτω. Οι χαρακτηριστικές κορυφές της κάθε συστάδας που χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό τον υπολογισμό της σύστασης ήταν τα $-CH_3$ υδρογόνα του μεθυλίου που αντιστοιχούν στη συστάδα του PnBA και εμφανίζονται στα 0,9 ppm (c κορυφή) [106], τα $-CH_3$ υδρογόνα του ενός μεθυλίου που αντιστοιχεί στη συστάδα του PDMAEA και εμφανίζεται περίπου στα 4,07 ppm (e κορυφή) [56] και τα $-CH_3$ υδρογόνα των δύο μεθυλίων που αντιστοιχούν στη συστάδα του Q₆PDMAEA και εμφανίζονται περίπου στα 3,53 ppm (j κορυφή). [109]



Σχήμα 4.31: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του συμπολυμερούς $\text{PnBA}_{21}\text{-b-Q}_1\text{PDMAEA}_{79}$ συμπολυμερούς σε Acetone-d_6 .

Πίνακας 4.9: Τα μοριακά βάρη και οι συστάσεις των συμπολυμερών $\text{PnBA-b-Q}_6\text{PDMAEA}$.

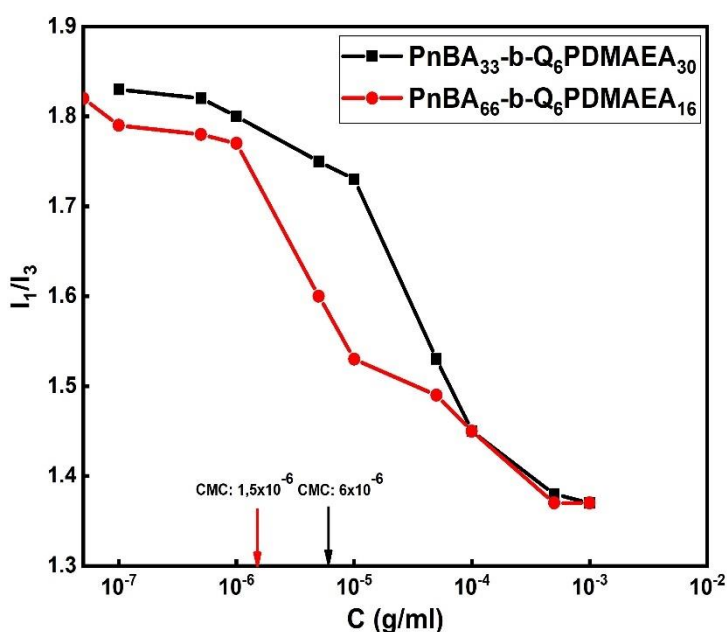
Δείγμα	M_w $\text{PnBA-b-Q}_6\text{PDMAEA}$ (g/mol)	M_w PDMAEA (g/mol)	M_w Q_6PDM AEA (g/mol)	% PnBA	% PDMAEA	% Q_6PDMAEA
$\text{PnBA}_{33}\text{-b-Q}_6\text{PDMAEA}_{30}$	9.500	3.500	2.800	33	37	30
$\text{PnBA}_{66}\text{-b-Q}_6\text{PDMAEA}_{16}$	13.300	2400	2100	66	18	16

4.14 Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός $\text{PnBA-b-Q}_6\text{PDMAEA}$ συμπολυμερών

Ο προσδιορισμός της CMC των πολυμερικών μικκυλίων των τροποποιημένων $\text{PnBA-b-Q}_6\text{PDMAEA}$ συμπολυμερών διεξάχθηκε μέσω της τεχνικής FS. Για τις μετρήσεις ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της CMC των προηγούμενων συμπολυμερών σε κατάλληλη συγκέντρωση 1.0×10^{-3} g/ml. Ένα χαρακτηριστικό διάγραμμα της κατηγορίας των τροποποιημένων συμπολυμερών φαίνεται στο Σχήμα 4.32.

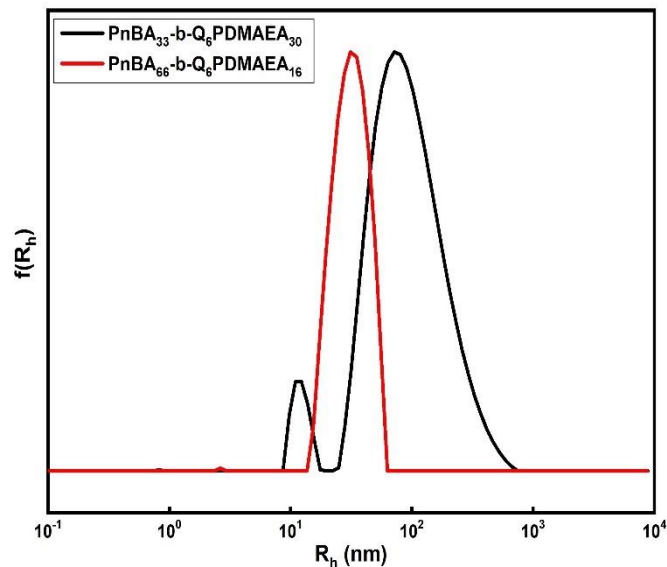
Από το παρακάτω συγκριτικό διάγραμμα του Σχήματος 4.32 και τον Πίνακα 4.10 παρατηρείται ότι η CMC του $\text{PnBA}_{33}\text{-b-Q}_6\text{PDMAEA}_{30}$

συμπολυμερούς έχει μειωθεί κατά μία τάξη μεγέθους σε σύγκριση με το διάλυμα του συμπολυμερούς PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉, διότι μειώνεται η διαλυτότητα λόγω των έξι ανθράκων που προστίθενται στις αλυσίδες και καθιστά το σύστημα πιο υδρόφοβο. [118] Παρ'όλα αυτά παραμένει αυξημένη η τιμή της CMC σε σχέση με το PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀, καθώς αυξάνεται η διαλυτότητα λόγω των φορτισμένων αλυσίδων. Επιπλέον, παρατηρείται ξεκάθαρη μείωση της CMC στην περίπτωση του PnBA₆₆-b-Q₆PDMAEA₁₆, λόγω της αυξημένης σε ποσοστό συστάδας του PnBA.



Σχήμα 4.32: Συγκριτικό διάγραμμα της έντασης του λόγου των κορυφών I_1 / I_3 του πυρενίου συναρτήσει της συγκέντρωσης για τα PnBA-b-Q₆PDMAEA συμπολυμερή.

Οι ιδιότητες των υδατικών διαλυμάτων των PnBA-b-Q₆PDMAEA συμπολυμερών μελετήθηκαν μέσω της τεχνικής DLS. Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν με απευθείας διαλυτοποίηση του πολυμερούς σε νερό. Τα αποτελέσματα της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, της υδροδυναμικής ακτίνας και του δείκτη πολυδιασποράς των PnBA-b-Q₆PDMAEA συμπολυμερών μετρήθηκαν σε διαφορετικές γωνίες, σε συγκεντρώσεις 1.0×10^{-3} g/ml και παρουσιάζονται στο συγκριτικό διάγραμμα του Σχήματος 4.33 και εξίσου στον Πίνακα 4.10. Τα PnBA₆₆-b-Q₆PDMAEA₁₆ συμπολυμερή παρουσιάζουν μία κορυφή με μικρότερες διαστάσεις σε σχέση με τα PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀ συμπολυμερή, πιθανόν λόγω της μειωμένης διαλυτότητας τους καθώς περιέχουν μικρότερο ποσοστό κατιοντικής υδρόφιλης κορώνας.



Σχήμα 4.33: Συγκριτικό διάγραμμα κατανομής μεγεθών των PnBA-b-Q₆PDMAEA συμπολυμερών.

Ωστόσο, στα PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀ παρατηρούνται συσσωματώματα μεγαλύτερης ακτίνας σε σχέση με το PnBA₂₁-b-Q₁PDMAEA₇₉ συμπολυμερές, λόγω του ότι το σύστημα καθίσταται πιο υδρόφοβο με την ύπαρξη των έξι ανθράκων στην πλευρική αλυσίδα του συμπολυμερούς. Σε σύγκριση όμως με το PnBA₄₀-b-PDMAEA₆₀ συμπολυμερές η τιμή της ακτίνας παρατηρείται σαφώς μικρότερη καθώς αυξάνεται η διαλυτότητα του συμπολυμερούς, λόγω των θετικά φορτισμένων ομάδων του Q₆PDMAEA.

Μέσω της τεχνικής ELS προσδιορίστηκε το ζ-δυναμικό των PnBA-b-Q₆PDMAEA συμπολυμερών των οποίων οι τιμές του είναι θετικές και οφείλεται στην τροποποίηση της αμινομάδας μέσω των αντιδράσεων χημικής τροποποίησης από μερικώς θετικά φορτισμένη αμινομάδα σε μόνιμα θετικά φορτισμένη. Οι τιμές των επιφανειακών φορτίων βρίσκονται στο συγκεντρωτικό Πίνακα 4.10.

Μέσω της τεχνικής SLS υπολογίσθηκαν οι τιμές της γυροσκοπικής ακτίνας (R_g), και κατ' επέκταση οι λόγοι R_g/R_{h0} , οι τιμές των οποίων βρίσκονται στο συγκεντρωτικό Πίνακα 4.10.

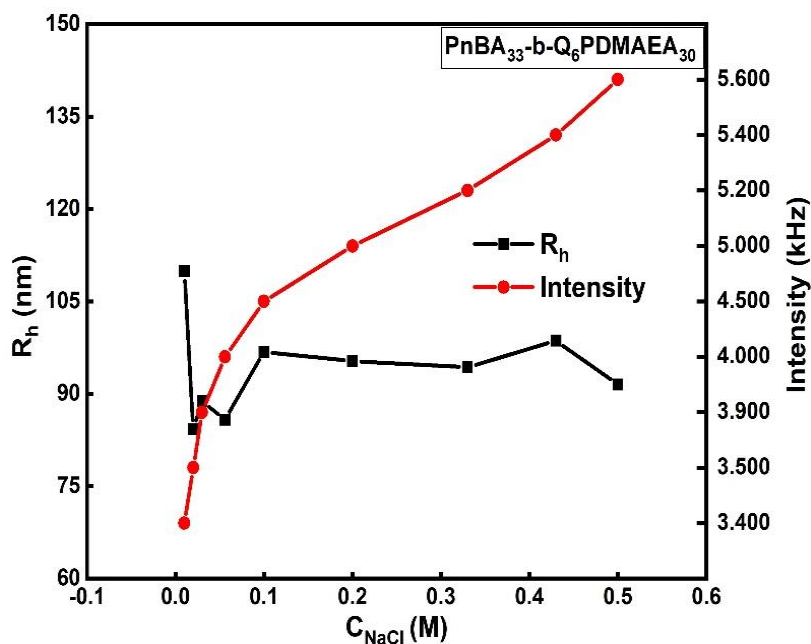
Πίνακας 4.10: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων DLS, SLS, FS και ELS.

Δείγμα	Intensity (kHz) (DLS)	R_h (nm) (DLS)	R_g (nm) (SLS)	R_g / R_{h0}	CMC (FS)	ζ_{pot} (mV) (ELS)
PnBA ₃₃ -b-Q ₆ PDMAEA ₃₀	2.508	93	351	1,99	6 x 10 ⁻⁶	+10
PnBA ₆₆ -b-Q ₆ PDMAEA ₁₆	1.585	31	50	1,67	1,5 x 10 ⁻⁶	+5

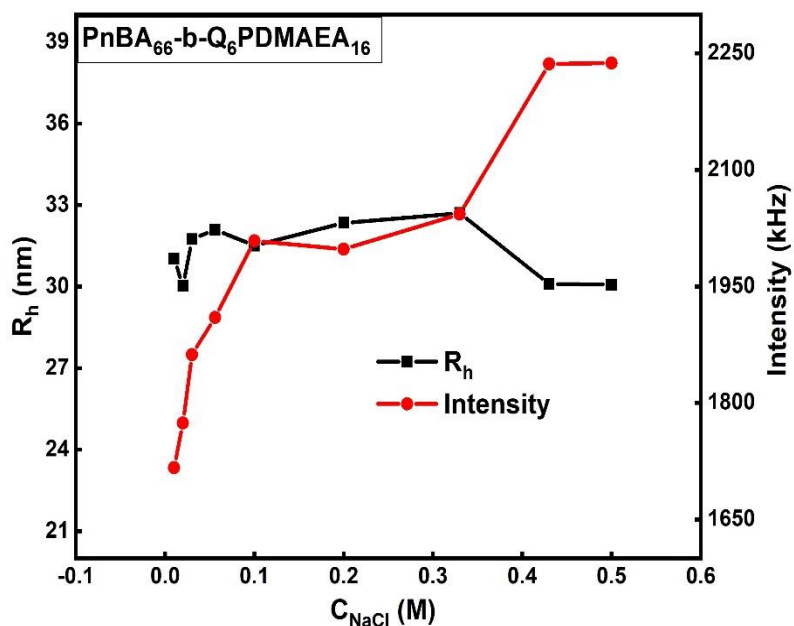
4.15 Μελέτη επίδρασης φυσικοχημικών παραμέτρων στα PnBA-b-Q₆PDMAEA διαλύματα συμπολυμερών

4.15.1 Μελέτη επίδρασης της ιοντικής ισχύος

Η μελέτη της ιοντικής ισχύος στα υδατικά διαλύματα των PnBA-b-Q₆PDMAEA συμπολυμερών πραγματοποιήθηκε με προσθήκη NaCl 1M ακολουθώντας ακριβώς την ίδια διαδικασία που πραγματοποιήθηκε για τα προηγούμενα συμπολυμερή. Μέσω της τεχνικής της DLS μετρήθηκαν οι μεταβολές της έντασης και της ακτίνας R_h με την αύξηση της αλατότητας του διαλύματος. Οι μετρήσεις έγιναν σε γωνία 90°, συγκέντρωση διαλύματος της τάξης των 10⁻³ g/ml, pH=7 και σε θερμοκρασία 25°C. Παρακολουθώντας τα Σχήματα 4.34 και 4.35 βλέπουμε παρόμοια συμπεριφορά, όπου παρατηρείται αύξηση της μάζας των σωματιδίων καθώς αυξάνεται σταδιακά η ένταση σκεδάσεως με την προσθήκη άλατος. Τα μικκύλια έδειξαν να μην συρρικνώνονται και να παρουσιάζουν σχετικά σταθερές τιμές της R_h με την αύξηση της ιοντικής ισχύος, ίσως λόγω μερικής συρρίκνωσης της υδρόφιλης κορώνας. Ομολογουμένως οι αλλαγές στην ένταση δεν είναι μεγάλες δηλώνοντας σχετικά μικρή τάση για συσσωμάτωση με αύξηση της ιοντικής ισχύος.



Σχήμα 4.35: Μεταβολή της ιοντικής ισχύος συναρτήσει R_h και I για το PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀ συμπολυμερές.



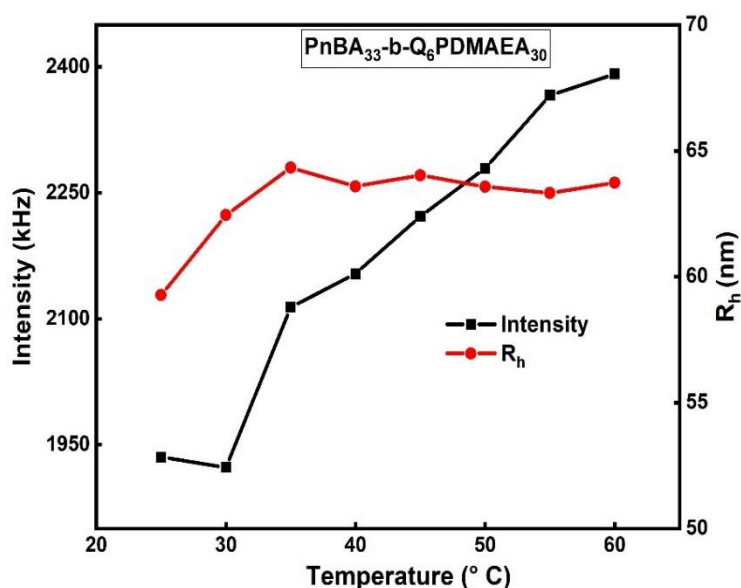
Σχήμα 4.34: Μεταβολή της ιοντικής ισχύος συναρτήσει R_h και I για PnBA₆₆-b-Q₆PDMAEA₁₆ συμπολυμερές.

4.15.2 Μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας

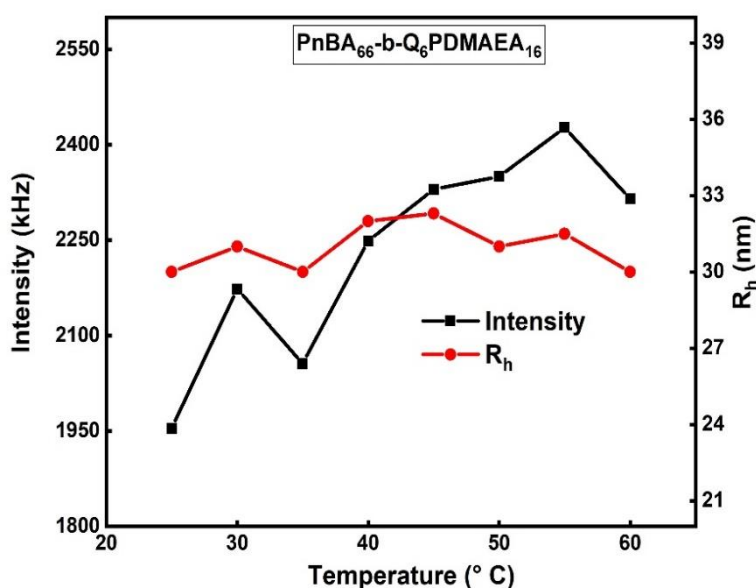
Η επίδραση της θερμοκρασίας μελετήθηκε στα υδατικά διαλύματα των αμφίφιλων PnBA-b-Q₆PDMAEA συμπολυμερών με τη χρήση της τεχνικής DLS. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στις 90°, σε συγκέντρωση διαλύματος της τάξης των 10⁻³ g/ml, pH=7 και σε ένα εύρος θερμοκρασιών των 25° C - 60° C.

Προσδιορίστηκε η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας και η υδροδυναμική ακτίνα με την μεταβολή της θερμοκρασίας.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα διαγράμματα των Σχημάτων 4.36 και 4.37 για τα διαλύματα των PnBA-b-Q₆PDMAEA συμπολυμερών. Το δεύτερο σύστημα δεν ανταποκρίνεται σημαντικά στην επίδραση της θερμοκρασίας, ενώ το σύστημα PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀ υποδεικνύει μία πιο αξιοσημείωτη αύξηση της μάζας των σωματιδίων με μικρή αύξηση της ακτίνας. Σε οποιαδήποτε περίπτωση οι αλλαγές δεν είναι δραματικές.



Σχήμα 4.37: Μεταβολή της θερμοκρασίας συναρτήσει R_h και I για PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀ συμπολυμερές.



Σχήμα 4.36: Μεταβολή της θερμοκρασίας συναρτήσει R_h και I για PnBA₆₆-b-Q₆PDMAEA₁₆ συμπολυμερές.

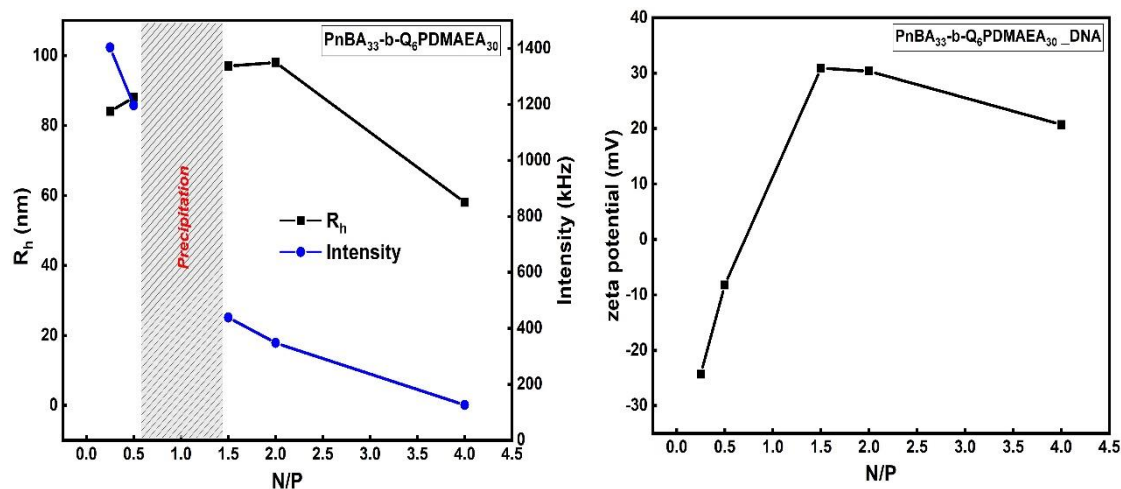
4.16 Σύμπλεξη PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀ με DNA

Μελέτες σύμπλεξης με μόρια DNA πραγματοποιήθηκαν και για τους κατιοντικούς PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀ πολυηλεκτρολύτες προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως φορείς γονιδιακής θεραπείας. Η σύμπλεξη των μορίων γίνεται μέσω της ηλεκτροστατικής σύζευξης των θετικά φορτισμένων αμινομάδων του πολυμερούς και των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του DNA. Η συναρμογή του DNA με το κατιοντικό πολυμερές πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές αναλογίες του λόγου N/P ακολουθώντας την ίδια διαδικασία που αναλύθηκε με τα προηγούμενα συμπολυμερή. Η σύμπλεξη του συστήματος μελετήθηκε μέσω πληθώρα τεχνικών όπως DLS, ELS, SLS, FS και UV-vis.

Τα διαλύματα πολυμερούς – συμπλόκου έγιναν σε συγκέντρωση άλατος 0,01 NaCl. Στο παρακάτω Σχήμα 4.38 παρουσιάζονται η επίδραση της μεταβολής του λόγου N/P στην ακτίνα R_h και στην ένταση σκεδάσεως I μέσω της τεχνικής DLS και η επίδραση της μεταβολής του λόγου N/P στο ζ-δυναμικό μέσω της τεχνικής ELS αντίστοιχα για το PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀/DNA συμπολυμερές.

Παρατηρείται ότι η ένταση μειώνεται με αύξηση του λόγου N/P και η ακτίνα αυξάνεται. Με άλλα λόγια, παρατηρείται σχηματισμός συμπλόκων με μικρότερη μάζα και μεγαλύτερες διαστάσεις με την αύξηση της αναλογίας σε συμπολυμερές μέχρι τον λόγο N/P=2. Στο Σχήμα 4.38 για το διάλυμα συμπλόκου - πολυμερούς παρατηρείται ότι για τον λόγο φορτίων N/P γύρω στη τιμή 1 εμφανίζεται καθίζηση. Αυτό οφείλεται στο ότι το DNA που βρίσκεται γύρω από τη κορώνα και ο μικρός σε μέγεθος πυρήνας του PnBA, το κάνουν να μπορεί να προσπελάσει τα φορτία που βρίσκονται κοντά στον πυρήνα με αποτέλεσμα την αποδοτική εξουδετέρωση των φορτίων και την καταβύθιση των συμπλόκων.

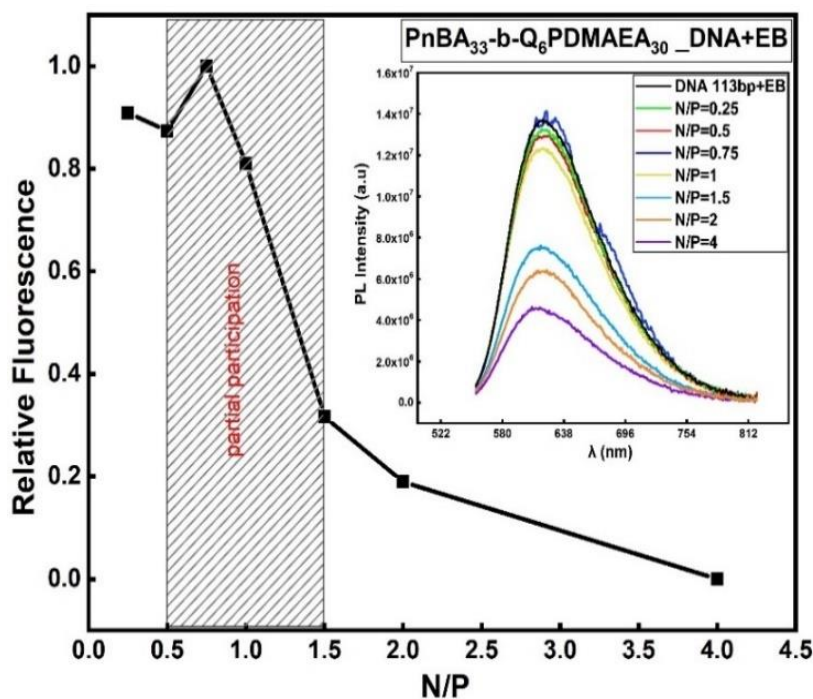
Μέσω μετρήσεων ELS προσδιορίστηκε η τιμή του ζ-δυναμικού για όλες τις αναλογίες φορτίων N/P. Παρατηρείται ότι σε χαμηλές τιμές N/P τα σωματίδια είναι φορτισμένα αρνητικά, λόγω της παρουσίας περισσότερων φωσφορικών ομάδων του DNA και φορτισμένα θετικά σε μεγαλύτερους λόγους N/P, καθώς υπερισχύουν οι θετικά φορτισμένες αμινομάδες.



Σχήμα 4.38: Μεταβολή της R_h , έντασης I και ζ-δυναμικού συναρτήσει του λόγου N/P για το σύμπλοκο PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀/DNA.

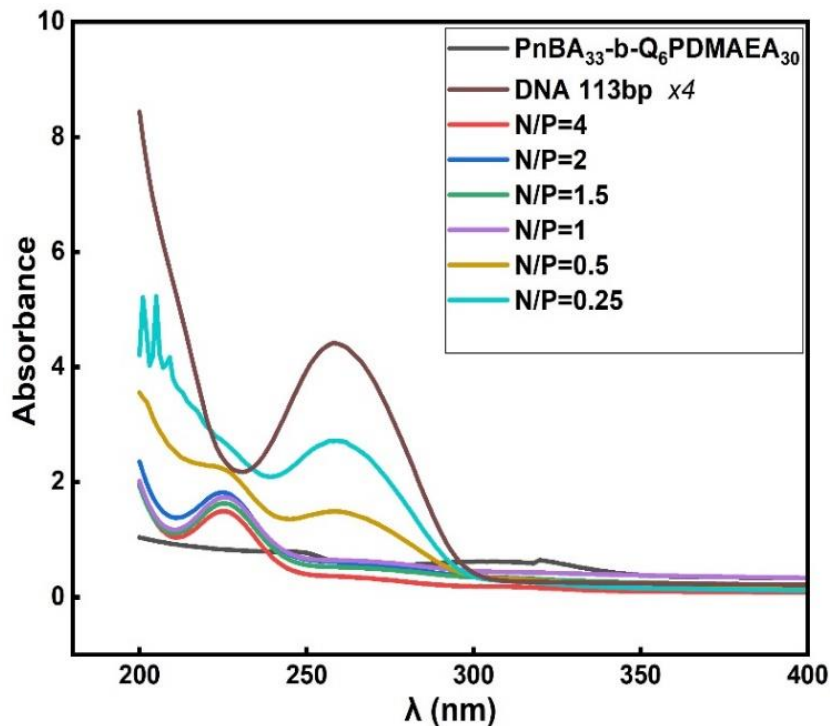
Επιπλέον από μετρήσεις SLS προσδιορίστηκε κατά προσέγγιση η μορφολογία των νανοδομών με τη σύμπλεξη του DNA στις διαφορετικές αναλογίες N/P . Οι τιμές R_g/R_h που προσκομίστηκαν για το συγκεκριμένο δείγμα κυμαίνονται γύρω στο 1, αφήνοντας την υποψία για μορφολογίες κυστιδίων ή άλλων σφαιρικών μορφολογιών.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μελέτες FS του βρωμιούχου αιθιδίου όπως αναλύθηκε με τα προηγούμενα σύμπλοκα. [73, 120] Στο Σχήμα 4.39 παρατίθεται το διάγραμμα απόσβεσης φθορισμού, καθώς και τα αντίστοιχα φάσματα για το σύμπλοκο EtBr/DNA υπό αλληλεπίδραση με το PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀ συμπολυμερές σε διαφορετικούς λόγους N/P . Οι μετρήσεις FS πραγματοποιούνται αμέσως μετά την παρασκευή των συμπλόκων και άρα οι δομές αυτές μπορεί να μην είναι δομές ισορροπίας. Παρατηρείται έντονη συμπλοκοποίηση/αλληλεπίδραση με το DNA με πολύ γρηγορότερο ρυθμό αποσυγκόλλησης των μορίων του EB σε σχέση με προηγούμενα σύμπλοκα που μελετήθηκαν προηγουμένως. Υπάρχει μία πολύ γρήγορη μείωση της έντασης φθορισμού σε σχέση με τα προηγούμενα σύμπλοκα κάτι που επιβεβαιώνει την ικανότητα σύμπλεξης του συμπολυμερούς με μόρια DNA, αλλά και την πιθανή επίδραση υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.



Σχήμα 4.39: Διάγραμμα απόσβεσης φθορισμού και αντίστοιχων φασμάτων που περιγράφουν την αλληλεπίδραση EtBr/DNA με το σύμπλοκο PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀/DNA. Η γραμμοσκιασμένη περιοχή αντιστοιχεί σε αναλογίες που οδηγούν σταδιακά σε καταβύθιση των συμπλόκων.

Η τεχνική της UV-vis χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη σύμπλεξης του κατιοντικού πολυμερούς με μόρια DNA. [120] Στο Σχήμα 4.40 παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης του δείγματος PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀/DNA σε αναλογίες N/P από 0.25 έως 4, όπου παρατηρείται ισχυρή σύμπλεξη με τις αρνητικές φωσφορικές ομάδες του DNA σε όλους τους λόγους N/P εκτός των 0.5 και 0,25 σε λ=260nm, όπου έχουμε περίσσεια φωσφορικών ομάδων και φαίνεται να υπάρχει ελεύθερο DNA σε λ_{max}=260 nm.



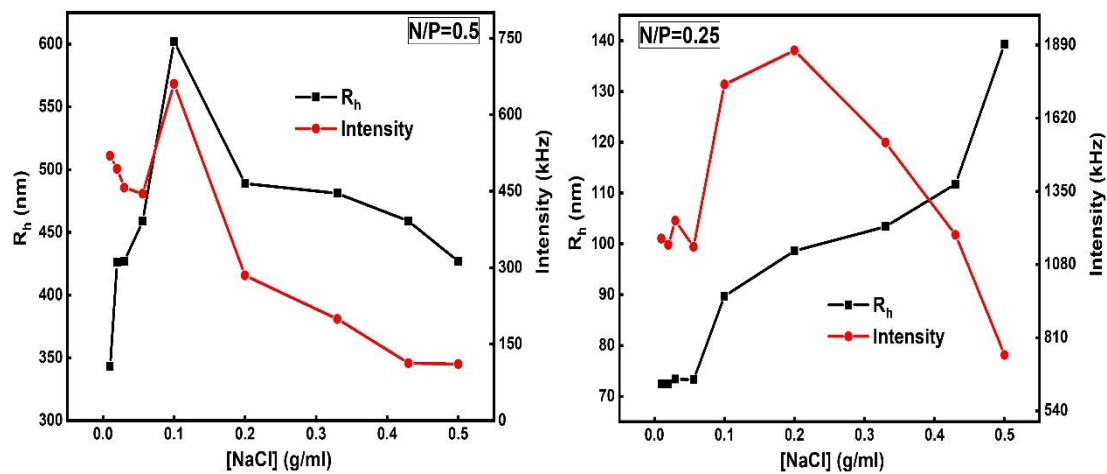
Σχήμα 4.40: Φάσματα απορρόφησης υπεριώδους για το δείγμα PnBA₃₃-b-Q₆PDMAEA₃₀/DNA σε αναλογίες N/P από 0.25 έως 4.

4.16.1 Μελέτη επίδρασης ιοντικής ισχύος στα PnBA-b-Q₆PDMAEA/DNA σύμπλοκα

Τα κατιοντικά σύμπλοκα μελετήθηκαν με διαφορετικούς λόγους N/P ως προς την επίδραση που έχει η αύξηση της ιοντικής ισχύος στη συμπεριφορά τους στο διάλυμα ακολουθώντας την ίδια διαδικασία που αναλύθηκε στα παραπάνω σύμπλοκα. Οι μετρήσεις έγιναν σε γωνία 90°, αρχική συγκέντρωση διαλύματος της τάξης των 10⁻³ g/ml, pH = 7 και σε θερμοκρασία 25°C.

Για τις μετρήσεις επίδρασης της ιοντικής ισχύος επιλέχθηκαν διαλύματα δυο διαφορετικών λόγων N/P για την κάθε σειρά συμπλόκων από αυτά που εμφάνιζαν μεγαλύτερη σταθερότητα με το πέρασμα του χρόνου. Στο Σχήμα 4.41 παρουσιάζονται οι μεταβολές έντασης και ακτίνας R_h με την αύξηση της ιοντικής ισχύος του συμπλόκου για τους λόγους φορτίων N/P = 0,5 και N/P = 0,25. Από τα διαγράμματα και για τους δυο λόγους φορτίων, παρατηρείται παρόμοια συμπεριφορά με τα προηγούμενα σύμπλοκα. Με την αύξηση της ιοντικής ισχύος μειώνεται η μάζα και αυξάνονται οι διαστάσεις. Η μείωση της έντασης σηματοδοτεί τη μείωση του συμπλόκου σε μάζα συνεπώς και την αποσύνθεσή του. Με την αύξηση της ακτίνας φαίνεται ότι απελευθερώνονται τα φορτία που

ήταν αρχικά συμπλεγμένα μιας και το σύστημα τώρα είναι πιο διαλυτό και μπορεί να εγκλωβίσει περισσότερο νερό.



Σχήμα 4.41: Διάγραμμα εξάρτησης της R_h και της I από την επίδραση της μεταβολής των λόγων N/P για το σύμπλοκο $PnBA_{33}-b-Q_6PDMAEA_{30}/DNA$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ολοκληρώνοντας την παρούσα ερευνητική εργασία τα συμπεράσματα που αποκομίστηκαν περιλαμβάνουν σε πρώτο επίπεδο την επιτυχή σύνθεση των αμφίφιλων συμπολυμερών PnBA-b-PDMAEA και PnBA-b-POEGA μέσω της τεχνικής πολυμερισμού RAFT, σε διαφορετικά μοριακά βάρη ως προς τη συστάδα του PnBA. Τα μοριακά χαρακτηριστικά όλων των συντιθέμενων συμπολυμερών προσδιορίστηκαν μέσω της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών, SEC και της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, $^1\text{H-NMR}$. Διαπιστώθηκε ότι επιτεύχθηκαν τα επιθυμητά μοριακά βάρη και χαρακτηριστικά, με ικανοποιητικές κατανομές που εντάσσονται στα όρια της τεχνικής RAFT. Ακολούθησε η επιτυχής σύνθεση των παραγώγων των πολυηλεκτρολυτών κατά συστάδες όπως επιβεβαιώνεται μέσω της $^1\text{H-NMR}$ φασματοσκοπίας, μέσω των αντιδράσεων τεταρτοταγοποίησης της αμίνης του PDMAEA χρησιμοποιώντας διαφορετικά αντιδραστήρια χημικής τροποποίησης.

Σε επόμενο στάδιο, παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα των αμφίφιλων συμπολυμερών χρησιμοποιώντας διαφορετικά πρωτόκολλα παρασκευής για το PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερές και μελετήθηκαν οι ιδιότητες της αυτο-οργάνωσή τους μέσω της Δυναμικής και Στατικής Σκέδασης Φωτός, DLS, SLS καθώς και η εξάρτηση των ιδιοτήτων αυτών από τις μεταβολές της θερμοκρασίας για τα PnBA-b-Q₆PDMAEA και PnBA-b-POEGA συμπολυμερή, του pH και της ιοντικής ισχύος για το PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερές. Μέσω των τεχνικών σκέδασης διαπιστώθηκε ότι το πρωτόκολλο παρασκευής των διαλυμάτων των PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την αυτο-οργάνωσή τους. Τα αποτελέσματα των μεθόδων DLS, SLS, ELS και FS που εφαρμόστηκαν φανερώνουν ότι τα συμπολυμερή αυτο-οργανώνονται στο νερό σχηματίζοντας συσσωματώματα, των οποίων οι ιδιότητες εξαρτώνται από τις αλλαγές στο pH και στην ιοντική ισχύ για τα PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερή. Επιπλέον, μέσω της Cryo-TEM μικροσκοπίας προσδιορίστηκε η μορφολογία των PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερών, η οποία εμπεριέχει ως επί το πλείστον σφαιρικά

μικκύλια σε όξινο pH, μορφολογίες πολυσύνθετων και πολυστρωματικών κυστιδίων σε ουδέτερα και βασικά pH καθώς και σκωλικοειδή μορφολογία σε βασικά pH.

Στη συνέχεια, τα PnBA-b-PDMAEA, PnBA-b-Q₁PDMAEA και PnBA-b-Q₆PDMAEA συμπολυμερή εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα με το DNA μέσω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μερικώς θετικά φορτισμένων αμινομάδων της PDMAEA ή των θετικά φορτισμένων αμινομάδων της QPDMAEA μονάδας του συμπολυμερούς και των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του DNA. Τα σύμπλοκα παρασκευάστηκαν σε διαφορετικές αναλογίες N/P και η ικανότητα σύμπλεξης τους μελετήθηκε με μεθόδους DLS, SLS, ELS, FS και UV-Vis. Αποδείχθηκε ότι η μάζα, το μέγεθος, το ζ-δυναμικό και η ικανότητα σύμπλεξης του πολυμερούς με το DNA εξαρτώνται ισχυρά από την αναλογία N/P. Η ισχυρότερη συμπλοκοποίηση συνέβει στην περίπτωση του PnBA-b-Q₆PDMAEA συμπολυμερούς καθώς οι κατιοντικές αλυσίδες του Q₆PDMAEA αντικαθιστούν με πολύ γρήγορο ρυθμό τα μόρια του EB τα οποία γρήγορα αποσυγκολλούνται από το DNA και η ένταση φθορισμού μειώνεται ταχύτατα ωστόσο μηδενιστεί ήδη στην N/P=4 αναλογία.

Συμπερασματικά, τα PnBA-b-PDMAEA συμπολυμερή και τα παράγωγά τους καθώς και τα PnBA-b-POEGA συμπολυμερή επέδειξαν ενδιαφέρον τόσο από συνθετική σκοπιά, όσο και από συμπεριφορά αυτο-οργάνωσης σε υδατικά διαλύματα. Η πιθανή χρήση των PnBA-b-PDMAEA και PnBA-b-POEGA συμπολυμερών αφορά τον εγκλωβισμό φαρμάκων στον υδρόφοβο πυρήνα του PnBA. Η επιτυχία σύμπλεξης των PnBA-b-Q₁PDMAEA και PnBA-b-Q₆PDMAEA συμπολυμερών με αρνητικά φορτισμένα μακρομόρια (DNA, RNA, πρωτεΐνες) τα καθιστά ιδιαίτερος ενδιαφέροντα συστήματα για περαιτέρω χρήση τους ως φορείς γονιδιακής θεραπείας.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 6.1: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Poly (n-butyl acrylate)	πολυ (ακρυλικός η-βουτυλεστέρας)
Poly (2-dimethylamino ethyl ether acrylate)	πολυ(ακρυλικός εστέρας της διμεθυλοαμινοαιθανόλης)
Poly (oligo ethylene glycol methyl ether acrylate)	πολυ(ακρυλικός εστέρας της ολιγο αιθυλενογλυκόλης)
Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer	Πολυμερισμός Αντιστρεπτής Προσθήκης-Μεταφοράς Αλυσίδας με Απόσπαση
Chain Transfer Agent	Αντιδραστήριο Μεταφοράς Αλυσίδας
Quaternization	Τεταρτοταγοποίηση
Polyelectrolytes	Πολυηλεκτρολύτες
Critical micelle concentration	Κρίσιμη Μικκυλιακή συγκέντρωση
Size Exclusion Chromatography	Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών
Nuclear Magnetic Resonance	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
Dynamic Light Scattering	Δυναμική Σκέδαση Φωτός
Static Light Scattering	Στατική Σκέδαση Φωτός
Electroforetic Light scattering	Ηλεκτροφορητική Σκέδαση φωτός
Zeta-Potential	ζ-δυναμικό
Fluorescence spectroscopy	Φασματοσκοπία Φθορισμού
Ultraviolet-visible spectroscopy	Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού
Cryogenic transmission electron microscopy	Κρυογενική Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Πίνακας 7.1 Ακρωνύμια και ανάπτυξη τους.

PnBA	Poly (n-butyl acrylate)
PDMAEA	Poly (2-dimethylamino ethyl acrylate)
POEGA	Poly (oligo ethylene glycol methyl ether acrylate)
RAFT	Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer
QPDMAEA	Quaternized poly (2-dimethylamino ethyl acrylate)
CTA	Chain Transfer Agent
AIBN	2,2-Azobis(isobutyronitrile)
CDCl ₃	Deuterated Chloroform
CH ₃ I	Methyl iodide
C ₆ H ₁₃ I	Iodoheptane
EtBr	Ethidium bromide
CD ₃ COCD ₃	Deuterated acetone
THF	Tetrahydrofuran
CH ₃ OH	Methanol
NaCl	Sodium Chloride
NaOH	Sodium hydroxide
CMC	Critical micelle Concentration
SEC	Size Exclusion Chromatography
¹ H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
DLS	Dynamic Light Scattering
SLS	Static Light Scattering
ELS	Electrophoretic Light Scattering
ζ _{pot}	Zeta-Potential

R_h	Hydrodynamic radius
R_g	Radius of gyration
D_h	Hydrodynamic diameter
M_w	Molecular weight
PDI	Polydispersity index
FS	Fluorescence spectroscopy
DNA	Deoxyribonucleic Acid
Cryo-TEM	Cryogenic transmission electron microscopy
UV-Vis	Ultraviolet-visible spectroscopy

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. A. Noshay, and J. E. McGrath, eds., *Block copolymers: overview and critical survey*, Elsevier, 2013.
2. Γ. Κοτζαμάνης, *Ανάπτυξη νέων "ευφυών" κατά συστάδες συμπολυμερών τύπου ομοπολυμερές – στατιτικό συμπολυμερές*, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2007.
3. P. Alexandridis, and B. Lindman, eds., *Amphiphilic block copolymers: self-assembly and applications*, Elsevier, 2000.
4. G. Riess, Micellization of block copolymers, *Progress in polymer science*, vol. 28, no. 7, 2003, pp. 1107-1170.
5. N. Hadjichristidis, S. Pispas, and G. Floudas, eds., *Block copolymers: synthetic strategies, physical properties, and applications*, John Wiley & Sons, 2003.
6. Μ. Πισικάλης, and Μ. Χατζηχρηστίδη, *Ειδικά Θέματα Επιστήμης Πολυμερών*, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2010.
7. Μ. Karayianni, and S. Pispas, Self-assembly of amphiphilic block copolymers in selective solvents, *Fluorescence Studies of Polymer Containing Systems*, Springer, 2016, pp. 27-63.
8. J.-F. Gohy, Block copolymer micelles, *Block copolymers II*, Springer, 2005, pp. 65-136.
9. P. Munk, Equilibrium and nonequilibrium polymer micelles, *Solvents and Self-organization of Polymers*, Springer, 1996, pp. 19-32.

10. L. Zhang, and A. Eisenberg, Multiple morphologies of " crew-cut" aggregates of polystyrene-b-poly (acrylic acid) block copolymers, *Science*, vol. 268, no. 5218, 1995, pp. 1728-1731.
11. H. Shen, and A. Eisenberg, Control of architecture in block-copolymer vesicles, *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 39, no. 18, 2000, pp. 3310-3312.
12. J. K. Kim, C. S. Lee, and E. Lee, Smart Vesicles: Synthesis, Characterization and Applications, *Smart Membranes and Sensors: Synthesis, Characterization, and Applications*, 2014, pp. 53-103.
13. G. Liu, X. Hu, C. Chen, Q. Jin, and J. Ji, Self-assembly and degradation of poly [(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-block-(D, L-lactide)] diblock copolymers: large compound micelles to vesicles, *Polymer International*, vol. 60, no. 4, 2011, pp. 578-583.
14. N. S. Cameron, M. K. Corbierre, and A. Eisenberg, 1998 EWR Steacie Award Lecture Asymmetric amphiphilic block copolymers in solution: a morphological wonderland, *Canadian journal of chemistry*, vol. 77, no. 8, 1999, pp. 1311-1326.
15. W. Rusli, A. Jackson, and A. van Herk, A Roadmap towards Successful Nanocapsule Synthesis via Vesicle Templated RAFT-Based Emulsion Polymerization, *Polymers*, vol. 10, no. 7, 2018, pp. 774.
16. A. Blanz, S. P. Armes, and A. J. Ryan, Self-assembled block copolymer aggregates: from micelles to vesicles and their biological applications, *Macromolecular rapid communications*, vol. 30, no. 4-5, 2009, pp. 267-277.

17. D. E. Discher, and A. Eisenberg, Polymer vesicles, *Science*, vol. 297, no. 5583, 2002, pp. 967-973.
18. Y. Mai, and A. Eisenberg, Self-assembly of block copolymers, *Chemical Society Reviews*, vol. 41, no. 18, 2012, pp. 5969-5985.
19. P. Lim Soo, and A. Eisenberg, Preparation of block copolymer vesicles in solution, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, vol. 42, no. 6, 2004, pp. 923-938.
20. Μ. Σούλη, *Μοριακή δυναμική θερμοαποκρινόμενων συμπολυμερών στυρενίου και ακρυλικών πολυμερών σε υδατικά διαλύματα*, Διπλωματική Εργασία, Τμήμα Φυσικής, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2013.
21. S. Rangelov, and A. Pispas, eds., *Polymer and polymer-hybrid nanoparticles: from synthesis to biomedical applications*, CRC Press, 2013.
22. Y. Kim, P. Dalhaimer, D. A. Christian, and D. E. Discher, Polymeric worm micelles as nano-carriers for drug delivery, *Nanotechnology*, vol. 16, no. 7, 2005, pp. S484.
23. C. LoPresti, H. Lomas, M. Massignani, T. Smart, and G. Battaglia, Polymersomes: nature inspired nanometer sized compartments, *Journal of Materials Chemistry*, vol. 19, no. 22, 2009, pp. 3576-3590.
24. M. Massignani, H. Lomas, and G. Battaglia, Polymersomes: a synthetic biological approach to encapsulation and delivery, *Modern Techniques for Nano-and Microreactors/-reactions*, Springer, 2010, pp. 115-154.

25. O. Onaca, R. Enea, D. W. Hughes, and W. Meier, Stimuli-responsive polymersomes as nanocarriers for drug and gene delivery, *Macromolecular bioscience*, vol. 9, no. 2, 2009, pp. 129-139.
26. J. Kuo, ed., *Electron microscopy: methods and protocols*, Springer Science & Business Media, 2007.
27. J. Kuntsche, J. C. Horst, and H. Bunjes, Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems, *International journal of pharmaceutics*, vol. 417, no. 1-2, 2011, pp. 120-137.
28. W. Zhou, and Z. L. Wang, eds., *Scanning microscopy for nanotechnology: techniques and applications*, Springer science & business media, 2007.
29. V. Nadtochenko, A. Rincon, S. Stanca, and J. Kiwi, Dynamics of E. coli membrane cell peroxidation during TiO₂ photocatalysis studied by ATR-FTIR spectroscopy and AFM microscopy, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 169, no. 2, 2005, pp. 131-137.
30. W. Schärfl, ed., *Light scattering from polymer solutions and nanoparticle dispersions*, Springer Science & Business Media, 2007.
31. Μ. Καραγιάννη, *Αυτοοργάνωση πολυμερών: πολυηλεκτρολύτες και σύμπλοκά τους με πρωτεΐνες*, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2012.
32. F. Oosawa, *Polyelectrolytes*, *Polyelectrolytes*, Marcel Dekker, 1971.
33. Θ. Ασημακόπουλος, *Μελέτη των αλληλεπιδράσεων της αλβουμίνης ορού βοοειδούς με κατιοντικούς πολυηλεκτρολύτες σε φυσιολογικές συνθήκες*, Διδακτορική Διατριβή, Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών

Σπουδών στην Επιστήμη και Τεχνολογία Πολυμερών, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2012.

34. T. Radeva, ed., *Physical chemistry of polyelectrolytes*, CRC Press, 2001.
35. D. Mecerreyes, Polymeric ionic liquids: Broadening the properties and applications of polyelectrolytes, *Progress in Polymer Science*, vol. 36, no. 12, 2011, pp. 1629-1648.
36. S. Förster, V. Abetz, and A. H. Müller, Polyelectrolyte block copolymer micelles, *Polyelectrolytes with Defined Molecular Architecture II*, Springer, 2004, pp. 173-210.
37. K. Hales, and D. J. Pochan, Using polyelectrolyte block copolymers to tune nanostructure assembly, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 11, no. 6, 2006, pp. 330-336.
38. M. Moffitt, K. Khougaz, and A. Eisenberg, Micellization of ionic block copolymers, *Accounts of Chemical Research*, vol. 29, no. 2, 1996, pp. 95-102.
39. A. Moradi-Araghi, D. Beardmore, and G. Stahl, The application of gels in enhanced oil recovery: theory, polymers and crosslinker systems, *Water-Soluble Polymers for Petroleum Recovery*, Springer, 1988, pp. 299-312.
40. K. Van Durme, H. Rahier, and B. Van Mele, Influence of additives on the thermoresponsive behavior of polymers in aqueous solution, *Macromolecules*, vol. 38, no. 24, 2005, pp. 10155-10163.

41. J. M. Morachis, E. A. Mahmoud, and A. Almutairi, Physical and chemical strategies for therapeutic delivery by using polymeric nanoparticles, *Pharmacological reviews*, vol. 64, no. 3, 2012, pp. 505-519.
42. C. I. Crucho, Stimuli-responsive polymeric nanoparticles for nanomedicine, *ChemMedChem*, vol. 10, no. 1, 2015, pp. 24-38.
43. M. Nakayama, J. Akimoto, and T. Okano, Polymeric micelles with stimuli-triggering systems for advanced cancer drug targeting, *Journal of drug targeting*, vol. 22, no. 7, 2014, pp. 584-599.
44. M. A. C. Stuart, W. T. Huck, J. Genzer, M. Müller, C. Ober, M. Stamm, G. B. Sukhorukov, I. Szleifer, V. V. Tsukruk, and M. Urban, Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials, *Nature materials*, vol. 9, no. 2, 2010, pp. 101.
45. D. Schmaljohann, Thermo-and pH-responsive polymers in drug delivery, *Advanced drug delivery reviews*, vol. 58, no. 15, 2006, pp. 1655-1670.
46. G. Kocak, C. Tuncer, and V. Bütün, pH-Responsive polymers, *Polymer Chemistry*, vol. 8, no. 1, 2017, pp. 144-176.
47. D. J. Phillips, and M. I. Gibson, Towards being genuinely smart: 'isothermally-responsive' polymers as versatile, programmable scaffolds for biologically-adaptable materials, *Polymer Chemistry*, vol. 6, no. 7, 2015, pp. 1033-1043.
48. H. S. Sundaram, J.-R. Ella-Menye, N. D. Brault, Q. Shao, and S. Jiang, Reversibly switchable polymer with cationic/zwitterionic/anionic behavior through synergistic protonation and deprotonation, *Chemical Science*, vol. 5, no. 1, 2014, pp. 200-205.

49. N. Tran Thi Dat, *Synthesis of timed-release polymer nanoparticles*, Doctoral Dissertation, Institute for Bioengineering and Nanotechnology, University of Queensland, 2015.
50. O. E. Philippova, D. Hourdet, R. Audebert, and A. R. Khokhlov, pH-responsive gels of hydrophobically modified poly (acrylic acid), *Macromolecules*, vol. 30, no. 26, 1997, pp. 8278-8285.
51. M. Torres-Lugo, and N. A. Peppas, Molecular design and in vitro studies of novel pH-sensitive hydrogels for the oral delivery of calcitonin, *Macromolecules*, vol. 32, no. 20, 1999, pp. 6646-6651.
52. S. Y. Park, and Y. H. Bae, Novel pH-sensitive polymers containing sulfonamide groups, *Macromolecular rapid communications*, vol. 20, no. 5, 1999, pp. 269-273.
53. S. I. Kang, and Y. H. Bae, A sulfonamide based glucose-responsive hydrogel with covalently immobilized glucose oxidase and catalase, *Journal of Controlled Release*, vol. 86, no. 1, 2003, pp. 115-121.
54. V. Pinkrah, M. Snowden, J. Mitchell, J. Seidel, B. Chowdhry, and G. Fern, Physicochemical properties of poly (N-isopropylacrylamide-co-4-vinylpyridine) cationic polyelectrolyte colloidal microgels, *Langmuir*, vol. 19, no. 3, 2003, pp. 585-590.
55. A. S. Lee, V. Bütün, M. Vamvakaki, S. P. Armes, J. A. Pople, and A. P. Gast, Structure of pH-dependent block copolymer micelles: charge and ionic strength dependence, *Macromolecules*, vol. 35, no. 22, 2002, pp. 8540-8551.
56. N. P. Truong, Z. Jia, M. Burges, N. A. McMillan, and M. J. Monteiro, Self-catalyzed degradation of linear cationic poly (2-dimethylaminoethyl

- acrylate) in water, *Biomacromolecules*, vol. 12, no. 5, 2011, pp. 1876-1882.
57. N. P. Truong, Z. Jia, M. Burgess, L. Payne, N. A. McMillan, and M. J. Monteiro, Self-catalyzed degradable cationic polymer for release of DNA, *Biomacromolecules*, vol. 12, no. 10, 2011, pp. 3540-3548.
58. N. P. Truong, W. Gu, I. Prasadam, Z. Jia, R. Crawford, Y. Xiao, and M. J. Monteiro, An influenza virus-inspired polymer system for the timed release of siRNA, *Nature communications*, vol. 4, 2013, pp. 1902.
59. M. Gillard, Z. Jia, J. J. C. Hou, M. Song, P. P. Gray, T. P. Munro, and M. J. Monteiro, Intracellular trafficking pathways for nuclear delivery of plasmid DNA complexed with highly efficient endosome escape polymers, *Biomacromolecules*, vol. 15, no. 10, 2014, pp. 3569-3576.
60. J. Seuring, and S. Agarwal, Polymers with upper critical solution temperature in aqueous solution, *Macromolecular rapid communications*, vol. 33, no. 22, 2012, pp. 1898-1920.
61. A. Gandhi, A. Paul, S. O. Sen, and K. K. Sen, Studies on thermoresponsive polymers: Phase behaviour, drug delivery and biomedical applications, *asian journal of pharmaceutical sciences*, vol. 10, no. 2, 2015, pp. 99-107.
62. K. Stubenrauch, I. Voets, G. Fritz-Popovski, and G. Trimmel, pH and ionic strength responsive polyelectrolyte block copolymer micelles prepared by ring opening metathesis polymerization, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 47, no. 4, 2009, pp. 1178-1191.

63. Y. Zhang, and P. S. Cremer, Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series, *Current opinion in chemical biology*, vol. 10, no. 6, 2006, pp. 658-663.
64. Y. Paz, E. Kesselman, L. Fahoum, I. Portnaya, and O. Ramon, The interaction between poly (N-isopropylacrylamide) and salts in aqueous media: The “salting-out” phenomenon as studied by attenuated total reflection/fourier transform infrared spectroscopy, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, vol. 42, no. 1, 2004, pp. 33-46.
65. M. L. Edelstein, M. R. Abedi, J. Wixon, and R. M. Edelstein, Gene therapy clinical trials worldwide 1989–2004—an overview, *The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications*, vol. 6, no. 6, 2004, pp. 597-602.
66. Z. Liu, Z. Zhang, C. Zhou, and Y. Jiao, Hydrophobic modifications of cationic polymers for gene delivery, *Progress in Polymer Science*, vol. 35, no. 9, 2010, pp. 1144-1162.
67. X. Guo, and L. Huang, Recent advances in nonviral vectors for gene delivery, *Accounts of chemical research*, vol. 45, no. 7, 2011, pp. 971-979.
68. D. Putnam, Polymers for gene delivery across length scales, *Nature materials*, vol. 5, no. 6, 2006, pp. 439.
69. M. A. Mintzer, and E. E. Simanek, Nonviral vectors for gene delivery, *Chemical reviews*, vol. 109, no. 2, 2008, pp. 259-302.

70. A. Sizovs, P. M. McLendon, S. Srinivasachari, and T. M. Reineke, Carbohydrate polymers for nonviral nucleic acid delivery, *Nucleic Acid Transfection*, Springer, 2010, pp. 131-190.
71. H. Cabral, K. Miyata, K. Osada, and K. Kataoka, Block copolymer micelles in nanomedicine applications, *Chemical reviews*, vol. 118, no. 14, 2018, pp. 6844-6892.
72. K. Kataoka, A. Harada, and Y. Nagasaki, Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance, *Advanced drug delivery reviews*, vol. 64, 2012, pp. 37-48.
73. E. Haladjova, G. Mountrichas, S. Pispas, and S. Rangelov, Poly (vinyl benzyl trimethylammonium chloride) Homo and Block Copolymers Complexation with DNA, *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 120, no. 9, 2016, pp. 2586-2595.
74. S. Jung, T. P. Lodge, and T. M. Reineke, Structures and Protonation States of Hydrophilic–Cationic Diblock Copolymers and Their Binding with Plasmid DNA, *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 122, no. 9, 2018, pp. 2449-2461.
75. M. Isik, M. Agirre, J. Zarate, G. Puras, D. Mecerreyes, H. Sardon, and J. Pedraz, Amine containing cationic methacrylate copolymers as efficient gene delivery vehicles to retinal epithelial cells, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 55, no. 2, 2017, pp. 280-287.
76. G. Moad, RAFT polymerization to form stimuli-responsive polymers, *Polymer Chemistry*, vol. 8, no. 1, 2017, pp. 177-219.

77. G. Moad, E. Rizzardo, and S. H. Thang, Living radical polymerization by the RAFT process—a first update, *Australian Journal of Chemistry*, vol. 59, no. 10, 2006, pp. 669-692.
78. A. E. Smith, X. Xu, and C. L. McCormick, Stimuli-responsive amphiphilic (co) polymers via RAFT polymerization, *Progress in polymer science*, vol. 35, no. 1-2, 2010, pp. 45-93.
79. S. b. Perrier, 50th Anniversary Perspective: RAFT Polymerization □ A User Guide, *Macromolecules*, vol. 50, no. 19, 2017, pp. 7433-7447.
80. A. B. Lowe, and C. L. McCormick, Reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT) radical polymerization and the synthesis of water-soluble (co) polymers under homogeneous conditions in organic and aqueous media, *Progress in Polymer Science*, vol. 32, no. 3, 2007, pp. 283-351.
81. D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, eds., *Principles of instrumental analysis*, Cengage learning, 2017.
82. U. W. Gedde, ed., *Polymer physics*, Springer Science & Business Media, 2013.
83. Κ. Παναγιώτου, Επιστήμη και τεχνολογία πολυμερών, Εκδόσεις Πήγασος, 2006.
84. Ε. Ιατρού, Α. Πίσπας, and Μ. Πιτσικάλης, *Μέθοδοι χαρακτηρισμού πολυμερών*, Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών: Επιστήμη πολυμερών και εφαρμογές της, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
85. N. J. Rankin, D. Preiss, P. Welsh, K. E. Burgess, S. M. Nelson, D. A. Lawlor, and N. Sattar, The emergence of proton nuclear magnetic

- resonance metabolomics in the cardiovascular arena as viewed from a clinical perspective, *Atherosclerosis*, vol. 237, no. 1, 2014, pp. 287-300.
86. B. Van der Meer, Fluorescence studies on biological membranes, *Subcellular Biochemistry*, vol. 13, 1988, pp. 1-53.
87. C. L. Zhao, M. A. Winnik, G. Riess, and M. D. Croucher, Fluorescence probe techniques used to study micelle formation in water-soluble block copolymers, *Langmuir*, vol. 6, no. 2, 1990, pp. 514-516.
88. T. Nivaggioli, P. Alexandridis, T. A. Hatton, A. Yekta, and M. A. Winnik, Fluorescence probe studies of pluronic copolymer solutions as a function of temperature, *Langmuir*, vol. 11, no. 3, 1995, pp. 730-737.
89. H.-H. Perkampus, ed., *UV-VIS Spectroscopy and its Applications*, Springer Science & Business Media, 2013.
90. N. C. Santos, and M. Castanho, Teaching light scattering spectroscopy: the dimension and shape of tobacco mosaic virus, *Biophysical journal*, vol. 71, no. 3, 1996, pp. 1641-1650.
91. S. W. Provencher, Inverse problems in polymer characterization: direct analysis of polydispersity with photon correlation spectroscopy, *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 180, no. 1, 1979, pp. 201-209.
92. R. Pecora, ed., *Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy*, Springer Science & Business Media, 2013.
93. P. Vangeyte, S. Gautier, and R. Jérôme, About the methods of preparation of poly (ethylene oxide)-b-poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles in water: Analysis by dynamic light scattering, *Colloids and*

- surfaces A: physicochemical and engineering aspects*, vol. 242, no. 1-3, 2004, pp. 203-211.
94. W. Goldberg, Dynamic light scattering, *American Journal of Physics*, vol. 67, no. 12, 1999, pp. 1152-1160.
 95. P. C. Hiemenz, and R. Rajagopalan, eds., *Principles of Colloid and Surface Chemistry, revised and expanded*, CRC press, 1997.
 96. K. E. Van Holde, W. C. Johnson, and P. S. Ho, *Principles of physical biochemistry*, 2006.
 97. J. M. G. Cowie, and V. Arrighi, eds., *Polymers: chemistry and physics of modern materials*, CRC press, 2007.
 98. Á. V. Delgado, F. González-Caballero, R. Hunter, L. Koopal, and J. Lyklema, Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena, *Journal of colloid and interface science*, vol. 309, no. 2, 2007, pp. 194-224.
 99. R. J. Hunter, ed., *Zeta potential in colloid science: principles and applications*, Academic press, 2013.
 100. S. Bhattacharjee, DLS and zeta potential—What they are and what they are not?, *Journal of Controlled Release*, vol. 235, 2016, pp. 337-351.
 101. R. Xu, Light scattering: A review of particle characterization applications, *Particuology*, vol. 18, 2015, pp. 11-21.
 102. A. Sze, D. Erickson, L. Ren, and D. Li, Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow, *Journal of colloid and interface science*, vol. 261, no. 2, 2003, pp. 402-410.

103. H. Friedrich, P. M. Frederik, G. de With, and N. A. Sommerdijk, Imaging of self-assembled structures: interpretation of TEM and Cryo-TEM images, *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 49, no. 43, 2010, pp. 7850-7858.
104. D. Danino, Cryo-TEM of soft molecular assemblies, *Current opinion in colloid & interface science*, vol. 17, no. 6, 2012, pp. 316-329.
105. N. D. Burrows, and R. L. Penn, Cryogenic transmission electron microscopy: aqueous suspensions of nanoscale objects, *Microscopy and Microanalysis*, vol. 19, no. 6, 2013, pp. 1542-1553.
106. J. Škvarla, J. Zedník, M. Šlouf, S. Pispas, and M. Štěpánek, Poly (N-isopropyl acrylamide)-block-poly (n-butyl acrylate) thermoresponsive amphiphilic copolymers: Synthesis, characterization and self-assembly behavior in aqueous solutions, *European Polymer Journal*, vol. 61, 2014, pp. 124-132.
107. E. Kaditi, G. Mountrichas, and S. Pispas, Amphiphilic block copolymers by a combination of anionic polymerization and selective post-polymerization functionalization, *European Polymer Journal*, vol. 47, no. 4, 2011, pp. 415-434.
108. V. Bütün, S. P. Armes, and N. C. Billingham, Selective quaternization of 2-(dimethylamino) ethyl methacrylate residues in tertiary amine methacrylate diblock copolymers, *Macromolecules*, vol. 34, no. 5, 2001, pp. 1148-1159.
109. T. Manouras, E. Koufakis, S. H. Anastasiadis, and M. Vamvakaki, A facile route towards PDMAEMA homopolymer amphiphiles, *Soft matter*, vol. 13, no. 20, 2017, pp. 3777-3782.

110. W. Zhao, P. Fonsny, P. FitzGerald, G. G. Warr, and S. Perrier, Unexpected behavior of polydimethylsiloxane/poly (2-(dimethylamino) ethyl acrylate)(charged) amphiphilic block copolymers in aqueous solution, *Polymer Chemistry*, vol. 4, no. 6, 2013, pp. 2140-2150.
111. A. Skandalis, and S. Pispas, pH-and thermo-responsive solution behavior of amphiphilic, linear triblock terpolymers, *Polymer*, vol. 157, 2018, pp. 9-18.
112. Z. Li, A. K. Serelis, W. F. Reed, and A. M. Alb, TOWARD AMPHIPHILIC DIBLOCK COPOLYMERS BY RAFT. KINETIC STUDY ON PH RESPONSIVE POLYMERS, *Polymer Preprints*, vol. 51, no. 1, 2010, pp. 476.
113. W. He, J. Ma, X. Shu, J. Qian, and D. Hua, Reconstitution of bacteriorhodopsin with cationic poly (dimethylaminoethyl acrylate)-block-poly (methylacrylate) for bio-hybrid materials, *RSC Advances*, vol. 6, no. 10, 2016, pp. 7955-7960.
114. B. Kim, C. N. Lam, and B. D. Olsen, Nanopatterned protein films directed by ionic complexation with water-soluble diblock copolymers, *Macromolecules*, vol. 45, no. 11, 2012, pp. 4572-4580.
115. N. Suchao-in, S. Chirachanchai, and S. Perrier, pH-and thermo-multi-responsive fluorescent micelles from block copolymers via reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization, *Polymer*, vol. 50, no. 17, 2009, pp. 4151-4158.
116. X. Liao, G. Walden, N. D. Falcon, S. Donell, M. J. Raxworthy, M. Wormstone, G. P. Riley, and A. Saeed, A direct comparison of linear and star-shaped poly (dimethylaminoethyl acrylate) polymers for

- polyplexation with DNA and cytotoxicity in cultured cell lines, *European Polymer Journal*, vol. 87, 2017, pp. 458-467.
117. Y. Xu, S. Bolisetty, M. Drechsler, B. Fang, J. Yuan, M. Ballauff, and A. H. Müller, pH and salt responsive poly (N, N-dimethylaminoethyl methacrylate) cylindrical brushes and their quaternized derivatives, *Polymer*, vol. 49, no. 18, 2008, pp. 3957-3964.
118. S. Antoun, J.-F. Gohy, and R. Jérôme, Micellization of quaternized poly (2-(dimethylamino) ethyl methacrylate)-block-poly (methyl methacrylate) copolymers in water, *Polymer*, vol. 42, no. 8, 2001, pp. 3641-3648.
119. B. M.Tande, and N. J.Wagner, Viscosimetric, Hydrodynamic, and Conformational Properties of Dendrimers and Dendrons, *Macromolecules*, vol. 34, 2001, pp. 8580–8585.
120. D. Dey, S. Kumar, R. Banerjee, S. Maiti, and D. Dhara, Polyplex formation between PEGylated linear cationic block copolymers and DNA: equilibrium and kinetic studies, *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 118, no. 25, 2014, pp. 7012-7025.
121. A. Skandalis, and S. Pispas, PLMA-b-POEGMA amphiphilic block copolymers: Synthesis and self-assembly in aqueous media, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 55, no. 1, 2017, pp. 155-163.
122. A. Skandalis, and S. Pispas, PDMAEMA-b-PLMA-b-POEGMA triblock terpolymers via RAFT polymerization and their self-assembly in aqueous solutions, *Polymer Chemistry*, vol. 8, no. 31, 2017, pp. 4538-4547.

123. G. Vancoillie, D. Frank, and R. Hoogenboom, Thermoresponsive poly (oligo ethylene glycol acrylates), *Progress in Polymer Science*, vol. 39, no. 6, 2014, pp. 1074-1095.
124. F. Hua, X. Jiang, D. Li, and B. Zhao, Well-defined thermosensitive, water-soluble polyacrylates and polystyrenics with short pendant oligo (ethylene glycol) groups synthesized by nitroxide-mediated radical polymerization, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 44, no. 8, 2006, pp. 2454-2467.