

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΠΟΛΥΜΕΡΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ DNA – ΠΡΟΤΥΠΑ
ΑΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΠΛΕΓΜΑΤΑ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ**

Θεονίτσα Κ. Γεωργίου

Επιβλ. Καθηγητής: Αν. Καθηγητής Δρ. Κώστας Πατρίκιος

Λευκωσία

MΑΡΤΙΟΣ 2006

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΠΟΛΥΜΕΡΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ DNA – ΠΡΟΤΥΠΑ
ΑΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΠΛΕΓΜΑΤΑ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ**

Θεονίτσα Κ. Γεωργίου

Ερευνητικός Σύμβουλος:

Δρ. Κώστας Σ. Πατρίκιος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Εξεταστική Επιτροπή:

Δρ. Επαμεινώνδας Λεοντίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής (Πανεπιστήμιο Κύπρου)

Δρ. Αναστάσιος Τασιόπουλος, Λέκτορας (Πανεπιστήμιο Κύπρου)

Δρ. Κώστας Παλαιός, Ερευνητής Α (Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος)

Δρ. Γιώργος Μπόκκας, Επίκουρος Καθηγητής (Πανεπιστήμιο Πατρών)

*Στους γονείς μου Ειρήνη και Κύπρο,
για την αγάπη και τη συμπαράστασή τους*

...μητέρα μου «στο καλό»

Θεονίτσα Κ. Γεωργίου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη Διδακτορική αυτή Διατριβή έγινε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός κατιοντικών αστεροειδών πολυμερών και η αξιολόγηση τους στη μεταφορά γενετικού υλικού στα κύτταρα (επιμόλυνση). Επίσης, έγινε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός τεσσάρων οικογενειών αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων, καθώς και πλεγμάτων ενός μακρομονομερούς.

Τα μονομερή που χρησιμοποιήθηκαν είναι: ο μεθακρυλικός (2-διμεθυλαμινο)αιθυλεστέρας (DMAEMA), ο μεθακρυλικός εστέρας της εξααιθυλενογλυκόλης (HEGMA), ο μεθακρυλικός τετραϋδροπυραυλεστέρας (THPMA), το μεθακρυλικό οξύ (MAA), ο μεθακρυλικός μεθυλεστέρας (MMA), ο μεθακρυλικός κ-βουτυλεστέρας (BuMA), ο μεθακρυλικός (2-αιθυλαμινο)αιθυλεστέρας (DEAEMA), ο μεθακρυλικός βενζυλεστέρας (BzMA) και το ισοβουτυλένιο (IB).

Οι δύο οικογένειες των αστεροειδών συμπολυμερών αποτελούνταν από τέσσερα αστεροειδή συμπολυμερή διαφόρων αρχιτεκτονικών (δύο αδρομερικά, ετεροβραχιονικό και τυχαίο) του DMAEMA – HEGMA και DMAEMA – MAA. Οι τέσσερις οικογένειες αστεροειδών πλεγμάτων αποτελούνταν από τους συνδυασμούς μονομερών : (1) MMA – BuMA, (2) DEAEMA – HEGMA, (3) DMAEMA – MAA, και (4) DMAEMA – BzMA. Όλες οι πιο πάνω οικογένειες πολυμερών παρασκευάστηκαν με χρήση του «ζωντανού» πολυμερισμού μεταφοράς ομάδας (GTP). Χρησιμοποιώντας το ζωντανό καρβοκατιοντικό πολυμερισμό (QLCCP) παρασκευάστηκε ένα oligομερές του IB το οποίο μετατράπηκε σε μεθακρυλικό μακρομονομερές που με τη σειρά του πολυμερίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο GTP για να παρασκευαστούν πλέγματα.

Όλα τα αστεροειδή πολυμερή και τα πρόδρομα μόριά τους, καθώς και τα πρόδρομα μόρια των πολυμερικών πλεγμάτων χαρακτηρίστηκαν ως προς τα μοριακά τους βάρη (MB) με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (GPC). Τα MB των γραμμικών πρόδρομων μορίων ήταν σε συμφωνία με τα θεωρητικά αναμενόμενα MB με χαμηλούς δείκτες πολυδιασποράς των MB ($\Delta\text{PIMB} \leq 1.32$). Τα MB των αστεροειδών πολυμερών ήταν σε όλες τις περιπτώσεις μεγαλύτερα από τα MB των αντίστοιχων πρόδρομων πολυμερών. Οι ΔPIMB όλων των αστεροειδών πολυμερών κυμάνθηκαν από 1.17 έως 1.42, που είναι ικανοποιητικοί για αστεροειδή πολυμερή. Τέλος, τα αστεροειδή πολυμερή χαρακτηρίστηκαν επίσης με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και βρέθηκε ότι η πειραματική σύσταση των αστεροειδών πολυμερών ήταν σε συμφωνία με τη θεωρητικά αναμενόμενη σύσταση.

Στη συνέχεια, τρεις οικογένειες αστεροειδών πολυμερών αξιολογήθηκαν ως επιμολυντές κυττάρων HeLa με πλασμιδιακό DNA σε σύγκριση με τον εμπορικά διαθέσιμο δένδριμερικό μεταφορέα SuperFect. Αρχικά αξιολογήθηκαν αστεροειδή ομοπολυμερή του DMAEMA διαφόρων MB όπου παρατηρήθηκε αύξηση της συνολικής απόδοσης επιμόλυνσης με μείωση του MB και αύξηση της ποσότητας του DNA, ενώ παρατηρήθηκε μικρό μέγιστο με αύξηση της ποσότητας του αστεροειδούς πολυμερούς. Με την αξιολόγηση των αστεροειδών συμπολυμερών παρατηρήθηκε ότι η παρουσία των δύο συμπολυμερών HEGMA και MAA μειώνει την τοξικότητα σε σύγκριση με αντίστοιχα ομοπολυμερή του DMAEMA, ενώ η απόδοση της επιμόλυνσης στις πλείστες περιπτώσεις μειώθηκε εκτός για δύο αστεροειδή συμπολυμερή DMAEMA – HEGMA και για ένα αστεροειδές συμπολυμερές DMAEMA – MAA όπου παρέμεινε περίπου στα ίδια επίπεδα. Τέλος, ένα αστεροειδές ομοπολυμερές DMAEMA και ένα αστεροειδές

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

συμπολυμερές DMAEMA – HEGMA παρουσίασαν εξίσου ικανοποιητικά αποτελέσματα με το δαπανηρότερο εμπορικό μεταφορέα SuperFect.

Τα αστεροειδή πολυμερικά πλέγματα χαρακτηρίστηκαν ως προς της ικανότητά τους να προσροφούν διαλύτη και συγκεκριμένα ως προς το βαθμό διόγκωσης (ΒΔ) σε διάφορους διαλύτες. Συγκεκριμένα, τα αστεροειδή πολυμερικά πλέγματα MMA – BuMA χαρακτηρίστηκαν σε μίγματα εξάνιου – τετραϋδροφουρανίου (THF), ενώ οι υπόλοιπες τρεις οικογένειες αστεροειδών πλεγμάτων χαρακτηρίστηκαν σε νερό διάφορων pH. Οι ΒΔ των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων MMA-BuMA αυξάνονταν με αύξηση της περιεκτικότητας του διαλύτη σε THF, ενώ για τις τρεις οικογένειες αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων που περιείχαν ιονιζόμενο/α μονομερές/η οι ΒΔ αυξάνονταν στα pH όπου ένα από τα δύο μονομερή ήταν ιονισμένο, συγκεκριμένα σε χαμηλά pH για τα αστεροειδή πολυμερικά πλέγματα DEAEMA – HEGMA και DMAEMA – BzMA και σε χαμηλά και υψηλά pH για τα αστεροειδή αμφολυτικά πολυμερικά πλέγματα DMAEMA – MAA. Αξιοσημείωτο είναι ότι για όλες τις οικογένειες τα πλέγματα, στην πλήρως διογκωμένη τους κατάσταση παρουσίασαν εξάρτηση του ΒΔ από την αρχιτεκτονική των αστεροειδών πλεγμάτων εκτός από τα διπλά υδρόφοβα αστεροειδή πλέγματα MMA – BuMA.

ABSTRACT

In this PhD Thesis cationic star polymers were synthesized, characterized and evaluated as vehicles that transfer genes into the cells (gene delivery, transfection). Moreover, four series of cross-linked star polymer networks, each based on 2 monomers, and one series of networks based on 2 monomers one of which was a macromonomer, were also synthesized and characterized.

The monomers used for all the syntheses were 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA), hexa(ethylene glycol) methacrylate (HEGMA), tetrahydropyranyl methacrylate (THPMA), methacrylic acid (MAA), methyl methacrylate (MMA), *n*-butyl methacrylate (BuMA), 2-(diethylamino)ethyl methacrylate, (DEAEMA), benzyl methacrylate (BzMA) and isobutylene (IB).

Four star copolymers of different architectures (block, heteroarm and statistical) were prepared for each of the two series of star copolymers based on DMAEMA – HEGMA and DMAEMA – MAA monomer combinations, respectively. The four series of cross-linked star polymer networks were based on monomers: (1) MMA – BuMA, (2) DEAEMA – HEGMA, (3) DMAEMA – MAA, and (4) DMAEMA – BzMA. All the above-mentioned series of polymers were prepared using group transfer polymerization (GTP). Using quasi-living carbocationic polymerization (QLCCP) one oligomer of IB was prepared which was later modified to a methacrylate macromonomer and polymerized using GTP to synthesize amphiphilic polymer networks.

All star polymers and their precursors as well as the precursors to the cross-linked star polymer networks were characterized in terms of their molecular weight (MW) using gel permeation chromatography (GPC). It was observed that all the linear precursors had MWs close to the theoretical MWs and with low polydispersity indices ($PDI \leq 1.32$). The MWs of the star polymers were always higher than the corresponding linear precursors, while their PDIs ranged from 1.17 to 1.42. Finally, the star polymers were also characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and it was observed that the experimental monomer composition of the copolymers was similar to the theoretical monomer composition.

Next, three series of star polymers were evaluated as vehicles for the delivery of plasmid DNA to HeLa cells. Their performance was compared with that of a commercially available reagent called SuperFect, which is a dendrimer. First, DMAEMA star homopolymers of different MWs were evaluated in transfection, where it was found that the overall transfection efficiency increased by decreasing the MW and increasing the amount of DNA, while a maximum was observed with respect to the amount of polymer. From the evaluation of the star copolymers it was concluded that the introduction of a comonomer in the star polymer, HEGMA or MAA, reduced both the toxicity and the transfection efficiency compared to star homopolymers, with the exception of two DMAEMA – HEGMA star copolymers and one DMAEMA – MAA star copolymer whose efficiency was similar to that of the DMAEMA homopolymers. Finally, one star homopolymer and one DMAEMA – HEGMA star copolymer presented the same satisfactory results in transfection as the commercially available reagent SuperFect.

The cross-linked star polymer networks were characterized in terms of their ability to absorb solvent. In particular, their degrees of swelling (DSs) in different

ABSTRACT

solvents were measured and, specifically, MMA – BuMA polymer networks were characterized in mixtures of hexane and tetrahydrofuran (THF), while the other 3 series of cross-linked star polymer networks were characterized in water solutions of different pH. The DSs of MMA – BuMA networks increased by increasing the THF content of the solvent, while the aqueous DSs of the other three series of polymer networks increased at the pH where one of the two monomers was ionized. In particular, the highest DSs of the DEAEMA – HEGMA and the DMAEMA – BzMA copolymer networks were at low pH, while for the ampholytic polymer networks DMAEMA – MAA the highest DSs were displayed both at low and high pH. It is noteworthy that for all four series of copolymer networks, the DSs in the most swollen state (highest DS) presented a dependence on network architecture, with the exception of double-hydrophobic cross-linked star copolymer networks MMA – BuMA.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Φτάνοντας στο τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που με βοήθησαν να διεκπεραιώσω αυτή της Διδακτορική Διατριβή.

Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον ερευνητικό μου σύμβουλο Αναπληρωτή Καθηγητή Δρ. Κώστα Πατρίκιο για τη συνεχή καθοδήγηση και τη βοήθεια του όλο αυτό το χρονικό διάστημα και που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με αυτό το θέμα.

Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Λεωνίδα Α. Φυλακτού ο οποίος με καθοδήγησε στην ερευνητική εργασία μου στο Ινστιτούτο Γενετικής και Νευρολογίας καθώς και την Δρ. Edna N. Yamasaki για τη βοήθεια της στην πειραματική διαδικασία της επιμόλυνσης και τη φιλία της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Δρ. Βέλα Ιβάν και τον Δρ. Peter Groh Werner από την Ουγγρική Ακαδημία Επιστημών για τη βοήθεια τους και τις συμβουλές τους στην παρασκευή του PIB.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φορείς που χρηματοδότησαν αυτή την έρευνα: το Ίδρυμα Προώθησης Έρευνας Κύπρου (ΠΕΝΕΚ 2001 και ΙΠΕ 2003), το Πανεπιστήμιο Κύπρου και την εταιρία Medochemie Ltd.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια Μαρία Βαμβακάκη από το Πανεπιστήμιο Κρήτης για την πολύτιμη βοήθεια της στα πρώτα μου βήματα στην έρευνα, την ανεκτίμητη φιλία και την ηθική συμπαράσταση της.

Θερμά ευχαριστώ σε όλα τα άτομα της ομάδας πολυμερών: την Στέλλα (την παλιά), την Αγγέλα (το χαμογελαστό παιδί), την Φρόσω (-άρα!!!), τον Δημήτρη (τον πρόεδρο), την Δήμητρα (το καλό παιδί), την Νάταλι (την καινούργια), την Μαριλίζ (το πελλόπλασμα), την Θεοδώρα (-ούλα την Γαλλιδούλα) και τον Gergő (köszönöm szerelmem!!!) για τη φιλία τους, τις αξέχαστες στιγμές που περάσαμε στο εργαστήριο μα πάνω απ' όλα την στήριξη τους. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ευδοκία και τον Mustafa για τη φιλία και την πολύτιμη βοήθεια τους στο εργαστήριο στο Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φίλους μου: Αγάθη (την Τεμβριώτισσα), Αντώνη, Ελένη (την «group» friend), Ροδούλα (το Ρόδο μου!!!) Μαρία Κωσταντίνου (την Μαριούλα μου), Μαρία Χατζηχριστοφόρου (τη μελλοντική «κουμέρα» μου), Μισιέλ (την κολλητή μου) και Χρίστο (τον κολλητό μου).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Κα Άννα Κυπριανού που με έκανε να αγαπήσω τη Χημεία.

Δεν θα μπορούσα φυσικά να μην ευχαριστήσω την οικογένεια μου, ιδιαίτερα την αδερφή μου Γεωργία για την πολύτιμη συμπαράσταση της και τον παππού μου Μιχάλη Χριστοδούλου για όλες τις ιστορίες και την απίστευτη διορατικότητα του, καθώς και το νονό μου Κυριάκο Χ΄Χρυσάνθου.

Περισσότερο από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Ειρήνη και Κύπρο, για την αγάπη τους, την ηθική συμπαράσταση τους, την υπομονή και την ανοχή που μου έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια μα πάνω από όλα που μου έμαθαν πως αντιμετωπίζονται οι πραγματικές δυσκολίες της ζωής. Και φυσικά την Λαΐκα!!!!

Μαμά μου σε λατρεύω... αιωνία σου η μνήμη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδες

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Στόχος και Πρωτοτυπία	1
1.2. «Ζωντανές» Μέθοδοι Πολυμερισμού	3
1.2.1. Πολυμερισμός Μεταφοράς Ομάδας	3
1.2.2. «Ζωντανός» Καρβοκατιοντικός Πολυμερισμός	6
1.3. Αστεροειδή Πολυμερή	8
1.3.1. Γενικοί Ορισμοί	8
1.3.2. Κύριοι Τρόποι σύνθεσης	9
1.4. Επιμόλυνση	15
1.4.1. Γενικά	15
1.4.2. Κύριοι Μεταφορείς	16
1.4.3. Πολυμερικοί Μεταφορείς	18
1.4.4. Κύριοι Μηχανισμοί Επιμόλυνσης	27
1.5. Πολυμερικά Πλέγματα	30
1.5.1. Γενικοί Ορισμοί	30
1.5.2. Κύριοι Τρόποι σύνθεσης	32
1.5.3. Τεχνικές Χαρακτηρισμού	46
1.5.4. Εφαρμογές	55
1.6. Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Πολυμερών	57
1.6.1. Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού	57
1.6.2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Πρωτονίων	58
1.6.3. Δυναμική Σκέδαση Φωτός	59
1.6.4. Στατική Σκέδαση Φωτός	60
1.6.5. Νεφελομετρία	61

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	62
2.1. Χημικά Αντιδραστήρια	62
2.2. Καθαρισμός Μονομερών, Διασταυρωτή, Εκκινητή και Διαλύτη Πολυμερισμού	63
2.3. Σύνθεση	64
2.3.1. Σύνθεση Δισθενούς Εκκινητή MTSCH, Μονομερούς THPMA και Μακρομονομερούς PIBMA	64
2.3.1.1. Σύνθεση Δισθενούς Εκκινητή MTSMC	64
2.3.1.2. Σύνθεση Μονομερούς THPMA	65
2.3.1.3. Σύνθεση Μακρομονομερούς PIBMA	66
2.3.2. Σύνθεση Καταλύτη	67
2.3.3. Σύνθεση Πολυμερών	68
2.3.4. Υδρόλυση Πολυμερών που Περιέχουν Μονάδες THPMA	70
2.3.4.1. Υδρόλυση Μονάδων THPMA Αστεροειδών Συμπολυμερών	70
2.3.4.2. Υδρόλυση Μονάδων THPMA Αστεροειδών Πολυμερικών Πλεγμάτων	70
2.4. Χαρακτηρισμός Αστεροειδών Πολυμερών	71
2.4.1. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους	71
2.4.2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Πρωτονίων	72
2.4.3. Δυναμική Σκέδαση Φωτός	72
2.4.4. Στατική Σκέδαση Φωτός	72
2.4.5. Νεφελομετρία	73
2.4.6. Τιτλοδότηση Υδρογονοϊόντων	73
2.5. Χαρακτηρισμός Αστεροειδών Πολυμερικών Πλεγμάτων	74
2.5.1. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους	74
2.5.2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Πρωτονίου	74
2.5.3. Ποσοστά Απωλειών των Πλεγμάτων	74
2.5.4. Βαθμοί Διόγκωσης	75
2.5.4.1. ΒΔ σε Οργανικούς Διαλύτες	75
2.5.4.2. ΒΔ σε Νερό Συναρτήσεως του pH	75

2.6.	Επιμόλυνση με χρήση των Αστεροειδών Πολυμερών	76
2.6.1.	Διαδικασία Παρασκευής του Πλασμιδιακού DNA	76
2.6.2.	Ηλεκτροφόρηση	76
2.6.3.	Διαδικασία Επιμόλυνσης	78
2.6.4.	Μέτρηση Αποτελεσμάτων με Οπτικό Μικροσκόπιο	79
2.7.	Προσρόφηση DNA στα Αστεροειδή Πολυμερικά Πλέγματα	80
2.8.	Θερμοδυναμική Μοντελοποίηση της Διόγκωσης των Πλεγμάτων	81

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ **84**

3.1.	Αστεροειδή Πολυμερή στην Επιμόλυνση	86
3.1.1.	Αστεροειδή Ομοπολυμερή DMAEMA στην Επιμόλυνση	86
3.1.2.	Αστεροειδή Συμπολυμερή DMAEMA-HEGMA	95
3.1.2.1.	<i>Σύνθεση</i>	95
3.1.2.2.	<i>Μοριακά Βάρη και Σύσταση</i>	96
3.1.2.3.	<i>Χαρακτηρισμός σε Υδατικά Διαλύματα</i>	100
3.1.2.3.1.	<i>Υδροδυναμικές Διάμετροι</i>	100
3.1.2.3.2.	<i>Φαινόμενα pK</i>	102
3.1.2.3.3.	<i>M_w και Αριθμός Βραχιόνων</i>	102
3.1.2.3.4.	<i>Θερμοκρασίες Νεφέλωσης</i>	102
3.1.2.4.	<i>Εφαρμογή στην Επιμόλυνση</i>	103
3.1.3.	Αστεροειδή Συμπολυμερή DMAEMA – MAA	112
3.1.3.1.	<i>Σύνθεση</i>	112
3.1.3.2.	<i>Μοριακά Βάρη και Σύσταση</i>	114
3.1.3.3.	<i>Χαρακτηρισμός σε Υδατικά Διαλύματα</i>	117
3.1.3.3.1.	<i>Υδροδυναμικές Διάμετροι</i>	117
3.1.3.3.2.	<i>Φαινόμενα pK</i>	118
3.1.3.3.3.	<i>M_w και Αριθμός Βραχιόνων</i>	119
3.1.3.3.4.	<i>Θερμοκρασίες Νεφέλωσης</i>	120
3.1.3.4.	<i>Εφαρμογή στην Επιμόλυνση</i>	121

3.2.	Αστεροειδή Πολυμερικά Πλέγματα	129
3.2.1.	Αστεροειδή Πλέγματα BuMA – MMA	130
3.2.1.1.	Σύνθεση	130
3.2.1.2.	Μοριακά Βάρη	134
3.2.1.3.	Ποσοστό Μάζας, MB και Σύσταση των Απωλειών των Πλεγμάτων	138
3.2.1.4.	Βαθμοί Διόγκωσης	140
3.2.1.5.	Θεωρητικά Προβλεπόμενοι Βαθμοί Διόγκωσης	144
3.2.2.	Αστεροειδή Πλέγματα DEAEMA – HEGMA	147
3.2.2.1.	Σύνθεση	147
3.2.2.2.	Μοριακά Βάρη	150
3.2.2.3.	Ποσοστό Μάζας, MB και Σύσταση των Απωλειών των Πλεγμάτων	152
3.2.2.4.	Βαθμοί Διόγκωσης	153
3.2.2.5.	Φαινόμενα pK	160
3.2.3.	Αστεροειδή Πλέγματα DMAEMA – THPMA (ΜΑΑ)	162
3.2.3.1.	Σύνθεση	162
3.2.3.2.	Μοριακά Βάρη	162
3.2.3.3.	Ποσοστό Μάζας, MB και Σύσταση των Απωλειών των Πλεγμάτων	166
3.2.3.4.	Βαθμοί Διόγκωσης	167
3.2.3.5.	Φαινόμενα pI και pK	171
3.2.3.6.	Συμπλοκοποίηση με DNA	172
3.2.4.	Αστεροειδή Πλέγματα DMAEMA – BzMA	175
3.2.4.1.	Σύνθεση	175
3.2.4.2.	Μοριακά Βάρη	178
3.2.4.3.	Ποσοστό Μάζας, MB και Σύσταση των Απωλειών των Πλεγμάτων	181
3.2.4.4.	Βαθμοί Διόγκωσης	183
3.2.4.5.	Φαινόμενα pK	187
3.2.4.6.	Συμπλοκοποίηση με DNA	188
3.2.5.	Πλέγματα Βασισμένα σε PIB	191
3.2.5.1.	Σύνθεση	191

3.2.5.2. Μοριακά Βάρη	194
3.2.5.3. Ποσοστό Μάζας, MB και Σύσταση των Απωλειών του Πλέγματος	197
3.2.5.4. Βαθμοί Διόγκωσης	198

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ **202**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ **208**

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

^1H NMR	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου
^{13}C NMR	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού άνθρακα
293 cells	Ανθρώπινα εμβρυικά κύτταρα νεφρού
2VP	2-βινυλική πυριδίνη
A549	Ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα πνεύμονα
AA	Ακρυλικό οξύ
AAm	Ακρυλαμίδιο
AEMA	Μεθακρυλική αιθυλαμίνη
AFM	Μικροσκοπία ατομικής δύναμης
A-PDXL-A	α,ω -διακρυλική πολυ(1,3-διοξολάνη)
A-PEtOx-A	α,ω -διακρυλική πολυ(2-αιθυλ-2-οξαζολίνη)
A-PMeOx-A	α,ω -διακρυλική πολυ(2-μεθυλ-2-οξαζολίνη)
ATRP	Πολυμερισμός ριζών μεταφοράς ατόμου
B	Βουταδιένιο
BA	Ακρυλικός κ -βουτυλεστέρας
BuMA	Μεθακρυλικός κ -βουτυλεστέρας
BzMA	Μεθακρυλικός βενζυλεστέρας
CaH₂	Υδρίδιο του ασβεστίου
CD₃OD	Δευτεριωμένη μεθανόλη
CDCl₃	Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
CHD	1,3-κυκλοεξαδιένιο
CL	Καπρολακτόνη
COS-1 ή 7	Μεταλλαγμένα κύτταρα νεφρού του Πράσινου Αφρικάνικου πιθήκου
D₂O	Δευτεριωμένο νερό
DCA	Μέτρηση της δυναμικής γωνία επαφής
DHP	2,3-διυδρο-2-πυράνιο
DHPMA	Μεθακρυλικός 2,3-διυδροξυπροπυλεστέρας
DLS	Δυναμική σκέδαση φωτός

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

DMA	Δυναμική μηχανική ανάλυση
DMAAm	N,N-διμεθυλακρυλαμίδιο
DMAE	Διμεθυλαμινοαιθανόλη
DMAEA	Ακρυλικός 2-(διμεθυλαμινο)αιθυλεστέρας
DMAEMA	Μεθακρυλικός 2-(διμεθυλαμινο)αιθυλεστέρας
DMAEMAm	Μεθακρυλαμιδικός 2-(διμεθυλαμινο)αιθυλεστέρας
DMAPMA	Μεθακρυλικός 3-(διμεθυλαμινο)προπυλεστέρας
DMAPMAm	Μεθακρυλαμιδικός 3-(διμεθυλαμινο)προπυλεστέρας
DMEM	Τροποποιημένο διάλυμα-μέσο (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSO	Δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ
D-PBS	Ρυθμιστικό διάλυμα φαινολικού άλατος (Dulbecco's phosphate buffered saline)
DPE	1,1,-διφαινυλαιθυλένιο
DPPH	2,2-διφαινυλο-πικρυλ-υδραζύνη
DRS	Μικροσκοπία διηλεκτρικής χαλάρωσης
DSC	Θερμιδομετρία διαφορική σάρωσης
DEAEMA	Μεθακρυλικός 2-(διαιθυλαμινο)αιθυλεστέρας
EDDMA	Διμεθακρυλική αιθυλενοδιόλη
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος
EGDMA	Διμεθακρυλική αιθυλενογλυκόλη
EGFP	Γονίδιο φθορίζουσας πρωτεΐνης (enhanced green fluorescent protein)
EMA	Μεθακρυλικός αιθυλεστέρας
EtBr	Βρωμιούχο αιθίδιο
FBS	Ορός βοοειδούς
GPC	Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού
GTP	Πολυμερισμός μεταφοράς ομάδας
HCl	Υδροχλωρικό οξύ
HEGMA	Μεθακρυλικός εστέρας της εξααιθυλενογλυκόλης
HeLa cells	Καρκινικά ανθρώπινα κολπικά κύτταρα
HEMA	Μεθακρυλικός 2-υδροξυαιθυλεστέρας
HeMA	Μεθακρυλικός κ-εξυλεστέρας

HepG2	Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα συκωτιού
HO-PEG-OH	Διυδρόξυ πολυ(αιθυλενογλυκόλη)
IB	Ισοβουτυλένιο
IP	Ισοπρένιο
LaMA	Μεθακρυλικός δωδεκυλεστέρας
MA	Ακρυλικός μεθυλεστέρας
MAA	Μεθακρυλικό οξύ
MA-PEO-MA	α,ω-διμεθακρυλικό πολυ(αιθυλενοξείδιο)
MBAAm	<i>N,N'</i> -μεθυλενοδιακρυλαμίδιο
MMA	Μεθακρυλικός μεθυλεστέρας ή μεθακρυλικό μεθύλιο
M_n	Μέσου αριθμού Μοριακό Βάρος
MTS	1-μεθόξυ-1-(τριμεθυλοσιλοξυ)-2-μεθυλο-1-προπένιο
MTSMC	1,4-δισ(μεθοξυτριμεθυλοσιλοξυμεθυλενο)κυκλοεξάνιο
M_w	Μέσου βάρους Μοριακό Βάρος
MWCO	Μέτρηση πορώδους και μοριακού βάρους αποκοπής
Na₂SO₄	Θεικό νάτριο
NaHCO₃	Όξινο ανθρακικό νάτριο
NaOH	Υδροξειδίου του νατρίου
NAPMAm	Μεθακρυλαμιδικός <i>N</i> -3-αμινοπροπυλεστέρας
NIPAm	<i>N</i> -ισοπροπυλακρυλαμίδιο
NMR	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού
NVP	Βινυλική πυριλιδόνη
OVCAr-3	Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ωοθήκης
P(D,L)LA	Πολυ(D,L-λακτιδίου)
P2VP	Πολυ(2-βινυλική πυριδίνη)
PB	Πολυβουταδιένιο
PCL	Πολυ(ε-καπρολακτόνη)
PCS	Φασματοσκοπία συσχετισμού φωτονίων
PD₅	Πενταμεθυλοκυκλοπεντασιλοξάνη
PE	Πολυαιθυλένιο
PEE	Πολυ(αιθυλαιθυλένιο)

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

PEGMA	Μεθακρυλικός εστέρα της πολυ(αιθυλενογλυκόλης)
PEI	Πολυαιθυλενιμίνη
PI	Πολυισοπρένιο
PIB	Πολυισοβουτυλένιο
PLL	Πολυ(L-λυσίνη)
PMMA	Πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας)
PPO	πολυ(προπυλενοξείδιο)
pRLSV40	Πλασμιδιακό DNA (ένα είδος)
PTFE	Πολυ(τετραφθορο αιθυλένιο)
RAFT	Πολυμερισμός ριζών μεταφοράς αλυσίδας με αντιστρεπτή προσθήκη και διάσπαση
ROP	Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
SANS	Σκέδαση νετρονίων υπό μικρή γωνία
SAXD	Περίθλαση ακτίνων X υπό μικρή γωνία
SAXS	Σκέδαση ακτίνων X υπό μικρή γωνία
SEM	Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης
SLS	Στατική σκέδασης φωτός
St	Στυρένιο
tBA	Ακρυλικός <i>t</i> -βουτυλεστέρας
TBABB	Διβενζοϊκό τετραβουτυλαμμώνιο
TBE	Ρυθμιστικό διάλυμα τριυδροξυμεθυλοαμινομεθανίου, βορικού οξέος και EDTA
TEGDMA	Διμεθακρυλικός διεστέρας της τετρα(αιθυλενογλυκόλης)
TEM	Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης
TGA	Θερμοσταθμική ανάλυση
THF	Τετραϋδροφουράνιο
THPMA	Μεθακρυλικός πυρανηλεστέρας
TMAEMA	Μεθακρυλικός 2-(τριμεθυλαμινο)αιθυλεστέρας
UV-Vis	Υπεριώδης-ορατή ακτινοβολία
V-PDMS-V	διβινυλικό πολυ(διμεθυλοσιλοξάνιο)
XPS	Φωτοηλεκτρονική φασματομετρία με ακτίνες X
α,ω-PMeOx	πολυ(2-μεθυλ-2-οξαζολίνη)

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

α,ω-PPhOx	Πολυ(2-φαινυλ-2-οξαζολίνη)
ΒΔ	Βαθμός διόγκωσης
ΒΙ	Βαθμός ιονισμού
ΒΠ	Βαθμό πολυμερισμού
ΔΠΜΒ	Δείκτης πολυδιασποράς μοριακών βαρών
ΗΕΝΙΜΑ	Αιθυλ μεθακρυλική νικοτιναμίνη
ΗΥΜΙΜΜΑ	4-μεθυλ-5-(μεθυλ μεθακρυλική) ιμιδαζόλη
κ.β.	Κατά βάρος
κ.ο.	Κατά όγκο
ΚΜΒ	Κατανομή μοριακών βαρών
ΜΒ	Μοριακό(α) βάρος(η)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ

- Πίνακας 1.1.** Μονομερή, μέθοδοι πολυμερισμού και τρόποι σύνθεσης που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή αστεροειδών πολυμερών.
- Πίνακας 1.2.** Μονομερή, μέθοδοι πολυμερισμού, αρχιτεκτονική πολυμερών, μέθοδοι χαρακτηρισμού των συμπλόκων του πολυμερούς με το DNA και κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην επιμόλυνση.
- Πίνακας 1.3.** Μονομερή και μέθοδοι πολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή πολυμερικών πλεγμάτων, οι μέθοδοι χαρακτηρισμού τους και οι εφαρμογές τους.
- Πίνακας 2.1** Παράμετροι διαλυτότητας, δ , των μονάδων MMA και BuMA και των διαλυτών νερού, THF και κ-εξανίου (Brandrup et al, 1999).
- Πίνακας 3.1** MB και ΔΠMB των αστεροειδών συμπολυμερών DMAEMA – HEGMA και των πρόδρομων μορίων τους.
- Πίνακας 3.2** Σύσταση των αστεροειδών πολυμερών DMAEMA – HEGMA.
- Πίνακας 3.3** Υδροδυναμικές διάμετροι και φαινόμενα pK των αστεροειδών πολυμερών DMAEMA – HEGMA.
- Πίνακας 3.4** MB και ΔΠMB των αστεροειδών συμπολυμερών DMAEMA – THPMA και των πρόδρομων μορίων τους.
- Πίνακας 3.5** Σύσταση των αστεροειδών πολυμερών DMAEMA – MAA.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ

- Πίνακας 3.6** Υδροδυναμικές διάμετροι σε ουδέτερο νερό και φαινόμενα ρK των αστεροειδών πολυμερών DMAEMA – MAA.
- Πίνακας 3.7** Τα M_w των αστεροειδών πολυμερών, των βραχιόνων τους, και οι μέσου βάρους αριθμοί βραχιόνων των αστεροειδών πολυμερών DMAEMA – MAA.
- Πίνακας 3.8** MB και ΔΠMB των πρόδρομων μορίων των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων BuMA – MMA.
- Πίνακας 3.9** Ποσοστιαία μάζα, MB, ΔΠMB και σύσταση των απωλειών των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων BuMA – MMA.
- Πίνακας 3.10** Οι παράμετροι αλληλεπίδρασης Flory – Huggins για δώδεκα συνδυασμούς μεταξύ τεσσάρων διαλύτων και τριών πολυμερών.
- Πίνακας 3.11** MB και ΔΠMB των πρόδρομων μορίων των αστεροειδών πλεγμάτων DEAEMA – HEGMA.
- Πίνακας 3.12** Ποσοστιαία μάζα, MB, ΔΠMB και σύσταση των απωλειών των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DEAEMA – HEGMA.
- Πίνακας 3.13** Τα φαινόμενα ρK των αστεροειδών πλεγμάτων DEAEMA – HEGMA.
- Πίνακας 3.14** MB και ΔΠMB των πρόδρομων μορίων των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – THPMA.
- Πίνακας 3.15** Ποσοστιαία μάζα, MB, ΔΠMB και σύσταση των απωλειών των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DMAEMA – THPMA.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ

- Πίνακας 3.16** Τα φαινόμενα ρK και ρI των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – MAA.
- Πίνακας 3.17** MB και ΔΠMB των αμφιφιλικών αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA και των πρόδρομων μορίων τους.
- Πίνακας 3.18** Ποσοστιαία μάζα, MB, ΔΠMB και σύσταση των απωλειών των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA.
- Πίνακας 3.19** Τα φαινόμενα ρK αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA.
- Πίνακας 3.20** MB, ΔΠMB, θεωρητικές και πειραματικές συστάσεις σε DMAEMA των πρόδρομων μορίων των πολυμερικών πλεγμάτων.
- Πίνακας 3.21** Ποσοστιαία μάζα, MB, ΔΠMB και σύσταση των απωλειών των πολυμερικών πλεγμάτων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΑ

- Σχήμα 1.1.** Χημικοί τύποι (α) ακρυλικού και (β) μεθακρυλικού μονομερούς με πλευρική ομάδα R.
- Σχήμα 1.2.** Ο μηχανισμός του πολυμερισμού μεταφοράς ομάδας που προϋποθέτει διάσταση του εκκινήτη.
- Σχήμα 1.3.** Σχηματική απεικόνιση αστεροειδούς πολυμερούς. Με μπλε συμβολίζονται οι βραχίονες και με μαύρο ο πυρήνας.
- Σχήμα 1.4.** Σχηματική απεικόνιση διαφόρων αρχιτεκτονικών αστεροειδών συμπολυμερών. Με μπλε και με κόκκινο συμβολίζονται οι μονάδες δύο μονομερών A και B, αντίστοιχα, και με μαύρο ο πυρήνας.
- Σχήμα 1.5.** Σχηματική απεικόνιση των τριών κύριων τρόπων σύνθεσης αστεροειδών πολυμερών. Με μπλε συμβολίζονται οι βραχίονες, με μαύρα αστεράκια τα ενεργά κέντρα του πολυμερισμού και με μαύρους κύκλους οι πυρήνες των αστεροειδών πολυμερών.
- Σχήμα 1.6.** Η λιπιδική διπλοστοιβάδα, η οποία αποτελείται από φωσφολιπίδια. Αυτά έχουν δύο υδρόφοβες συρές (μαύρο) και μία αρνητικά (συνήθως) φορτισμένη κεφαλή (γαλάζιο). Με πορτοκαλί παριστάνονται οι εσωτερικές πρωτεΐνες (Voet και Voet 1995).
- Σχήμα 1.7.** Οι κύριοι μεταφορείς γενετικού υλικού και οι διάφορες κατηγορίες τους.
- Σχήμα 1.8.** Χημικές δομές κατιοντικών πολυμερικών οχημάτων (Merdan et al 2002).

- Σχήμα 1.9.** Σχηματική απεικόνιση της μη ενεργοποιημένης και της ενεργοποιημένης δομής του δενδριμερούς και η χημική του δομή (Hudde et al 1999).
- Σχήμα 1.10.** Χημικές δομές μεθακρυλικών, μεθακρυλαμιδικών και ακρυλικών ομοπολυμερών που χρησιμοποιηθήκαν στην επιμόλυνση (van de Wetering et al 1999(α)).
- Σχήμα 1.11.** Απεικόνιση της ενδοκύτωσης, της εισόδου δηλαδή υλικών μέσα στο κύτταρο με εγκόλπωση της πλασματικής κυτταρικής μεμβράνης (www.kscience.co.uk).
- Σχήμα 1.12.** Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού του φαινομένου του σφουγγαριού πρωτονίων (Pang et al 2002).
- Σχήμα 1.13.** Σχηματική απεικόνιση ενός πολυμερικού πλέγματος όπου παρουσιάζονται οι ελαστικές του αλυσίδες (μπλε χρώμα), οι ελεύθερες του αλυσίδες (κόκκινο χρώμα) και οι κόμβοι του (μαύρο χρώμα).
- Σχήμα 1.14.** Σχηματική απεικόνιση πρότυπου πολυμερικού πλέγματος. Με μαύρο χρώμα συμβολίζονται οι κόμβοι και με μπλε χρώμα οι ελαστικές αλυσίδες.
- Σχήμα 1.15.** Παραδείγματα πρόσφατα παρασκευασμένων συμπολυμερικών πλεγμάτων. Με άσπρο και μαύρο χρώμα παριστάνονται τα δύο συστατικά (Patrickios και Georgiou 2003).
- Σχήμα 1.16.** Στάδια σύνθεσης ενός πρότυπου αμφιφιλικού πλέγματος από δύο ομοπολυμερή και ένα τετραδραστικό διασταυρωτή (συμβολίζεται με Y) (Erdodi και Kennedy 2005(α)).

- Σχήμα 1.17.** Διαγράμματα DSC μίας σειράς από αμφιφιλικά πολυμερικά πλέγματα. Όσο προχωρούμε προς τα πάνω αυξάνεται η σύσταση σε υδρόφιλο μονομερές. Είναι διακριτές δύο κορυφές T_g για κάθε πολυμερικό πλέγμα εκτός για τα δύο ομοπολυμερικά πλέγματα (Guan et al 2000).
- Σχήμα 1.18.** TEM ρητίνης μαζί με διαδρομερές συμπολυμερές PI-*b*-P2VP. Χαρακτηριστική φυλλώδης δομή (Kosonen et al 2001).
- Σχήμα 1.19.** Εικόνα από SEM δερματικών ινοβλαστών (dermal fibroblast – είδος δερματικών κύτταρων), τα οποία καλλιεργήθηκαν σε ομοπολυμερές πλέγμα του LaMA (Haigh et al 2002).
- Σχήμα 1.20.** Αρχή λειτουργίας GPC: Τα μικρά μόρια (μαύρο χρώμα), διεισδύουν μέσα στους πόρους, σε αντίθεση με τα μεγάλα μόρια (άσπρο χρώμα) (Allcock και Lampe 1990(β)).
- Σχήμα 3.1.** Χημικές δομές και ονόματα των μονομερών, των εκκινητών, του διασταυρωτή και του καταλύτη, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα Διατριβή.
- Σχήμα 3.2.** Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του «in-out» αστεροειδούς ομοπολυμερούς, DMAEMA₂₀-*star*-DMAEMA₂₀, όπου διακρίνεται και το πρόδρομό του «arm-first» αστεροειδές ομοπολυμερές. Οι μονάδες του DMAEMA συμβολίζονται με άσπρο, ενώ ο μαύρος κύκλος στο κέντρο κάθε αστεροειδούς πολυμερούς συμβολίζει τον υδρόφοβο πυρήνα από EGDMA. Με μαύρο αστεράκι συμβολίζονται τα ενεργά κέντρα του πολυμερισμού.
- Σχήμα 3.3.** Εξάρτηση (**α**) της απόδοσης της επιμόλυνσης (**β**) της βιωσιμότητας των κυττάρων και (**γ**) της συνολικής απόδοσης επιμόλυνσης από το ΒΠ των

βραχιόνων των «arm-first» αστεροειδών ομοπολυμερών του DMAEMA (άσπρο χρώμα). Ένα «arm-first» αστεροειδές ομοπολυμερές αντιστοιχεί σε κάθε τιμή του ΒΠ του βραχίονα στον άξονα χ. Με γκρίζο χρώμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα του «in-out» αστεροειδούς πολυμερούς DMAEMA₂₀-star-DMAEMA₂₀. Για την επιμόλυνση, χρησιμοποιήθηκαν 15 µg αστεροειδούς ομοπολυμερούς και 1 µg πλασμιδιακού DNA.

Σχήμα 3.4. Η εξάρτηση της απόδοσης επιμόλυνσης, της βιωσιμότητας των κυττάρων, και της συνολικής απόδοσης επιμόλυνσης από (α) την ποσότητα του DMAEMA₁₀-star σε σταθερή ποσότητα DNA 3 µg, (β) την ποσότητα του πλασμιδιακού DNA σε σταθερή ποσότητα DMAEMA₁₀-star 4.5 µg και (γ) τη συνολική ποσότητα επιμολυντών για σταθερή αναλογία αστεροειδούς πολυμερούς : DNA ίση με 15 : 1 (µg : µg). Στο ίδιο Σχήμα, με μαύρο χρώμα παριστάνονται η απόδοση επιμόλυνσης, η βιωσιμότητα των κυττάρων και η συνολική απόδοση επιμόλυνσης για τον εμπορικά διαθέσιμο μεταφορέα SuperFect στις βέλτιστες συνθήκες απόδοσής του (12 µg SuperFect και 1 µg DNA).

Σχήμα 3.5. Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την παρασκευή των τεσσάρων αστεροειδών συμπολυμερών DMAEMA – HEGMA και ενός αστεροειδούς ομοπολυμερούς του DMAEMA. Οι μονάδες του DMAEMA συμβολίζονται με άσπρο, ενώ του HEGMA συμβολίζονται με μαύρο. Ο μαύρος κύκλος στο κέντρο κάθε αστεροειδούς πολυμερούς συμβολίζει τον υδρόφοβο πυρήνα από EGDMA και με μαύρο αστεράκι συμβολίζονται τα ενεργά κέντρα του πολυμερισμού.

Σχήμα 3.6. Χρωματογραφήματα GPC του «arm-first» αστεροειδούς διαδρομερούς συμπολυμερούς (DMAEMA₁₈-b-HEGMA₂)-star και των δύο γραμμικών πρόδρομων μορίων του.

Σχήμα 3.7. Φάσμα ^1H NMR του «arm-first» αστεροειδούς συμπολυμερούς (DMAEMA₁₈-*b*-HEGMA₂)-*star* σε CDCl₃.

Σχήμα 3.8 Εξάρτηση της απόδοσης της επιμόλυνσης, της βιωσιμότητας των κυττάρων και της συνολικής απόδοσης της επιμόλυνσης από την ποσότητα του αστεροειδούς πολυμερούς (**α**) DMAEMA₂₀-*star*, (**β**) DMAEMA₁₈-*b*-HEGMA₂-*star*, (**γ**) HEGMA₂-*b*-DMAEMA₁₈-*star*, (**δ**) DMAEMA₁₈-*co*-HEGMA₂-*star*, και (**ε**) DMAEMA₁₈-*star*-HEGMA₂ για σταθερή ποσότητα πλασμιδιακού DNA 3 μg (άσπρο χρώμα). Το δενδριμερές SuperFect στις βέλτιστες του συνθήκες (12 μg SuperFect και 1 μg πλασμιδιακό DNA) απεικονίζεται με μαύρο χρώμα στις αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις.

Σχήμα 3.9. Εξάρτηση (**α**) της απόδοσης της επιμόλυνσης, (**β**) της βιωσιμότητας των κυττάρων και (**γ**) της συνολικής απόδοσης επιμόλυνσης από το είδος του πολυμερούς: του δενδριμερούς SuperFect, ενός αστεροειδούς ομοπολυμερούς του DMAEMA και των τεσσάρων αστεροειδών συμπολυμερών DMAEMA-HEGMA στις βέλτιστες τους συνθήκες.

Σχήμα 3.10. Φωτογραφίες των κυττάρων κάτω από κανονικό φως (αριστερά) και κάτω από λάμπα φθορισμού (δεξιά) όταν τα κύτταρα επιμολύνθηκαν χρησιμοποιώντας (**α**) το πολυμερές (DMAEMA₁₈-*b*-HEGMA₂)-*star* και (**β**) το SuperFect. Τα κύτταρα που φθορίζουν (πράσινο χρώμα στις δεξιές εικόνες) είναι αυτά στα οποία το DNA έχει μεταφερθεί επιτυχώς στον πυρήνα και έχει μεταφραστεί στην πρωτεΐνη.

Σχήμα 3.11. Αντίδραση παρασκευής του μεθακρυλικού τετραϋδροπυραυλεστέρα.

Σχήμα 3.12. Φάσμα ^1H NMR του μονομερούς THPMA σε CDCl₃.

- Σχήμα 3.13.** Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την παρασκευή των τεσσάρων αστεροειδών συμπολυμερών DMAEMA – THPMA και ενός αστεροειδούς ομοπολυμερούς του DMAEMA. Οι μονάδες του DMAEMA συμβολίζονται με άσπρο, ενώ του THPMA συμβολίζονται με μαύρο. Ο μαύρος κύκλος στο κέντρο κάθε αστεροειδούς πολυμερούς συμβολίζει τον υδρόφοβο πυρήνα από EGDMA και με μαύρο αστεράκι συμβολίζονται τα ενεργά κέντρα του πολυμερισμού.
- Σχήμα 3.14.** Χρωματογραφήματα GPC του «arm-first» αστεροειδούς διαδρομερούς συμπολυμερούς (DMAEMA₁₅-*b*-THPMA₅)-*star* και των δύο γραμμικών πρόδρομων μορίων του.
- Σχήμα 3.15.** Οι καμπύλες τιτλοδότησης του κατιοντικού ομοπολυμερούς DMAEMA₁₅-*star* και του αμφολυτικού πολυμερούς (MAA₅-*b*-DMAEMA₁₅)-*star*.
- Σχήμα 3.16.** Εξάρτηση της απόδοσης της επιμόλυνσης, της βιωσιμότητας των κυττάρων και της συνολικής απόδοσης της επιμόλυνσης από την ποσότητα του αστεροειδούς πολυμερούς (α) DMAEMA₁₅-*star*, (β) DMAEMA₁₅-*b*-MAA₅-*star*, (γ) MAA₅-*b*-DMAEMA₁₅-*star*, (δ) DMAEMA₁₅-*co*-MAA₅-*star*, και (ε) DMAEMA₁₅-*star*-MAA₅ για σταθερή ποσότητα πλασμιδιακού DNA 3 μg (άσπρο χρώμα). Το δενδριμερές SuperFect στις βέλτιστές του συνθήκες (12 μg SuperFect και 1 μg πλασμιδιακό DNA) απεικονίζεται με μαύρο χρώμα στις αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις.
- Σχήμα 3.17.** Εξάρτηση (α) της απόδοσης της επιμόλυνσης, (β) της βιωσιμότητας των κυττάρων και (γ) της συνολικής απόδοσης της επιμόλυνσης από το είδος του πολυμερούς: του δενδριμερούς SuperFect, ενός αστεροειδούς

ομοπολυμερούς του DMAEMA και των τεσσάρων αστεροειδών συμπολυμερών DMAEMA – MAA στις βέλτιστες τους συνθήκες.

Σχήμα 3.18. Οι τέσσερις συνδυασμοί των μονομερών των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων που παρασκευάστηκαν σε αυτή τη Διδακτορική Εργασία.

Σχήμα 3.19. Συνθετικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή των διάφορων αρχιτεκτονικών των αστεροειδών πλεγμάτων BuMA – MMA.

Σχήμα 3.20. Σχηματική απεικόνιση της συνθετικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του πλέγματος [(MMA₂₅-*b*-BuMA₂₅)-*star*-(BuMA₂₅-*b*-MMA₂₅)]-*network*, το οποίο είναι βασισμένο σε αδρομερή αστεροειδή συμπολυμερή. Ο αριθμός των βραχιόνων των αστεροειδών πολυμερών δεν είναι 3 / 6, όπως υποδεικνύεται στο σχήμα, αλλά μεγαλύτερος. Με μπλε και κόκκινο συμβολίζονται τα τμήματα των μονάδων MMA και BuMA, αντίστοιχα, ενώ με μαύρους κύκλους και μαύρους αστερίσκους συμβολίζονται οι κόμβοι και τα ενεργά κέντρα των πολυμερών, αντίστοιχα.

Σχήμα 3.21. Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων αρχιτεκτονικών των πλεγμάτων BuMA – MMA βασισμένων σε αστεροειδή πολυμερή που συντέθηκαν. Με μπλε και κόκκινο συμβολίζονται τα τμήματα των μονάδων MMA και BuMA, αντίστοιχα. Με μαύρο χρώμα συμβολίζονται οι κόμβοι των πλεγμάτων οι οποίοι αποτελούνται από το διασταυρωτή EGDMA.

Σχήμα 3.22. Χρωματογραφήματα GPC των διαλυτών πρόδρομων πολυμερών απωλειών του αστεροειδούς συμπολυμερούς Πλέγματος 5, [(MMA₂₅-*b*-BuMA₂₅)-*star*-(BuMA₂₅-*b*-MMA₂₅)]-*network*, και των απωλειών του. Τα γράμματα M και B είναι περαιτέρω συντομογραφίες για τις μονάδες MMA και BuMA, αντίστοιχα.

- Σχήμα 3.23.** Οι βαθμοί διόγκωσης των αστεροειδών πλεγμάτων BuMA – MMA σαν συνάρτηση της σύστασης του διαλύτη σε THF.
- Σχήμα 3.24.** Βαθμοί διόγκωσης των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων BuMA – MMA σε διάφορους διαλύτες συναρτήσει του τύπου του πολυμερικού πλέγματος.
- Σχήμα 3.25.** Εξάρτηση του βαθμού διόγκωσης των δύο ομοπολυμερών πλεγμάτων και του 50-50 συμπολυμερούς πλέγματος από τη σύσταση του διαλύτη σε THF. **(α)** Θεωρητικά προβλεπόμενοι βαθμοί διόγκωσης **(β)** Πειραματικά προσδιορισμένοι βαθμοί διόγκωσης.
- Σχήμα 3.26.** Συνθετικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή των διάφορων αρχιτεκτονικών των αστεροειδών πλεγμάτων DEAEEMA – HEGMA.
- Σχήμα 3.27.** Σχηματική απεικόνιση της συνθετικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του πλέγματος [(HEGMA₂₅-*b*-DEAEEMA₁₅)-*star*-(DEAEEMA₁₅-*b*-HEGMA₂₅)]-*network*, το οποίο είναι βασισμένο σε αδρομερή αστεροειδή συμπολυμερή. Ο αριθμός των βραχιόνων των αστεροειδών πολυμερών δεν είναι 3 / 6, όπως υποδεικνύεται στο σχήμα, αλλά μεγαλύτερος. Με μπλε και κόκκινο συμβολίζονται τα τμήματα των μονάδων HEGMA και DEAEEMA, αντίστοιχα, ενώ με μαύρους κύκλους και μαύρους αστερίσκους συμβολίζονται οι κόμβοι και τα ενεργά κέντρα των πολυμερών, αντίστοιχα.
- Σχήμα 3.28.** Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων αρχιτεκτονικών των πλεγμάτων DEAEEMA – HEGMA που συντέθηκαν βασισμένα σε αστεροειδή πολυμερή. Με κόκκινο και μπλε συμβολίζονται τα τμήματα των μονάδων DEAEEMA και HEGMA, αντίστοιχα. Με μαύρο χρώμα συμβολίζονται οι

κόμβοι των πλεγμάτων οι οποίοι αποτελούνται από το διασταυρωτή EGDMA.

Σχήμα 3.29. Σχηματική απεικόνιση της αλλαγής της διόγκωσης του αδρομερικού αμφιφιλικού πλέγματος, [(HEGMA₂₅-*b*-DEAEMA₁₅)-*star*-(DEAEMA₁₅-*b*-HEGMA₂₅)]-*network* σε σχέση με το pH. Με κόκκινο και μπλε συμβολίζονται τα τμήματα των μονάδων DEAEMA και HEGMA, αντίστοιχα. Με μαύρο χρώμα συμβολίζονται οι κόμβοι των πλεγμάτων οι οποίοι αποτελούνται από το διασταυρωτή EGDMA.

Σχήμα 3.30. Οι βαθμοί διόγκωσης και οι βαθμοί ιονισμού των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – HEGMA σαν συνάρτηση του pH.

Σχήμα 3.31. Βαθμοί διόγκωσης των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DEAEMA – HEGMA σε διάφορους διαλύτες συναρτήσει του τύπου του πολυμερικού πλέγματος.

Σχήμα 3.32. Συνθετικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή των διαφόρων αρχιτεκτονικών των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – THPMA.

Σχήμα 3.33. Χρωματογραφήματα GPC των διαλυτών πρόδρομων πολυμερών του αστεροειδούς συμπολυμερούς Πλέγματος 3, [(DMAEMA₁₀-*b*-THPMA₁₀)-*star*-(THPMA₁₀-*b*-DMAEMA₁₀)]-*network* και των απωλειών του. Τα γράμματα D και T είναι περαιτέρω συντομογραφίες για τις μονάδες DMAEMA και THPMA, αντίστοιχα.

Σχήμα 3.34. Οι βαθμοί διόγκωσης των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – MAA σαν συνάρτηση του pH.

- Σχήμα 3.35.** Βαθμοί διόγκωσης των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DMAEMA – MAA σε διάφορους διαλύτες συναρτήσει του τύπου του πολυμερικού πλέγματος.
- Σχήμα 3.36.** Τα ποσοστά προσρόφησης DNA και οι βαθμοί διόγκωσης των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – MAA παρουσία DNA σε τρία διαφορετικά pH.
- Σχήμα 3.37.** Συνθετικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή των διάφορων αρχιτεκτονικών των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA.
- Σχήμα 3.38.** Σχηματική απεικόνιση της συνθετικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του πλέγματος [(DMAEMA_{22.5}-b-BzMA_{7.5})-star-(BzMA_{7.5}-b-DMAEMA_{22.5})]-network, το οποίο είναι βασισμένο σε αδρομερή αστεροειδή συμπολυμερή. Ο αριθμός των βραχιόνων των αστεροειδών πολυμερών δεν είναι 3 / 6, όπως υποδεικνύεται στο σχήμα αλλά μεγαλύτερος. Με μπλε και κόκκινο συμβολίζονται τα τμήματα των μονάδων DMAEMA και BzMA, αντίστοιχα, ενώ με μαύρους κύκλους και μαύρους αστερίσκους συμβολίζονται οι κόμβοι και τα ενεργά κέντρα των πολυμερών, αντίστοιχα.
- Σχήμα 3.39.** Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων αρχιτεκτονικών των πλεγμάτων DMAEMA – BzMA που συντέθηκαν βασισμένα σε αστεροειδή πολυμερή. Με χρώματα μπλε και κόκκινο συμβολίζονται τα τμήματα των μονάδων DMAEMA και BzMA, αντίστοιχα. Με μαύρο χρώμα συμβολίζονται οι κόμβοι των πλεγμάτων οι οποίοι αποτελούνται από το διασταυρωτή EGDMA.
- Σχήμα 3.40.** Χρωματογραφήματα GPC των διαλυτών πρόδρομων πολυμερών του αστεροειδούς συμπολυμερούς Πλέγματος 3, [(DMAEMA_{22.5}-b-BzMA_{7.5})-

star-(BzMA_{7.5}-*b*-DMAEMA_{22.5})]-*network* και των απωλειών του. Τα γράμματα D και B είναι περαιτέρω συντομογραφίες για τις μονάδες DMAEMA και BzMA, αντίστοιχα.

Σχήμα 3.41. Οι βαθμοί διόγκωσης και οι βαθμοί ιονισμού των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA σαν συνάρτηση του pH.

Σχήμα 3.42. Βαθμοί διόγκωσης των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA σε διάφορους διαλύτες συναρτήσει του τύπου του πολυμερικού πλέγματος.

Σχήμα 3.43. Τα ποσοστά προσρόφησης DNA και οι βαθμοί διόγκωσης των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA παρουσία DNA σε τρία διαφορετικά pH.

Σχήμα 3.44. Αντιδράσεις παρασκευής του PIBMA.

Σχήμα 3.45. Φάσματα ¹H NMR (α) του PIBOH και (β) του μακρομονομερούς PIBMA.

Σχήμα 3.46. Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του πλέγματος (PIB_{2.6}-*b*-D₁₀-*b*-PIB_{2.6})-*network*. Οι μονάδες του DMAEMA συμβολίζονται με μπλε χρώμα, ενώ του PIBMA συμβολίζονται με κόκκινο χρώμα. Ο μαύρος κύκλος συμβολίζει τον υδρόφοβο πυρήνα από EGDMA και με μαύρο αστεράκι συμβολίζονται τα ενεργά κέντρα του πολυμερισμού.

Σχήμα 3.47. Χρωματογραφήματα GPC για τα πρόδρομα μόρια των πλεγμάτων: (α) (PIBMA_{2.6}-*b*-DMAEMA₁₀-*b*-PIBMA_{2.6})-*network* και (β) (DMAEMA₅-*b*-PIBMA₅-*b*-DMAEMA₅)-*network*.

Σχήμα 3.48. Οι ΒΔ σαν συνάρτηση του pH του διαλύματος για τα πλέγματα για το ομοπολυμερικό πλέγμα του DMAEMA, των δύο DMAEMA-PIBMA πλεγμάτων και των δύο DMAEMA – MMA πλεγμάτων. Το DMA και το PIB συμβολίζουν το DMAEMA και το PIBMA, αντίστοιχα.

Σχήμα 3.49 ΒΔ για του ομοπολυμερικού πλέγματος του DMAEMA, των δύο DMAEMA – PIBMA πλεγμάτων και των δύο DMAEMA – MMA πλεγμάτων σε εξάνιο, THF και σε νερό χαμηλού pH.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Στόχος και Πρωτοτυπία

Στόχος αυτής της εργασίας ήταν η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός αστεροειδών πολυμερών και αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων, και η διερεύνηση της χρήσης των πρώτων στη μεταφορά DNA σε κύτταρα, που ονομάζεται επιμόλυνση.

Η Διδακτορική αυτή Διατριβή αποτελεί την πρώτη αναφορά σε επιμόλυνση με χρήση *αστεροειδών* πολυμερών. Συγκεκριμένα τρεις ομάδες αστεροειδών πολυμερών που συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν στο εργαστήριό μας αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους για επιμόλυνση, ώστε να εξετασθεί συστηματικά η επίδραση του μοριακού βάρους, της σύστασης και της αρχιτεκτονικής των αστεροειδών πολυμερών.

Η Διατριβή αυτή αποτελεί επίσης την πρώτη συστηματική σύνθεση και μελέτη *αστεροειδών* πολυμερικών πλεγμάτων, μία καινοτομική αρχιτεκτονική που αναπτύχθηκε από την ερευνητική μας ομάδα. Συγκεκριμένα, συντέθηκαν τέσσερις οικογένειες αστεροειδών πολυμερών: δύο αμφιφιλικές, μία διπλά υδρόφοβη και μία διπλά υδρόφιλη, και μελετήθηκε η επίδραση της αρχιτεκτονικής των πλεγμάτων ως προς το βαθμό διόγκωσής τους. Σαν μία προσπάθεια βελτίωσης των μηχανικών ιδιοτήτων αυτών των πλεγμάτων διερευνήθηκε ο πολυμερισμός ενός μακρομονομερούς που θα συνεισέφερε στη βελτίωση των μηχανικών ιδιοτήτων. Αυτή η Διατριβή αποτελεί την πρώτη αναφορά πολυμερισμού αυτού του μακρομονομερούς με τη μέθοδο πολυμερισμού που χρησιμοποιεί η ομάδα Χημείας Πολυμερών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου.

Σε αυτή τη Διδακτορική Διατριβή αναφέρονται:

Κεφάλαιο 1 Οι μέθοδοι πολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκαν, γενικοί ορισμοί των αστεροειδών πολυμερών και αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων, κύριοι τρόποι σύνθεσης και εφαρμογές τους. Ιδιαίτερη αναφορά γίνεται στη χρήση πολυμερών στην επιμόλυνση και στους μηχανισμούς

επιμόλυνσης. Τέλος, αναφέρεται η αρχή λειτουργίας για κάθε μέθοδο χαρακτηρισμού που χρησιμοποιήθηκε.

Κεφάλαιο 2 Τα χημικά αντιδραστήρια, οι διαδικασίες: καθαρισμού και σύνθεσης των διαφόρων αντιδραστηρίων, χαρακτηρισμού των αστεροειδών πολυμερών και των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων, της επιμόλυνσης και της προσρόφησης DNA στα πλέγματα.

Κεφάλαιο 3 Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων για τα αστεροειδή πολυμερή και τα πλέγματα και η συζήτηση των αποτελεσμάτων.

Κεφάλαιο 4 Τα κύρια συμπεράσματα από τα αποτελέσματα αυτής της Διδακτορικής Διατριβής.

Κεφάλαιο 5 Όλες οι βιβλιογραφικές αναφορές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη.

Κεφάλαιο 6 Τα παραρτήματα.

1.2. «Ζωντανές» Μέθοδοι Πολυμερισμού

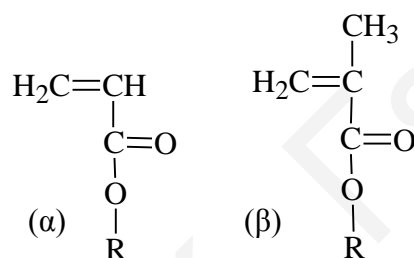
Υπάρχουν δύο κύριοι μέθοδοι πολυμερισμού, οι «ζωντανοί» και οι «μη ζωντανοί» πολυμερισμοί. Σε μία «ζωντανή» μέθοδο πολυμερισμού τα ενεργά κέντρα στο τέλος κάθε πολυμερικής αλυσίδας διατηρούνται ενεργά καθ' όλη τη διάρκεια του πολυμερισμού. Έτσι υπάρχει πλήρης μετατροπή του μονομερούς σε πολυμερές (σε αντίθεση με τους «μη ζωντανούς» πολυμερισμούς). Κάθε αλυσίδα πολυμερούς έχει στην αρχή της ένα μόριο εκκινητή, έτσι ώστε ο αριθμός αλυσίδων στο διάλυμα να ισούται με τον αριθμό μορίων του εκκινητή που προστέθηκαν για τον πολυμερισμό και ο βαθμός πολυμερισμού (BΠ) να ισούται με το πηλίκο των moles τους μονομερούς διά τα moles του εκκινητή. Περαιτέρω προσθήκη μονομερούς οδηγεί σε περαιτέρω αύξηση του μεγέθους της αλυσίδας. Ένα άλλο χαρακτηριστικό των «ζωντανών» μεθόδων πολυμερισμού είναι η στενή κατανομή των μοριακών βαρών (MB). Αυτό συμβαίνει επειδή ο ρυθμός εκκίνησης του πολυμερισμού είναι ίσος με ή γρηγορότερος από το ρυθμό της προόδου του πολυμερισμού και γιατί δεν συμβαίνουν φαινόμενα μεταφοράς ή τερματισμού (Rempp και Merril 1991(α)). Στους «ζωντανούς» πολυμερισμούς κατατάσσονται ο ανιοντικός πολυμερισμός, ο ζωντανός καρβοκατιοντικός πολυμερισμός (quasi-living carbocationic polymerization, QLCCP) και ο πολυμερισμός μεταφοράς ομάδας (group transfer polymerization, GTP) ενώ στους «μη ζωντανούς» πολυμερισμούς εντάσσονται ο κατιοντικός πολυμερισμός και ο πολυμερισμός ελευθέρων ριζών (Allcock και Lampe 1990(α), Rempp και Merril 1991(α) και (β)).

Στην παρούσα Διδακτορική Εργασία χρησιμοποιήθηκε κυρίως ο GTP και σε μερικές περιπτώσεις ο QLCCP. Πιο κάτω ακολουθεί μικρή περιγραφή των δύο αυτών μεθόδων πολυμερισμού.

1.2.1. Πολυμερισμός Μεταφοράς Ομάδας

Ο GTP επινοήθηκε το 1979 από τον Webster στα κεντρικά ερευνητικά εργαστήρια της Du Pont στις ΗΠΑ και παρουσιάστηκε στην ευρύτερη επιστημονική κοινότητα το 1983 (Webster et al 1983). Στην αρχή θεωρήθηκε ότι υπάρχει συνεχής ομοιοπολική μεταφορά της ομάδας του τριμεθυλοπυριτίου την οποία περιέχει ο εκκινητής σε κάθε προσθήκη μονομερούς και για αυτό ονομάστηκε πολυμερισμός μεταφοράς ομάδας (Webster 2004).

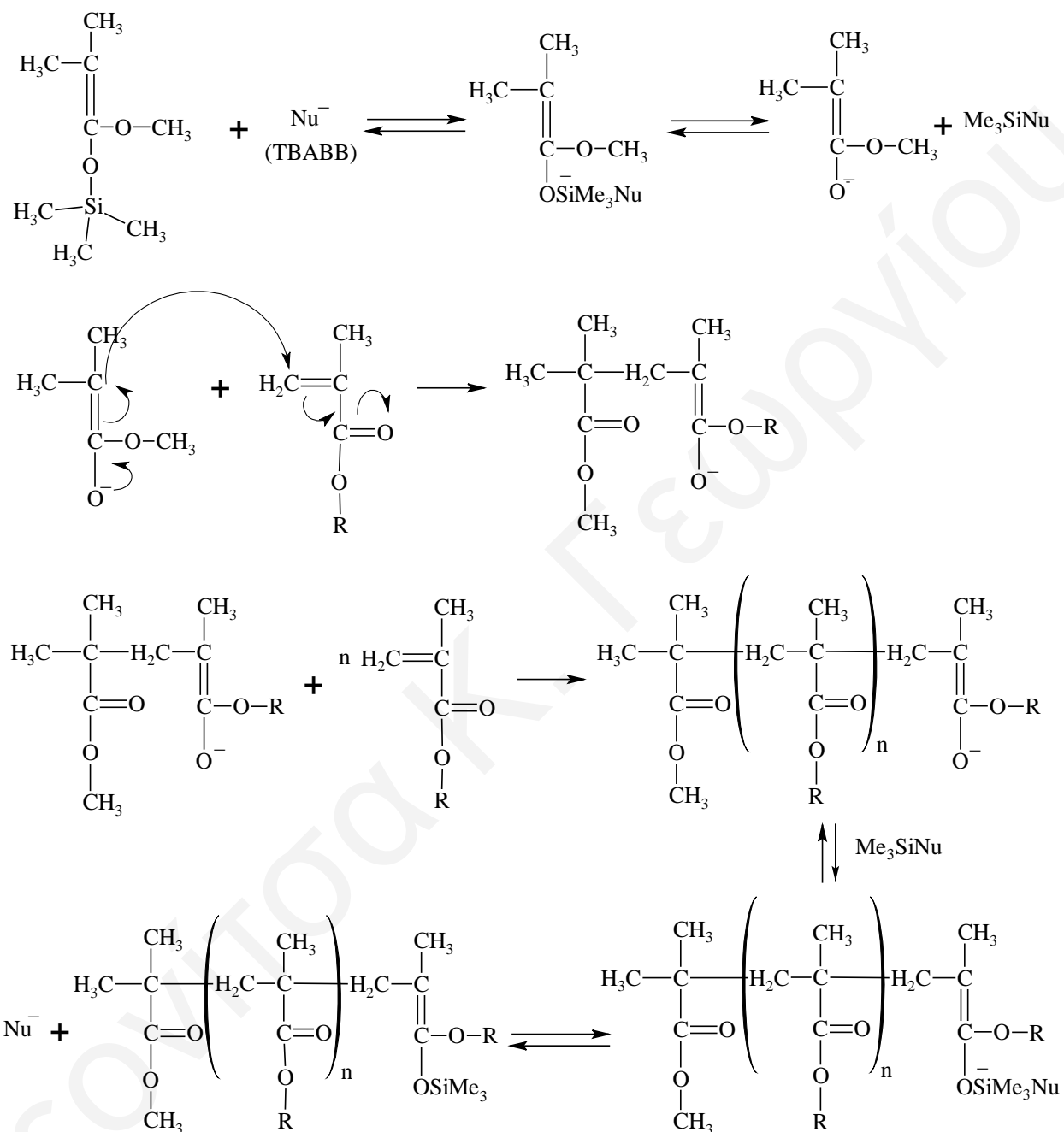
Τα μονομερή που χρησιμοποιούνται σε αυτή την μέθοδο πολυμερισμού είναι τα ακρυλικά και κυρίως τα μεθακρυλικά (Σχήμα 1.1.). Η πλευρική ομάδα R μπορεί να είναι αλειφατική, αρωματική, τριτοταγής αμίνη, αλλά δεν μπορεί να περιέχει ομάδες με όξινα άτομα υδρογόνου όπως είναι τα καρβοξυλικά οξέα, οι αλκοόλες και οι φαινόλες. Αυτό οφείλεται στο ότι ο GTP προχωρεί με ενεργά κέντρα που εξουδετερώνονται στην παρουσία όξινων ατόμων υδρογόνου. Στην περίπτωση που σκοπός είναι η παρασκευή πολυμερών που να περιέχουν όξινες πλευρικές ομάδες, θα πρέπει πρώτα αυτές οι ομάδες να προστατευτούν χημικά (Webster et al 1983, Webster 2000 και 2004, Sogah et al 1987 και Dicker et al 1990). Σε αυτή τη Διδακτορική Εργασία χρησιμοποιήθηκαν μεθακρυλικά μονομερή με διάφορες πλευρικές ομάδες R.



Σχήμα 1.1. Χημικοί τύποι (α) ακρυλικού και (β) μεθακρυλικού μονομερούς με πλευρική ομάδα R.

Ως καταλύτες στον GTP χρησιμοποιούνται κυρίως πυρηνόφιλα ανιόντα (οξέα Lewis για ακρυλικά μονομερή). Συγκεκριμένα χρησιμοποιούνται καταλύτες οι οποίοι περιέχουν διφθοριούχα ιόντα (F_2^-) ή οξυανιόντα (COO^-) (Webster 2004). Στη Διδακτορική αυτή Εργασία γίνεται χρήση του διβενζοϊκού τετραβουτυλαμμωνίου (tetrabutylammonium bibenzoate, TBABB).

Ο πλήρης μηχανισμός του GTP δεν έχει προσδιοριστεί μέχρι στιγμής. Υπάρχουν δύο κύριοι προτεινόμενοι μηχανισμοί: ο μηχανισμός που προϋποθέτει διάσπαση του εκκινητή (dissociative) και ο μηχανισμός που δεν την προϋποθέτει (associative) (Webster 2004). Και οι δύο μηχανισμοί οδεύουν μέσω της αντίδρασης Mukiyama-Michael. Στο Σχήμα 1.2 δίνεται ο μηχανισμός που πιστεύεται ότι είναι ο πιο πιθανός και είναι αυτός που προϋποθέτει την διάσπαση του εκκινητή.



Σχήμα 1.2. Ο μηχανισμός του πολυμερισμού μεταφοράς ομάδας που προϋποθέτει διάσταση του εκκινήτη.

Ο GTP παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα (Allcock και Lampe 1990(α), Rempp και Merril 1991(β), Webster 2004):

1. Είναι μία γρήγορη και απλή μέθοδος.
2. Δίνει ποσοτικές αντιδράσεις.
3. Πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου (ή ακόμη και σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες μέχρι και 100 °C)
4. Ως ζωντανή μέθοδος πολυμερισμού επιτυγχάνει στενές κατανομές MB.
5. Είναι κατάλληλος για την παρασκευή αδρομερών συμπολυμερών, τα οποία αποτελούνται από δύο αλυσίδες διαφορετικών ομοπολυμερών ενωμένων σε σειρά, και τέλος,
6. Είναι εφικτή η χρησιμοποίηση διασταυρωτή για την συνένωση ενεργών γραμμικών πολυμερών, για την παρασκευή πολυμερών με διακλαδωμένες δομές, όπως τα αστεροειδή πολυμερή και τα πολυμερικά πλέγματα.

Εντούτοις, ο GTP παρουσιάζει και κάποια μειονεκτήματα (Allcock και Lampe 1990(α), Rempp και Merril 1991(β), Webster 2004):

1. Είναι περιορισμένος ο αριθμός των μονομερών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν.
2. Δεν προσφέρει στερεοτακτικότητα.
3. Είναι ευαίσθητη μέθοδος (τερματίζεται εύκολα από όξινα πρωτόνια κλπ), και τέλος,
4. Δίνει πολυμερή με σχετικά χαμηλά MB ($\leq 50,000 \text{ g mol}^{-1}$), που αντιστοιχούν σε σχετικά χαμηλούς ΒΠ (≤ 500).

1.2.2. «Ζωντανός» Καρβοκατιοντικός Πολυμερισμός

Οι πλείστοι καρβοκατιοντικοί πολυμερισμοί είναι «μη ζωντανοί», παρουσιάζοντας αντιδράσεις μεταφοράς αλυσίδων (chain transfer) και τερματισμού (termination), και οδηγώντας έτσι σε πολυμερή χωρίς στενή κατανομή MB (Kennedy και Iván 1992). Στις αρχές της δεκαετίας του 1980 οι Kennedy και Iván ανέπτυξαν τον «ζωντανό» καρβοκατιοντικό πολυμερισμό, QLCCP, μειώνοντας κατά πολύ τη συγκέντρωση του διαλύματος κατά τον πολυμερισμό. Έτσι, το ιξώδες και η συγκέντρωση των ενεργών κέντρων διατηρούνται σε πολύ χαμηλά επίπεδα και επομένως

μειώνοντας τις αντιδράσεις μεταφοράς (Kennedy και Iván 1992, Rempp και Merril 1991(β), Allcock και Lampe 1990(β)). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο πολυμερισμός του ισοβουτυλενίου (isobutylene, IB) ο οποίος απασχολεί και την παρούσα Διδακτορική Εργασία. Το IB πολυμερίζεται σε μίγμα διαλυτών (CH_2Cl_2 – κ-εξανίου) και χρησιμοποιώντας ως εκκινητή το 2,4,4-τριμεθυλο-2-χλωρο-πεντάνιο στην παρουσία βάσης (αμίνης). Αξίζει να αναφερθεί ότι αυτός ο πολυμερισμός μπορεί να τερματιστεί με αλλυλικό τριμεθυλοσιλάνιο, το οποίο προσκολλάται σαν τερματική δραστική ομάδα (με διπλό δεσμό) που μπορεί αργότερα να μετατραπεί σε άλλες τερματικές ομάδες (π.χ. υδροξυλίου και στη συνέχεια μεθακρυλικού εστέρα) (Rempp και Merril 1991, Kennedy και Iván 1992).

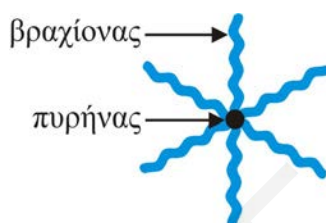
Γενικά ο QLCCP παρουσιάζει τα ίδια πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν οι πλείστοι «ζωντανοί» πολυμερισμοί, δηλαδή οδηγεί στην παρασκευή πολυμερών με στενή κατανομή MB, δίνει αντιδράσεις με ποσοτική απόδοση και είναι δυνατή η σύνθεση αδρομερών συμπολυμερών. Ένα επιπρόσθετο πλεονέκτημά του είναι η σύνθεση πολυμερών με τερματικές ομάδες, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, ενώ μειονεκτεί στο γεγονός ότι πραγματοποιείται σε χαμηλή θερμοκρασία ($-78\text{ }^\circ\text{C}$) και απαιτεί τη χρήση μεγάλων ποσοτήτων διαλύτη.

1.3. Αστεροειδή Πολυμερή

1.3.1. Γενικοί ορισμοί

Τί είναι αστεροειδή πολυμερή;

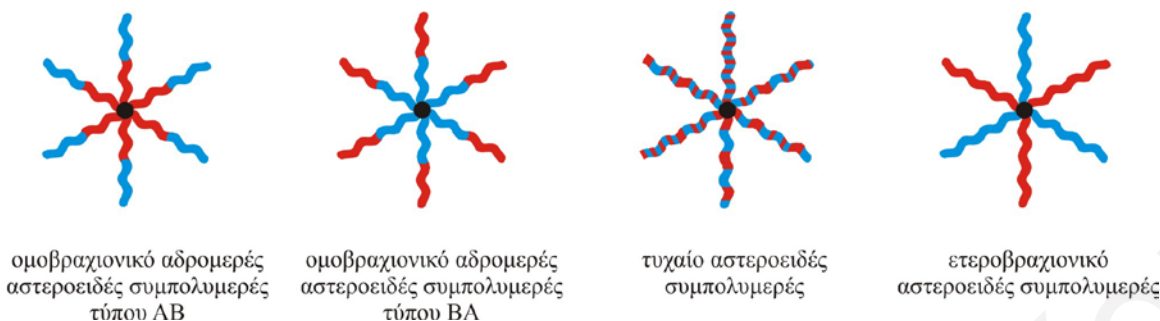
Τα αστεροειδή πολυμερή είναι πολυμερή που, όπως λέει και το όνομά τους, έχουν σχήμα αστεριού και αποτελούνται από τους βραχίονες που ενώνονται στο ένα άκρο τους στο κέντρο του αστεριού, το οποίο ονομάζεται πυρήνας (Σχήμα 1.3). Ο αριθμός των βραχιόνων σε ένα αστεροειδές πολυμερές καθορίζεται από τη μέθοδο σύνθεσης.



Σχήμα 1.3. Σχηματική απεικόνιση αστεροειδούς πολυμερούς. Με μπλε συμβολίζονται οι βραχίονες και με μαύρο ο πυρήνας.

Αρχιτεκτονικές αστεροειδών πολυμερών

Οι βραχίονες των αστεροειδών πολυμερών μπορούν να αποτελούνται από ένα ή περισσότερα μονομερή. Συγκεκριμένα, όταν τα αστεροειδή πολυμερή αποτελούνται από δύο μονομερή είναι δυνατό, αλλάζοντας την κατανομή των μονάδων στα πολυμερή να παρασκευαστούν αστεροειδή πολυμερή διαφόρων αρχιτεκτονικών. Μερικές από αυτές τις αρχιτεκτονικές φαίνονται στο σχήμα που ακολουθεί. Συγκεκριμένα, δίνονται οι σχηματικές απεικονίσεις τεσσάρων αστεροειδών αρχιτεκτονικών: δύο ομοβραχιονικών αδρομερών αστεροειδών συμπολυμερών όπου όλοι οι βραχίονες είναι όμοιοι και αποτελούνται από αδρομερή συμπολυμερή των μονομερών A και B (τύπου AB ή BA), ενός τυχαίου αστεροειδούς συμπολυμερούς, του οποίου οι βραχίονες δεν είναι όμοιοι και αποτελούνται από τυχαία συμπολυμερή των μονομερών A και B, και ενός ετεροβραχιονικού αστεροειδούς συμπολυμερούς, όπου οι βραχίονες και πάλι δεν είναι όμοιοι αλλά αποτελούνται από ομοπολυμερή των μονομερών A και B.



Σχήμα 1.4. Σχηματική απεικόνιση διαφόρων αρχιτεκτονικών αστεροειδών συμπολυμερών. Με μπλε και με κόκκινο συμβολίζονται οι μονάδες δύο μονομερών A και B, αντίστοιχα, και με μαύρο ο πυρήνας.

1.3.2. Κύριοι Τρόποι σύνθεσης

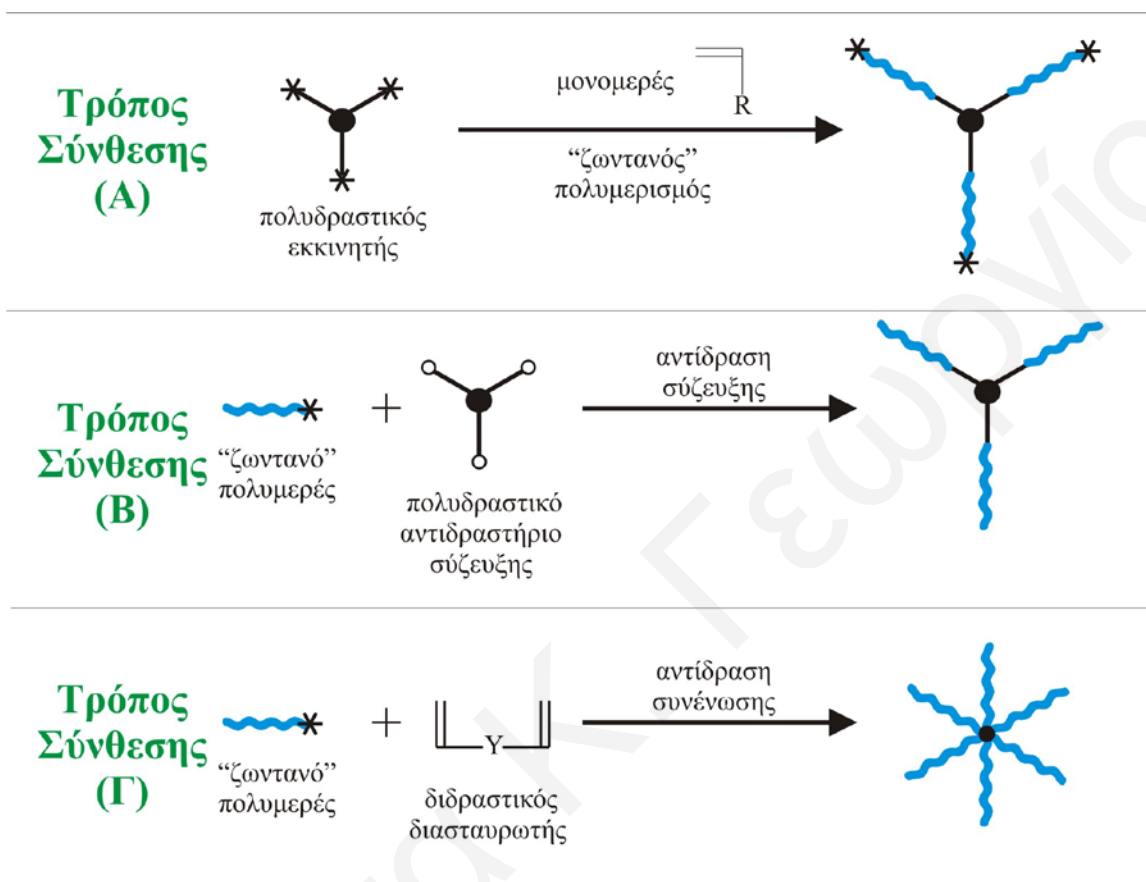
Υπάρχουν διάφοροι τρόποι σύνθεσης αστεροειδών πολυμερών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Πιο κάτω περιγράφονται οι τρεις κυριότεροι τρόποι σύνθεσης αστεροειδών πολυμερών (Hadjichristidis et al 2001) και απεικονίζονται στο Σχήμα 1.5:

(A) Πολυμερισμός από μέσα προς τα έξω. Χρησιμοποιώντας ένα πολυδραστικό εκκινητή (multifunctional initiator) από όπου οι αλυσίδες που θα αποτελέσουν τους βραχίονες του αστεροειδούς πολυμερούς αρχίζουν να πολυμερίζονται από τον πυρήνα προς τα έξω (Τρόπος Σύνθεσης A, Σχήμα 1.5). Σε αυτή τη περίπτωση σχηματίζονται αστεροειδή πολυμερή με γνωστό αριθμό βραχιόνων, ίσο με τη δραστικότητα του εκκινητή (3 στο παρόν σχήμα).

Μερικά παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων (Moschogianni et al 2001, Heise et al 2001, Feng και Pan 2001, Jankova et al 2005, Matmour et al 2005, Erdogan et al 2004) παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.1, όπου δίνονται τα μονομερή και η μέθοδος πολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε περίπτωση. Οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στον Πίνακα ορίζονται στην αρχή της Διδακτορικής Διατριβής.

Το μειονέκτημα αυτού του τρόπου σύνθεσης είναι ότι ο ΒΠ των βραχιόνων διαφέρει για κάθε βραχίονα γιατί δεν έχουν όλα τα κέντρα εκκίνησης την ίδια ενεργότητα (Hadjichristidis et al 2001). Πολύ λίγοι εκκινητές τηρούν τα κριτήρια για την επιτυχή χρησιμοποίησή τους. Για το λόγο αυτό, αυτή η διαδικασία

σύνθεσης αστεροειδών πολυμερών δεν θεωρείται ιδιαίτερα επιτυχημένη (Hadjichristidis et al 2001).



Σχήμα 1.5. Σχηματική απεικόνιση των τριών κύριων τρόπων σύνθεσης αστεροειδών πολυμερών. Με μπλε συμβολίζονται οι βραχίονες, με μαύρα αστεράκια τα ενεργά κέντρα του πολυμερισμού και με μαύρους κύκλους οι πυρήνες των αστεροειδών πολυμερών.

- (B) Παρασκευή πρώτα των γραμμικών πολυμερών, τα οποία θα αποτελέσουν τους βραχίονες, και στη συνέχεια σύνδεσή τους με χρήση ενός πολυδραστικού αντιδραστήριου σύζευξης (multifunctional coupling agent). Σε αυτή τη διαδικασία παρασκευής απαιτείται ένα-προς-ένα στοιχειομετρία μεταξύ των ενεργών γραμμικών πολυμερών και των δραστικών ομάδων του αντιδραστήριου σύζευξης. Τα αστεροειδή πολυμερή που σχηματίζονται εδώ έχουν καλά

ελεγχόμενη δομή, γνωστό αριθμό και ΒΠ των βραχιόνων, αλλά παρουσιάζονται προβλήματα πλήρους μετατροπής κατά τη σύζευξη καθώς και καθαρότητας του τελικού προϊόντος. Μερικά παραδείγματα δίνονται στον Πίνακα 1.1 (Roovers et al 1993, Hong et al 2001, Switek et al 2004, Hirao et al 2004).

- (Γ) Παρασκευή πρώτα των γραμμικών πολυμερών και στη συνέχεια σύνδεσή τους με την προσθήκη ενός διδραστικού συνδετικού μορίου (διασταυρωτή). Εδώ χρησιμοποιείται περίσσεια του διασταυρωτή ως προς τα ενεργά άκρα του πολυμερούς. Η γραμμομοριακή αναλογία διασταυρωτή προς τις αλυσίδες του πολυμερούς κυμαίνεται μεταξύ 2 και 20, με αποτέλεσμα να λαμβάνονται αστεροειδή πολυμερή που έχουν μέχρι και 200 βραχίονες. Παραδείγματα αυτού του τρόπου σύνθεσης δίνονται επίσης στον Πίνακα 1.1 (Tsitsilianis και Voulgaris 1997 2000, Lee et al 2005, Zheng και Pan 2005, Hadjiyannakou et al 2005, Triftaridou et al 2005).

Με αυτή τη μέθοδο παρασκευάζονται αστεροειδή πολυμερή με ελεγχόμενο ΒΠ βραχιόνων αλλά όχι ελεγχόμενη κατανομή του αριθμού βραχιόνων. Τα χαρακτηριστικά των πολυμερικών προϊόντων αυτής της σύνθεσης εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, όπως η συγκέντρωση και η αναλογία των αντιδρώντων. Αποτελεί μία γρήγορη και σχετικά εύκολη μέθοδο με την οποία, εναλλάσσοντας την προσθήκη των μονομερών και του διασταυρωτή, μπορούν να παραχθούν αστεροειδή πολυμερή διαφόρων αρχιτεκτονικών που δεν μπορούν να παρασκευαστούν τόσο εύκολα και σε «one-pot» διαδικασία με τους δύο προηγούμενους τρόπους σύνθεσης (Α και Β). Σε αυτή τη Διδακτορική Διατριβή τα αστεροειδή πολυμερή επιλέγηκαν να παρασκευαστούν με αυτό τον τελευταίο τρόπο σύνθεσης (Γ).

Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι αυτοί οι τρεις κύριοι τρόποι σύνθεσης δεν είναι οι μοναδικοί. Πρόσφατα έχουν γίνει μελέτες όπου συνδυάστηκαν δύο από τους τρεις τρόπους σύνθεσης και συγκεκριμένα οι (Α) και (Γ), όπου παρασκευάστηκε πρώτα ένας μακροεκκινητής που αποτελείτο από το ένα μονομερές χρησιμοποιώντας τον τρόπο (Γ) και στη συνέχεια πολυμερίστηκε το δεύτερο μονομερές από τον πυρήνα του μακροεκκινητή προς τα έξω (τρόπος Α) (Gao et al 2005, Du και Chen 2004).

Στις περισσότερες μελέτες αστεροειδών πολυμερών δόθηκε μεγαλύτερη έμφαση στη σύνθεσή τους παρά στο χαρακτηρισμό τους αφού χαρακτηρίζονταν συνήθως μόνο με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους ή μοριακού αποκλεισμού (gel permeation chromatography, GPC) και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίων (proton nuclear magnetic resonance, ^1H NMR). Όσον αφορά εφαρμογές των αστεροειδών πολυμερών δεν δόθηκε ούτε σε αυτές έμφαση, εκτός από μία περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν ως γαλακτωματοποιητές (Hadjiyannakou et al 2005). Τα αστεροειδή πολυμερή που συντέθηκαν σε αυτή τη Διδακτορική Διατριβή έγιναν με σκοπό την εφαρμογή τους στην επιμόλυνση, για την οποία ακολουθεί μία εκτενής αναφορά.

Πίνακας 1.1. Μονομερή, μέθοδοι πολυμερισμού και τρόποι σύνθεσης που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή αστεροειδών πολυμερών.

	Μονομερές Α	Μονομερές Β (εάν υπάρχει)	Αρχιτεκτονική Αστεροειδούς Πολυμερούς	Μέθοδος Πολυμερισμού	Τρόπος Σύνθεσης	Βιβλιογραφική Αναφορά
1	MMA	-	Ομοπολυμερές	RAFT	(A)	Moschogianni et al 2001
2	MMA	CL	Ετεροβραχιονικό	ATRP για το Α μονομερές ROP για το Β μονομερές	(A)	Heise et al 2001
3	St MA BA	-	Ομοπολυμερές Ομοπολυμερές Ομοπολυμερές	ATRP ATRP ATRP	(A)	Feng και Pan 2001
4	St MA	-	Ομοπολυμερές Ομοπολυμερές	ATRP	(A)	Jankova et al 2005
5	St B MMA	B, MMA	Ομοπολυμερή PSt, PB, PMMA Ομοβραχιονικά τριαδρομερή P(St-b-B-b-MMA)	Ανιοντικός	(A)	Matmour et al 2005
6	CL	<i>t</i> -BA, MMA	Ετεροβραχιονικά	ROP για το Α μονομερές ATRP για το Β μονομερές	(A)	Erdogan et al 2004
7	B	-	Ομοπολυμερή	Ανιοντικός	(B)	Roovers et al 1993
8	CHD	St	Ομοπολυμερές CHD Ομοβραχιονικά διαδρομερή τύπου AB και BA	Ανιοντικός	(B)	Hong et al 2001
9	IP	-	Ομοπολυμερή	Ανιοντικός	(B)	Switek et al 2004
10	DPE	St	Ομοπολυμερή και ετεροβραχιονικά	Ανιοντικός	(B)	Hirao et al 2004

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

	Μονομερές Α	Μονομερές Β (εάν υπάρχει)	Αρχιτεκτονική Αστεροειδούς Πολυμερούς	Μέθοδος Πολυμερισμού	Τρόπος Σύνθεσης	Βιβλιογραφική Αναφορά
11	St	2VP	Ετεροροβραχιονικά συμπολυμερή τύπου A(n)B(n) και διαδρομερή συμπολυμερή τύπου BA	Ανιοντικός	(Γ)	Tsitsilianis και Voulgaris 1997
12	St	EMA, tBA, 2VP	Ετεροροβραχιονικά συμπολυμερή τύπου A(n)B(n)	Ανιοντικός	(Γ)	Tsitsilianis και Voulgaris 2000
13	St	-	Ομοπολυμερή St	Ανιοντικός	(Γ)	Lee et al 2005
14	St	DVB	Ομοπολυμερές St και Ομοβραχιονικά διαδρομερή τύπου AB και BA	RAFT	(Γ)	Zheng και Pan 2005
15	BzMA	HEGMA	Ομοβραχιονικά διαδρομερή τύπου AB και BA, ετεροβραχιονικά και τυχαία	GTP	(Γ)	Hadjiyannakou et al 2005
16	DMAEMA	HEGMA, MMA	Τρία ομοβραχιονικά τριαδρομερή τριπολυμερή και ένα τυχαίο	GTP	(Γ)	Triftaridou et al 2005
17	BA MMA	St BA	Ετεροβραχιονικά συμπολυμερή	ATRP	(Α) και (Γ)	Gao et al 2005
18	CL	St	Ετεροβραχιονικά συμπολυμερή	ATRP	(Α) και (Γ)	Du και Chen 2004

*Όλες οι συντομογραφίες των μονομερών και των μεθόδων πολυμερισμού δίνονται στις «Συντομογραφίες» στις αρχικές σελίδες της Διατριβής.

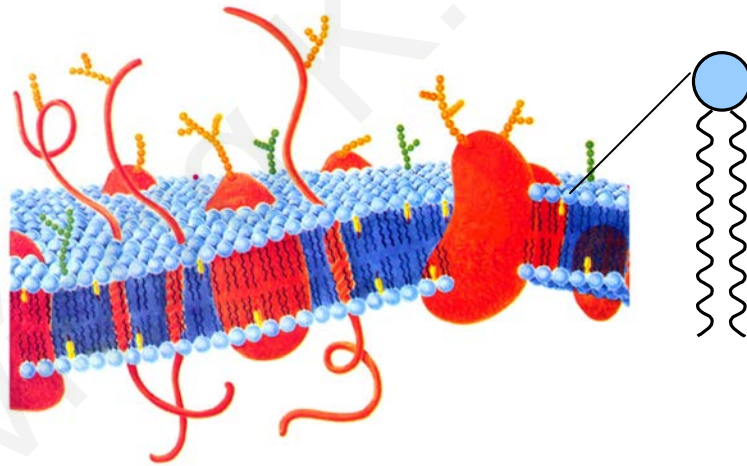
1.4. Επιμόλυνση

1.4.1. Γενικά

Τα τελευταία τριάντα χρόνια πολλές μελέτες επικεντρώνονται στη μεταφορά γενετικού υλικού DNA στα κύτταρα, μία διαδικασία που ονομάζεται *επιμόλυνση* (transfection) (Freitag 2003). Η μεταφορά του DNA στα κύτταρα, το οποίο στη συνέχεια θα εκφραστεί σε πρωτεΐνη, μπορεί να γίνει είτε διότι είναι επιθυμητή η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε μεγάλες ποσότητες (Freitag 2003), είτε διότι αυτή η πρωτεΐνη έχει θεραπευτικές ιδιότητες για μία ανθρώπινη ασθένεια (π.χ. καρκίνο), δηλαδή για σκοπούς γενετικής θεραπείας (Freitag 2003, Merdan et al 2002).

Τα κύρια βήματα της επιμόλυνσης είναι (Freitag 2003):

1. Η συρρίκνωση του DNA που κάνει τη δομή του πιο συμπαγή (compaction). Το DNA είναι ένα μεγάλο, υδρόφιλο και αρνητικά φορτισμένο μόριο που δεν μπορεί εύκολα να περάσει την υδρόφοβη και αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη, η οποία αποτελείται από λιπιδική διπλοστοιβάδα, που περιβάλλει το κύτταρο (Σχήμα 1.6).



Σχήμα 1.6. Η λιπιδική διπλοστοιβάδα, η οποία αποτελείται από φωσφολιπίδια. Αυτά έχουν δύο υδρόφοβες ουρές (μαύρο) και μία αρνητικά (συνήθως) φορτισμένη κεφαλή (γαλάζιο). Με πορτοκαλί παριστάνονται οι εσωτερικές πρωτεΐνες (Voet και Voet 1995).

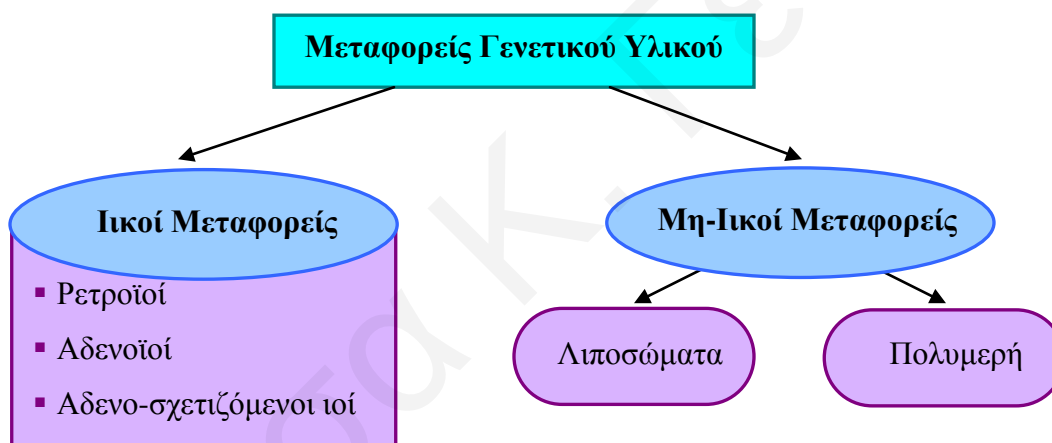
2. Η διέλευση από την κυτταρική μεμβράνη. Αυτό μπορεί να γίνει είτε με ειδικούς υποδοχείς που υπάρχουν στην κυτταρική μεμβράνη (που όμως δεν αναγνωρίζουν συνήθως ένα απλό DNA κάποιου ξενιστή) είτε με ενδοκύτωση στην οποία γίνεται αργότερα εκτενέστερη αναφορά.
3. Μεταφορά διαμέσου του κυτταροπλάσματος μέχρι την πυρηνική μεμβράνη. Το DNA μέσα στο κυτταρόπλασμα μπορεί να αποικοδομηθεί, δηλαδή να καταστραφεί, από τα λυσοσώματα που υπάρχουν εκεί και είναι υπεύθυνα για την πέψη και τη διάλυση ξένων σωματιδίων στο κύτταρο.
4. Η διέλευση από την πυρηνική μεμβράνη, δηλαδή τη μεμβράνη που περιβάλλει τον πυρήνα του κυττάρου. Αυτό μπορεί να γίνει είτε με πέρασμα από τους πόρους της πυρηνικής μεμβράνης είτε όταν το κύτταρο βρίσκεται στο στάδιο της μίτωσης, όπου η πυρηνική μεμβράνη εξαφανίζεται εντελώς. Το στάδιο της μίτωσης όμως διαρκεί 2 με 3 λεπτά, ενώ ο κυτταρικός κύκλος έχει διάρκεια από 12 μέχρι 20 ώρες και ο χρόνος ημιζώης του DNA στο κυτταρόπλασμα είναι 1 ως 2 ώρες, έτσι το πέρασμα του DNA στον πυρήνα καθίσταται αρκετά δύσκολο. Και τέλος,
5. Η έκφραση του DNA σε πρωτεΐνη, η οποία εξαρτάται από τον τύπο του DNA και του κυττάρου που χρησιμοποιείται.

Μόνο από αυτά τα κύρια βήματα της επιμόλυνσης, στα οποία δεν αναφέρεται η ανοσοποιητική απόκριση που προκαλεί σε μερικές περιπτώσεις η παρουσία ενός ξένου DNA, συμπεραίνεται ότι η μεταφορά του DNA χωρίς τη χρησιμοποίηση κάποιου μέσου / οχήματος μεταφοράς του είναι εξαιρετικά δύσκολη. Έτσι, κατά τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί διάφοροι μεταφορείς DNA στα κύτταρα οι οποίοι κατατάσσονται σε δύο κυρίως κατηγορίες (Σχήμα 1.7). Πιο κάτω γίνεται αναφορά στους κύριους μεταφορείς που έχουν χρησιμοποιηθεί, στα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους.

1.4.2. Κύριοι Μεταφορείς

Οι μεταφορείς γενετικού υλικού στα κύτταρα χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, στους *ικούς μεταφορείς* και στους *μη-ικούς μεταφορείς* (Σχήμα 1.7). Στους ικούς μεταφορείς συγκαταλέγονται οι ρετροϊοί (retroviruses), οι αδενοϊοί (adenoviruses) και οι αδeno-σχετιζόμενοι ιοί (adeno-associated viruses). Αυτού του είδους οι μεταφορείς

παρουσιάζουν εντυπωσιακά αποτελέσματα ως προς την ικανότητά τους να διοχετεύουν το γενετικό υλικό μέσα στο κύτταρο ξενιστή (Merdan et al 2002, Friedman 1997). Παρόλη όμως την εξαιρετική ικανότητά τους να επιμολύνουν τα κύτταρα, παρουσιάζουν προβλήματα. Συγκεκριμένα, μπορούν να προκαλέσουν ανοσοποιητική απόκριση ή ογκογένεση, δεν μεταφέρουν το γενετικό υλικό αποκλειστικά στον παθογόνο ιστό (κύτταρα-στόχο), μεταφέρουν σχετικά μικρού μεγέθους γενετικό υλικό και δεν μπορούν εύκολα να παρασκευαστούν σε μεγάλες ποσότητες για να γίνει και πρακτικά δυνατή η εφαρμογή τους σαν θεραπευτικά οχήματα (De Smedt et al 2000, Merdan et al 2002, Friedman 1997). Για αυτό το λόγο άρχισαν να αναπτύσσονται μη-ικκοί μεταφορείς που με τη σειρά τους χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, στα λιποσώματα και στα πολυμερή (Σχήμα 1.7).



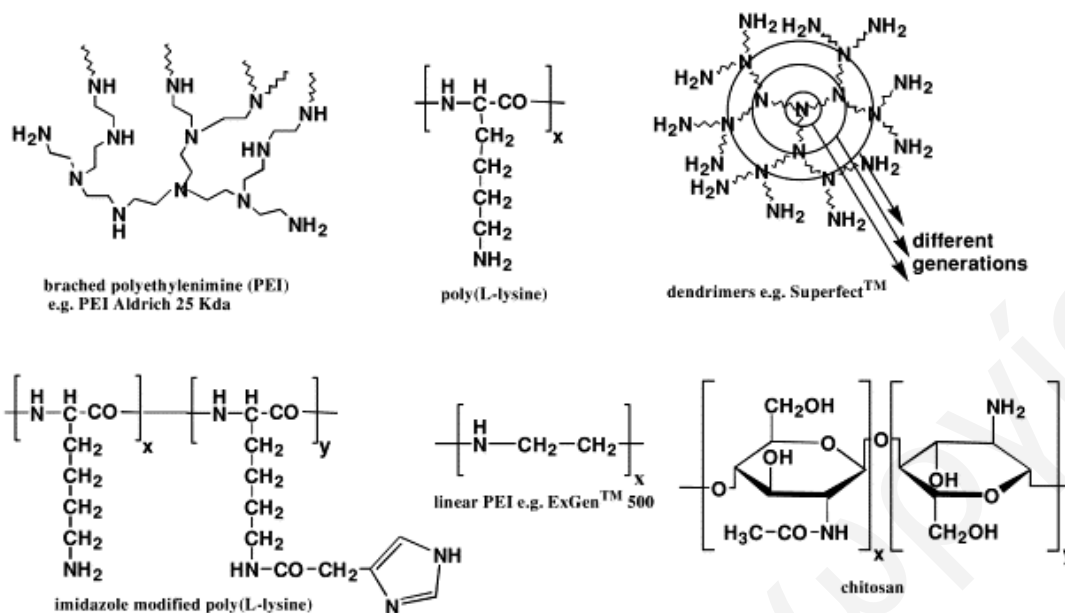
Σχήμα 1.7. Οι κύριοι μεταφορείς γενετικού υλικού και οι διάφορες κατηγορίες τους.

Τα λιποσώματα είναι μικρά σφαιρικά κυστίδια που σχηματίζονται από μόρια που περιέχουν δύο υδρόφοβες αλυσίδες και μία υδρόφιλη κεφαλή (συνήθως πρόκειται για θετικά φορτισμένα λιπίδια). Τα μόρια αυτά κατανέμονται με τέτοιο τρόπο που να σχηματίζουν μία σφαιρική λιπιδική διπλοστοιβάδα, η οποία στο εσωτερικό της περιέχει μία υδρόφιλη κοιλότητα στην οποία βρίσκεται το γενετικό υλικό κατά τη διάρκεια της επιμόλυνσης. Τα λιποσώματα πλεονεκτούν σε σχέση με του ικούς μεταφορείς γιατί δεν προκαλούν ανοσοποιητική απόκριση ή ογκογένεση, είναι λιγότερο δαπανηρά και

παρασκευάζονται πιο εύκολα. Σε σχέση όμως με τους υκούς μεταφορείς, παρουσιάζουν μειωμένη απόδοση. Άλλα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν είναι το μικρό μέγεθος του πλασμιδίου (plasmid) που μπορούν να μεταφέρουν και η αποσταθεροποίησή τους πριν την εισδοχή τους στα κύτταρα (Friedman 1997). Έτσι, τις τελευταίες δεκαετίες άρχισαν να αναπτύσσονται καινούργια μη-υκά οχήματα, τα πολυμερικά οχήματα (Friedman 1997, De Smedt et al 2000, Godbey και Mikos 2001, Merdan et al 2002, Jagur-Grodzinski 2003). Τα πολυμερικά οχήματα παρουσιάζουν τα πλεονεκτήματα να μπορούν να μεταφέρουν μεγάλα μόρια DNA, να μην προκαλούν ανοσοποιητική απόκριση ή ογκογένεια, και να μπορούν εύκολα και με μικρό σχετικά κόστος να παραχθούν σε μεγάλη κλίμακα (Friedman 1997, Merdan et al 2002). Ακόμη, τα πολυμερή μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν με την προσθήκη της κατάλληλης ομάδας για να επιμολύνουν συγκεκριμένους κυτταρικούς ιστούς ή να εμφανίζουν συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες με αλλαγή π.χ. του MB ανάλογα με την πιθανή εφαρμογή (Merdan et al 2002).

1.4.3. Πολυμερικοί Μεταφορείς

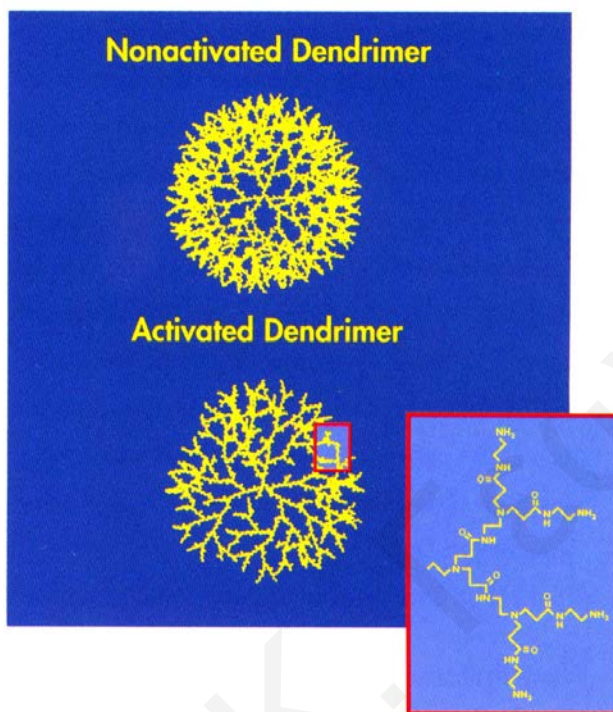
Τα πολυμερή που χρησιμοποιούνται στην επιμόλυνση είναι συνήθως κατιοντικά, για να μπορούν να συμπλοκοποιούν το αρνητικά φορτισμένο DNA και έτσι να το μεταφέρουν στο κύτταρο. Τα πιο συνηθισμένα κατιοντικά πολυμερικά οχήματα είναι η γραμμική και η διακλαδωμένη πολυαιθυλενιμίνη (polyethylenimine, PEI), η χιτοσάνη (chitosan) και η πολύ(L-λυσίνη) [poly(L-lysine), PLL] (De Smedt et al 2000, Godbey και Mikos 2001, Merdan et al 2002, Jagur-Grodzinski 2003), μερικά από τα οποία απεικονίζονται στο Σχήμα 1.8 (Merdan et al 2002). Από αυτά, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η PEI που είναι από τα πρώτα πολυμερή που αξιολογήθηκαν στην επιμόλυνση (Godbey et al 1999(α) και (β)) και που διαπιστώθηκε εξάρτηση της απόδοσης επιμόλυνσης από το MB του πολυμερούς και από την αρχιτεκτονική του. Η διακλαδωμένη PEI παρουσίασε καλύτερα αποτελέσματα από το αντίστοιχο γραμμικό πολυμερές πιθανότατα διότι συμπλοκοποιούσε καλύτερα το DNA.



Σχήμα 1.8. Χημικές δομές κατιοντικών πολυμερικών οχημάτων (Merdan et al 2002).

Εκτεταμένη έρευνα στην επιμόλυνση έχει γίνει και με πολυαμιδοαμινικά δενδριμερή (polyamidoamine dendrimers) (Cloninger 2002, Hudde et al 1999), τα οποία παρουσίασαν ικανοποιητικά αποτελέσματα σαν μεταφορείς γενετικού υλικού. Τα δενδριμερή είναι διακλαδωμένα σφαιρικά μόρια με ένα ακριβές σχήμα και μέγεθος. Οι διακλαδώσεις ξεκινούν από το κέντρο και απλώνονται προς τα έξω. Ένα συγκεκριμένο δενδριμερές το οποίο αποτελείται από επαναλαμβανόμενες ομάδες πρωτοταγούς, δευτεροταγούς και τριτοταγούς αμίνης (Σχήμα 1.9) παρουσίασε ενδιαφέροντα αποτελέσματα (Hudde et al 1999). Συγκεκριμένα, όταν δοκιμάστηκε αρχικά στην επιμόλυνση δεν παρουσίασε καλά αποτελέσματα. Μετά όμως από «ενεργοποίηση» του με θέρμανση που εν μέρει το καταστρέφει αποκόπτοντας μερικούς από τους βραχίονές του, παρουσίασε καλύτερα αποτελέσματα *in vitro* και *in vivo*. Αυτό αποδόθηκε στο γεγονός ότι ο μειωμένος αριθμός βραχιόνων προσδίδει στο «ενεργοποιημένο» δενδριμερές (activated dendrimer) κάποια ευκαμψία, η οποία φαίνεται να είναι απαραίτητη για επιτυχημένη συμπλοκοποίηση με το γενετικό υλικό, αυξάνοντας έτσι την απόδοση μεταφοράς του (Σχήμα 1.9). Τα ικανοποιητικά αποτελέσματα αυτού του δενδριμερούς έχουν οδηγήσει στη διάθεσή του εμπορικά με το όνομα SuperFect, το

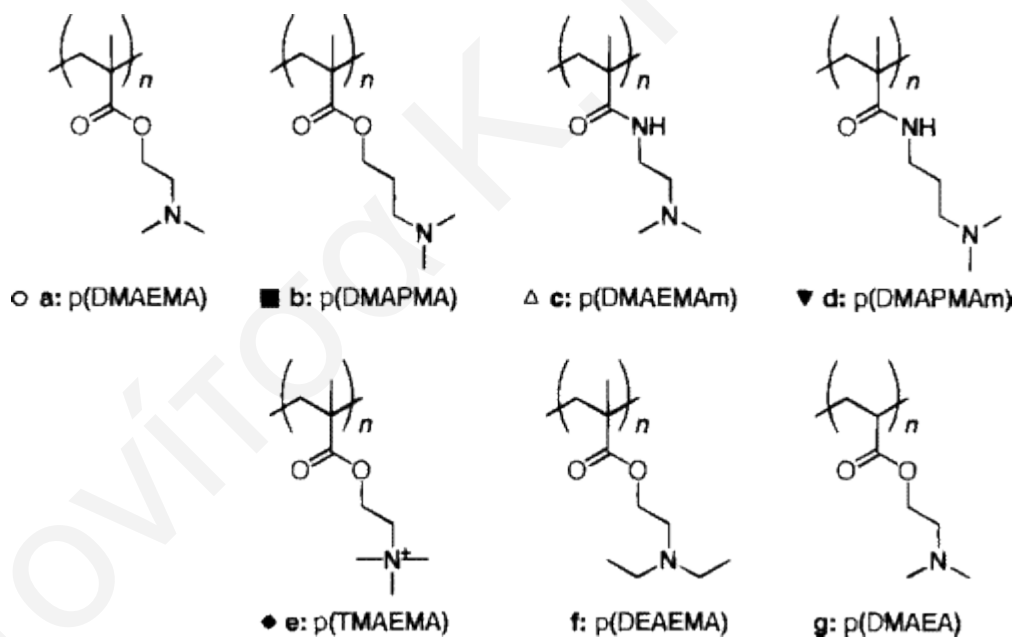
οποίο συχνά χρησιμοποιείται ως μέτρο σύγκρισης της απόδοσης στην επιμόλυνση των υπό εξέταση οχημάτων μεταφοράς γενετικού υλικού.



Σχήμα 1.9. Σχηματική απεικόνιση της μη ενεργοποιημένης και της ενεργοποιημένης δομής του δενδριμερούς και η χημική του δομή (Hudde et al 1999).

Εκτενείς μελέτες στην επιμόλυνση έγιναν και με τα πολυμερή του μεθακρυλικού (2-διμεθυλαμινο)αιθυλεστέρα [2-(dimethylamino)ethyl methacrylate, DMAEMA], κυρίως από την ερευνητική ομάδα του Hennink (Cherng et al 1996, 1997, 1999(α), (β) και (γ), van den Wetering et al 1998, 1999(α) και (β), 2000) οι οποίες δίνονται και στον Πίνακα 1.2. Σε μία πολύ ενδιαφέρουσα μελέτη αυτής της ομάδας, δοκιμάστηκαν πολλά ομοπολυμερή διαφόρων μεθακρυλικών, μεθακρυλαμιδικών και ακρυλικών μονομερών που συντέθηκαν με τη μέθοδο του πολυμερισμού ελευθέρων ριζών. Συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν ομοπολυμερή του DMAEMA, του μεθακρυλικού 3-(διμεθυλαμινο)προπυλεστέρα [3-(dimethylamino)propyl methacrylate, DMAPMA], του μεθακρυλαμιδικού 2-(διμεθυλαμινο)αιθυλεστέρα [2-(dimethylamino)ethyl

methacrylamide, DMAEMAm], του μεθακρυλαμιδικού 3-(διμεθυλαμινο)προπυλεστέρα [3-(dimethylamino)propyl methacrylamide, DMAPMAm], του μεθακρυλικού 2-(τριμεθυλαμινο)αιθυλεστέρα [2-(trimethylamino)ethyl methacrylate, TMAEMA], του μεθακρυλικού 2-(διαιθυλαμινο)αιθυλεστέρα [2-(diethylamino)ethyl methacrylate, DEAEMA] και του ακρυλικού 2-(διμεθυλαμινο)αιθυλεστέρα [2-(dimethylamino)ethyl acrylate, DMAEA], οι χημικοί τύποι των οποίων φαίνονται στο Σχήμα 1.10 (van de Wetering et al 1999(α)). Από αυτά τα ομοπολυμερή, αυτό που παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα ήταν το ομοπολυμερές του DMAEMA και αυτό αποδόθηκε στο pK του, το οποίο θεωρήθηκε ότι είναι το καταλληλότερο για να βοηθά στο φαινόμενο του «σφουγγαριού των πρωτονίων» (proton «sponge» effect), για το οποίο γίνεται αναφορά αργότερα. Αξίζει να σημειωθεί ότι ομοπολυμερή του DMAEMA αξιολογήθηκαν επίσης και σε *in vivo* μελέτες επιμόλυνσης σε ποντικούς και όχι μόνο *in vitro* (van de Wetering 1999(β), Verbaan et al 2001 και 2003).



Σχήμα 1.10. Χημικές δομές μεθακρυλικών, μεθακρυλαμιδικών και ακρυλικών ομοπολυμερών που χρησιμοποιήθηκαν στην επιμόλυνση (van de Wetering et al 1999(α)).

Ακόμη, εκτός από γραμμικά ομοπολυμερή του DMAEMA στην επιμόλυνση *in vitro* αξιολογήθηκαν και διάφορα γραμμικά συμπολυμερή του με υδρόφιλα και υδρόφοβα μονομερή, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.2. Η ύπαρξη ενός δεύτερου μονομερούς στο πολυμερές του DMAEMA μειώνει ή αυξάνει την επιμόλυνση, ανάλογα με το είδος του μονομερούς το ποσοστό του δεύτερου αυτού μονομερούς στο πολυμερές, και το είδος των κυττάρων που χρησιμοποιούνται.

Στις πλείστες μελέτες επιμόλυνσης των πολυμερών DMAEMA έχουν γίνει και μελέτες συμπλοκοποίησης του πολυμερούς με το DNA (Πίνακας 1.2). Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κυρίως η Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS) και μετρήσεις του zeta-δυναμικού, για τον προσδιορισμό του μεγέθους και του φορτίου του συμπλόκου πολυμερούς – DNA. Γενικά παρατηρήθηκε ότι όταν το σύμπλοκο είναι γύρω στα 100 nm και έχει ελαφρώς θετικό φορτίο έχει καλύτερη απόδοση στην επιμόλυνση.

Δυστυχώς, άμεση σύγκριση της απόδοσης των διαφόρων πολυμερών που χρησιμοποιήθηκαν σαν οχήματα μεταφοράς γενετικού υλικού δεν μπορεί να γίνει λόγω των διαφορετικών κυττάρων που χρησιμοποιούνται και των διαφορετικών πειραματικών διαδικασιών (De Smedt et al 2000). Από αυτές τις μελέτες όμως μπορούν να εξαχθούν τα τρία κυριότερα χαρακτηριστικά τα οποία φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στην απόδοση των κατιοντικών πολυμερικών μεταφορέων στην επιμόλυνση, τα οποία είναι: (α) η αρχιτεκτονική, (β) το pK , και (γ) το MB.

Επομένως, σε αυτή την Διδακτορική Εργασία έγινε προσπάθεια παρασκευής *αστεροειδών* κατιοντικών πολυμερών των οποίων η δομή-αρχιτεκτονική μιμείται την ευκαμψία της αρχιτεκτονικής των ενεργοποιημένων δενδριμερών και της διακλαδωμένης PEI, χρησιμοποιώντας το DMAEMA για μονομερές αφού, όπως αποδείχθηκε, είναι ένα μεθακρυλικό μονομερές που έχει το κατάλληλο pK . Αξιολογήθηκαν ομοπολυμερή του DMAEMA διαφόρων MB για να βρεθεί το βέλτιστο MB και παρασκευάστηκαν *αστεροειδή* συμπολυμερή του DMAEMA για να εξεταστεί η επίδραση των συμμοномерών στην επιμόλυνση.

Πίνακας 1.2. Μονομερή, μέθοδοι πολυμερισμού, αρχιτεκτονική πολυμερών, μέθοδοι χαρακτηρισμού των συμπλόκων του πολυμερούς με το DNA και κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην επιμόλυνση.

	Μονομερές Α	Μονομερές Β (εάν υπάρχει)	Αρχιτεκτονική Πολυμερούς	Μέθοδος Πολυμερισμού	Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Συμπλόκων	Κύτταρα	Βιβλιογραφική Αναφορά
1	DMAEMA	-	Γραμμικό Ομοπολυμερές	Ελευθέρων Ριζών	DLS, μετρήσεις Zeta-δυναμικού,	COS-7	Cherng et al 1996
2	DMAEMA	-	Γραμμικό Ομοπολυμερές	Ελευθέρων Ριζών	-	COS-7, OVCAR-3	van de Wetering et al 1997
3	DMAEMA	-	Γραμμικό Ομοπολυμερές	Ελευθέρων Ριζών	DLS, μετρήσεις Zeta-δυναμικού	COS-7	Cherng et al 1997
4	DMAEMA	-	Γραμμικό Ομοπολυμερές	Ελευθέρων Ριζών	DLS, μετρήσεις Zeta-δυναμικού	Πιθανότατα COS-7	Cherng et al 1999(β)
5	DMAEMA	-	Γραμμικό Ομοπολυμερές	Ελευθέρων Ριζών	DLS, μετρήσεις Zeta-δυναμικού, αποκλεισμός EtBr	COS-7	Cherng et al 1999(γ)
6	DMAEMA	-	Γραμμικό Ομοπολυμερές	Ελευθέρων Ριζών	DLS, μετρήσεις Zeta-δυναμικού	COS-7, OVCAR-3	Cherng et al 1999(α)
7	DMAEMA	-	Γραμμικό Ομοπολυμερές	Ελευθέρων Ριζών	DLS, μετρήσεις Zeta-δυναμικού, ηλεκτροφόριση αγαρόζης	COS-7, OVCAR-3	Bos et al 2000
8	DMAEMA DMAPMA DMAEMAm DMAPMAm TMAEMA DEAEMA DMAEA	-	Γραμμικά Ομοπολυμερή διαφόρων θετικά ιονιζόμενων μονομερών	Ελευθέρων Ριζών	DLS, μετρήσεις Zeta-δυναμικού	OVCAR-3	van de Wetering et al 1999(α)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

	Μονομερές Α	Μονομερές Β (εάν υπάρχει)	Αρχιτεκτονική Πολυμερούς	Μέθοδος Πολυμερισμού	Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Συμπλόκων	Κύτταρα	Βιβλιογραφική Αναφορά
9	DMAEMA	MMA triEGMA, NVP	Γραμμικά Τυχαία Συμπολυμερή	Συμπολυμερισμός Ελευθέρων Ριζών	DLS, μετρήσεις Zeta- δυναμικού	COS-7, OVCAR-3	van de Wetering et al 1998
10	DMAEMA	NIPAm	Γραμμικά Τυχαία Συμπολυμερή	Συμπολυμερισμός Ελευθέρων Ριζών	DLS, μετρήσεις Zeta- δυναμικού	OVCAR-3	Hinrichs et al 1999
11	DMAEMA	triEGMA NVP	Γραμμικά Τυχαία Συμπολυμερή	Συμπολυμερισμός Ελευθέρων Ριζών	DLS, μετρήσεις Zeta- δυναμικού	OVCAR-3	van de Wetering et al 2000
12	DMAEMA	NIPAm + BuMA	Γραμμικά Τυχαία Τριπολυμερή	Συμπολυμερισμός Ελευθέρων Ριζών	Ηλεκτροφόρηση αгарόζης	COS-1	Kurisawa et al 2000(α)
13	DMAEMA	NIPAm + BuMA	Γραμμικά Τυχαία Τριπολυμερή	Συμπολυμερισμός Ελευθέρων Ριζών	Ηλεκτροφόρηση αгарόζης	COS-1	Kurisawa et al 2000(β)
14	DMAEMA	St	Τυχαία Συμπολυμερή	Πολυμερισμός Γαλακτώματος	SEM, μετρήσεις Zeta- δυναμικού	293 cells	Pang et al 2002
15	DMAEMA	PEG	Γραμμικό Ομοπολυμερές, Δύο Ημιδιακλαδωμένα Συμπολυμερή, Γραμμικό Αδρομερές Συμπολυμερές, Γραμμικό Τυχαίο Συμπολυμερές	Οξυανιοντικός Πολυμερισμός και GTP	PLS	COS-7, A549, HepG2	Deshpande et al 2004
16	DMAEMA	AEMA → Πρωτεΐνη ή πεπτίδιο	Τυχαία Συμπολυμερή. Στις τυχαίες θέσεις τρανσφερίνη ή το δεκαπεπτίδιο	Συμπολυμερισμός Ελευθέρων Ριζών → τροποποιήσεις	-	-	Van Dijk- Wolthuis et al 1999
17	DMAEMA	NAPMAm + ομάδες PEG	Γραμμικό Τυχαίο Συμπολυμερές	Συμπολυμερισμός Ελευθέρων Ριζών → τροποποιήσεις	DLS, μετρήσεις Zeta- δυναμικού	OVCAR-3	van Stennis et al 2003

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

	Μονομέρες Α	Μονομέρες Β (εάν υπάρχει)	Αρχιτεκτονική Πολυμερούς	Μέθοδος Πολυμερισμού	Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Συμπλόκων	Κύτταρα	Βιβλιογραφική Αναφορά
18	DMAEMA	NVP + PEG + Ομ. γαλακτόζης	Γραμμικό Τυχαίο Συμπολυμερές, Ομάδες γαλακτόζης στα άκρα	Συμπολυμερισμός Ελευθέρων Ριζών → τροποποιήσεις	DLS, μετρήσεις Zeta- δυναμικού	HepG2	Lim et al 2000
19	DMAEMA	Πολυφωσφαζίνη, Πολυφωσφαζίνη + DMAE	Γραμμικό Ομοπολυμερές Τυχαία Συμπολυμερή	Πολυμερισμός Ελευθέρων Ριζών→ αντ. υποκατάστασης	DLS, μετρήσεις Zeta- δυναμικού,	COS-7	Luten et al 2003
20	DMAEMA	PEG	Γραμμικό Αδρομερές Συμπολυμερές	Ανιοντικός	DLS, μετρήσεις Zeta- δυναμικού, αποκλεισμός EtBr, φθορισμός πυρενίου	293 cells	Wakebayashi et al 2004
21	DMAEMA	NIPAm + BuMA	Γραμμικά Τυχαία Τριπολυμερή	Συμπολυμερισμός Ελευθέρων Ριζών	DLS, μετρήσεις Zeta- δυναμικού, αποκλεισμός EtBr,	COS-1	Takeda et al 2004
22	DMAEMA	HENIMA, MA, HYMIMMA	Γραμμικό Ομοπολυμερές Γραμμικά Τυχαία Συμπολυμερή	Συμπολυμερισμός Ελευθέρων Ριζών	Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης, αποκλεισμός EtBr	COS-1	Dubruel et al 2003
23	DMAEMA	MA, HYMIMMA	Γραμμικό Ομοπολυμερές Γραμμικά Τυχαία Συμπολυμερή	Συμπολυμερισμός Ελευθέρων Ριζών	Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης	COS-1	Dubruel et al 2004
24	DMAEMA	PEG	Γραμμικό Αδρομερές Συμπολυμερές	ATRP	DLS, μετρήσεις Zeta- δυναμικού	COS-7	Pirotton et al 2004
25	DMAEMA	-	Γραμμικό Ομοπολυμερές	Ελευθέρων Ριζών	-	OVCAR-3 <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> και <i>in vivo</i> σε ποντικό	van de Wetering et al 1999(β)

	Μονομερές Α	Μονομερές Β (εάν υπάρχει)	Αρχιτεκτονική Πολυμερούς	Μέθοδος Πολυμερισμού	Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Συμπλόκων	Κύτταρα	Βιβλιογραφική Αναφορά
26	DMAEMA	-	Γραμμικό Ομοπολυμερές	Ελευθέρων Ριζών	-	<i>in vivo</i> σε ποντικό	Verbaan et al 2001
27	DMAEMA	-	Γραμμικό Ομοπολυμερές	Ελευθέρων Ριζών	DLS, μετρήσεις Zeta- δυναμικού	<i>in vivo</i> σε ποντικό	Verbaan et al 2003

*Όλες οι συντομογραφίες των μονομερών, των μεθόδων πολυμερισμού και των κυττάρων δίνονται στις «Συντομογραφίες» στις αρχικές σελίδες της Διατριβής.

1.4.4. Κύριοι Μηχανισμοί Επιμόλυνσης

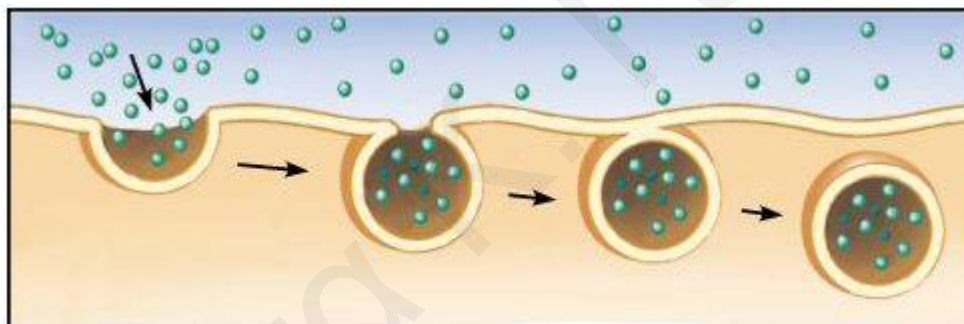
Μηχανισμοί Εισόδου του Συμπλόκου DNA/πολυμερούς στο κυτταρόπλασμα

Ένα από τα πιο καθοριστικά στάδια της επιμόλυνσης είναι το πέρασμα του συμπλόκου DNA/πολυμερούς από το εξωτερικό του κυττάρου στο κυτταρόπλασμα διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Όπως έχει αναφερθεί, το DNA είναι υδρόφιλο και αρνητικά φορτισμένο, ενώ η κυτταρική μεμβράνη είναι λιπόφιλη και αρνητικά φορτισμένη. Επομένως, είναι πολύ δύσκολο για το DNA να περάσει διαμέσου της μεμβράνης χωρίς τη βοήθεια κάποιου μεταφορέα. Τα κατιοντικά πολυμερή συμπλοκοποιούνται με το DNA για να δώσουν συνήθως ουδέτερο ή ελαφρώς θετικά φορτισμένο σύμπλοκο το οποίο μπορεί να περάσει μέσα από την κυτταρική μεμβράνη. Υπάρχουν δύο πιθανές θεωρίες-μηχανισμοί για το πώς το σύμπλοκο περνά από το εξωτερικό του κυττάρου στο κυτταρόπλασμα:

1. Με ενδοκύτωση. Στην ενδοκύτωση η είσοδος των υλικών, του συμπλόκου, μέσα στο κύτταρο γίνεται με εγκόλπωση της πλασματικής κυτταρικής μεμβράνης. Το σύμπλοκο μπορεί να βρίσκεται στην υγρή φάση του σχηματιζόμενου κυστιδίου (λυσόσωμα) ή να έχει προσκολληθεί στην μεμβράνη του (Σχήμα 1.11). Για την εξακρίβωση του μηχανισμού με τον οποίο το σύμπλοκο εισέρχεται στη μεμβράνη (με ενδοκύτωση ή με αποσταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης), έχουν γίνει διάφορες μελέτες. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί, χρησιμοποιώντας φθορίζοντα σύμπλοκα DNA/PEI, ότι τα σύμπλοκα συγκεντρώνονται στην πλασματική μεμβράνη, κάτι που υποστηρίζει την υπόθεση ότι η επιμόλυνση γίνεται με ενδοκύτωση (Godbey et al 1999). Έχουν επίσης διατυπωθεί και επιπρόσθετες θεωρίες στο αν η ενδοκύτωση γίνεται μέσω αρνητικά φορτισμένων υποδοχέων που βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης ή μέσω ενός μηχανισμού προσρόφησης, με αντιφατικά αποτελέσματα (Merdan et al 2002).
2. Με αποσταθεροποίηση της πλασματικής μεμβράνης. Πιστεύεται ότι το ελαφρά θετικά φορτισμένο σύμπλοκο DNA/πολυμερούς αλληλεπιδρά με την ελαφρά αρνητικά φορτισμένη πλασματική μεμβράνη, έτσι την αποσταθεροποιεί για ένα μικρό χρονικό διάστημα που είναι αρκετό ώστε να μπορεί το σύμπλοκο να διαχυθεί μέσα από αυτή (Godbey et al 1999, van de Wetering et al 1998). Ένα

γεγονός που υποστηρίζει αυτό το μηχανισμό είναι ότι έχει αποδειχθεί ότι το ελεύθερο (μη-συμπλοκοποιημένο) πολυμερές είναι τοξικό. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι αλληλεπιδρά και αποσταθεροποιεί την κυτταρική μεμβράνη και τελικά καταστρέφει το κύτταρο (De Smedt et al 2000, van de Wetering et al 1998). Γνωρίζοντας ότι το ελεύθερο πολυμερές αποσταθεροποιεί την εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου, μπορεί κανείς να υποθέσει ότι το επίσης θετικά φορτισμένο σύμπλοκο πολυμερές/DNA συμπεριφέρεται με τον ίδιο τρόπο.

Παρόλο που έχει μελετηθεί αρκετά το θέμα του μηχανισμού που ακολουθείται, δεν έχει γίνει πλήρως αποδεκτός κανένας από τους δύο τρόπους. Αυτό οφείλεται στα αντιφατικά αποτελέσματα που έχουν αναφερθεί σε διάφορες μελέτες. Για αυτό πρόσφατα άρχισε να πιστεύεται ότι το ποιος μηχανισμός ακολουθείται μπορεί να εξαρτάται από το είδος των κυττάρων που χρησιμοποιούνται (Merdan et al 2002).

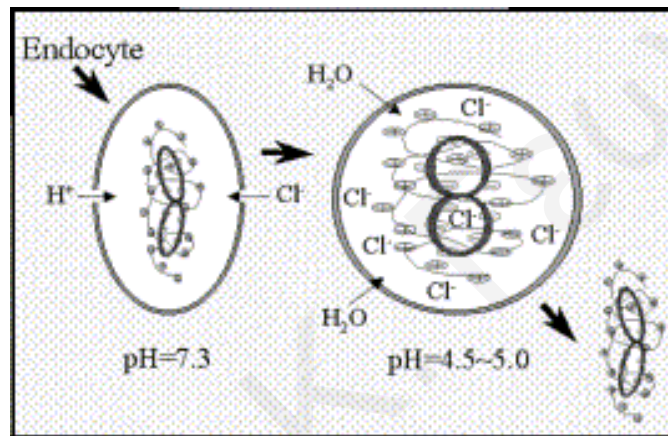


Σχήμα 1.11. Απεικόνιση της ενδοκύτωσης, της εισόδου δηλαδή υλικών μέσα στο κύτταρο με εγκόλπωση της πλασματικής κυτταρικής μεμβράνης (www.kscience.co.uk).

Φαινόμενο «σφουγγαριού» των πρωτονίων (*proton «sponge» effect*)

Το θετικό φορτίο του συμπλόκου πολυμερούς / DNA θεωρείται απαραίτητο αφού βοηθά στο φαινόμενο «σφουγγαριού» των πρωτονίων (*proton «sponge» effect*) το οποίο διατυπώθηκε για πρώτη φορά το 1995 από το Behr (Boussif et al 1995, Pang et al 2002, Merdan et al 2002). Ο μηχανισμός αυτού του φαινομένου εξηγείται στο Σχήμα 1.12. Αρχικά, το σύμπλοκο εισέρχεται μέσα στο κύτταρο, πιθανότατα με ενδοκύτωση, και βρίσκεται μέσα στο λυσόσωμα (ενδόσωμα), το οποίο έχει σχετικά όξινο pH ~ 5. Το

πολυμερές που είναι ασθενής πολυηλεκτρολύτης φορτίζεται θετικά, δεσμεύοντας πρωτόνια (των οποίων η συγκέντρωση είναι σχετικά υψηλή αφού το pH είναι χαμηλό). Η ηλεκτροστατική αυτή φόρτιση του πολυμερούς προκαλεί ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ των αλυσίδων του. Προκαλεί επίσης και εισδοχή ιόντων Cl^- για αντιστάθμιση του θετικού φορτίου και δημιουργία ωσμωτικής πίεσης. Τα δύο πιο πάνω φαινόμενα προκαλούν διόγκωση του λυσοσώματος με εισδοχή μορίων νερού, και τελικά τη διάρρηξή του. Έτσι, το DNA ελευθερώνεται μέσα στο κυτταρόπλασμα για να προχωρήσει αργότερα προς τον πυρήνα.



Σχήμα 1.12. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού του φαινομένου του σφουγγαριού πρωτονίων (Pang et al 2002).

1.5. Πολυμερικά Πλέγματα

1.5.1. Γενικοί Ορισμοί

Αυτό το μέρος της Εισαγωγής αναφέρεται στα πολυμερικά πλέγματα. Πριν όμως γίνει περιγραφή στους τρόπους σύνθεσης, στο χαρακτηρισμό και στις εφαρμογές των πολυμερικών πλεγμάτων πρέπει να γίνουν κατανοητοί μερικοί ορισμοί που χρησιμοποιούνται στο κείμενο σε σχέση με αυτά.

Τί είναι τα πολυμερικά πλέγματα;

Τα πολυμερικά πλέγματα και ειδικότερα τα ομοιοπολικά συνδεδεμένα πλέγματα ή δίκτυα, στα οποία αναφέρεται ένα μεγάλο μέρος αυτής της Διδακτορικής Διατριβής, είναι συστήματα πολυμερικών αλυσίδων οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς σε σημεία που ονομάζονται *κόμβοι* (cross-links) (Σχήμα 1.13) (Allcock και Lampe 1990). Οι αλυσίδες οι οποίες συνδέουν δύο κόμβους ονομάζονται *ελαστικές αλυσίδες* (elastic chains) οι οποίες παρουσιάζονται στο ίδιο σχήμα με μπλε χρώμα. Με κόκκινο χρώμα παριστάνονται οι *ελεύθερες αλυσίδες* (dangling chains) οι οποίες είναι ενωμένες μόνο στο ένα άκρο τους με κόμβο ενώ το άλλο άκρο τους είναι ελεύθερο.



Σχήμα 1.13. Σχηματική απεικόνιση ενός πολυμερικού πλέγματος όπου παρουσιάζονται οι ελαστικές του αλυσίδες (μπλε χρώμα), οι ελεύθερες του αλυσίδες (κόκκινο χρώμα) και οι κόμβοι του (μαύρο χρώμα).

Το κυριότερο χαρακτηριστικό των πολυμερικών πλεγμάτων είναι, σε αντίθεση με τα γραμμικά, τα αστεροειδή και τα ενοφθαλμισμένα πολυμερή, η μη διαλυτότητά τους σε

όλους τους διαλύτες. Παρουσιάζουν όμως την ικανότητα να απορροφούν διαλύτη, αναλόγως της συμβατότητάς τους με αυτόν (Osada και Ross-Murphy 1993, Tanaka 1981).

Κατηγορίες πλεγμάτων ανάλογα με την υδροφοβικότητα

Τα πολυμερικά πλέγματα είναι δυνατό να αποτελούνται από περισσότερα από ένα είδη μονάδων / μονομερών. Έτσι μπορούν να χωριστούν στις πιο κάτω κατηγορίες ανάλογα με την υδροφιλικότητα ή υδροφοβικότητα αυτών των μονάδων:

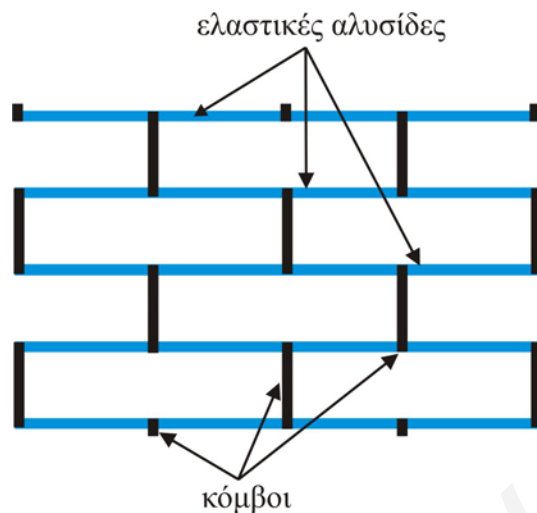
- *Διπλά υδρόφοβα* πολυμερικά πλέγματα όταν αποτελούνται από διαφορετικά είδη μονάδων που είναι όλα υδρόφοβα.
- *Αμφιφιλικά* πολυμερικά πλέγματα όταν αποτελούνται από υδρόφοβες και από υδρόφιλες μονάδες.
- *Διπλά υδρόφιλα* πολυμερικά πλέγματα όταν αποτελούνται από διαφορετικά είδη μονάδων που είναι όλα υδρόφιλα. Εάν αυτές οι μονάδες έχουν και αντίθετα φορτία, το ένα είδος είναι θετικά φορτισμένο και το άλλο αρνητικά φορτισμένο, τα διπλά υδρόφιλα πολυμερικά αυτά πλέγματα είναι *αμφολυτικά*.

Τί είναι τα τμηματικά πλέγματα

Όταν οι διαφορετικές αυτές μονάδες των πλεγμάτων, υδρόφιλες ή υδρόφοβες, είναι τοποθετημένες σε ξεχωριστά τμήματα, αυτά τα πλέγματα ονομάζονται *τμηματικά* (segmented). Τα τμηματικά αυτά πλέγματα μπορούν να παρουσιάσουν μικροφασικό διαχωρισμό, όπως τα αντίστοιχα γραμμικά τμηματικά αμφιφιλικά πολυμερή σε νερό τα οποία σχηματίζουν οργανωμένες μορφολογίες όπως είναι τα μικύλια.

Τί είναι τα πρότυπα πλέγματα

Τα *πρότυπα* (model) πλέγματα έχουν αλυσίδες μεταξύ των κόμβων σύνδεσης οι οποίες είναι ομοιόμορφου και επακριβούς μήκους (Hild 1998). Αυστηρά μιλώνοντας, τα πρότυπα δίκτυα έχουν και επακριβώς καθορισμένο αριθμό βραχιόνων στους κόμβους, κάτι όμως το οποίο συναντάται πιο σπάνια. Μία απλουστευμένη σχηματική απεικόνιση ενός πρότυπου πλέγματος δίνεται στο σχήμα που ακολουθεί, όπου με μαύρο χρώμα συμβολίζονται οι κόμβοι και με μπλε χρώμα οι ελαστικές αλυσίδες.



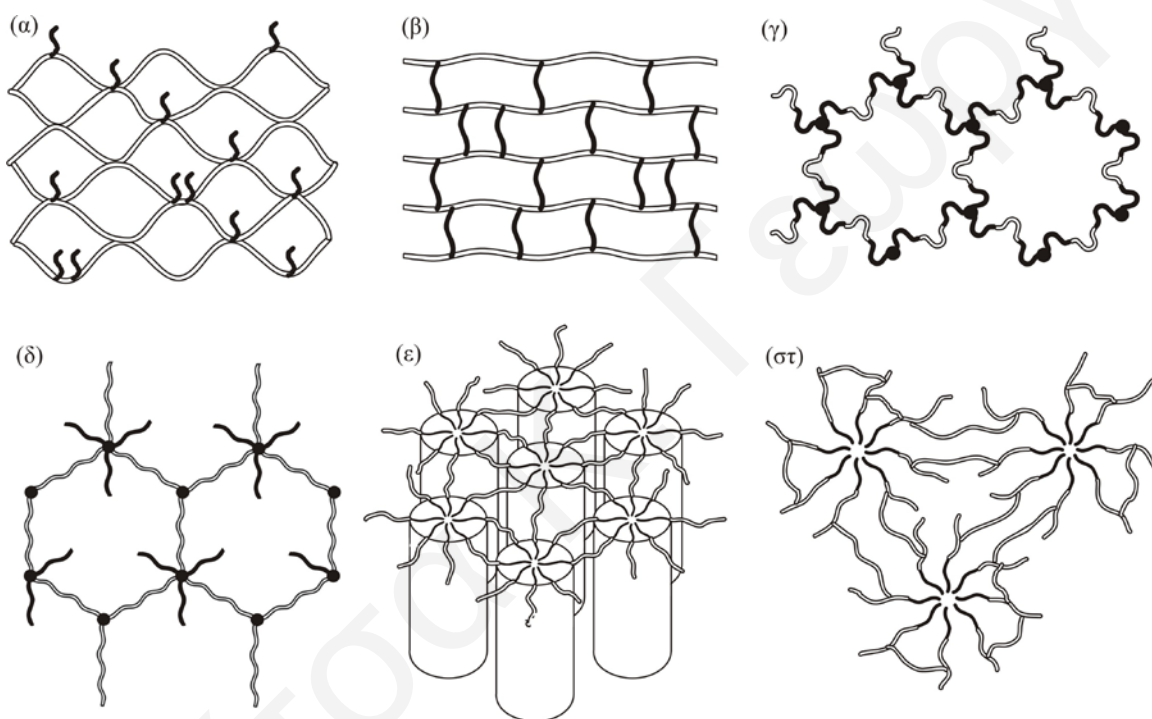
Σχήμα 1.14. Σχηματική απεικόνιση πρότυπου πολυμερικού πλέγματος. Με μαύρο χρώμα συμβολίζονται οι κόμβοι και με μπλε χρώμα οι ελαστικές αλυσίδες.

Έτσι, ως προς την αρχιτεκτονική του, ένα πολυμερικό πλέγμα μπορεί να είναι τμηματικό αλλά όχι πρότυπο (όχι ομοιόμορφο μέγεθος όλων των τμημάτων), πρότυπο αλλά όχι τμηματικό (τυχαίο συμπολυμερές με ελαστικές αλυσίδες ομοιόμορφου μεγέθους), ούτε τμηματικό ούτε πρότυπο (ελαστικές αλυσίδες οι οποίες είναι τυχαία συμπολυμερή μη ομοιόμορφου μεγέθους), και τέλος, και τμηματικό και πρότυπο (π.χ. ελαστικές αλυσίδες βασισμένες σε αδρομερές συμπολυμερές ομοιόμορφου μεγέθους). Στο Σχήμα 1.15 απεικονίζονται έξι παραδείγματα πρόσφατα παρασκευασμένων τμηματικών πολυμερικών πλεγμάτων, από τα οποία τα (γ), (δ) και (ε) είναι και πρότυπα. Η σύνθεση αυτών και άλλων κύριων αρχιτεκτονικών πολυμερικών πλεγμάτων περιγράφονται στις σελίδες που ακολουθούν.

1.5.2. Κύριοι Τρόποι σύνθεσης

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος σύνθεσης των πολυμερικών πλεγμάτων δύο συστατικών / μονομερών είναι η χρήση του πολυμερισμού ελευθέρων ριζών για ταυτόχρονο πολυμερισμό και των δύο μονομερών αλλά και του διασταυρωτή. Αυτή η μέθοδος όμως δεν επιτρέπει οποιοδήποτε έλεγχο στην αρχιτεκτονική του δικτύου, στο

ΜΒ των ελαστικών αλυσίδων, της σύστασης ή της κατανομής των ΜΒ και των συστάσεων. Επιπρόσθετα, με αυτή τη μέθοδο δεν μπορούν να παρασκευαστούν ούτε τμηματικά (εκτός αν χρησιμοποιηθεί ένας μακρομοριακός διασταυρωτής) ούτε και πρότυπα πλέγματα. Αυτά, μόνο με τη χρήση «ζωντανών» μεθόδων πολυμερισμού (Webster 1991), όπως ο ανιοντικός, ο GTP, ο QLCCP και ο «ζωντανός» πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου που δίνουν ελαστικές αλυσίδες μεγάλης ομοιογένειας (στενής κατανομής μεγέθους), μπορούν να παρασκευαστούν.



Σχήμα 1.15. Παραδείγματα πρόσφατα παρασκευασμένων συμπολυμερικών πλεγμάτων. Με άσπρο και μαύρο χρώμα παριστάνονται τα δύο συστατικά (Patrickios και Georgiou 2003).

Σε σχέση με τη χρήση «ζωντανών» και «μη ζωντανών» μεθόδων πολυμερισμού, υπάρχουν τρεις πιθανότητες για τη σύνθεση πολυμερικών πλεγμάτων:

1. Τα δύο μονομερή πολυμερίζονται μαζί χρησιμοποιώντας μέθοδο πολυμερισμού που δεν οδηγεί σε ελεγχόμενα ΜΒ («μη ζωντανή» μέθοδο, π.χ. ελευθέρων ριζών),

2. Τα δύο μονομερή πολυμερίζονται μαζί χρησιμοποιώντας μέθοδο πολυμερισμού που προδίδει ελεγχόμενα MB («ζωντανή» μέθοδο), και
3. Με συνδυασμό των δύο κατηγοριών μεθόδων πολυμερισμού, το ένα μονομερές πολυμερίζεται με την πρώτη και το άλλο με τη δεύτερη μέθοδο.

Το επόμενο μέρος αυτής της μελέτης παρουσιάζει μερικές πρόσφατες τεχνικές παρασκευής πολυμερικών πλεγμάτων καταταγμένες ανάλογα με τη στρατηγική σύνθεσης. Οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται βρίσκονται συγκεντρωμένες στις αρχικές σελίδες αυτής της Διδακτορικής Εργασίας.

Συμπολυμερισμός ελευθέρων ριζών και των δύο μονομερών

Έχουν παρασκευαστεί ένα πλήθος από πολυμερικά πλέγματα χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο σύνθεσης και για αυτό μόνο ένα μέρος τους θα αναφερθεί πιο κάτω. Ο Peppas και οι συνεργάτες του (Podual et al (α), (β) και (γ) 2000) παρασκεύασαν πολυμερικά πλέγματα αποτελούμενα από ένα μη ιοντικό υδρόφιλο μονομερές, το μεθακρυλικό εστέρα της πολυ(αιθυλενογλυκόλης) [poly(ethylene glycol) methacrylate, PEGMA] και το υδρόφοβο μονομερές DEAEEMA το οποίο έχει την ικανότητα να ιονίζεται σε όξινο pH, και χρησιμοποιώντας το διμεθακρυλικό διεστέρα της τετρα(αιθυλενογλυκόλης) [tetra(ethylene glycol) dimethacrylate, TEGDMA] σαν διασταυρωτή. Ο Khokhlov και οι συνεργάτες του (Philippova et al 1997) καθώς και ο Osada και οι συνεργάτες του (Miyasaki et al 2002) εφάρμοσαν τον πολυμερισμό ελευθέρων ριζών για την παρασκευή τυχαίων πολυμερικών πλεγμάτων βασισμένων σε τυχαία συμπολυμερή του ακρυλικού οξέος (acrylic acid, AA) και ακρυλικών εστέρων κ-αλκοολών (*n*-alkyl acrylates) με 8, 12, 14, 16, 18, 20 και 22 άτομα άνθρακα στην πλευρική αλυσίδα, χρησιμοποιώντας *N,N'*-μεθυλενοδιακρυλαμίδιο (*N,N'*-methylenebisacrylamide, MBAAm) σαν διασταυρωτή. Ο Rimmer και οι συνεργάτες του (Haigh et al 2000 και 2002) παρασκεύασαν πολυμερικά πλέγματα με το μη-ιοντικό υδρόφοβο μεθακρυλικό δωδεκυλεστέρα (lauryl methacrylate, LaMA) και το μη ιοντικό, υδρόφιλο μεθακρυλικό 2,3-διυδροξυπροπυλεστέρα (2,3-dihydroxypropyl methacrylate, DHPMA) χρησιμοποιώντας το διμεθακρυλικό διεστέρα της αιθυλενογλυκόλης (ethylene glycol dimethacrylate, EGDMA) σαν διασταυρωτή. Τα τρία τελευταία είδη πλεγμάτων (Peppas et al (α), (β) και (γ) 2000, Philippova et al 1997, Miyasaki et al 2002, Haigh et al

2000 και 2002) μπορούν να θεωρηθούν τμηματικά λόγω του σχετικά μεγάλου μήκους της πλάγιας αλυσίδας του υδρόφοβου μονομερούς (Σχήμα 1.15α).

Συμπολυμερισμός ελευθέρων ριζών μακρομοριακού διασταυρωτή και μονομερούς

Οι ομάδες των J. P. Kennedy (Blezer et al 1995, Park et al 1995 και 1997, Shamlou 1997, Allen et al 1999, Kennedy et al 2000 και 2001, Keszler et al 2000, Isayeva et al 2002(α) και (β)) και B. Iván (Iván et al 1996, Süvegh et al 1998, Scherble et al 2001) είναι από τις πρώτες που παρασκεύασαν πολυμερικά πλέγματα με τη χρήση μακρομοριακού διασταυρωτή και έχουν συνεισφέρει σημαντικά σε αυτό τον τομέα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούν σαν μακρομοριακό διασταυρωτή σχεδόν μονοδιάσπαρτο πολυIB (polyIB, PIB) με δύο τερματικές ολεφινικές (πολυμεριζόμενες) ομάδες. Το PIB παρασκευάζεται με QLCCP και στη συνέχεια με κατάλληλη επεξεργασία μετατρέπεται σε α,ω- διδραστικό μόριο είτε με δύο αλλυλικές είτε με δύο μεθακρυλικές τελικές ομάδες (ομάδες που μπορούν να πολυμεριστούν). Αυτοί οι ερευνητές συνδύασαν το μακροδιασταυρωτή PIB μαζί με πολλά εμπορικά διαθέσιμα μονομερή για την παρασκευή πολυμερικών πλεγμάτων. Οι συνδυασμοί αυτοί δίνονται στον Πίνακα 1.3.

Ο Rimmer και οι συνεργάτες του (Rimmer et al 1999) παρασκεύασαν πολυμερικά πλέγματα με το υδρόφιλο μη ιοντικό μονομερές DHPMA και το υδρόφοβο α,ω-διμεθακρυλικό διασταυρωτή του μεθακρυλικού κ-βουτυλεστέρα (*n*-butyl methacrylate, BuMA) ή του μεθακρυλικού κ-εξυλεστέρα (*n*-hexyl methacrylate, HeMA). Οι μακροδιασταυρωτές παρασκευάστηκαν με συμπολυμερισμό ελευθέρων ριζών του BuMA ή του HeMA μαζί με βουταδιένιο, ακόλουθη οζονόλυση των διπλών δεσμών της κύριας αλυσίδας του πολυμερούς και προσθήκη των δύο τερματικών μεθακρυλικών ομάδων με δυνατότητα πολυμερισμού.

Πίνακας 1.3. Μονομερή και μέθοδοι πολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή πολυμερικών πλεγμάτων, οι μέθοδοι χαρακτηρισμού τους και οι εφαρμογές τους.

	Μονομερές Α	Μονομερές Β	Μέθοδος Πολυμερισμού	Μέθοδοι Χαρακτηρισμού	Εφαρμογές	Βιβλιογραφική Αναφορά
1	PEGMA	DEAEMA	Ελευθέρων ριζών	ΒΔ, ΒΔ=f(pH)	πλέγματα ευαίσθητα στη γλυκόζη	Podual et al 2000 (α), (β) και (γ)
2	AA	ακρυλικοί εστέρες κ-αλκοολών	Ελευθέρων ριζών	ΒΔ, ΒΔ=f(pH), ¹³ C NMR, φθορισμός	-	Philippova et al 1997
3	AA	ακρυλικοί εστέρες κ-αλκοολών	Ελευθέρων ριζών	ΒΔ, DSC, SAXD	-	Miyasaki et al 2002
4	DHPMA	LaMA	Ελευθέρων ριζών	ΒΔ	προσρόφιση της ανοσοσφαιρίνης G	Haigh et al 2000
5	DHPMA	LaMA	Ελευθέρων ριζών	DSC, SEM	καλλιέργεια κυττάρων	Haigh et al 2002
6	DMAEMA, DMAAm	MA-PIB-MA	Ελευθέρων ριζών	-	καλλιέργεια κυττάρων	Blezer et al 1995,
7	HEMA	MA-PIB-MA	Ελευθέρων ριζών	XPS, AFM, DCA, SAXS	-	Park et al 1995
8	DMAEMA, DMAAm	MA-PIB-MA	Ελευθέρων ριζών	ηλεκτροφόρηση αгарόζης	απελευθέρωση φαρμάκων, γλυκόζης, ινσουλίνης, αλβουμίνης	Shamlou 1997
9	HEMA, DMAA	MA-PIB-MA	Ελευθέρων ριζών	ΒΔ σε νερό και κ-επτάνιο, SAXS, TGA, DMTA, DSC, TEM, και μηχανική αντοχή σε εφελκυσμό	-	Park et al 1997
10	q-DMAEMA	MA-PIB-MA	Ελευθέρων ριζών	ΒΔ σε νερό και κ-επτάνιο, DSC, TEM	-	Allen et al 1999
11	DMAAm	MA-PIB-MA	Ελευθέρων ριζών	ηλεκτροφόρηση αгарόζης	διάχυση γλυκόζης και ινσουλίνης	Kennedy et al 2000

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

	Μονομερές Α	Μονομερές Β	Μέθοδος Πολυμερισμού	Μέθοδοι Χαρακτηρισμού	Εφαρμογές	Βιβλιογραφική Αναφορά
12	DMAAm	(PIB)-MA ₃	Ελευθέρων ριζών	ΒΔ σε νερό και κ-επτάνιο, μέτρηση αντοχής σε εφελκυσμό και τάσης έκτασης	-	Keszler et al 2000
13	DMAAm	MA-PIB-MA, (PIB)-MA ₃	Ελευθέρων ριζών	μέτρηση αντοχής σε εφελκυσμό και τάσης έκτασης, ηλεκτροφόρηση αгарόζης	διάχυση γλυκόζης και ινσουλίνης	Kennedy et al 2001
14	DMAAm	PIB(MA) ₈	Ελευθέρων ριζών	ΒΔ σε μεθανόλη και κ-επτάνιο, μηχανική αντοχή	-	Isayeva et al 2002 (α)
15	DMAAm	PIB	Ελευθέρων ριζών	ΒΔ σε νερό, μηχανική αντοχή	-	Isayeva et al 2002 (β)
16	HEMA	MA-PIB-MA	Ελευθέρων ριζών	ΒΔ σε νερό, TEM, DSC	-	Iván et al 1996
17	DMAEMA	MA-PIB-MA	Ελευθέρων ριζών	Μετρήσεις εξαύλωσης ποζιτρονίων	-	Süvegh et al 1998
28	HEMA	MA-PIB-MA	Ελευθέρων ριζών	TEM, AFM, SAXS	ημιαγωγικοί νανοκρύσταλλοι CdS	Scherble et al 2001
29	DHPMA	MA-nBuMA-MA	Ελευθέρων ριζών	SEM	-	Rimmer et al 1999
20	AM	A-PTHF-A	Ελευθέρων ριζών	ΒΔ σε νερό, κυκλοεξάνιο και THF, DSC, SEM	-	Guan et al 2000
21	MAA	A-PTHF-A	Ελευθέρων ριζών	ΒΔ σε νερό και κυκλοεξάνιο, ΒΔ=f(pH)	-	Guan et al 2002 (α)
22	AA, MMA	A-PTHF-A	Ελευθέρων ριζών	ΒΔ σε νερό και κυκλοεξάνιο, ΒΔ=f(pH)	-	Guan et al 2001
23	NIPAm	A-PTHF-A	Ελευθέρων ριζών	ΒΔ σε νερό και κυκλοεξάνιο, ΒΔ=f(T)	-	Guan et al 2002 (β)
24	AA, AM, NIPAm	A-PDXS-A	Ελευθέρων ριζών	ΒΔ=f(pH), ΒΔ=f(T)	αποικοδόμηση των δικτύων	Du et al 2002

	Μονομερές Α	Μονομερές Β	Μέθοδος Πολυμερισμού	Μέθοδοι Χαρακτηρισμού	Εφαρμογές	Βιβλιογραφική Αναφορά
25	HEMA	MA-PCL-MA, MA-P(D,L)LA-MA	Ελευθέρων ριζών	ΒΔ σε νερό, CHCl ₃ , νερό/αιθυλενογλυκόλη	απόδοση της δεξαμεθαζόνης	Barakat et al 1999
26	MA-PEO-MA	MMA	Ελευθέρων ριζών	ΒΔ σε νερό και THF, DSC, TEM	-	Carrot et al 1998
27	A-PDXL-A	MMA, BuMA, στυρένιο και HEMA	Ελευθέρων ριζών	ΒΔ σε νερό, μετρήσεις συμπίεσης, DSC	-	Sahli et al 2005
28	A-PDXL-A	PMMA	Ελευθέρων ριζών	solid-state ¹³ C CP/MAS NMR, DMA, DSC and TGA	-	Adriaensens et al 2002
29	A-PDXL-A	HEMA	Φωτοπολυμερισμός, Ελευθέρων ριζών	ΒΔ σε νερό, AFM		Bruns et al 2005
30	A-P(MeOx)-A A-P(EtOx)-A	MMA	Ελευθέρων ριζών	ΒΔ σε νερό και ακετόνη ΒΔ σε νερό, τολουόλιο και ακετόνη, DSC, DMTA	- -	Christova et al 2002
31	PEO	α,ω-διφουράνης, nBuMA, α,ω-διφουράνης, nHeMA	Αντίδραση Diels-Alder	-	-	Delerba et al 1997
32	DHPMA	α,ω-διφουράνης, nBuMA	Χημική αντίδραση	ΒΔ	Καλλιέργεια κυττάρων	Rimmer et al 2005
33	PDMAEMA	α,ω-P(MeOx) α,ω-P(PhOx)	Αντίδραση τερματισμού	ΒΔ σε νερό και CHCl ₃	-	Pantchev et al 1998
34	PEO	PIB	Χημική διασταύρωση με PD5	ΒΔ σε νερό και εξάνιο, DSC, TGA, μέτρηση τάσης έκταση	-	Kurian και Kennedy 2002 (α)
35	A-PEG-A	V-PDMS-V	Χημική διασταύρωση με PD5	ΒΔ σε μεθανόλη και εξάνιο, DSC, TGA, μέτρηση αντοχής σε έκταση	-	Kurian και Kennedy 2002 (β)
36	HO-PEG-OH	τριδρόζυ PIB		ΒΔ σε νερό και εξάνιο, DSC	-	Erdodi και Iván 2004
37	HO-PEG-OH	V-PDMS-V	Διασταύρωση με SiPh(SiH) ₂ OEt	ΒΔ σε νερό και εξάνιο, μέτρηση αντοχής σε έκταση	εμφύτευση κυττάρων, μετρήσεις διαπερατότητας σε O ₂	Erdodi και Kennedy 2005 (α), (β) και (γ)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

	Μονομερές Α	Μονομερές Β	Μέθοδος Πολυμερισμού	Μέθοδοι Χαρακτηρισμού	Εφαρμογές	Βιβλιογραφική Αναφορά
38	DHPMA	MMA	Ανιοντικό πολυμερισμό	-	-	Hild και Lamps 1995
39	DHPMA	St	Ανιοντικό πολυμερισμό	-	-	Hild και Lamps 1998
40	DMAEMA	MMA	GTP	ΒΔ σε νερό, ΒΔ=f(pH)	-	Simmons et al 2000
41	DMAEMA	MMA	GTP	ΒΔ σε νερό, ΒΔ=f(pH)	-	Triftaridou et al 2002
42	DMAEMA	MAA	GTP	ΒΔ σε νερό, DS=f(pH)	-	Demosthenous et al 2002
43	DMAEMA	HEGMA	GTP	ΒΔ σε νερό, ΒΔ=f(pH)	-	Loizou et al 2003
44	DMAEMA		GTP	ΒΔ σε νερό, ΒΔ=f(pH)	-	Vamvakaki et al 2001
45	DMAEMA	MMA	GTP	ΒΔ σε νερό, ΒΔ=f(pH)	-	Vamvakaki και Patrickios 2002
46	HEGMA	MAA	GTP	ΒΔ σε νερό, ΒΔ=f(pH)	-	Georgiades et al 2002
47	MMA, υδρολυόμενος διασταυρωτής		GTP	ΒΔ σε νερό, ΒΔ=f(pH)	-	Themistou και Patrickios 2004
48	PEO- <i>b</i> -PB		Ελευθέρων ριζών	πολωτικό μικροσκόπιο, SAXS, TEM	-	Hentze et al 1999
49	AA	PPO	Ελευθέρων ριζών	DS=f(pH), SEM	απόδοση φαρμάκων	Bromberg et al 2002
50	εποξειδική ρητίνη PEO- <i>b</i> - P(E- <i>alt</i> -P)			SAXS, DMA, TEM, DSC	-	Hillmyer et al 1997
51	εποξειδική ρητίνη PEO- <i>b</i> - P(E- <i>alt</i> -P) PEO- <i>b</i> -PEE			SANS, TEM, SAXS	-	Lipic et al 1998
52	εποξειδική ρητίνη PEO- <i>b</i> -PPO, PEO- <i>b</i> -PPG- <i>b</i> -PEO			DSC, AFM, DRS	-	Mijovic et al 2000
53	ρητίνη, P2VP- <i>b</i> -PI,		Ελευθέρων ριζών	DSC, DMA	-	Kosonen et al 2001

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

	Μονομερές Α	Μονομερές Β	Μέθοδος Πολυμερισμού	Μέθοδοι Χαρακτηρισμού	Εφαρμογές	Βιβλιογραφική Αναφορά
55	εποξυδική ρητίνη, PEO-b-PPO-b-PEO			DSC, TEM, AFM, SAXS, αντοχή στην εκτόνωση	-	Guo et al 2002
56	PEO	Δεντρίτες πολύ(βενζολικώναιθέρων)	χημικές αντιδράσεις	BΔ, DSC	-	Gitsov και Zhu 2002
57	PEO	Δεντρίτες πολύ(βενζολικώναιθέρων)	χημικές αντιδράσεις	BΔ=f(pH) και BΔ=f(T)	-	Zhu et al 2005
58	ουραιθανικό πολυTHF		ελευθέρων ριζών	BΔ σε νερό και CH ₃ Cl, BΔ=f(pH), DCA, SEM	-	Kim J.-Y et al 2000
59	ουραιθανικό πολυTHF		ελευθέρων ριζών	BΔ σε βασικό νερό, CH ₃ Cl, διοξάνη, και διμέθυλοσουλφοξείδιο, DMA	-	Kim J.-Y et al 2001

* Όλες οι συντομογραφίες των μονομερών, των μεθόδων πολυμερισμού και των μεθόδων χαρακτηρισμού δίνονται στις «Συντομογραφίες» στις αρχικές σελίδες της Διατριβής.

Πρόσφατα, ο Peng και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν εμπορικά διαθέσιμο σχεδόν μονοδιάσπαρτο πολυ(τετραϋδροφουράνιο) [poly(tetrahydrofuran), polyTHF] το οποίο πιθανότατα παρασκευάστηκε με «ζωντανό» κατιοντικό πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου (ring opening polymerization, ROP), MB γύρω στα 2000 g mol^{-1} , το οποίο μετέτρεψαν σε α,ω-διακρυλικό παράγωγο, και το οποίο χρησιμοποίησαν σαν μακροδιασταυρωτή για την παρασκευή πολυμερικών πλεγμάτων με διάφορα μονομερή (βλέπε Πίνακα 1.3) (Du et al 2002, Guan et al 2001, 2001, 2002 (α) και (β)).

Ο Jérôme και οι συνεργάτες του (Barakat et al 1999) παρασκεύασαν πολυμερικά πλέγματα με ένα υδρόφιλο μονομερές, το μεθακρυλικό 2-υδροξυαιθυλεστέρα (hydroxyl ethyl methacrylate, HEMA), και βιοαποικοδομήσιμους μακροδιασταυρωτές της πολυ(ε-καπρολακτόνης) [poly(ε-caprolactone), PCL] και του πολυ(D,L-λακτιδίου) [poly(D,L)-lactide, P(D,L)LA] που συντέθηκαν με «ζωντανό» κατιοντικό πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου.

Ο Lutz και οι συνεργάτες του (Carrot et al 1998) πολυμέρισαν σε THF με συμπολυμερισμό ελευθέρων ριζών το α,ω-διμεθακρυλικό πολυ(αιθυλενοξείδιο) [α,ω-dimethacrylated poly(ethylene oxide), MA-PEO-MA], παρασκευασμένο με ανιοντικό πολυμερισμό, με το μεθακρυλικό μεθυλεστέρα (methyl methacrylate, MMA). Πρόσφατα πολυμέρισαν με συμπολυμερισμό ελευθέρων ριζών την α,ω-διακρυλική πολυ(1,3-διοξολάνη) [α,ω-diacrylated poly(1,3-dioxolane), A-PDXL-A] με το MMA, το BuMA, το στυρένιο και το HEMA σε νερό (Sahli et al 2005). Παλαιότερα, ο Du Prez και οι συνεργάτες του πολυμέρισαν με συμπολυμερισμό ελευθέρων ριζών τη A-PDXL-A παρασκευασμένη με κατιοντικό πολυμερισμό με το MMA αλλά σε τολουόλιο (Adriaensens et al 2002). Σε μία, επίσης, πολύ πρόσφατη μελέτη συμπολυμερίστηκε η A-PDXL-A και η διμεθακρυλική PDXL (MA-PDXL-MA) μαζί με HEMA προστατευμένο με πυριτιούχες ομάδες με χρήση φωτοπολυμερισμού (Bruns et al 2005).

Τέλος, ο Goethals και οι συνεργάτες του (Christova et al 2002) συμπολυμέρισαν το MMA με την α,ω-διακρυλική πολυ(2-μεθυλ-2-οξαζολίνη) [α,ω-diacrylated poly(2-methyl-2-oxazoline), A-PMeOx-A] ή με την α,ω-διακρυλική πολυ(2-αιθυλ-2-οξαζολίνη) [α,ω-diacrylated poly(2-ethyl-2-oxazoline), A-PEtOx-A] οι οποίες παρασκευάστηκαν και οι δύο με «ζωντανό» κατιοντικό πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου.

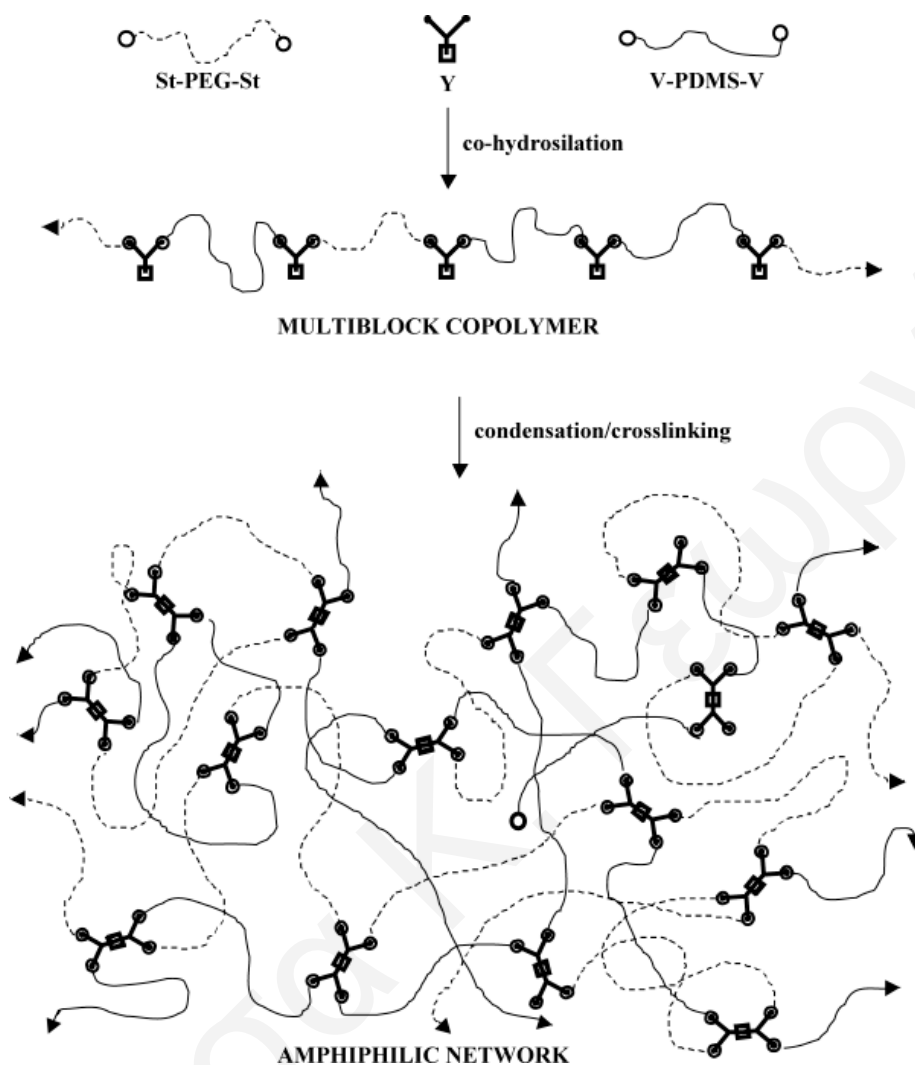
Ξεχωριστός πολυμερισμός των δύο μονομερών

Ο Rimmer και οι συνεργάτες του (Delerba et al 1997) συνέθεσαν πολυμερικά πλέγματα μέσω αντίδρασης Diels-Alder μεταξύ υδρόφοβου πολυ(BuMA) ή πολυ(HeMA) με τερματικές ομάδες φουρανίου και του υδρόφιλου PEO το οποίο περιέχει ακετυλένιο. Η σύνθεση του πρώτου (της υδρόφοβης α,ω-διφουράνης) περιλαμβάνει το συμπολυμερισμό ελευθέρων ριζών του BuMA ή HeMA με βουταδιένιο, την ακόλουθη οξονόλυση των διπλών δεσμών της πολυμερικής αλυσίδας και την τελική σύνδεση των φουρανικών τερματικών ομάδων. Πρόσφατα, η ίδια ομάδα έκανε παρόμοια σύνθεση με οξονόλυση αδρομερούς συμπολυμερούς του BuMA και του βουταδιενίου και συμπολυμερισμό ελευθέρων ριζών με το υδρόφιλο μονομερές DHPMA και τον διασταυρωτή EGDMA (Rimmer et al 2005).

Ο Goethals και οι συνεργάτες (Pantchev et al 1998) παρασκεύασαν πολυμερικά πλέγματα αντιδρώντας διδραστικές υδρόφοβες πολυ(2-φαινυλ-2-οξαζολίνες) [poly(2-phenyl-2-oxazoline)s α,ω-PPhOx] και διδραστικές υδρόφιλες πολυ(2-μεθυλ-2-οξαζολίνες) [poly(2-methyl-2-oxazoline)s, α,ω-PMeOx] οι οποίες παρασκευάστηκαν με «ζωντανό» κατιοντικό ROP με το υδρόφιλο πολυμερές του DMAEMA το οποίο παρασκευάστηκε με πολυμερισμό ελευθέρων ριζών.

Η ομάδα του Kennedy παρασκεύασε πλέγματα που αποτελούνται από δύο ομοπολυμερή, το α,ω-διαλλυλικό PIB (το οποίο ετοιμάστηκε με καρβοκατιοντικό πολυμερισμό), την α,ω-διαλλυλική πολυαιθυλενογλυκόλη [diacrylate poly(ethylene glycol), A-PEG-A] (που πιθανότατα ετοιμάστηκε με ανιοντικό πολυμερισμό), τα οποία ενώνονται με τρίτο συστατικό, την πενταμεθυλοκυκλοπεντασιλοξάνη (pentamethylcyclopentasiloxane, PD₅) (Kurian και Kennedy 2002 (β)). Το τελευταίο συστατικό πολυμερίζεται μέσω αντίδρασης υδροπυριτίωσης με τις βινυλικές ομάδες των μακρομοριακών διασταυρωτών. Οι ίδιοι ερευνητές ετοίμασαν παρόμοια πλέγματα όπου το διαλλυλικό PIB αντικαταστάθηκε με το διβινυλικό πολυ(διμεθυλοσιλοξάνιο) [divinyl poly(dimethylsiloxane), V-PDMS-V (Kurian και Kennedy 2002 (α)).

Χρησιμοποιώντας επίσης δύο ομοπολυμερή, ένα διδραστικό και συγκεκριμένα το α,ω-διωδρόξυ PEG (hydroxy ditelechelic HO-PEG-OH) και το τριωδρόξυ PIB, τα οποία συνένωσαν χρησιμοποιώντας ένα δισοκυανιούχο μόριο, οι Erdodi και Iván παρασκεύασαν αμφιφιλικά πολυμερικά πλέγματα (Erdodi και Iván 2004).



Σχήμα 1.16. Στάδια σύνθεσης ενός πρότυπου αμφιφιλικού πλέγματος από δύο ομοπολυμερή και ένα τετραδραστικό διασταυρωτή (συμβολίζεται με Y) (Erdodi και Kennedy 2005(a)).

Πρόσφατα, οι Erdodi και Kennedy παρασκεύασαν σχεδόν πρότυπα πλέγματα με τη χρήση δύο διδραστικών πολυμερών, του V-PDMS-V και του HO-PEG-OH, του οποίου οι ομάδες υδροξυλίου μετατράπηκαν σε ομάδες στυρενίου, και συνενώθηκαν με ένα νέο μόριο, του διασταυρωτή Y, το δι(διμεθυλοσιλυλόξυ) (αιθοξυδιμεθυλοσιλυλόξυ)φαινυλοσιλάνιο [bis(dimethylsilyloxy) (ethoxydimethylsilyloxy) phenylsilane, (SiPh(SiH)₂OEt)] για να παρασκευαστούν

αρχικά πολυαδρομερή συμπολυμερή. Στη συνέχεια, τα τελευταία συνενώθηκαν στις θέσεις που ήταν ο διασταυρωτής Y και έτσι παρασκευάστηκε το πλέγμα (Erdodi και Kennedy 2005(α), (β) και (γ)). Η όλη διαδικασία παρασκευής δίνεται στο Σχήμα 1.16.

Πρέπει να σημειωθεί ότι σε αυτά τα πλέγματα υπάρχει έλεγχος στο μήκος της ελαστικής αλυσίδας καθώς και στον αριθμό των αλυσίδων σε κάθε κόμβο. Το μόνο σημείο που δεν μπορεί να υπάρξει έλεγχος σε αυτή τη δομή είναι η σειρά με την οποία τα δύο ομοπολυμερή συνδέονται μεταξύ τους. Αυτό θα μπορούσε να γίνει αν μπορούσε να βρεθεί τρόπος που να ένωνονται εναλλάξ τα δύο ομοπολυμερή ή αν πολυμερίζονταν διαδοχικά τα δύο αντίστοιχα μονομερή. Το τελευταίο όμως είναι εφικτό να γίνει μόνο με χρήση διαδοχικού «ζωντανού» πολυμερισμού όπως περιγράφεται στην παράγραφο που ακολουθεί.

Διαδοχικός «ζωντανός» πολυμερισμός των μονομερών

Οι Hild και Lamps χρησιμοποίησαν διαδοχικό ανιοντικό πολυμερισμό για την παρασκευή πρότυπων δικτύων βασισμένων σε υδρόφοβα ομοπολυμερή και υδρόφοβα ABA τριαδρομερή συμπολυμερή (Σχήμα 1.15.γ) (Hild και Lamps 1995, 1998). Αυτή η στρατηγική σύνθεσης χρησιμοποιήθηκε και από τον Πατρίκιο και τους συνεργάτες του χρησιμοποιώντας όμως διαδοχικό GTP (Simmons et al 2000, Triftaridou et al 2002, Demosthenous et al 2002, Loizou et al 2003). Σε αυτές τις μελέτες, η σύσταση των πολυμερών μεταβαλλόταν συστηματικά και διαφορετικές πρότυπες αρχιτεκτονικές των πολυμερικών πλεγμάτων συντέθηκαν, βασισμένες σε αμφιφιλικά ABA και BAB τριαδρομερή καθώς και σε τυχαία συμπολυμερή, τα οποία διασταυρώθηκαν επί τόπου με EGDMA (Simmons et al 2000, Triftaridou et al 2002, Demosthenous et al 2002, Loizou et al 2003). Επιπρόσθετα, συντέθηκαν τυχαία διασταυρωμένα (σε αντίθεση με τα πρότυπα) πλέγματα με GTP με ταυτόχρονη προσθήκη των δύο μονομερών και του διασταυρωτή. Η σύνθεση όλων αυτών των αρχιτεκτονικών πρότυπων και μη πρότυπων πολυμερικών πλεγμάτων με την ίδια μέθοδο πολυμερισμού αποτελεί πρωτοποριακή εργασία σε αυτό τον τομέα έρευνας. Οι συνδυασμοί των μονομερών που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση αυτών των πλεγμάτων αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 1.3.

Επεκτείνοντας την πιο πάνω εργασία, η ίδια ομάδα συνέθεσε πλέγματα με μία πολύπλοκη αρχιτεκτονική βασισμένη σε διασταυρωμένα αστεροειδή συμπολυμερή τα οποία αποτελούνται από ίσο αριθμό ελεύθερων και ελαστικών αλυσίδων. Η συγκεκριμένη σύνθεση απαιτεί ως και έξι διαδοχικές προσθήκες με GTP (Σχήμα 1.15.δ, φαίνεται ετεροβραχιονικό αστεροειδές συμπολυμερές πλέγμα) (Vamvakaki et al 2001, Vamvakaki και Patrickios 2002, Georgiades et al 2002, Themistou και Patrickios 2004). Οι συνδυασμοί των μονομερών που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση αυτών των πλεγμάτων αναφέρονται και αυτοί αναλυτικά στον Πίνακα. 1.3. Η συγκεκριμένη κατηγορία πλεγμάτων αποτελεί το αντικείμενο μελέτης ενός σημαντικού μέρους της παρούσας Διδακτορικής Εργασίας.

Ο Antonietti και οι συνεργάτες του (Hentze et al 1999) συνέθεσαν δύο γραμμικά αμφιφιλικά διαδρομερή συμπολυμερή του πολυβουταδιενίου (polybutadiene, PB) και του PEO τα οποία διαλύθηκαν σε νερό σε διάφορες συγκεντρώσεις και θερμοκρασίες με αποτέλεσμα το σχηματισμό διαφορετικών μικροφασικών μορφολογιών. Αυτά τα δείγματα διασταυρώθηκαν επί τόπου με γ -ακτινοβολία και διατήρησαν τις αρχικές αυτές μορφολογίες (Σχήμα 1.15.ε, φαίνονται εξαγωνικοί κύλινδροι).

Ο Bromberg και οι συνεργάτες του παρασκεύασαν πολυμερικά πλέγματα χρησιμοποιώντας αμφιφιλικά ABA τριαδρομερή συμπολυμερή του PEO (τμήμα A) και του πολυ(προπυλενοξειδίου) (poly(propylene oxide), PPO, τμήμα B) τα οποία είναι εμπορικά διαθέσιμα (γνωστά ως Pluronics) και συντέθηκαν με «ζωντανό» ανιοντικό πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου. Αυτοί οι ερευνητές χρησιμοποίησαν το Pluronic F127 το οποίο ενοφθάλμισαν και διασταύρωσαν με AA και EGDMA, αντίστοιχα, σε διαλύτη δωδεκάνιο (Σχήμα 1.15.στ) (Bromberg et al 2002).

Ο Bates και οι συνεργάτες του (Hillmyer et al 1997, Lipic et al 1998) χρησιμοποίησαν εποξειδικές ρητίνες και αμφιφιλικά διαδρομερή συμπολυμερή τα οποία παρασκευάστηκαν με ανιοντικό πολυμερισμό και διασταυρώθηκαν θερμικά. Η ίδια προσέγγιση εφαρμόστηκε αργότερα και από τις ομάδες των Mijovic (Mijovic et al 2000), Ikkala (Kosonen et al 2001) και Gronski (Guo et al 2002) οι οποίοι ετοίμασαν πλέγματα από εποξειδικές ρητίνες και διαδρομερή ή τριαδρομερή συμπολυμερή, τα οποία παρασκευάστηκαν με χρήση ανιοντικού πολυμερισμού.

Άλλες προσεγγίσεις για τη σύνθεση ομοιοπολικών πλεγμάτων

Ο Gitson και οι συνεργάτες του παρασκεύασαν πολυμερικά πλέγματα βασισμένα σε υδρόφοβα δενδριμερή τα οποία περιείχαν βενζολικές ομάδες, και γραμμικά υδρόφιλα PEO, διασυνδεδεμένα με ισοκυανικές ή εποξειδικές ομάδες (Gitson και Zhu 2002, Zhu et al 2005). Ο Suh και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν ένα συνδυασμό πολυμερισμού ελευθέρων ριζών και της χημείας των ισοκυανικών για τη σύνθεση πολυμερικών πλεγμάτων τα οποία αποτελούνται κυρίως από υδρόφοβες ελαστικές αλυσίδες ουραιθανικού πολυTHF με μία καρβοξυλική ομάδα ανά ελαστική αλυσίδα (Kim et al 2000, 2001).

1.5.3. Τεχνικές Χαρακτηρισμού

Για το χαρακτηρισμό των ομοιοπολικών αμφιφιλικών πλεγμάτων χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές ή μέθοδοι χαρακτηρισμού. Οι κυριότερες μέθοδοι που συναντούνται στη βιβλιογραφία είναι:

1. Προσδιορισμός του βαθμού διόγκωσης (degree of swelling, ΒΔ) του πλέγματος, ο οποίος είναι ένα μέτρο μέτρησης του ποσού του διαλύτη, συνήθως νερού που απορροφούν (Βλέπε Πίνακα 1.3). Ο ΒΔ προσδιορίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις από μετρήσεις μάζας (διογκωμένη μάζα του πλέγματος δια την ξηρή του μάζα, $ΒΔ=(m_{wet}/m_{dry})$) και σε λιγότερες περιπτώσεις με παρατήρηση αλλαγής της διαμέτρου του πλέγματος (Podual et al (α), (β) και (γ) 2000, Philippova et al 1997).
2. Τιτλοδότηση των βασικών ή όξινων δομικών φορτίων του πλέγματος. Αυτό γίνεται φυσικά όταν το πλέγμα αποτελείται από μονομερές το οποίο έχει την ικανότητα να ιοντίζεται (ασθενής βάση ή ασθενή οξύ), όπως το DMAEMA το οποίο είναι μία τριτοταγής αμίνη και έχει την ικανότητα να φορτίζεται θετικά σε χαμηλά pH (Podual et al (α), (β) και (γ) 2000, Philippova et al 1997, Guan et al 2001, 2002 (α) και (β), Simmons et al 2000, Triftaridou et al 2002, Demosthenous et al 2002, Loizou et al 2003, Vamvakaki et al 2001, Vamvakaki και Patrickios 2002, Georgiades et al 2002, Themistou και Patrickios 2004, Bromberg et al 2002, Zhu et al 2005, Kim J.-Y et al 2000).

3. Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (differential scanning calorimetry, DSC). Σε αυτή την τεχνική μετράται η διαφορά της προσληφθείσας ενέργειας μεταξύ της εξεταζόμενης ουσίας, δηλαδή του πλέγματος, σε σχέση με μία ουσία αναφοράς ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Στο σημείο όπου παρατηρείται σημαντική διαφορά, υπάρχει αλλαγή, αντιστοιχεί σε μεταβολή της φάσης του πλέγματος. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κατά κόρον ειδικότερα στις μελέτες μικροφασικού διαχωρισμού (Miyasaki et al 2002, Haigh et al 2002, Allen et al 1999, Guan et al 2000, Carrot et al 1998, Sahli et al 2005, Adriaensens et al 2002, Christova et al 2002, Kurian και Kennedy 2002 (α) και (β), Erdodi και Iván 2004, Hillmyer et al 1997, Mijovic et al 2000, Kosonen et al 2001, Guo et al 2002, Gitsov και Zhu 2002).
4. Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (atomic force microscopy, AFM). Η τεχνική αυτή δίνει ένα «χάρτη» της επιφάνειας όσον αφορά τη μηχανική αντοχή. Χρησιμοποιείται για να δίνει την εικόνα την επιφάνειας του πλέγματος (τοπογραφία) ενώ με την τομή της επιφάνειας μπορούν να ληφθούν πληροφορίες που αφορούν τη μορφολογία του πλέγματος (Park et al 1995, Scherble et al 2001, Adriaensens et al 2002, Bruns et al 2005, Kosonen et al 2001, Guo et al 2002).
5. Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (transmission electron microscopy, TEM). Είναι μία τεχνική με μεγάλη διακριτική ικανότητα ($\sim 10 \text{ \AA}$) αλλά που απαιτεί δείγμα με μεγάλη ηλεκτρονιακή πυκνότητα (τα πλέγματα είναι κυρίως οργανικά υλικά που δεν αλληλεπιδρούν έντονα με τα ηλεκτρόνια) και απουσία διαλύτη, λόγω του επιβαλλόμενου κενού. Και αυτή η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για να παρατηρηθούν πιθανές μορφολογίες (μικροφασικός διαχωρισμός) του πλέγματος (Park et al 1997, Allen et al 1999, Iván et al 1996, Scherble et al 2001, Carrot et al 1998, Hillmyer et al 1997, Lipic et al 1998, Guo et al 2002).

Περαιτέρω μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό των πλεγμάτων είναι η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (scanning electron microscopy, SEM) (Haigh et al 2002, Guan et al 2000, Bromberg et al 2002, Kim, J.-Y. et al 2001), η σκέδαση ακτίνων X υπό μικρή γωνία (small-angle X-ray scattering, SAXS) (Park et al 1995 και 1997, Scherble et al 2001, Hillmyer et al 1997, Lipic et al 1998, Guo et al 2002), η σκέδαση νετρονίων υπό μικρή γωνία (small-angle neutron scattering, SANS) (Lipic et al

1998), η φωτοηλεκτρονική φασματοσκοπία με ακτίνες X (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) (Park et al 1995), η μέτρηση της δυναμικής γωνίας επαφής (dynamic contact angle, DCA) (Park et al 1995, Kim J.-Y. 2000), η θερμοσταθμική ανάλυση (thermogravimetric analysis TGA) (Park et al 1997, Adriaensens et al 2002, Kurian και Kennedy 2002(α) και (β)), η δυναμική μηχανική θερμική ανάλυση (dynamic mechanical thermal analysis, DMTA ή dynamic mechanical analysis, DMA) (Park et al 1997, Christova et al 2002, Adriaensens et al 2002, Hillmyer et al 1997, Kosomen et al 2001, Kim J.-Y. 2001), NMR άνθρακα στερεάς κατάστασης, (solid state carbon NMR, ^{13}C NMR) (Philippova et al 1997, Adriaensens et al 2002), μετρήσεις εξαύλωσης ποζιτρονίων (positron annihilation measurements) (Park et al 1995), η περίθλαση ακτινών X υπό μικρή γωνία (small-angle X-ray diffraction SAXD) (Miyasaki et al 2002), η μέτρηση πορώδους και μοριακού βάρους αποκοπής (molecular weight cut off, MWCO) με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης (Shamlou et al 1997, Kennedy et al 2000 και 2001), η μέτρηση αντοχής σε εφελκυσμό ή σε τάση εφελκυσμού (Park et al 1997, Keszler et al 2000, Kennedy et al 2001, Isayeva et al 2002(α) και (β), Kurian και Kennedy 2002(α) και (β), Erdodi και Kennedy 2005(γ)), η φασματοσκοπία διηλεκτρικής χαλάρωσης (broad-band dielectric relaxation spectroscopy, DRS) (Mijovic et al 2000) και η πολωτική μικροσκοπία (polarized light microscopy) (Hentze et al 1999).

Βαθμός Διόγκωσης (BΔ)

Ο ΒΔ των ομοιοπολικών αμφιφιλικών πλεγμάτων μελετάται στις πλείστες περιπτώσεις συναρτήσει της σύστασης του πλέγματος είτε προς το υδρόφοβο είτε προς το υδρόφιλο μονομερές. Αυτοί οι ΒΔ προσδιορίζονται σε όλες τις περιπτώσεις στο νερό και σε λιγότερες περιπτώσεις σε οργανικούς διαλύτες. Γενικά παρατηρείται ότι με αύξηση της σύστασης στο υδρόφοβο συστατικό ο ΒΔ μειώνεται στο νερό και αυξάνεται σε οργανικό διαλύτη, όπως και είναι αναμενόμενο.

Στις περιπτώσεις όπου το ένα από τα δύο μονομερή έχει την ικανότητα ιοντισμού μελετάται η εξάρτηση του ΒΔ από το pH. Τέτοια μονομερή είναι τα εξής: DEAEMA (Podual et al 200 (α), (β) και (γ)), AA (Philippova et al 1997, Guan et al 2001, Du et al 2002, Bromberg et al 2002), MAA (Guan et al 2002(α), Demosthenous et al 2002, Georgiades et al 2002), και το DMAEMA (Simmons et al 2000, Triftaridou et al 2002,

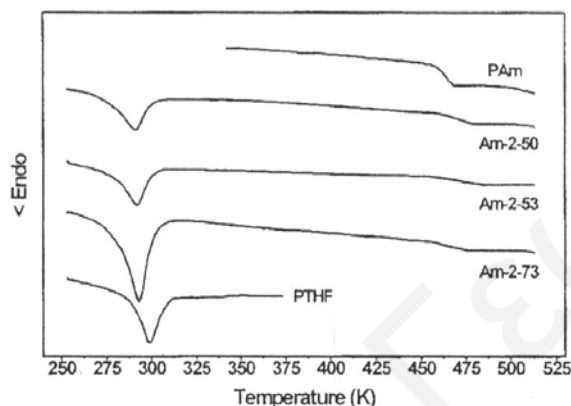
Demosthenous et al 2002, Loizou et al 2003, Vamvakaki et al 2001, Vamvakaki και Patrickios 2002, Georgiades et al 2002), τα οποία όλα είναι υδρόφιλα και ιοντιζόμενα εκτός από το DEAEMA το οποίο είναι υδρόφοβο και ιοντιζόμενο. Όταν το ιοντιζόμενο μονομερές ιοντίζεται με μείωση του pH (DMAEMA και DEAEMA) ο ΒΔ μειώνεται όσο αυξάνεται το pH, ενώ στις περιπτώσεις όπου η επαναλαμβανόμενη μονάδα ιοντίζεται με αύξηση του pH (MAA και AA), ο ΒΔ αυξάνεται όσο αυξάνεται το pH. Η αύξηση του ΒΔ με την αύξηση του βαθμού ιοντισμού οφείλεται στην οσμωτική πίεση που δημιουργείται από την παρουσία των αντισταθμιστικών ιόντων, καθώς και στις απωστικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιοντισμένων αλυσίδων (Philippova et al 1997, Simmons et al 2000).

Τέλος, ο ΒΔ μελετάται και συναρτήσεται της θερμοκρασίας σε περιπτώσεις όπου ένα από τα μονομερή είναι θερμοευαίσθητο. Ένα τέτοιο μονομερές είναι το NIPAm το οποίο με αύξηση της θερμοκρασίας γίνεται πιο υδρόφοβο (Guan et al 2002(β), Du et al 2002). Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι η κατώτερη θερμοκρασία διάλυσης (lower critical solution temperature, LCST) του υδροπλέγματος NIPAm σε νερό είναι οι 32-33 °C (Kokufuta et al 1998). Αυξάνοντας τη θερμοκρασία πάνω από το LCST οι αλυσίδες του NIPAm προτιμούν να αλληλεπιδρούν με τον εαυτό τους («συσσωματώνονται») παρά με το νερό, διότι αυτό ευνοείται ενεργειακά λόγω της συνολικής αύξησης της εντροπίας που οδηγεί σε μείωση της ελεύθερης ενέργειας (υδρόφοβο φαινόμενο) (Kokufuta et al 1998).

Μικροφασικός Διαχωρισμός

Η πιο ενδιαφέρουσα ιδιότητα των ομοιοπολικών αμφιφιλικών πολυμερικών πλεγμάτων είναι ο (πιθανός) μικροφασικός διαχωρισμός τους σε νερό, ο οποίος οφείλεται στην ασυμβατότητα του υδρόφοβου συστατικού με το νερό. Συγκεκριμένα, το υδρόφοβο συστατικό προτιμά να έρχεται σε επαφή με τον εαυτό του παρά με το διαλύτη, με αποτέλεσμα να συσσωματώνεται, ενώ αντίθετα τα υδρόφιλα συστατικά προτιμά να έρχεται σε επαφή με το νερό και έτσι να διογκώνεται. Έτσι, τα δύο συστατικά κατανέμονται σε δύο μικροφάσεις, όπως ακριβώς συμβαίνει στα γραμμικά αδρομερή συμπολυμερή. Στα τελευταία έχει μελετηθεί συστηματικά ο μικροφασικός τους διαχωρισμός στην ξηρή φάση αλλά και σε διαλύτες και έχουν ανιχνευθεί οι εξής

μορφολογίες: φυλλώδεις (lamellae), σφαίρες (spheres), κύλινδροι (cylinders). Στα αμφιφιλικά πλέγματα, το ζητούμενο είναι εάν επέρχεται μικροφασικός διαχωρισμός, και εάν και κάτω από ποιες προϋποθέσεις, τι μορφολογία έχουν και εάν αυτή είναι παραμορφωμένη σε σχέση με αυτή των γραμμικών πολυμερών λόγω της παρουσίας των διασταυρώσεων. Αυτά είναι τα ερωτήματα τα οποία απασχολούν στη συνέχεια αυτή τη μελέτη.



Σχήμα 1.17. Διαγράμματα DSC μίας σειράς από αμφιφιλικά πολυμερικά πλέγματα. Όσο προχωρούμε προς τα πάνω αυξάνεται η σύσταση σε υδρόφιλο μονομερές. Είναι διακριτές δύο κορυφές T_g για κάθε πολυμερικό πλέγμα εκτός για τα δύο ομοπολυμερικά πλέγματα (Guan et al 2000).

Στις περισσότερες μελέτες δεν ερευνάται σε βάθος η πιθανότητα μικροφασικού διαχωρισμού και σε ορισμένες περιπτώσεις αυτός θεωρείται δεδομένος. Στο μεγαλύτερο μέρος αυτών των μελετών τα πλέγματα χαρακτηρίζονται (σε ξηρή φάση) με DSC, από τα αποτελέσματα της οποίας συμπεραίνεται ότι υπάρχει μικροφασικός διαχωρισμός (Miyasaki et al 2002, Haigh et al 2002, Allen et al 1999, Guan et al 2000, Carrot et al 1998, Sahli et al 2005, Adriaensens et al 2002, Christova et al 2002, Kurian και Kennedy 2002 (α) και (β), Erdodi και Iván 2004, Hillmyer et al 1997, Mijovic et al 2000, Kosonen et al 2001, Guo et al 2002, Gitsov και Zhu 2002). Συγκεκριμένα, όταν στα διαγράμματα του DSC παρατηρείται μόνο μία κορυφή τότε το πλέγμα συμπεριφέρεται σαν μονοφασικό με μετάβαση από την υαλώδη άμορφη στη πλαστική άμορφη κατάσταση

στη συγκεκριμένη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (glass transition temperature, T_g). Αν υπάρχουν δύο κορυφές τότε τα δύο συστατικά θεωρείται ότι σχηματίζουν δύο διαφορετικές μικροφάσεις και η κάθε μικροφάση έχει τη δική της χαρακτηριστική T_g (Σχήμα 1.17).

Παρόλο όμως που στις πλείστες περιπτώσεις διαπιστώνεται ή υπάρχει υποψία ότι συμβαίνει μικροφασικός διαχωρισμός, σε πολύ λίγες έρευνες αυτός μελετάται βαθύτερα, π.χ διερευνάται η μορφολογία των μικροφάσεων. Ακολουθούν μερικά παραδείγματα από αυτές τις έρευνες.

Η ομάδα του Kennedy (Park et al 1995) μελέτησε πολυμερικά πλέγματα PHEMA-PIB με πειράματα XPS και αποδείχθηκε ότι στα ξηρά πλέγματα τα υδρόφοβα τμήματα (PIB) «προτιμούν» να είναι στην επιφάνεια, ενώ στην παρουσία νερού έγινε γρήγορη αναδιάρθρωση και η επιφάνεια έγινε υδρόφιλη, όπως παρατηρήθηκε από πειράματα DCA. Η σκληρότητα της επιφάνειας των πλεγμάτων μελετήθηκε και με AFM.

Σε μία άλλη μελέτη της ίδια ομάδας (Park et al 1997) παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν πλέγματα PHEMA-PIB (H-πλέγματα) όπως και πιο πάνω, καθώς και πλέγματα PDMAAm-PIB (A-πλέγματα). Σύμφωνα με το TEM στα αμφιφιλικά αυτά πλέγματα παρατηρήθηκε μία δι-συνεχής δομή και στη φάση του PHEMA σχηματίζονταν κανάλια τα οποία συνδέονταν μεταξύ τους (interconnecting channels) με διάμετρο ~ 10 Å. Η ύπαρξη και μεγάλων συσσωματωμάτων του PHEMA πιθανότατα να οφείλονταν στις ελεύθερες αλυσίδες PHEMA. Χαρακτηριστικές μέσες αποστάσεις μεταξύ των κόμβων των πλεγμάτων προσδιορίστηκαν με SAXS. Και για τα δύο τύπου πλέγματα οι χαρακτηριστικές αποστάσεις μειώνονταν αυξάνοντας τη σύσταση του υδρόφοβου τμήματος PIB γιατί ο μακρομοριακός αυτός διασταυρωτής κατάστειλε το μικροφασικό διαχωρισμό των μη-συμβατών συστατικών. Οι αποστάσεις αυτές ήταν μικρότερες για τα A-πλέγματα από ό,τι για τα H-πλέγματα για την ίδια σύσταση σε PIB και εξάχθηκε το συμπέρασμα ότι τα A-πλέγματα ήταν πιο ομοιογενή από τα H-πλέγματα. Οι τιμές των αποστάσεων για ξηρά πλέγματα κυμαίνονταν μεταξύ 74 και 173 Å για τα H-πλέγματα, ενώ για τα A-πλέγματα μεταξύ 62 και 112 Å. Σε επάνιο ή νερό όλες οι τιμές ήταν μεταξύ 100 και 127 Å. Σε μία πιο πρόσφατη έρευνα του Kennedy (Kurian και Kennedy 2002(α)) μελετήθηκε ο μακροφασικός διαχωρισμός πλεγμάτων τριών συστατικών PEO, PIB και PD₅. Τα τρία αυτά συστατικά δεν ήταν συμβατά μεταξύ τους και υπήρξε

μικροφασικός διαχωρισμός ο οποίος επιβεβαιώθηκε με DSC. Οι μικροφάσεις ήταν ανεξάρτητες μεταξύ τους και συνεχής (cocontinuous phase – channels).

Στη μελέτη των Iván et al (Iván et al 1996) παρατηρήθηκε με DSC μικροφασικός διαχωρισμός σε αμφιφιλικά πλέγματα PHEMA-PIB. Από εικόνες του TEM του πλέγματος PHEMA-PIB, παρατηρήθηκε ύπαρξη περιοχών (domains) μεγέθους της τάξης των 10 nm, παρατήρηση η οποία ήταν σύμφωνη με τη μελέτη του Kennedy η οποία αναφέρεται πιο πάνω (Park et al 1997).

Σε μία άλλη έρευνα (Scherble et al 2001) μελετήθηκαν πλέγματα PHEMA-PIB, όπως και πιο πάνω, χρησιμοποιώντας AFM, TEM και SAXS. Μέσω του TEM παρατηρήθηκε σε κάποιες περιοχές νανοσκοπική διαχωρισμένη δομή και σε συνδυασμό με το AFM διαπιστώθηκε η ύπαρξη διεσπαρμένης φάσης PHEMA σε μία συνεχή φάση PIB. Άλλες περιοχές του δείγματος φάνηκε να παρουσιάζουν δισυνεχή μορφολογία. Το μέσο μέγεθος των περιοχών PHEMA ήταν μεταξύ 8-10 nm (σε συμφωνία με πιο πάνω), ενώ οι αποστάσεις μεταξύ αυτών των περιοχών ήταν περίπου 17 nm. Παρόλο όμως που παρατηρήθηκε μικροφασικός διαχωρισμός, δεν παρατηρήθηκε μία συγκεκριμένη μορφολογία π.χ. φυλλώδης δομή.

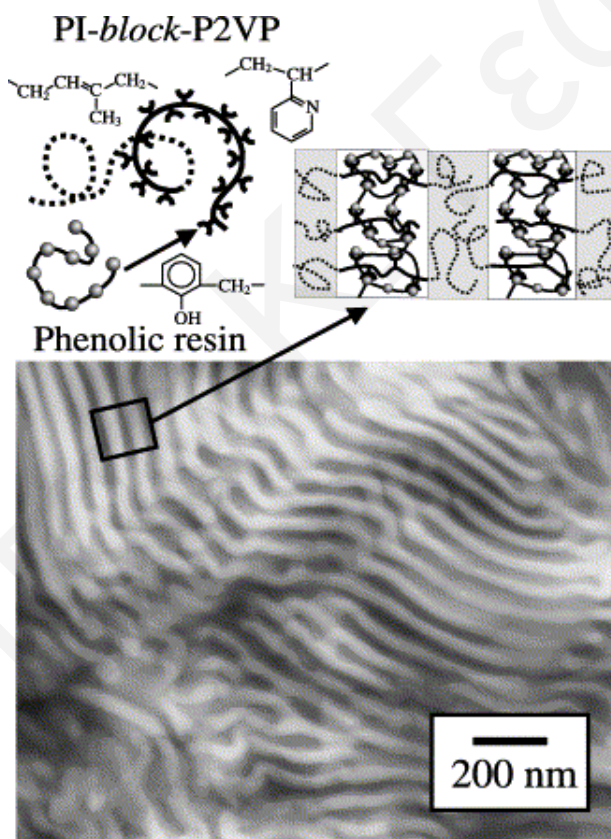
Σε μελέτη της ομάδα του Peng (Guan et al 200) συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν πλέγματα PAM-PTHF χρησιμοποιώντας DSC, SEM και πειράματα διόγκωσης. Παρατηρήθηκε ότι στα πλέγματα επήλθε μικροφασικός διαχωρισμός καθώς και η ύπαρξη δισυνεχούς μορφολογίας. Συγκεκριμένα δεν παρατηρήθηκε μακροφασικός διαχωρισμός με το SEM, ενώ από το DSC παρατηρήθηκε η ύπαρξη δύο κορυφών όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως.

Σε μία πρωτότυπη μελέτη με ^{13}C NMR στερεάς κατάστασης πλεγμάτων PDXL-PMMA (Adriaenssens et al 2002), από τους χαρακτηριστικούς χρόνους χαλάρωσης σε συνδυασμό με αποτελέσματα DSC και DMA προσδιορίστηκε το μέγεθος των περιοχών του PDXL μεταξύ 1 – 20 nm.

Σε μία άλλη μελέτη (Miyasaki et al 2002) μελετήθηκε με DSC και μετρήσεις περίθλασης ακτίνων X ο φασικός διαχωρισμός πλεγμάτων του AA με ακρυλικούς εστέρες αλειφατικών κ-αλκοολών. Διαπιστώθηκε ότι η παρουσία νερού στο πλέγμα προκάλεσε μικροφασικό διαχωρισμό και διατυπώθηκε η άποψη ότι η κρυσταλλική δομή

που παρατηρήθηκε στο πλέγμα οφειλόταν στο πακετάρισμα των αλειφατικών πλευρικών αλυσίδων.

Σε μία πολύ ενδιαφέρουσα μελέτη (Carrot et al 1998) παρασκευάστηκαν πλέγματα MA-PEO-MA και MMA σε οργανικό διαλύτη και σε νερό. Τα πλέγματα με χαμηλές συστάσεις MMA, τα οποία παρασκευάστηκαν σε νερό, παρουσίασαν, σύμφωνα με το TEM, πιθανά φυλλώδη δομή του συστατικού με χαρακτηριστικό μέγεθος ~ 10 nm. Σε συνδυασμό με DSC και κινητικές μελέτες εξάχθηκε το συμπέρασμα ότι τα πλέγματα τα οποία συντέθηκαν σε νερό αντί σε οργανικούς διαλύτες παρουσίασαν καλύτερες μηχανικές ιδιότητες, λόγω του μικροφασικού διαχωρισμού που επήλθε στο νερό κατά τη διάρκεια της σύνθεσης.



Σχήμα 1.18. TEM ρητίνης μαζί με διαδρομερές συμπολυμερές PI-*b*-P2VP. Χαρακτηριστική φυλλώδης δομή (Kosonen et al 2001).

Πρέπει να σημειωθεί ότι σπάνια παρατηρείται καθαρά μία κλασική μορφολογία μικροφασικού διαχωρισμού στα ομοιοπολικά πλέγματα. Τα περισσότερα πλέγματα στα οποία παρατηρήθηκε η ύπαρξη χαρακτηριστικών μορφολογιών ήταν κατασκευασμένα έτσι ώστε να δώσουν αυτή τη μορφολογία. Αυτά της ομάδας του Antonietti π.χ., έδωσαν φυλλώδη και κυλινδρική μορφολογία (Hentze et al 1999) όπου διαδρομερή συμπολυμερή σχημάτισαν οργανωμένες νανομορφολογίες οι οποίες στη συνέχεια διασταυρώθηκαν. Αυτά μιας άλλης ομάδας ερευνητών προέκυψαν από κατάλληλο συνδυασμό διαδρομερών συμπολυμερών με ρητίνες (Hillmyer et al 1997, Lipic et al 1998, Mijovic et al 2000, Kosonen et al 2001, Guo et al 2002). Ένα παράδειγμα εικόνας TEM της μορφολογίας για την τελευταία περίπτωση δίνεται στο Σχήμα 1.18.

Μοντελοποίηση Μικροφασικού Διαχωρισμού

Τα τελευταία χρόνια άρχισαν να γίνονται θεωρητικές μελέτες που προσπαθούν να προβλέψουν το μικροφασικό διαχωρισμό των πρότυπων πολυμερικών πλεγμάτων. Συγκεκριμένα έχουν αναπτυχθεί δύο θερμοδυναμικά μοντέλα από την Ομάδα Πολυμερών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου (Vamvakaki και Patrickios 2001, Georgiou et al 2004(α)). Αυτά τα μοντέλα προβλέπουν τη σύσταση του πλέγματος και τις εξωτερικές συνθήκες κάτω από τις οποίες επέρχεται μικροφασικός διαχωρισμός σε πρότυπα πλέγματα τα οποία είναι σε νερό και μπορούν να ιονιστούν.

Το πρώτο μοντέλο που αναπτύχθηκε διακρίνει κατά πόσο το πλέγμα είναι ή όχι μικροφασικά διαχωρισμένο με σφαιρικές υδρόφοβες περιοχές (παρόμοιες με τους σφαιρικούς μικυλιακούς πυρήνες) (Vamvakaki και Patrickios 2001). Στο μοντέλο προβλέπεται μικροφασικός διαχωρισμός πλεγμάτων τα οποία αποτελούνται από αλυσίδες τριαδρομερών συμπολυμερών [και όχι τυχαίων (στατιστικών) συμπολυμερών] σε σφαιρική μορφολογία. Η μετάβαση αυτή μελετάται ως προς τη σύσταση και το βαθμό ιονισμού του πλέγματος.

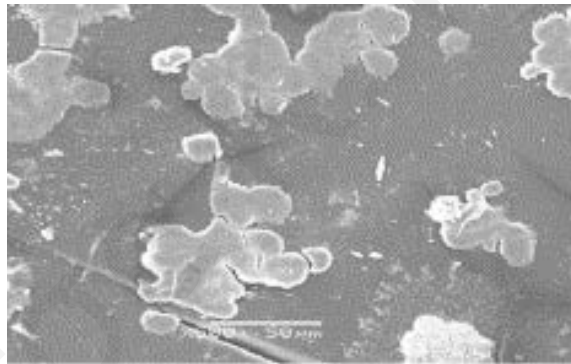
Όμως το μοντέλο αυτό δεν μπορεί να δώσει ολοκληρωμένα την εικόνα της συμπεριφοράς αυτών των πλεγμάτων αφού δεν συμπεριλαμβάνει όλες τις πιθανές μορφολογίες που μπορεί να πάρει ένα πλέγμα. Για αυτό το λόγο αναπτύχθηκε το δεύτερο θερμοδυναμικό μοντέλο που συμπεριλαμβάνει τη φυλλώδη δομή (lamellae), τη κυλινδρική (cylinders) καθώς και δύο άτακτες δομικές μορφολογίες όπου το πλέγμα

μπορεί να είναι διογκωμένο ή όχι (Georgiou et al 2004(α)). Οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται σε αυτό το μοντέλο δίδονται στο Παράρτημα I αυτής της Διατριβής.

1.5.4. Εφαρμογές

Στη βιβλιογραφία οι δύο πιο κοινές εφαρμογές των πολυμερικών πλεγμάτων είναι:

1. Σαν βάση για την καλλιέργεια κυττάρων, δηλαδή σαν υλικά προσκόλλησης, εμφύτευσης κυττάρων (cell adhesion, implantation of tissue) (Haigh et al 2002, Blezer et al 1995, Rimmer et al 2005). Μελετήθηκε πόσο καλή ήταν η διασπορά των κυττάρων σε αυτά τα καινούργια υλικά (Haigh et al 2002) και έγινε αναφορά κατά πόσο ήταν βιοσυμβατά και για το αν θα μπορούσαν να είχαν άμεση εφαρμογή στην ιατρική (Blezer et al 1995, Rimmer). Στο πιο κάτω σχήμα παρουσιάζεται η διασπορά των κυττάρων σε ομοπολυμερές πλέγμα του LaMA.



Σχήμα 1.19. Εικόνα από SEM δερματικών ινοβλαστών (dermal fibroblast – είδος δερματικών κύτταρων), τα οποία καλλιεργήθηκαν σε ομοπολυμερές πλέγμα του LaMA (Haigh et al 2002).

2. Για απόδοση φαρμάκων (drug release) (Podual et al 2000(α), Haigh et al 2000, Shamlou et al 1997, Kennedy et al 2000 και 2001, Barakat et al 1999, Bromberg 2002, Loizou et al 2003]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζεται στις διάφορες μελέτες στην απόδοση της γλυκόζης (Podual et al 2000(α), Shamlou et al 1997, Kennedy et al 2000 και 2001], ενώ από την ομάδα του Kennedy (Kennedy et al

2000 και 2001) η απόδοση γλυκόζης μελετήθηκε σε συνδυασμό με την ινσουλίνη, γιατί ερευνήθηκε η πιθανότητα να χρησιμοποιηθούν τα πολυμερικά αυτά πλέγματα σαν βάση για εμφύτευση κυττάρων του παγκρέατος (όπου είναι ζωτικής σημασίας να μπορούν να διαχέονται αυτές οι δύο ουσίες). Για αυτό το λόγο έγιναν και μελέτες αν τα πολυμερικά πλέγματα είναι διαπερατά από το οξυγόνο. Παρόμοιες μελέτες έγιναν και πιο πρόσφατα από την ίδια ομάδα (Erdodi και Kennedy 2005).

1.6. Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Πολυμερών

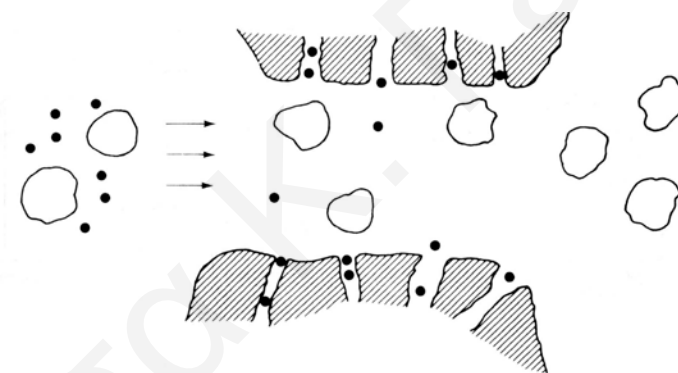
Στη συνέχεια ακολουθούν οι αρχές λειτουργίας των κύριων μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για το χαρακτηρισμό των πολυμερών που συντέθηκαν σε αυτή τη Διδακτορική Εργασία.

1.6.1. Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού

Η GPC είναι μία από τις σημαντικότερες μεθόδους διαχωρισμού μακρομορίων. Ο διαχωρισμός των μορίων επιτυγχάνεται λόγω των διαφορετικών χρόνων διάχυσης των πολυμερών μέσα από τη στατική φάση (στους πόρους της οποίας υπάρχει εγκλωβισμένος διαλύτης) στην κινητή φάση, την οποία αποτελεί ο διαλύτης έκλουσης. Πρέπει να σημειωθεί ότι, σε αντίθεση με τις συνηθισμένες μεθόδους χρωματογραφίας, στη χρωματογραφία GPC τα μεγάλα μόρια εκκλούνται νωρίτερα. Αυτό συμβαίνει γιατί στη GPC δεν υπάρχουν χημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων που διαχωρίζονται και του υποστρώματος και έτσι ο χρόνος έκλουσης εξαρτάται μόνο από το πόσο γρήγορα τα μόρια θα διαχυθούν και θα περάσουν μέσα από τους πόρους για να εκλουσθούν. Τα μεγάλα μόρια καθυστερούν λιγότερο, γιατί λόγω του όγκου τους δεν μπορούν να περάσουν μέσα από όλους τους πόρους και έτσι εκκλούνται πρώτα (Σχήμα 1.20). Σε αντίθεση, τα μικρά μόρια, που έχουν διάμετρο μικρότερη από αυτή του μεγέθους των πόρων, διαχέονται μέσα στους πόρους και καθυστερούν περισσότερο με αποτέλεσμα να εκκλούνται σε μεγαλύτερους χρόνους (Skoog et al 1998). Επίσης, πάλι σε αντίθεση με τις άλλες χρωματογραφικές μεθόδους, υπάρχει ένα ανώτατο όριο στο χρόνο έκλουσης. Αυτό συμβαίνει γιατί κανένα προς ανάλυση είδος δεν μπορεί να κατακρατηθεί περισσότερο από το μόριο που διεισδύει περισσότερο στη στατική φάση, δηλαδή το διαλύτη (νοουμένου βεβαίως ότι δεν υπάρχει προσρόφηση μεταξύ κάποιου δείγματος και της στατικής φάσης) (Skoog et al 1998).

Το χρωματογράφημα GPC παρουσιάζει το σήμα του ανιχνευτή (συνήθως είναι ανιχνευτής δείκτη διάθλασης) ως προς το χρόνο ή τον όγκο έκλουσης. Από βαθμονόμηση που γίνεται συνδέονται οι τιμές του χρόνου έκλουσης με το σχετικό MB. Έτσι, λαμβάνεται η κατανομή των MB (ως το σήμα του ανιχνευτή) ως προς τα MB και από αυτή την κατανομή υπολογίζονται τα μέσα MB. Συγκεκριμένα, από την ανάλυση GPC υπολογίζονται τα M_n , M_p , M_w και ο λόγος M_w/M_n . Το M_n είναι το μέσου-αριθμού

MB (number-average molecular weight) και εκφράζει το μέσο MB με κριτήριο το σχετικό πλήθος των πολυμερών. Το M_w είναι το μέσου-βάρους MB (weight-average molecular weight) και εκφράζει το μέσο MB με κριτήριο το σχετικό βάρος των πολυμερών. Ο λόγος τους, το M_w/M_n , ορίζει την πολυδιασπορά και παίρνει τιμές από $1 \rightarrow \infty$. Αν ο λόγος αυτός ισούται με ένα, τότε έχουμε τέλεια κατανομή MB, όπου όλα τα μόρια έχουν ακριβώς το ίδιο MB. Όσο μεγαλώνει οδηγούμαστε σε ευρείες κατανομές. Το M_p είναι το MB που αντιστοιχεί στο μέγιστο της κορυφής που λαμβάνεται στο χρωματογράφημα. Τα M_n των πολυμερών που λαμβάνονται με «ζωντανούς» πολυμερισμούς συγκρίνονται με το θεωρητικό MB που υπολογίζεται σαν το γινόμενο του MB του μονομερούς επί το θεωρητικό ΒΠ (επί την απόδοση του πολυμερισμού), συν το MB του τμήματος του εκκινητή, το οποίο ενσωματώνεται μέσα στο πολυμερές (Allcock και Lampe 1990(β)).



Σχήμα 1.20. Αρχή λειτουργίας GPC: Τα μικρά μόρια (μαύρο χρώμα), διεισδύουν μέσα στους πόρους, σε αντίθεση με τα μεγάλα μόρια (άσπρο χρώμα) (Allcock και Lampe 1990(β)).

1.6.2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Πρωτονίων

Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί μία από τις σημαντικότερες τεχνικές ταυτοποίησης χημικών ενώσεων διότι παρέχει πληροφορίες για όλο τον ανθρακικό σκελετό και τα υδρογόνα ενός μορίου. Οι πληροφορίες αυτές λαμβάνονται ως αποτέλεσμα των διεγέρσεων μαγνητικών πυρήνων που βρίσκονται σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο. Σε ένα τέτοιο πεδίο οι πυρήνες μπορούν να πάρουν ορισμένους προσανατολισμούς, με αντίστοιχες στάθμες ενέργειας. Η τεχνική αυτή έχει τη

δυνατότητα να ανιχνεύει το ελάχιστο ποσό ενέργειας που απορροφάται καθώς ο πυρήνας μεταβαίνει από τη μία ενεργειακή στάθμη στην άλλη (McMurry 1998). Επειδή κάθε συγκεκριμένος πυρήνας ενός μορίου βρίσκεται σε κάπως διαφορετικό ηλεκτρονικό περιβάλλον, το πραγματικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο διαφέρει. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να διαφοροποιούνται τα διάφορα πρωτόνια του μορίου, και έτσι να «χαρτογραφείται» το μόριο (McMurry 1998). Πρωτόνια με το ίδιο χημικό περιβάλλον, δηλαδή που είναι χημικά ισότιμα, δίνουν την ίδια μετατόπιση (είναι μαγνητικά ισοδύναμα). Όταν δεν είναι χημικά ισότιμα δίνουν διαφορετικά σήματα συντονισμού. Ο λόγος των σχετικών εμβαδών δύο κορυφών ισούται με το λόγο των αριθμών των πρωτονίων που αντιστοιχούν στις κορυφές. Έτσι, από το ^1H NMR μπορούν να αντληθούν πληροφορίες για τον αριθμό και τη θέση των πρωτονίων στο μόριο.

1.6.3. Δυναμική Σκέδαση Φωτός

Στη DLS μετράται η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός υπό μία συγκεκριμένη γωνία. Το δείγμα ακτινοβολείται με μονοχρωματική δέσμη φωτός με τη χρήση ενός laser. Η ακτινοβολία αυτή σκεδιάζεται από τα σωματίδια (πολυμερή) του δείγματος. Ο ανιχνευτής μετρά την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός υπό μία συγκεκριμένη γωνία (συνήθως 90°), συναρτήσει του χρόνου (Hiemenz και Rajagopalan 1997). Συγκεκριμένα, μετρά τη διακύμανση από μία μέση τιμή της έντασης, συναρτήσει του χρόνου (σε msec) και υπολογίζει τη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης (autocorrelation) (Kiserow et al 1992):

$$C(t) = Ae^{-2\Gamma t} + B \quad [1.1]$$

όπου το A είναι μία σταθερά που καθορίζεται από το σχεδιασμό του οργάνου, το B είναι η γραμμή αναφοράς (baseline) και το Γ είναι ο συντελεστής αυτοσυσχέτισης.

Από αυτή την εξίσωση υπολογίζεται το Γ . Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας την πιο κάτω εξίσωση υπολογίζεται ο συντελεστής διάχυσης D:

$$\Gamma = D q^2 \quad [\text{rad}\cdot\text{sec}^{-1}] \quad [1.2]$$

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι δύο πιο πάνω εξισώσεις ισχύουν μόνο για σφαιρικά σωματίδια .

Η τιμή του q υπολογίζεται από τον πιο κάτω τύπο:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2} \quad [1.3]$$

όπου λ_0 είναι το μήκος κύματος της ακτινοβολίας του laser, θ η γωνία σκέδασης και n ο δείκτης διάθλασης του διαλύτη. Ακολουθώντας, γνωρίζοντας το συντελεστή διάχυσης και με βάση την πιο κάτω εξίσωση υπολογίζεται η υδροδυναμική διάμετρος του μορίου, d_h , το οποίο θεωρείται σφαιρικό:

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d_h} \quad [\text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}] \quad [1.4]$$

όπου k_B είναι η σταθερά Boltzmann, T η θερμοκρασία σε K και η το δυναμικό ιξώδες του διαλύτη.

Τα πλεονεκτήματα της DLS είναι ότι είναι γρήγορη και απόλυτη μέθοδος, απαιτεί μικρό όγκο δείγματος, και είναι μη καταστρεπτική για το δείγμα.

Το κύριο μειονεκτήματα της είναι ότι είναι μία μέθοδος πολύ ευαίσθητη στην παρουσία σκόνης και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συστήματα που απορροφούν ακτινοβολία (στα ίδια λ με αυτά που στέλνει το laser του μηχανήματος).

1.6.4. Στατική Σκέδαση Φωτός

Στη στατική σκέδαση φωτός (static light scattering, SLS) σε αντίθεση με τη DLS μετράται η μέση ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας υπό διάφορες γωνίες και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλυμάτων σε σχέση με την προσπίπτουσα ακτινοβολία (Hiemenz και Rajagopalan 1997, Hiemenz 1984(β)). Η ένταση αυτή του σκεδαζόμενου φωτός εξαρτάται από το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, το μέγεθος και το σχήμα των σωματιδίων, τις οπτικές ιδιότητες των σημείων σκέδασης (των σκεδαστών) και τη γωνία παρατήρησης.

Για τη στατική σκέδαση από πολυμερικά διαλύματα μικρών συγκεντρώσεων ισχύει η γνωστή εξίσωση Zimm:

$$\frac{KC}{R_\theta} = \left(\frac{1}{M_w} + 2A_2C + \dots \right) \left(1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} \overline{R_g^2} \sin^2 \frac{\theta}{2} + \dots \right) \quad [1.5]$$

όπου K : σταθερά στην οποία μεταξύ άλλων περιέχονται πληροφορίες για το δείκτη διάθλασης του διαλύματος του πολυμερούς, θ : γωνία σκέδασης, λ : μήκος

κύματος, και C (g/L) συγκέντρωση διαλύματος πολυμερούς. Από τη SLS προσδιορίζονται το M_w , η γυροσκοπική ακτίνα, $\overline{R_g^2}$, και ο δεύτερος δυναμικός συντελεστής, A_2 , ο οποίος δίνει πληροφορίες που αφορούν τις αλληλεπιδράσεις που ασκούνται μεταξύ του διαλύτη και του πολυμερούς (εάν είναι καλός, κακός ή θ -διαλύτης για το πολυμερές).

Το κύριο πλεονέκτημα της SLS είναι ότι είναι μία απόλυτη μέθοδος από την οποία αντλούνται μερικές ιδιαίτερα σημαντικές πληροφορίες για τα πολυμερή και επίσης είναι μη καταστρεπτική για το δείγμα.

Τα μειονεκτήματα της SLS είναι ότι είναι μία χρονοβόρα και σχετικά δύσκολη μέθοδος, η οποία, όπως και η DLS, επηρεάζεται πολύ από την παρουσία σκόνης και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συστήματα που απορροφούν (στα ίδια λ με αυτά που στέλνει το laser του μηχανήματος), ενώ επίσης απαιτούνται πληροφορίες για το δείκτη διάθλαση του δείγματος.

1.6.5. Νεφελομετρία

Στη νεφελομετρία μετράται η θερμοκρασία στην οποία ο διαλύτης παύει να είναι καλός για το δείγμα. Συγκεκριμένα, με τη μέθοδο αυτή γίνεται ταυτόχρονη μέτρηση της θερμοκρασίας και της σκέδασης στο ορατό ενός πολυμερικού διαλύματος (Hiemenz και Rajagopalan 1997). Η μέθοδος προσδιορίζει τη θ -θερμοκρασία όπου ο διαλύτης παύει να είναι «καλός» για το πολυμερές με αποτέλεσμα να δημιουργούνται συσσωματώματα τα οποία προκαλούν αυξημένη σκέδαση φωτός που ανιχνεύει το φασματοφωτόμετρο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Χημικά Αντιδραστήρια

Όλα τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση και τον καθαρισμό των μονομερών και τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό των πολυμερών αγοράστηκαν από την Aldrich Γερμανίας. Τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση και τον καθαρισμό του δισθενούς εκκινητή, 1,4-δισ(μεθοξυτριμεθυλοσιλοξυμεθυλενο)κυκλοεξανίου [1,2-bis(methoxytrimethylsiloxymethylene) cyclohexane (MTSMC)] ήταν: η διϊσοπροπυλαμίνη, διαλύμα του κ-βουτυλολίθιου 2.5 M σε εξάνιο, ο 1,4-κυκλοεξανοδικαρβοξυλικός διμεθυλεστέρας [1,4-(dimethylcarboxylate) cyclohexane], το τριμεθυλοχλωροσιλανίου [ClSi(CH₃)₃] και το THF. Για τη σύνθεση και τον καθαρισμό των μονομερών τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: το μεθακρυλοχλωρίδιο, η τριαιθυλαμίνη, το όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO₃), το άνυδρο θειικό νάτριο (Na₂SO₄), το θειικό οξύ, το 2,3-διυδρο-2-πυράνιο (2,3-dihydro-2H-pyran, DHP), το MAA, φαινοθειαζίνη, υδρίδιο του ασβεστίου (calcium hydride, CaH₂) και ο παρεμποδιστής ελευθέρων ριζών ένυδρη 2,2-διφαινυλο-πικρυλο-υδραζύλη (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate, DPPH).

Τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των πολυμερών ήταν: ο εκκινητής 1-μεθοξυ-1-(τριμεθυλοσιλοξυ)-2-μεθυλο-1-προπένιο (1-methoxy-1-(trimethylsiloxy)-2-methylpropene, MTS), τα μονομερή DMAEMA, DEAEEMA, MMA, BuMA, μεθακρυλικός βενζυλεστέρας (benzyl methacrylate BzMA), ο διασταυρωτής EGDMA και μεταλλικό κάλιο και νάτριο (για την ξήρανση του διαλύτη του πολυμερισμού). Για το χαρακτηρισμό των πολυμερών χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο νερό (deuterium oxide, D₂O) δευτεριωμένη μεθανόλη (d₄-methanol, CD₃OD), δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (d-chloroform, CDCl₃) και δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (d₆-dimethyl sulfoxide, DMSO), τα πρότυπα διαλύματα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) 0.5 M και υδροχλωρικού οξέος (HCl) 0.5 M.

Το μονομερές HEGMA μας το πρόσφερε δωρεάν η εταιρεία Laporte Performance Chemicals του Ηνωμένου Βασιλείου.

Τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του καταλύτη του πολυμερισμού GTP, του TBABB, τα οποία αγοράστηκαν από την Aldrich Γερμανίας ήταν το υδροξείδιο του τετραβουτυλαμμωνίου, το βενζοϊκό οξύ, το χλωροφόρμιο και ο διαιθυλαιθέρας.

Το μεταλλικό νάτριο (για την ξήρανση του διαλύτη του πολυμερισμού) προμηθεύτηκε από την εταιρεία Fluka Γερμανίας, ενώ το διαλύτη του πολυμερισμού και του GPC, το THF, καθαρότητας αντιδραστηρίου και αναλυτικής καθαρότητας, αντίστοιχα, αγοράστηκαν από την εταιρεία Labscan, Ιρλανδίας.

Τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εφαρμογή των πολυμερών στη μεταφορά γενετικού υλικού αγοράστηκαν από την Invitrogen του Ηνωμένου Βασιλείου και ήταν τα ακόλουθα: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού με φυσιολογική συγκέντρωση άλατος (Dulbecco's phosphate buffered saline, D-PBS) χωρίς χλωρίδια μαγνησίου και ασβεστίου, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), serum-free DMEM, στο οποίο προστίθενται ορός βοοειδούς (fetal bovine serum, FBS), η γλουταμίνη, πενικιλίνη και η στρεπτομυκίνη για να ληφθεί έτσι το complete DMEM. Το πλασμίδιο pRLSV40 το οποίο χρησιμοποιήθηκε για να παρασκευαστεί το πλασμίδιο που περιέχει το γονίδιο της έντονα πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (enhanced green fluorescent protein, EGFP) αγοράστηκε από την Promega των ΗΠΑ. Το HiSpeed Plasmid Max Kit, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό του πλασμιδιακού DNA που περιέχει το γονίδιο EGFP, αγοράστηκε από την Qiagen, Γερμανίας. Από την ίδια εταιρία αγοράστηκε και το ενεργοποιημένο δενδριμερές πολυαμιδοαμίνης με το εμπορικό όνομα SuperFect.

2.2. Καθαρισμός Μονομερών, Διασταυρωτή, Εκκινητή και Διαλύτη Πολυμερισμού

Τα μονομερή MMA, BuMA, DMAEMA, BzMA, DEAEMA, μεθακρυλικός τετραϋδροπυραυλεστέρας (tetrahydropyranyl methacrylate, THPMA) και ο διασταυρωτής EGDMA περάστηκαν δύο φορές από στήλη βασικής αλούμινας με σκοπό την απομάκρυνση του παρεμποδιστή του πολυμερισμού και τυχόν όξινων ακαθαρσιών. Στη συνέχεια, τα μονομερή αυτά και ο διασταυρωτής αναδεύτηκαν το λιγότερο για μία ώρα, στην παρουσία CaH_2 (για απομάκρυνση και τα τελευταίου ίχνους υγρασίας και

όξινων ακαθαρσιών) και DPPH και αποστάχθηκαν με τη βοήθεια της γραμμής κενού πριν από τη χρήση τους.

Το μονομερές HEGMA, λόγω του μεγάλου του ιξώδους, καθαρίστηκε σαν διάλυμα σε THF. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε διάλυμα 50 % κατά όγκο (κ.ο.) του μονομερούς σε απεσταγμένο THF (Vamvakaki et al, 1999). Το διάλυμα αυτό περάστηκε δύο φορές από στήλη βασικής αλούμινας και αφέθηκε να αναδεύεται στην παρουσία CaH_2 (χωρίς DPPH) για τρεις ώρες. Στη συνέχεια, το διάλυμα διηθήθηκε απ' ευθείας μέσα στη φιάλη του πολυμερισμού μέσω ενός φίλτρου σύριγγας με μεμβράνη φίλτρου από PTFE διαμέτρου πόρων 0.45 μm . Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και σε μερικές περιπτώσεις για το μεθακρυλικό πολυισοβουτυλένιο (methacrylate polyisobutylene, PIBMA).

Ο διαλύτης του πολυμερισμού, το THF, αφέθηκε να αποστάζει υπό αντιρροή στην παρουσία ευτηκτικού κράματος καλίου/νατρίου για τρεις μέρες και αποστάχθηκε και πάλι πριν από τη χρήση του. Ο εκκινητής MTS αποστάχθηκε ακριβώς πριν από τη χρήση του, ενώ ο καταλύτης του πολυμερισμού, TBABB, κρατήθηκε υπό κενό το βράδυ πριν από τον πολυμερισμό.

2.3. Σύνθεση

2.3.1. Σύνθεση Δισθενούς Εκκινητή MTSC_H, Μονομερούς THPMA και Μακρομονομερούς PIBMA

2.3.1.1. Σύνθεση Δισθενούς Εκκινητή MTSMC

Η σύνθεση του δισθενούς εκκινητή για το GTP, το MTSMC, έγινε με βάση τη βιβλιογραφία (Steinbrecht και Bandermann, 1989). Συγκεκριμένα, 45 mL φρεσκοαποσταγμένου THF προστέθηκαν με τη βοήθεια γυάλινης σύριγγας των 50 mL σε δίλιμη σφαιρική φιάλη των 250 mL, ενώ το σύστημα βρισκόταν υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Κατόπιν, προστέθηκαν 10.2 mL δίσοπροπυλαμίνης (7.36 g, 0.0729 mol) με βοήθεια γυάλινης σύριγγας των 5 mL. Το σύστημα τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο και ψύχθηκε. Στη συνέχεια, 29 mL διαλύματος κ-βουτυλολιθίου 2.5 M (0.0725 mol) σε εξάνιο τοποθετήθηκε σε εξισορροπητική χοάνη, η οποία ήταν ενωμένη με το δεύτερο στόμιο της σφαιρικής φιάλης και προστέθηκαν κατά στάγδην στη φιάλη που περιείχε το THF και τη δίσοπροπυλαμίνη (~ 8 min). Παρατηρήθηκε αύξηση της θερμοκρασίας από

τους 0.1 °C στους 8.6 °C. Το σύστημα αφέθηκε υπό ανάδευση για 90 min υπό ατμόσφαιρα αζώτου.

Μετά την προσθήκη του κ-βουτυλολιθίου, η φιάλη βυθίστηκε σε θέρμο Dewar στον οποίο τοποθετήθηκε ποσότητα ακετόνης και στερεού CO₂, μέχρι που η θερμοκρασία μειώθηκε στους -78 °C, οπότε με τη βοήθεια γυάλινης σύριγγας προστέθηκαν 7.5 mL 1,4-κυκλοεξανοδικαρβοξυλικού διμεθυλεστέρα (8.33 g, 0.0416 mol), ο οποίος είχε τοποθετηθεί το προηγούμενο βράδυ σε CaH₂ και είχε αποσταχθεί το πρωί της αντίδρασης. Το σύστημα, αφέθηκε υπό ανάδευση για 120 min σε θερμοκρασία -78 °C.

Μετά την πάροδο των 120 min, παρατηρήθηκε πήξη του περιεχομένου της φιάλης, το οποίο είχε υποκίτρινο χρώμα. Λόγω της πήξης που παρατηρήθηκε, προστέθηκαν με τη βοήθεια γυάλινης σύριγγας 20 mL THF. Μετά τη διάλυση προστέθηκαν 11.5 mL τριμεθυλοχλωροσιλανίου (9.89 g, 0.0919 mol) και αφέθηκε υπό ανάδευση για άλλα 120 min στους -78 °C.

Στη συνέχεια, μετά από διήθηση με τη βοήθεια πλαστικών μικροφίλτρων σύριγγας πόρων 0.45 μm και εξάτμιση του THF καθώς και της περίσσειας του τριμεθυλοχλωροσιλανίου που παρέμεινε στο περιεχόμενο της φιάλης με χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα, ο ανακτηθείς εκκινητής MTSMC, που είχε τη μορφή παχύρρευστου λαδιού, καθαρίστηκε περαιτέρω με απόσταξη υπό κενό (στη γραμμή του κενού) σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 90 °C.

2.3.1.2. Σύνθεση Μονομερούς THPMA

Η παρασκευή του μονομερούς THPMA έγινε ακολουθώντας τη βιβλιογραφία (Hertler 1991), μέσω αντίδρασης του MAA με το DHP με τη διαφορά ότι αντί της διασταυρωμένης πολυ(υδροχλωρικής 4-βινυλικής πυριδίνης) χρησιμοποιήθηκε θειικό οξύ (Demosthenous et al, 2002, Georgiades et al, 2002).

Συγκεκριμένα, σε μία τρίλαιμη φιάλη των 500 mL η οποία περιείχε 1 g φαινοθειαζίνης (παρεμποδιστής ελευθέρων ριζών) και 125 mL DHP (116.25 g, 1.38 mol) προστέθηκαν αργά, και υπό ανάδευση, 20 σταγόνες 50 % κ.ο. θειικού οξέος, και το διάλυμα πήρε καφέ χρώμα. Ακολούθησε η προσθήκη μίγματος 125 mL DHP (116.25 g, 1.38 mol), 116 mL MAA (117.7 g, 1.37 mol) και 1 g φαινοθειαζίνης. Η θερμοκρασία, η

οποία μετρήθηκε με τη βοήθεια ψηφιακού θερμομέτρου, αυξήθηκε από 27.3 °C στους 39.6 °C. Η φιάλη μεταφέρθηκε σε λουτρό ελαίου και το μίγμα αφέθηκε να θερμαίνεται στους 50 °C καθ' όλη τη διάρκεια της νύκτας.

Την επόμενη μέρα, αφού προστέθηκαν στη φιάλη της αντίδρασης 10 g και 40 g των ξηραντικών NaHCO_3 και Na_2SO_4 , αντίστοιχα, το ετερογενές μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 2-3 ώρες και ακολούθησε διήθηση για απομάκρυνση των στερεών. Το υγρό μίγμα του προϊόντος του THPMA με τα εναπομείνοντα αντιδρώντα αφέθηκε να αναδεύεται στην παρουσία βασικής αλούμινας για απομάκρυνση του MAA που τυχόν δεν αντέδρασε πλήρως. Ακολούθησε διήθηση και στη συνέχεια το μίγμα περάστηκε από στήλη βασικής αλούμινας για περαιτέρω καθαρισμό από όξινες ακαθαρσίες. Τέλος, το προϊόν αποστάχθηκε με τη βοήθεια της γραμμής κενού στους 75 °C. Πριν τη χρήση του, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία καθαρισμού με τα υπόλοιπα μονομερή (ανάδευση με CaH_2 και απόσταξη υπό κενό).

2.3.1.3. Σύνθεση Μακρομονομερούς PIBMA

Η παρασκευή του PIBMA έγινε σε συνεργασία με την Ουγγρική Ακαδημία Επιστημών και συγκεκριμένα τον Καθηγητή Βέλα Ιβάν. Η σύνθεση του υδρόξυ-PIB (PIBOH) με QLCCP έγινε στην Ουγγαρία, μετά από επίσκεψή μου στην ομάδα του Καθηγητή Βέλα Ιβάν και η μεθακρυλίωσή του στην Κύπρο. Αρχικά, πολυμερίστηκε με QLCCP το αέριο IB (Kennedy και Ιβάν, 1992, Ιβάν και Kennedy, 1988) και παρασκευάστηκε έτσι PIB το οποίο μετά από αντιδράσεις υδροβορίωσης και οξειδωσης (με υπεροξείδιο του υδρογόνου, H_2O_2) (Ιβάν et al, 1980, Kennedy και Hiza, 1983) μετατράπηκε στο PIBOH. Στη συνέχεια, με αντίδραση εστεροποίησης μετατράπηκε σε PIBMA, το οποίο και πολυμερίστηκε με GTP.

Συγκεκριμένα, σε μία τετράλιμη φιάλη των 6000 mL, αφού προστέθηκαν 2400 mL εξανίου και 1600 mL διχλωρομεθάνιου (αναλογία 6:4) και αφέθηκε υπό ροή αερίου αζώτου για 10 min προστέθηκαν 8.0202 g του εκκινητή 2,4,4,τριμεθυλο-2-χλωροπενανίου (0.0540 mol) και στη συνέχεια ψύχθηκε στους -78 °C. Μετά προστέθηκαν 57.2 mL της βάσης N,N,N',N'-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνης (44.00 g, 0.38 mol). Ακολούθως, προστέθηκαν ~29.5 mL IB (21.24 g, 0.38 mol) και μετά 52 mL χλωριούχου τιτανίου (IV) (89.96 g, 0.48 mol). Μετά από χρόνο αναμονής 3 min

προστέθηκαν 15 mL αλλυλοτριμεθυλοσιλανίου (10.80 g, 0.0947 mol). Τέλος, μετά από 15 με 30 min προστέθηκαν πάνω από 50 mL μεθανόλης. Μετά από μερικές διαδικασίες καθαρισμού (εκχύλιση με μίγμα μεθανόλης/αμμωνίας μαζί με εξάνιο και στήλη αλούμινας) διάλυμα του αλλυλοPIB σε THF αφέθηκε να αντιδράσει με 258 mL 0.5 M διαλύματος του 9-BBN κατά τη διάρκεια της νύκτας. Την επόμενη μέρα προστέθηκε στάγδην ~45 mL διαλύματος H_2O_2 σε νερό (30 g/mL, 13.50 g, 0.3971 mol) κρατώντας τη θερμοκρασία πάντα χαμηλότερη από 10 °C με τη βοήθεια παγόλουτρο. Μετά από την προσθήκη του H_2O_2 το διάλυμα αφέθηκε να αντιδράσει στους 40 °C για 2.5 h. Στη συνέχεια το PIBOH που παρασκευάστηκε καθαρίστηκε με εκχυλίσεις και καταβυθίσεις σε μεθανόλη.

Ακολούθως, 10 g PIBOH (~ 0.016 mol) διαλύθηκαν σε 40 mL THF σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 250 mL. Στη συνέχεια, η φιάλη αφέθηκε για περίπου 5 min υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Ακολούθως, με τη βοήθεια γυάλινης σύριγγας προστέθηκαν 6.5 mL φρεσκοαπεσταγμένης τριαιθυλαμίνης (4.7 g, 0.046 moles) και η φιάλη τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο. Τέλος, προστέθηκαν 2 mL μεθακρυλοχλωρίδιο (2.14 g, 0.02 mol) που οδήγησαν σε αύξηση της θερμοκρασίας από του 2.0 °C στους 7.4 °C. Το προϊόν περάστηκε από στήλη βασικής αλούμινας και αποστάχθηκε σε όσες περιπτώσεις ήταν εφικτό ή ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία καθαρισμού του όπως του μονομερούς HEGMA.

2.3.2. Σύνθεση Καταλύτη

Η παρασκευή του καταλύτη του πολυμερισμού GTP, του TBABB, έγινε με βάση τη διαδικασία των Dicker et al, αντιδρώντας υδροξείδιο του τετραβουτυλαμμωνίου με βενζοϊκό οξύ (Dicker et al, 1990). Συγκεκριμένα, σε μία σφαιρική φιάλη των 250 mL, προστέθηκαν 10.0 g (0.08 mol) βενζοϊκού οξέος σε 80 mL υδατικού διαλύματος 40 % κατά βάρος (κ.β.) υδροξειδίου του τετραβουτυλαμμωνίου (0.12 mol). Αφού αναδεύτηκε το μίγμα μέχρι διάλυσης και ομογενοποίησης, τοποθετήθηκε στη συνέχεια σε εκχυλιστική χοάνη μαζί με 75 mL χλωροφορμίου, ανακινήθηκε και αφέθηκε μέχρι να επιτευχθεί καλός διαχωρισμός φάσεων. Συλλέχθηκε η υδατική φάση και τοποθετήθηκε ξανά στην εκχυλιστική χοάνη με άλλα 75 mL χλωροφορμίου. Η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. Μετά από την τελευταία εκχύλιση, προστέθηκαν ακόμα 10.0

g (0.08 mol) βενζοϊκού οξέος. Στο διάλυμα προστέθηκε άνυδρο Na_2SO_4 για να ξηρανθεί από την υγρασία που μπορεί να υπήρχε. Μετά από την απομάκρυνση του χλωροφορμίου με χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα, λήφθηκε λευκό κρυσταλλικό προϊόν. Για πλήρη καθαρισμό του έγινε ανακρυστάλλωση. Συγκεκριμένα, το στερεό διαλύθηκε σε ~100 mL θερμού THF στο οποίο προστέθηκαν 3 φορές από 70 mL διαιθυλαιθέρα και αφέρθηκε να κρυσταλλωθεί κατά τη διάρκεια της νύκτας. Το διάλυμα αποχύθηκε, το λευκό κρυσταλλικό προϊόν ξεπλύθηκε με διαιθυλαιθέρα, ξηράνθηκε στο φούρνο κενού για δύο μέρες και κρατήθηκε υπό κενό μέχρι και τη χρήση του.

2.3.3. Σύνθεση Πολυμερών

Όπως έχει προαναφερθεί, η μέθοδος πολυμερισμού GTP είναι μία ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδος η οποία μπορεί να τερματιστεί σχετικά εύκολα. Ως τερματιστές μπορούν να λειτουργήσουν τα όξινα πρωτόνια, η υγρασία και άλλες ακαθαρσίες. Για αυτό, τα γυαλικά που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις συνθέσεις έπρεπε να είναι πολύ καθαρά και απαλλαγμένα από κάθε υγρασία. Έτσι, όλα τα γυαλικά πλύθηκαν πολύ καλά, διαδοχικά σε λουτρό βάσης και λουτρό οξέος, ξεπλύθηκαν προσεκτικά με νερό και ακετόνη και ξηρανθήκαν κατά τη διάρκεια της προηγούμενης από τη σύνθεση νύκτας σε φούρνο στους 120 °C. Αμέσως πριν από τη χρήση τους, τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα μέχρι να κρυσώσουν. Το εξώθερμο όλων των αντιδράσεων πολυμερισμού παρατηρήθηκε με ψηφιακό θερμόμετρο.

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή παρασκευάστηκαν έξι διαφορετικές οικογένειες συμπολυμερών, δύο αστεροειδών συμπολυμερών και τεσσάρων συμπολυμερικών πλεγμάτων. Συγκεκριμένα, συντέθηκαν αστεροειδή πολυμερή DMAEMA-HEGMA και DMAEMA-THPMA (το THPMA υδρολύθηκε μετά τον πολυμερισμό σε MAA) και τα αστεροειδή πολυμερικά πλέγματα MMA-BuMA, DEAEMA-HEGMA, DMAEMA-THPMA (MAA) και DMAEMA-BzMA. Τέλος, συντέθηκαν και μερικά πολυμερικά πλέγματα του PIB-MA.

Μία τυπική διαδικασία σύνθεσης είναι αυτή για την παρασκευή του αστεροειδούς συμπολυμερούς πλέγματος του οποίου οι βραχίονες αποτελούνται από αδρομερή συμπολυμερή με 25 μονάδες MMA και 25 μονάδες BuMA. Αυτή η διαδικασία έγινε όπως περιγράφεται από τους Vamvakaki et al (2001, 2002) και Georgiades et al (2002)

και δίνεται πιο κάτω. Περιγράφεται η συγκεκριμένη διαδικασία σύνθεσης διότι περιλαμβάνει τα περισσότερα στάδια από όλες τις διαδικασίες σύνθεσης αστεροειδών πολυμερών και αστεροειδών πλεγμάτων και αναφέρονται έτσι όλα τα στάδια σύνθεσής τους. Σε μία σφαιρική φιάλη των 100 mL η οποία ήδη περιείχε καταλυτική ποσότητα TBABB (~10 mg, 20 μmol) προστέθηκαν με τη βοήθεια γυάλινης σύριγγας 50 mL φρεσκοαπεσταγμένου THF και 0.25 mL του μονοσθενούς εκκινητή MTS (0.215 g, 1.23 mmol). Έπειτα έγιναν οι διαδοχικές προσθήκες των μονομερών και του διασταυρωτή στη σφαιρική φιάλη του πολυμερισμού, πάντοτε με τη βοήθεια γυάλινων συριγγών. Αρχικά προστέθηκαν αργά 3.3 mL του μονομερούς MMA (3.08 g, 30.8 mmol). Παρατηρήθηκε απότομη αύξηση της θερμοκρασίας από τους 20.8 °C στους 26.1 °C. Σε αυτό το σημείο σχηματίστηκαν οι γραμμικές αλυσίδες του ομοπολυμερούς MMA₂₅. Στη συνέχεια προστέθηκαν 5.0 mL του μονομερούς BuMA (4.44 g, 30.8 mmol). Η προσθήκη συνοδευόταν με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 21.5 στους 23.9 °C. Σε αυτό το στάδιο σχηματίστηκαν οι γραμμικές αλυσίδες του αδρομερούς συμπολυμερούς MMA₂₅-*b*-BuMA₂₅. Ακολούθως προστέθηκαν 0.93 mL του διασταυρωτή EGDMA (0.98 g, 4.92 mmol), που επέφεραν αύξηση της θερμοκρασίας από τους 22.3 στους 24.9 °C, για να σχηματιστούν τα αστεροειδή συμπολυμερή (MMA₂₅-*b*-BuMA₂₅)-*star*. Στη συνέχεια προστέθηκαν 5.0 mL του μονομερούς BuMA (4.44 g, 30.8 mmol), με τη θερμοκρασία να αυξάνεται από τους 22.2 στους 25.1 °C, σχηματίζοντας έτσι τα αστεροειδή συμπολυμερή (MMA₂₅-*b*-BuMA₂₅)-*star*-(BuMA₂₅). Ακολούθησε η προσθήκη 3.3 mL του μονομερούς MMA (3.08 g, 30.8 mmol) που προκάλεσαν αύξηση της θερμοκρασίας από τους 23.8 στους 29.8 °C. Σε αυτό το στάδιο σχηματίστηκαν τα αστεροειδή συμπολυμερή (MMA₂₅-*b*-BuMA₂₅)-*star*-(BuMA₂₅-*b*-MMA₂₅). Τέλος για την ένωση των αστεροειδών συμπολυμερών και την παρασκευή του πλέγματος [(MMA₂₅-*b*-BuMA₂₅)-*star*-(BuMA₂₅-*b*-MMA₂₅)]-*network* προστέθηκαν 0.93 mL του διασταυρωτή EGDMA (0.98 g, 4.92 mmol). Σε κάθε στάδιο προσθήκης, τόσο των μονομερών όσο και του διασταυρωτή, λαμβανόταν δείγμα για ανάλυση με χρωματογραφία GPC και σε μερικές περιπτώσεις και για ανάλυση με φασματοσκοπία ¹H NMR. Επίσης σε μερικές περιπτώσεις στο φιαλίδιο δειγματοληψίας για το GPC είχε προηγηθεί η προσθήκη μίας σταγόνας μεθανόλης (τερματιστής του πολυμερισμού GTP).

2.3.4. Υδρόλυση Πολυμερών που Περιέχουν Μονάδες THPMA

Όλα τα πολυμερή τα οποία περιείχαν μονάδες του μονομερούς THPMA υδρολύθηκαν με οξύ για να δώσουν μονάδες του MAA. Οι διαδικασίες όξινης υδρόλυσης και καθαρισμού των αστεροειδών πολυμερών και των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων περιγράφονται πιο κάτω.

2.3.4.1. Υδρόλυση Μονάδων THPMA Αστεροειδών Συμπολυμερών

Η διαδικασία υδρόλυσης των αστεροειδών συμπολυμερών DMAEMA-THPMA που ακολουθήθηκε ήταν παρόμοια με αυτή των Hadjikallis et al (2002), με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε διαφορετική διαδικασία ανάκτησης του πολυμερούς, λυοφιλίωση αντί καταβύθιση. Σε προζυγισμένη ποσότητα αστεροειδούς συμπολυμερούς προστέθηκε διάλυμα 2 M HCl και αφέθηκε να αναδεύεται για τουλάχιστον δύο εβδομάδες. Τα ισοδύναμα HCl που προστέθηκαν ήταν διπλάσια από το άθροισμα των ισοδυνάμων των μονάδων THPMA συν DMAEMA (οι μονάδες του DMAEMA πρωτονιώνονται σε όξινο pH). Μετά τις δύο εβδομάδες προστέθηκε τόσο διάλυμα 2 M NaOH ώστε το pH να γίνει ουδέτερο. Στη συνέχεια, το διάλυμα του συμπολυμερούς μεταφέρθηκε σε σωλήνα διαπίδυσης (dialysis tubing) και αφέθηκε για δύο εβδομάδες. Το νερό απομακρυνόταν κάθε δύο – τρεις μέρες και προστίθετο φρέσκο απιονισμένο νερό, για την απομάκρυνση του άλατος και του DHP (παραπροϊόντος υδρόλυσης). Στη συνέχεια, ακολούθησε διαδικασία λυοφιλίωσης, (lyophilization, freeze-drying) στο διάλυμα του πολυμερούς για την απομάκρυνση του νερού και την ανάκτηση του στερεού πολυμερούς.

2.3.4.2. Υδρόλυση Μονάδων THPMA Αστεροειδών Πολυμερικών Πλεγμάτων

Για την υδρόλυση των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DMAEMA-THPMA ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με αυτή των Demosthenous et al (2002) και Georgiades et al (2002). Συγκεκριμένα, αφού προσδιορίστηκαν οι απώλειες των πλεγμάτων (βλέπε πιο κάτω, 2.5.3), ποσότητα διογκωμένου σε THF πλέγματος μεταφέρθηκε σε άλλο δοχείο και προστέθηκε μίγμα διαλύματος 2 M HCl και THF. Τα ισοδύναμα του HCl που προστέθηκαν ήταν διπλάσια από το άθροισμα των ισοδυνάμων των μονάδων THPMA και DMAEMA, όπως και στα αστεροειδή συμπολυμερή. Τα πλέγματα αφέθηκαν σε αυτό το μίγμα διαλυτών για τουλάχιστον τρεις εβδομάδες. Στη

συνέχεια, τα πλέγματα ξεπλύθηκαν για το λιγότερο δύο εβδομάδες σε απιονισμένο νερό, με τη σχεδόν καθημερινή απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και την προσθήκη καθαρού απιονισμένου νερού.

2.4. Χαρακτηρισμός Αστεροειδών Πολυμερών

Όπως προαναφέρθηκε, κατά τη διάρκεια της σύνθεσης των αστεροειδών πολυμερών εξάχθηκαν δείγματα των πολυμερών σε κάθε στάδιο από τη φιάλη του πολυμερισμού για ανάλυση. Το πολυμερή χαρακτηρίστηκαν με GPC σε THF για να προσδιοριστούν τα MB και οι κατανομές των MB. Η μέση σύσταση των πολυμερών προσδιορίστηκε με φασματοσκοπία NMR πρωτονίων (^1H NMR). Με χρήση δυναμικής σκέδασης φωτός (dynamic light scattering, DLS) υπολογίστηκε το υδροδυναμικό μέγεθος των πολυμερών και των συσσωματωμάτων που δημιουργούν τα πολυμερή αυτά σε υδατικά διαλύματα, ενώ με χρήση στατικής σκέδασης φωτός (static light scattering, SLS) καθορίστηκαν τα M_w και προσδιορίστηκαν ο μέσος αριθμός βραχιόνων των αστεροειδών πολυμερών. Ο προσδιορισμός του σημείου θολώσεως έγινε με ταυτόχρονη μέτρηση της θερμοκρασίας και της οπτικής πυκνότητας του υδατικού διαλύματος του πολυμερούς στο ορατό, ενώ ο προσδιορισμός του φαινόμενου pK των ιοντιζόμενων μονάδων έγινε με τιτλοδότηση των υδρογονοϊόντων.

2.4.1. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους (GPC)

Με τη GPC προσδιορίστηκαν τα MB των πρόδρομων μορίων των αστεροειδών πολυμερών και των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων καθώς και των τελικών αστεροειδών πολυμερών. Τα δείγματα που εξάχθηκαν κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού (0.1 mL) μεταφέρθηκαν σε μικρά γυάλινα φιαλίδια χωρητικότητας περίπου 1.5 mL και αραιώθηκαν με την κατάλληλη ποσότητα διαλύτη THF έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του πολυμερούς στο δείγμα να είναι 1 – 4 %. Στη συνέχεια τα δείγματα διηθήθηκαν με τη βοήθεια σύριγγας διαμέσου φίλτρου Teflon διαμέτρου 13 mm και με μέγεθος πόρων 0.5 μm .

Ο χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν της Polymer Laboratories εφοδιασμένος με ισοκρατική αντλία PL-LC1120, ανιχνευτή δείκτη διάθλασης ERC-7515A και χρωματογραφική στήλη PL Mixed 'D'. Ο φέρων διαλύτης ήταν THF

αντλούμενο με ροή 1 mL min^{-1} . Η βαθμονόμηση των μοριακών βαρών έγινε με πρότυπα γραμμικά PMMA στενής κατανομής μοριακών βαρών και με MB 630, 2600, 4250, 13000, 22650, 50000, 128000 και 260000 g mol^{-1} τα οποία επίσης αγοράστηκαν από την Polymer Laboratories.

2.4.2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Πρωτονίων ($^1\text{H NMR}$)

Με τη φασματοσκοπία $^1\text{H NMR}$ προσδιορίστηκε η μέση σύσταση των αστεροειδών συμπολυμερών. Μετά από την ξήρανση των πολυμερών, λήφθηκαν δείγματα ($\sim 20 \text{ mg}$) τα οποία διαλύθηκαν σε 0.5 mL δευτεριωμένου διαλύτη (χλωροφορμίου, νερού, μεθανόλης ή διμεθυλοσουλφοξειδίου) παρασκευάζοντας έτσι διαλύματα συγκέντρωσης 4 %. Τα φάσματα λήφθηκαν με φασματογράφο 300 MHz μοντέλο Avance της Bruker. Η βαθμονόμηση έγινε με βάση την κορυφή του πρωτονιωμένου διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε στην κάθε περίπτωση.

2.4.3. Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

Οι φαινόμενες υδροδυναμικές διαμέτροι των πολυμερών και των συσσωματωμάτων τους σε υδατικά διαλύματα μετρήθηκαν με DLS. Ο προσδιορισμός έγινε σε 1 % υδατικό διάλυμα σε θερμοκρασία $25 \text{ }^\circ\text{C}$ που διατηρείτο σταθερή με τη βοήθεια θερμοστάτη Peltier που έχει ενσωματωμένο το όργανο. Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το μοντέλο 90 Plus της Brookhaven, εξοπλισμένο με το Particle Sizing Software Version 2.31 και με laser ισχύος 30 mW το οποίο εκπέμπει ακτινοβολία στα 673 nm . Ο ανιχνευτής είναι τοποθετημένος σε γωνία 90° σε σχέση με το laser. Τα υδατικά διαλύματα ετοιμάστηκαν με απιονισμένο νερό και διηθήθηκαν πριν από την τοποθέτησή τους στην κυψελίδα για την απομάκρυνση σκόνης και άλλων ακαθαρσιών. Στη συνέχεια αφέθηκαν σε ηρεμία για 30 περίπου λεπτά. Το φασματοφωτόμετρο ρυθμίστηκε να λαμβάνει πέντε μετρήσεις για το ίδιο δείγμα και λήφθηκε ο μέσος όρος των δεδομένων.

2.4.4. Στατική Σκέδαση Φωτός (SLS)

Τα M_w των αστεροειδών πολυμερών και ο μέσος αριθμός βραχιόνων καθορίστηκαν με SLS. Για τα πειράματα της SLS χρησιμοποιήθηκε το όργανο BIMwA

της Brookhaven το οποίο είναι εξοπλισμένο με Laser ισχύος 30 mW που εκπέμπει μονοχρωματική ακτινοβολία στα 673 nm. Μετρήθηκαν οι σκεδαζόμενες εντάσεις των διαλυμάτων των πολυμερών (διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων, ανάλογα με το μοριακό βάρος των πολυμερών) σε επτά διαφορετικές γωνίες 35, 50, 75, 90, 105, 130 και 145°. Τα πολυμερικά διαλύματα διοχετεύονταν στο σύστημα με τη χρήση μίας αντλίας τύπου σύριγγας (syringe pump) και περνούσαν από πλαστικά μικροφίλτρα PTFE με πόρους 0.45 μm. Τα διαλύματα διοχετεύονταν με σειρά αυξανόμενης συγκέντρωσης. Για τη βαθμονόμηση του οργάνου χρησιμοποιήθηκε τολουόλιο (δείκτης διάθλασης = 1.4740, λόγος Rayleigh = 1.090×10^{-5}). Κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα Zimm από τα οποία προσδιορίστηκε το M_w και από αυτό υπολογίστηκε ο μέσος αριθμός βραχιόνων των αστεροειδών πολυμερών.

2.4.5. Νεφελομετρία

Υδατικά διαλύματα 1 % των αστεροειδών συμπολυμερών σε απιονισμένο νερό χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του σημείου θολώσεως. Περίπου 3 mL των υδατικών διαλυμάτων θερμάνθηκαν σταδιακά σε κυψελίδα στην οποία βρισκόταν ένας μικροσκοπικός μαγνητικός αναδευτήρας και η οποία ήταν τοποθετημένη σε φασματόμετρο απλής δέσμης ορατού / υπεριώδους μοντέλο Lambda 10 της Perkin Elmer. Στο φασματόμετρο γινόταν ταυτόχρονη μέτρηση της θερμοκρασίας και της απορρόφησης στα 500 nm (ορατό) και το σημείο θολώσεως λαμβάνετο σαν η θερμοκρασία εκείνη όπου παρατηρείτο απότομη αύξηση της απορρόφησης (η οποία οφείλεται στο φαινόμενο της σκέδασης).

2.4.6. Τιτλοδότηση Υδρογονοϊόντων

Έγινε τιτλοδότηση υδρογονοϊόντων υδατικών διαλυμάτων όλων των αστεροειδών συμπολυμερών. Οι ομάδες που τιτλοδοτούνται είναι οι τριτοταγείς αμίνες του DMAEMA που περιέχονται σε όλα τα συμπολυμερή (καθώς και του MAA σε μία ομάδα συμπολυμερών). Παρασκευάστηκαν 5 g 1% κ.β. διαλύματος του κάθε συμπολυμερούς σε απιονισμένο νερό και τιτλοδοτήθηκαν με 0.5 M NaOH από pH 2 ως 12. Κατά τις τιτλοδοτήσεις, το pH μετρήθηκε με τη βοήθεια ενός φορητού pH-μέτρου μοντέλο PS30 της Corning.

2.5. Χαρακτηρισμός Αστεροειδών Πολυμερικών Πλεγμάτων

Τα πρόδρομα μόρια των αστεροειδών πολυμερικά πλεγμάτων και οι απώλειές τους χαρακτηρίστηκαν με χρωματογραφία GPC σε THF και φασματοσκοπία ^1H NMR για να προσδιοριστούν τα MB και οι κατανομές των MB καθώς και η μέση σύστασή τους, όπως και για τα αστεροειδή πολυμερή. Περαιτέρω χαρακτηρισμός των πλεγμάτων έγινε με προσδιορισμό των ποσοστών απωλειών τους και των βαθμών διόγκωσης (ΒΔ). Όλες οι διαδικασίες χαρακτηρισμού των πολυμερικών πλεγμάτων, πρόδρομων μορίων τους και των απωλειών τους αναφέρονται πιο κάτω.

2.5.1. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους

Χρησιμοποιήθηκε για το χαρακτηρισμό των πρόδρομων μορίων και των απωλειών των πολυμερικών πλεγμάτων. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως αυτή με τα αστεροειδή πολυμερή.

2.5.2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Πρωτονίου

Χρησιμοποιήθηκε για το χαρακτηρισμό των πρόδρομων μορίων και των απωλειών των πολυμερικών πλεγμάτων. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως αυτή με τα αστεροειδή πολυμερή.

2.5.3. Ποσοστά Απωλειών των Πλεγμάτων

Τα πλέγματα που συντέθηκαν αφαιρέθηκαν από τις φιάλες πολυμερισμού μετά από θρυμματίσμα των φιαλών. Τα πλέγματα μεταφέρθηκαν σε γυάλινα δοχεία. Σε κάθε δοχείο τοποθετήθηκαν περίπου 200 mL THF και το κάθε πλέγμα αφέθηκε εκεί για μία βδομάδα για να ανακτηθούν οι απώλειές του (ποσό που δεν ενσωματώθηκε στο πλέγμα - διαλυτό κλάσμα). Στη συνέχεια, το διάλυμα του THF ανακτήθηκε με διήθηση. Η ίδια διαδικασία έγινε για ακόμα μία φορά για ακόμα μία βδομάδα και στη συνέχεια το THF απομακρύνθηκε με χρήση περιστροφικού εξαμιστήρα. Το πολυμερές που ανακτήθηκε ξηράνθηκε στο φούρνο κενού για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου. Το ποσοστό των απωλειών υπολογίστηκε ως ο λόγος της μάζας των απωλειών προς τη θεωρητική μάζα του πολυμερικού πλέγματος. Η τελευταία εκτιμήθηκε ως το άθροισμα των μαζών των μονομερών, του διασταυρωτή και του εκκινήτη που χρησιμοποιήθηκε στη σύνθεση.

2.5.4. Βαθμοί Διόγκωσης

Προσδιορίστηκαν οι ΒΔ όλων των πολυμερικών πλεγμάτων σε THF και σε νερό. Για τα πλέγματα τα οποία περιείχαν ιονιζόμενες μονάδες, δηλαδή μονάδες DMAEMA, DEAEEMA ή MAA προσδιορίστηκαν οι ΒΔ σε νερό σε διάφορα pH ενώ για τα διπλά υδρόφοβα πλέγματα προσδιορίστηκαν οι ΒΔ σε μίγματα διαλυτών, συγκεκριμένα κ-εξανίου και THF.

2.5.4.1. ΒΔ σε Οργανικούς Διαλύτες

Από το κάθε πλέγμα το οποίο βρισκόταν σε ισορροπία με THF κόπηκαν μικρά κομματάκια (5-10 mm) τα οποία τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένα φιαλίδια. Η μάζα των διογκωμένων σε THF κομματιών των πλεγμάτων βρέθηκε με ζύγιση πριν τοποθετηθούν όλα σε φούρνο κενού, τουλάχιστον για 48 h συνήθως σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα αυτά, αφού ξηράνθηκαν πλήρως, ζυγίστηκαν ξανά για να προσδιοριστεί έτσι η ξηρή τους μάζα. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 5 mL THF σε κάθε κομματάκι πλέγματος το οποίο αφέθηκε για μία εβδομάδα πριν την επαναζύγιση για τον προσδιορισμό του ΒΔ. Αυτό έγινε για όλες τις ομάδες αστεροειδών πλεγμάτων. Για τα διπλά υδρόφοβα πλέγματα έγινε και μελέτη των ΒΔ σε μίγματα οργανικών διαλυτών και συγκεκριμένα κ-εξανίου με THF, από 0 % έως και 100 % κατά όγκο (κ.ο.) περιεκτικότητα σε THF. Αφού τα δείγματα έφτασαν σε ισορροπία, ζυγίστηκε η μάζα τους προσδιορίζοντας έτσι την υγρή τους μάζα. Οι ΒΔ υπολογίστηκαν ως το πηλίκο της υγρής μάζας του πλέγματος προς την ξηρή μάζα του πλέγματος. Όλοι οι ΒΔ προσδιορίστηκαν το λιγότερο τρεις φορές και υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι και τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους για επίπεδο βεβαιότητας 95 %.

2.5.4.2. ΒΔ σε Νερό Συναρτήσει του pH

Από το κάθε πλέγμα το οποίο βρισκόταν σε ισορροπία με THF κόπηκαν μικρά κομματάκια (5-10 mm) τα οποία τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένα φιαλίδια. Η μάζα των διογκωμένων σε THF κομματιών των πλεγμάτων ζυγίστηκε πριν τοποθετηθούν όλα σε φούρνο κενού, τουλάχιστον για 48 h συνήθως σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα αυτά, αφού ξηράνθηκαν πλήρως, ζυγίστηκαν ξανά για να προσδιοριστεί έτσι η ξηρή τους μάζα. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 5 mL απιονισμένου νερού σε κάθε κομματάκι

πλέγματος το οποίο και αφέθηκε για δύο βδομάδες πριν την επαναζύγιση για τον προσδιορισμό του ΒΔ. Αυτό έγινε για όλες τις ομάδες αστεροειδών πλεγμάτων. Για όλα τα πλέγματα τα οποία περιείχαν ιονιζόμενες ομάδες (DMAEMA, DEAEMA ή MAA) έγινε και μελέτη των ΒΔ σε νερό για διάφορα pH. Το pH του νερού ρυθμίστηκε με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας πρότυπου διαλύματος 0.5 M HCl ή 0.5 M NaOH. Τα δείγματα αφέθηκαν να ισορροπήσουν το λιγότερο για δύο βδομάδες πριν μετρηθεί το pH του υπερκείμενου διαλύματος και η υγρή μάζα των πλεγμάτων. Όλοι οι ΒΔ μετρήθηκαν το λιγότερο τέσσερις φορές και υπολογίστηκαν και οι μέσοι όροι και τα σφάλματά τους. Τα φαινόμενα pK των πλεγμάτων προσδιορίστηκαν από την καμπύλη του βαθμού ιονισμού (BI) συναρτήσει του pH του υπερκείμενου διαλύματος ως το pH όπου ο BI ήταν ίσος με 50 %.

2.6. Επιμόλυνση με χρήση των Αστεροειδών Πολυμερών

Όλα τα αστεροειδή πολυμερή μελετήθηκαν σαν οχήματα μεταφοράς γενετικού υλικού στα κύτταρα. Τα πειράματα αυτά έγιναν στο Ινστιτούτο Γενετικής και Νευρολογίας στο εργαστήριο του Δρ. Λεωνίδα Α. Φυλακτού.

2.6.1. Διαδικασία Παρασκευής του Πλασμιδιακού DNA

Το πλασμίδιο καλλιεργήθηκε σε κύτταρα *E. coli* DH5a και στη συνέχεια καθαρίστηκε χρησιμοποιώντας το HiSpeed Plasmid Max Kit. Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίστηκε με τη μέτρηση της απορρόφησής του στα 260 nm χρησιμοποιώντας ένα Eppendorf Biophotometer.

2.6.2. Ηλεκτροφόρηση

Όλα τα μίγματα αστεροειδών συμπολυμερών με το DNA χαρακτηρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση αгарόζης, έτσι ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο δημιουργήθηκε ή όχι σύμπλοκο μεταξύ του DNA και του αστεροειδούς συμπολυμερούς και αν αυτό ήταν φορτισμένο θετικά, αρνητικά ή αν ήταν ουδέτερο. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στην ηλεκτροφόρηση αναλύεται πιο κάτω:

1. Παρασκευάστηκαν 150-200 mL διαλύματος αгарόζης 1% κ.ο. σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE [ρυθμιστικό διάλυμα των τριυδροξυμεθυλοαμινομεθανίου (tris

- base), του βορικού οξέος και του αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)].
2. Το διάλυμα της αγαρόζης θερμάνθηκε για ~ 3.5 min στο φούρνο μικροκυμάτων (για να διαλυθεί η αγαρόζη).
 3. Αμέσως αφού το διάλυμα αφέθηκε να κρυώσει, προστέθηκαν 4 μL βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide, EtBr) για κάθε 100 mL διαλύματος που είχε παρασκευαστεί (συνήθως 150-200 mL) και το διάλυμα τοποθετήθηκε στο «καλούπι» (μήτρα) που είχε ήδη ετοιμαστεί. Αφέθηκε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου για να σχηματιστεί το πήκτωμα της αγαρόζης.
 4. Ταυτόχρονα άρχισε η διαδικασία της συμπλοκοποίησης. Τοποθετήθηκαν στα σωληνάκια ο κατάλληλος όγκος μέσου serum-free DMEM έτσι ώστε, προσθέτοντας αργότερα το διάλυμα του αστεροειδούς συμπολυμερούς, να επιτευχθεί 20 ή 30 μL συνολικός όγκος διαλύματος, δηλαδή (20-X) ή (30 - X) μL , όπου X ο όγκος του διαλύματος του συμπολυμερούς. Ο όγκος του διαλύματος του DNA (1-2 μL) δεν λήφθηκε υπόψη στο συνολικό όγκο του διαλύματος.
 5. Προστέθηκε το DNA (συνήθως 1 μg) σε όλα τα σωληνάκια.
 6. Ακολούθησε έντονη ανάδευση με μηχανήμα vortex και φυγοκέντρηση (spin down) για ~7 s, έτσι ώστε να ανακτηθεί όλο το υγρό από τα τοιχώματα και το πώμα.
 7. Προστέθηκε η ποσότητα του συμπολυμερούς που είχε ήδη καθοριστεί στα σωληνάκια εκτός σε αυτό που βρισκόταν το δείγμα ελέγχου και περιείχε μόνο ελεύθερο (μη συμπλοκοποιημένο) DNA.
 8. Ακολούθησε έντονη ανάδευση με μηχανήμα vortex και φυγοκέντρηση για ~7 s. Με το τέλος της φυγοκέντρησης, το διάλυμα αφέθηκε για να συμπλοκοποιηθεί το πολυμερές με το DNA. Αυτό το χρονικό διάστημα ονομάζεται χρόνος συμπλοκοποίησης και συνήθως είναι 30 min.
 9. Στο μεταξύ, ετοιμάστηκε το μηχανήμα της ηλεκτροφόρησης. Τοποθετήθηκε το πήκτωμα αγαρόζης στο δοχείο της ηλεκτροφόρησης και στο δοχείο τοποθετήθηκε 1% κ.ο. διάλυμα αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE, έως ότου σκεπαστεί το πήκτωμα αγαρόζης με το διάλυμα.

10. Αφού έχει περάσει ο χρόνος συμπλοκοποίησης, προστέθηκε σε κάθε δείγμα χρωστική (6X loading dye), 3 μL για κάθε 10 μL δείγματος, και μεταφέρθηκε το κάθε δείγμα στο πήκτωμα αγαρόζης.
11. Τέλος, η συσκευή καλύφθηκε, τοποθετήθηκαν οι πόλοι και η ηλεκτροφόρηση έλαβε χώρα για 2 – 3 h στα 80 V.
12. Αφού ολοκληρώθηκαν οι 2-3 ώρες, παρατηρήθηκε το πήκτωμα κάτω από UV.
Αυτό που παρατηρείται στην ηλεκτροφόρηση είναι το DNA (με το οποίο αλληλεπιδρά το EtBr και το κάνει ορατό στο UV), η θέση του οποίου δίνει χρήσιμες πληροφορίες όσον αφορά το συνολικό φορτίο του συμπλόκου.

2.6.3. Διαδικασία Επιμόλυνσης

Η διαδικασία της επιμόλυνσης, κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν επωαστικός κλίβανος (incubator Jouan Quality System 150 9001) και απαγωγός (Microflow Advanced Bio Safety Cabinet), περιγράφεται αναλυτικά πιο κάτω:

1. 24 ώρες πριν από τη διεξαγωγή του πειράματος επιμόλυνσης, τοποθετήθηκαν σε κάθε φρεάτιο (well) 5×10^4 κύτταρα HeLa τα οποία αφέθηκαν να μεγαλώσουν για να υπάρχει την επόμενη μέρα 60 – 80% αλληλοεπικάλυψη των κυττάρων (confluency). Τα κύτταρα παραμένουν προσκολλημένα στο φρεάτιο και δεν μπορούν να αφαιρεθούν από αυτό εκτός και αν χρησιμοποιηθεί το κατάλληλο ένζυμο (θρυψίνη). Μέσα σε κάθε φρεάτιο προστέθηκαν ~2 mL μέσου complete DMEM. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37 °C και σε 5 % CO_2 .
2. Αρχικά, προστέθηκε σε σωληνάκια η ποσότητα του μέσου serum-free DMEM, που είχε ήδη υπολογιστεί έτσι ώστε να επιτευχθεί συνολικός όγκος 100 μL διαλύματος, δηλαδή (100 – X) μL μέσου όπου X είναι ο όγκος του διαλύματος του συμπολυμερούς που θα προστίθετο αργότερα.
3. Προστέθηκε η καθορισμένη από πριν ποσότητα DNA σε κάθε σωληνάκι.
4. Ακολούθησε έντονη ανάδευση χρησιμοποιώντας το μηχάνημα περιδίνησης (vortex) και φυγοκέντρηση για ~7 s.
5. Προστέθηκε η ποσότητα πολυμερούς στα σωληνάκια. Εδώ να σημειωθεί ότι ανά δώδεκα φρεάτια υπήρχαν δύο φρεάτια που περιείχαν, το ένα μόνο κύτταρα χωρίς

- πολυμερές ή δενδριμερές (μη επιμολυσμένα κύτταρα – control φρεάτιο) και το άλλο 4 μL δενδριμερούς και 1 μg DNA.
6. Ακολούθησε έντονη ανάδευση με μηχανήμα vortex και φυγοκέντρηση για ~ 7 s. Μόλις ολοκληρώθηκε η φυγοκέντρηση, το πολυμερές αφέθηκε να συμπλοκοποιηθεί με το DNA.
 7. Αφού συμπληρώθηκε ο χρόνος συμπλοκοποίησης (30 min, complexation time), προστέθηκαν σε κάθε σωληνάκι 400 μL complete DMEM.
 8. Ακολούθως, αφαιρέθηκε το μέσο από τα φρεάτια (με τη βοήθεια αντλίας κενού).
 9. Προστέθηκε περίπου 1 mL PBS σε κάθε φρεάτιο και αφαιρέθηκε όσο το δυνατό πιο γρήγορα (για ξέπλυμα).
 10. Ακολούθως προστέθηκαν σε κάθε φρεάτιο τα 500 μL διαλύματος του συμπλόκου και τοποθετήθηκαν τα κύτταρα στον επωαστικό κλίβανο, όπου αφέθηκαν για ένα χρονικό διάστημα, συνήθως 3 h (χρόνος επώασης - incubation time).
 11. Μετά, αφαιρέθηκε το μέσο και μαζί με αυτό το σύμπλοκο.
 12. Προστέθηκε σε κάθε φρεάτιο 1 mL D-PBS και αφαιρέθηκε πολύ γρήγορα.
 13. Τέλος, προστέθηκαν σε κάθε φρεάτιο 2 mL complete DMEM και τοποθετήθηκαν τα κύτταρα στον επωαστικό κλίβανο.

2.6.4. Μέτρηση Αποτελεσμάτων με Οπτικό Μικροσκόπιο

Μετά από δύο μέρες παρατηρήθηκε στο οπτικό μικροσκόπιο κατά πόσο παράχθηκε η επιθυμητή φθορίζουσα πρωτεΐνη ή όχι και μετρήθηκαν τα κύτταρα με τη βοήθεια αιματοκυτταρομέτρου. Πρέπει να επισημανθεί ότι με το αιματοκυτταρόμετρο μετρήθηκαν τα κύτταρα ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος (60 μL) και όχι όλα τα κύτταρα που βρίσκονταν στο φρεάτιο.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν:

1. Αφαιρέθηκε το medium από τα φρεάτια και έτσι αφαιρέθηκαν μαζί τα νεκρά κύτταρα.
2. Ξεπλύθηκαν τα κύτταρα με D-PBS (~ 1 mL σε κάθε φρεάτιο).
3. Προστέθηκαν 150 μL θρυψίνης σε κάθε φρεάτιο.
4. Τοποθετήθηκαν τα κύτταρα για 5 λεπτά στον επωαστικό κλίβανο.

5. Προστέθηκαν 350 μL μέσου complete DMEM σε κάθε φρεάτιο.
6. Λήφθηκε δείγμα από το κάθε φρεάτιο (60 μL) και προστέθηκε 20 μL διαλύματος της χρωστικής trypan blue.
7. Μέτρηση των κύτταρων με τη βοήθεια του αιματοκυτταρομέτρου και χρησιμοποίηση του οπτικού μικροσκοπίου το οποίο ήταν εφοδιασμένο και με φθορισμό (Zeiss Axiovert 25).

Συγκεκριμένα, μετρήθηκαν οι εξής τρεις αριθμοί κυττάρων: ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων που φθορίζουν ανά mL μέσου για το κάθε ένα φρεάτιο, ο συνολικός αριθμός των ζωντανών κυττάρων ανά mL μέσου για το κάθε ένα φρεάτιο και ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων ανά mL μέσου στο φρεάτιο στο οποίο δεν είχε προστεθεί ούτε DNA ούτε αστεροειδές πολυμερές ή δενδριμερές (μη επιμολυσμένα κύτταρα – control φρεάτιο).

Από τις μετρήσεις των κυττάρων υπολογίστηκε η απόδοση της επιμόλυνσης, η βιωσιμότητα των κυττάρων κατά την επιμόλυνση (cell viability) (Cherng et al, 1999) και η συνολική απόδοση της επιμόλυνσης (overall transfection efficiency) με βάση τις εξισώσεις που ακολουθούν:

$$\text{Απόδοση Επιμόλυνσης} = \frac{\text{αριθμός ζωντανών φθορίζοντων κυττάρων στο φρεάτιο}}{\text{αριθμός ζωντανών κυττάρων στο φρεάτιο}} \quad [2.1]$$

$$\text{Βιωσιμότητα} = \frac{\text{αριθμός ζωντανών κυττάρων στο φρεάτιο}}{\text{αριθμός ζωντανών κυττάρων στο control φρεάτιο}} \quad [2.2]$$

$$\text{Συνολική Απόδοση Επιμόλυνσης} = \frac{\text{αριθμός ζωντανών φθορίζοντων κυττάρων στο φρεάτιο}}{\text{αριθμός ζωντανών κυττάρων στο control φρεάτιο}} \quad [2.3]$$

2.7. Προσρόφηση DNA στα Αστεροειδή Πολυμερικά Πλέγματα

Έγινε μελέτη της προσρόφησης του DNA σε όλα τα υδροπλέγματα σε συνάρτηση με το pH. Για το σκοπό αυτό λήφθηκαν δείγματα από το κάθε πλέγμα, ξηράθηκαν στο φούρνο κενού (απουσία θέρμανσης) και στη συνέχεια, υπολογίστηκε σταθμομετρικά η ξηρή τους μάζα. Αρχικά, παρασκευάστηκαν δύο καμπύλες βαθμονόμησης. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν διαλύματα DNA διαφόρων συγκεντρώσεων (1×10^{-7} – 1×10^{-4} g/mL) με τη βοήθεια των οποίων κατασκευάστηκε η καμπύλη βαθμονόμησης

$A=f(C)$, όπου A είναι η απορρόφηση του διαλύματος DNA στο UV και C οι διάφορες συγκεντρώσεις των διαλυμάτων του DNA. Οι απορροφήσεις των διαλυμάτων μετρήθηκαν σε μήκος κύματος $\lambda = 260$ nm. Ακολούθως, επιλέχθηκε ένα από τα πιο πυκνά διαλύματα DNA, συγκέντρωσης 4×10^{-5} g/mL, το οποίο παρουσίαζε απορρόφηση κοντά στη μονάδα, για να μετρηθεί η απορρόφηση του σε διάφορα pH και έτσι κατασκευάστηκε η καμπύλη βαθμονόμησης $A=f(\text{pH})$. Το pH προσαρμόστηκε με την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας πρότυπων διαλυμάτων HCl και NaOH. Στη συνέχεια μετά την κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης, παρασκευάστηκαν τρία διαλύματα DNA της ίδιας συγκέντρωσης, 4×10^{-5} g/mL σε διαφορετικά pH και προστέθηκαν 6 mL σε κάθε ένα από τα ήδη ξηραμένα δείγματα. Τα δείγματα αφέθηκαν να ισορροπήσουν για δύο βδομάδες. Έπειτα το διάλυμα από το κάθε πλέγμα αφαιρέθηκε με τη βοήθεια σύριγγας και η απορρόφηση του μετρήθηκε με φασματόμετρο υπεριώδους-ορατού (από 800-200 nm). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο υπεριώδους-ορατού μάρκας Shimadzu, μοντέλο UV-1601. Χρησιμοποιώντας την εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης υπολογίστηκε η συγκέντρωση του DNA στο υπερκείμενο υγρό. Αφαιρώντας τη συγκέντρωση αυτή από την αρχική συγκέντρωση του διαλύματος, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του DNA που προσροφήθηκε στα πλέγματα και το ποσοστό προσρόφησης του. Τέλος, έγινε μέτρηση του pH και του βαθμού διόγκωσης του κάθε πλέγματος.

2.8. Θερμοδυναμική Μοντελοποίηση της Διόγκωσης των Πλεγμάτων

Στην περίπτωση των διπλά υδρόφοβων αστεροειδών πολυμερών BuMA-MMA προσδιορίστηκαν οι ΒΔ και θεωρητικά με χρήση ενός θεωρητικού μοντέλου που αναπτύχθηκε από την ομάδα Χημείας Πολυμερών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου (Vamvakaki και Patrickios, 2001, Georgiou et al, 2004(α)). Αυτό το μοντέλο περιγράφει το σύστημα με βάση τις δύο κύριες συνιστώσες της ελεύθερης ενέργειας, που είναι η ελαστική ελεύθερη ενέργεια και η ελεύθερη ενέργεια μίξης. Όταν εξεταζόταν η περίπτωση ύπαρξης μικροφασικού διαχωρισμού, μία τρίτη συνιστώσα της ελεύθερης ενέργειας συμπεριλαμβανόταν στο σύστημα. Η συνιστώσα της ελεύθερης ενέργειας για τη μίξη περιγραφόταν από δύο ενθαλπικούς όρους, οι οποίοι αποδίδουν την αλληλεπίδραση του κάθε υδρόφοβου μέρους (τμήματος) του πλέγματος με το διαλύτη

μέσω των κατάλληλων παραμέτρων αλληλεπίδρασης των Flory-Huggins, χ και ένα εντροπικό όρο ο οποίος περιγράφει την εντροπία των μορίων του διαλύτη και αγνοώντας τη μεταφορική (translational) εντροπία του πολυμερικού πλέγματος ακολουθώντας την παραδοχή του Flory (Flory, 1953). Η συνολική ελεύθερη ενέργεια Gibbs ελαχιστοποιείται σε σχέση με το κλάσμα όγκου του πολυμερούς με τη βοήθεια ενός κώδικα γραμμένου στην GWBASIC. Ο ΒΔ στην ισορροπία υπολογιζόταν σαν το αντίστροφο του κλάσματος όγκου του πολυμερούς στο σύστημα στο ελάχιστο της ελεύθερης ενέργειας. Οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται σε αυτό το μοντέλο δίδονται στο Παράρτημα αυτής της Διατριβής.

Οι σταθερές που απαιτήθηκαν για τον κώδικα ήταν: πρώτα το κλάσμα όγκου του πολυμερούς τη στιγμή που γίνεται η σύνθεση (διασταύρωση) του πλέγματος το οποίο λήφθηκε ίσο με 0.25 (όπως είναι στη συνθετική διαδικασία), μετά, ο αριθμός των βραχιόνων σε κάθε κόμβο του πλέγματος ο οποίος θεωρήθηκε ίσος με 30, όπως βρέθηκε σε παλαιότερες μελέτες που αφορούν αστεροειδή πολυμερή (Vamvakaki και Patrickios, 2002) και, τέλος, ο αριθμός των ατόμων του άνθρακα στην κύρια πολυμερική αλυσίδα (backbone) του κάθε μέρους του συμπολυμερούς, ο οποίος είναι ίσος με το διπλάσιο του αντίστοιχου βαθμού πολυμερισμού της αλυσίδας.

Οι παράμετροι αλληλεπίδρασης Flory – Huggins χ μεταξύ του διαλύτη και του καθενός από τα δύο υδρόφοβα μέρη, χ_{MMA} και χ_{BuMA} , ήταν επίσης απαραίτητες για τον κώδικα και υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση (Van Krevelen, 1990):

$$\chi = 0.34 + \frac{V_s}{RT} (\delta_p - \delta_s)^2 \quad [2.4]$$

όπου V_s είναι ο γραμμοριακός όγκος του διαλύτη, και δ_p και δ_s είναι οι παράμετροι διαλυτότητας του πολυμερούς και του διαλύτη αντίστοιχα. Οι παράμετροι διαλυτότητας του THF, του κ-εξανίου, των επαναλαμβανόμενων μονάδων μονομερών MMA και BuMA δίνονται στον Πίνακα 2.1 (Brandrup et al, 1999). Για να υπολογιστούν οι ΒΔ των πλεγμάτων σε διαφορετικές συστάσεις του διαλύτη (THF και κ-εξάνιο) η τιμή του δ_s μεταβλήθηκε συστηματικά μεταξύ αυτής του κ-εξανίου και αυτής του THF, και οι αντίστοιχες τιμές των χ_{MMA} και χ_{BuMA} υπολογιζόνταν μέσω της Εξίσωσης [2.4].

Πίνακας 2.1 Παράμετροι διαλυτότητας, δ , των μονάδων MMA και BuMA και των διαλυτών νερού, THF και κ-εξάνιου (Brandrup et al, 1999).

Πολυμερές	Παράμετρος Διαλυτότας δ_p (cal/cm ³) ^{1/2}	Διαλύτης	Παράμετρος Διαλυτότας δ_s (cal/cm ³) ^{1/2}
MMA	9.5	H ₂ O	23.4
BuMA	8.8	THF	9.1
		κ-εξάνιο	7.3

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

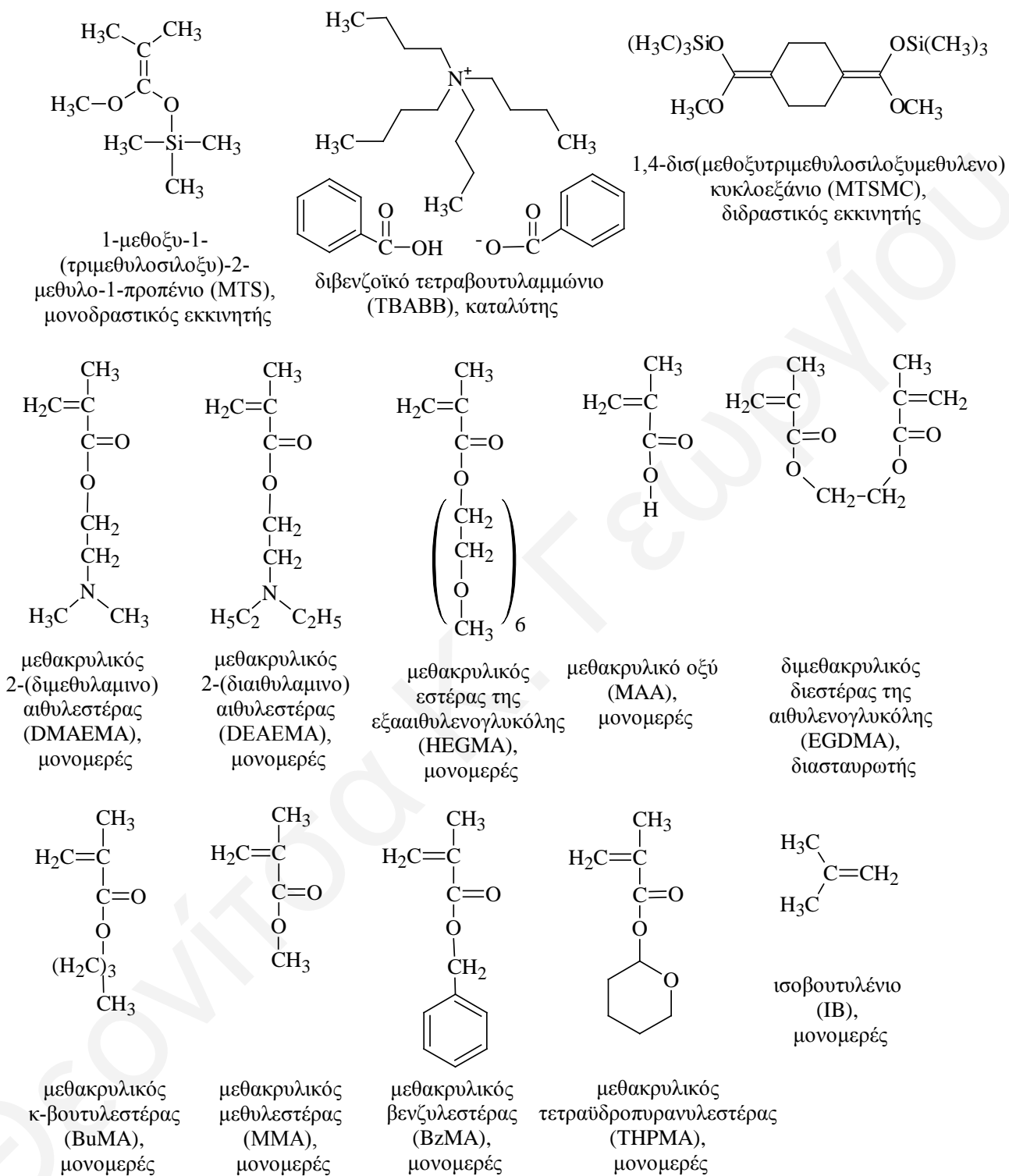
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για τη σύνθεση όλων των ομάδων πολυμερών που παρουσιάζονται σε αυτή τη Διατριβή χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος GTP (Webster 1983, 2000 και 2004, Sogah 1987 και Dicker 1990), ενώ σε μία περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος GTP σε συνδυασμό με τον QLCCP (Kennedy και Iván 1992).

Τα μονομερή που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις συνθέσεις αυτής της Διδακτορικής Διατριβής είναι τα DMAEMA, HEGMA, THPMA, MAA, MMA, BuMA, DEAEMA, BzMA και το IB. Το DMAEMA είναι υδρόφιλο θετικά ιονιζόμενο σε χαμηλά pH, το οποίο μπορεί να συμπλοκοποιηθεί με το αρνητικά φορτισμένο DNA. Το HEGMA είναι ένα υδρόφιλο, μη-ιοντικό μονομερές, το THPMA είναι υδρόφοβο, μη ιοντικό το οποίο όταν υδρολυθεί δίνει το MAA, ένα υδρόφιλο, αρνητικά ιονιζόμενο σε ψηλά pH μονομερές και το DEAEMA είναι υδρόφοβο, θετικά ιονιζόμενο σε χαμηλά pH. Τα MMA, BuMA και BzMA είναι και τα τρία υδρόφοβα, μη-ιοντικά μονομερή, των οποίων η υδροφοβικότητα αυξάνει με την πιο πάνω σειρά. Το IB είναι υδρόφοβο μονομερές, που σε αυτή την εργασία μεθακρυλικό πολυμερές του χρησιμοποιήθηκε ως μονομερές (μακρομονομερές). Ως εκκινητής του πολυμερισμού χρησιμοποιήθηκε το μονοδραστικό MTS και σε μερικές περιπτώσεις ο διδραστικός εκκινητής MTSMC και ως διασταυρωτής το EGDMA, το οποίο είναι υδρόφοβο, μη-ιοντικό. Τα ονόματα και οι χημικές δομές των μονομερών, των εκκινητών, του διασταυρωτή και του καταλύτη που χρησιμοποιήθηκαν στη Διδακτορική αυτή Διατριβή δίδονται στο Σχήμα 3.1.

Στο κεφάλαιο που ακολουθεί συζητούνται τα αποτελέσματα της κάθε οικογένειας πολυμερών ξεχωριστά. Αρχικά γίνεται η συζήτηση όσον αφορά τα αστεροειδή πολυμερή στην επιμόλυνση, ακολουθεί η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων και τέλος η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός μερικών πλεγμάτων του IB.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

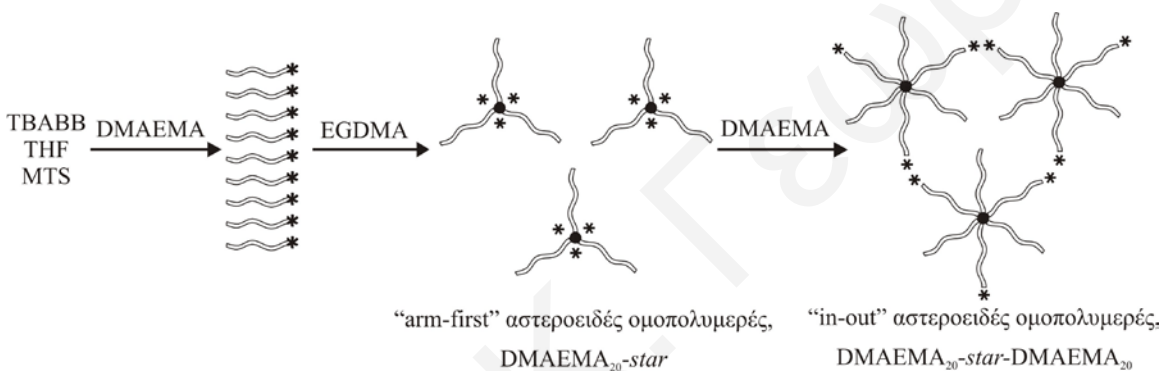


Σχήμα 3.1. Χημικές δομές και ονόματα των μονομερών, των εκκινητών, του διασταυρωτή και του καταλύτη, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα Διατριβή.

3.1. Αστεροειδή Πολυμερή στην Επιμόλυνση

3.1.1. Αστεροειδή Ομοπολυμερή DMAEMA στην Επιμόλυνση

Στα πλαίσια της προπτυχιακής Διπλωματικής μου Εργασίας είχαν συντεθεί και χαρακτηρίσει αστεροειδή ομοπολυμερή του DMAEMA. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν επτά ομοπολυμερή του DMAEMA με διαφορετικούς ΒΠ του βραχίονα από 10 ως 100. Τα έξι από αυτά (ΒΠ_{βραχίονα}=10, 20, 30, 40, 70 και 100) είναι «arm-first» αστεροειδή πολυμερή και το ένα είναι «in-out» αστεροειδές πολυμερές, με ΒΠ_{βραχίονα}=20. Το τελευταίο έχει μεγαλύτερο αριθμό βραχιόνων από το αντίστοιχο «arm-first» αστεροειδές πολυμερές με ίδιο ΒΠ (βλέπε Σχήμα 3.2).



Σχήμα 3.2. Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του «in-out» αστεροειδούς ομοπολυμερούς, DMAEMA₂₀-star-DMAEMA₂₀, όπου διακρίνεται και το πρόδρομό του «arm-first» αστεροειδές ομοπολυμερές. Οι μονάδες του DMAEMA συμβολίζονται με άσπρο, ενώ ο μαύρος κύκλος στο κέντρο κάθε αστεροειδούς πολυμερούς συμβολίζει τον υδρόφοβο πυρήνα από EGDMA. Με μαύρο αστεράκι συμβολίζονται τα ενεργά κέντρα του πολυμερισμού.

Στη συνέχεια, σε αυτή τη Διδακτορική Διατριβή τα πολυμερή αυτά αξιολογήθηκαν ως οχήματα μεταφοράς γενετικού υλικού στα καρκινικά κύτταρα HeLa. Όλες οι μελέτες επιμόλυνσης έγιναν σε σύγκριση με τον εμπορικά διαθέσιμο δεντριτικό μεταφορέα SuperFect (ο οποίος χρησιμοποιείται πάντα στις βέλτιστες συνθήκες απόδοσής του). Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η μελέτη είναι η πρώτη στην οποία έχουν

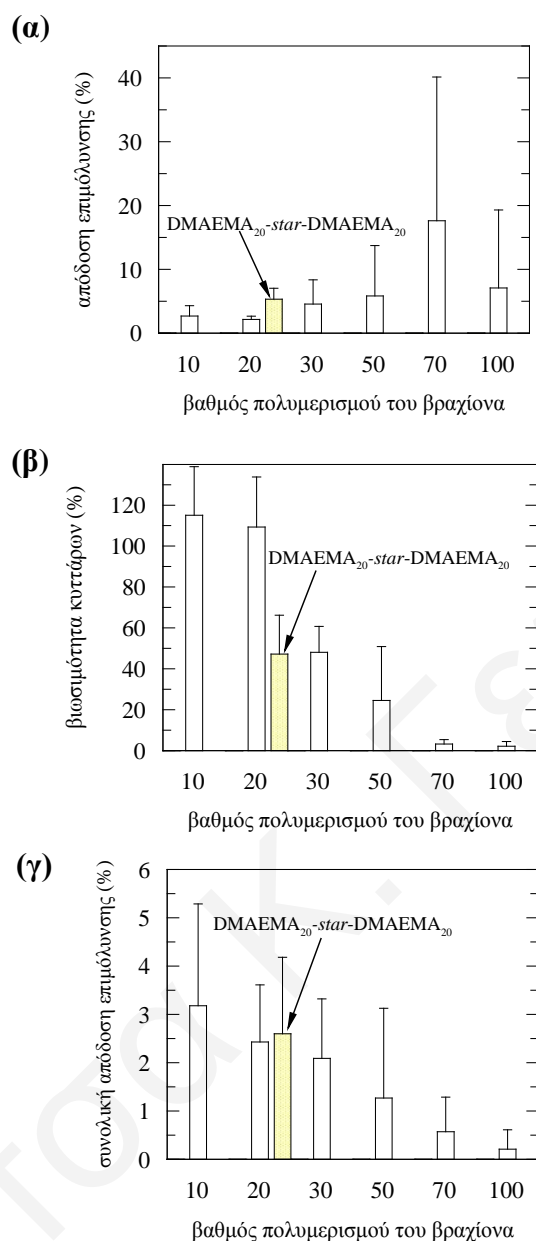
χρησιμοποιηθεί αστεροειδή πολυμερή σαν επιμόλυντες (Georgiou et al, 2004). Στη βιβλιογραφία υπάρχει μία αναφορά αστεροειδών πολυμερών PEI, για τα οποία έγινε μελέτη ως προς την συμπλοκοποίηση τους με το DNA, αλλά δεν δοκιμάστηκε η επιμόλυνσή τους σε κύτταρα (Petersen et al, 2002).

Όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να επιμόλνουν τα κύτταρα HeLa με πλασμιδιακό DNA, υπολογίζοντας: την απόδοση επιμόλυνσης, τη βιωσιμότητα των κυττάρων και τη συνολική απόδοση (για τους σχετικούς ορισμούς βλέπε 2.6.4 σελ.80) σαν συνάρτηση του ΒΠ του βραχίονά τους, την ποσότητα του πολυμερούς, την ποσότητα του πλασμιδιακού DNA και την ποσότητα των επιμόλυντών (δηλαδή την συνολική ποσότητα πολυμερούς και DNA). Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι η συνολική απόδοση επιμόλυνσης είναι μία παράμετρος η οποία δεν υπολογίζεται από άλλους ερευνητές αλλά είναι πολύ σημαντική γιατί συμπεριλαμβάνει την απόδοση επιμόλυνσης καθώς και τη βιωσιμότητα των κυττάρων στην επιμόλυνση.

Επίδραση του ΒΠ του Βραχίονα.

Στο Σχήμα 3.3 απεικονίζονται τα αποτελέσματα επιμόλυνσης με χρήση όλων των αστεροειδών ομοπολυμερών DMAEMA. Για την επιμόλυνση, χρησιμοποιήθηκαν για κάθε αστεροειδές ομοπολυμερές 15 μg και 1 μg πλασμιδιακού DNA. Συγκεκριμένα, στις τρεις γραφικές παραστάσεις παρουσιάζεται η εξάρτηση (α) της απόδοσης επιμόλυνσης (β) της βιωσιμότητας των κυττάρων και (γ) της συνολικής απόδοσης επιμόλυνσης από το ΒΠ των βραχίωνων των «arm-first» αστεροειδών ομοπολυμερών (άσπρο χρώμα). Με γκρίζο χρώμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα του «in-out» αστεροειδούς πολυμερούς DMAEMA₂₀-star-DMAEMA₂₀. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο ΒΠ του βραχίονα που παρουσιάζεται στον άξονα χ είναι ανάλογος με το συνολικό MB των αστεροειδών πολυμερών, όπως διαπιστώθηκε στο χαρακτηρισμό αυτών των ομοπολυμερών.

Στο Σχήμα 3.3 (α) παρατηρείται ότι η απόδοση της επιμόλυνσης αυξάνεται ανάλογα με το ΒΠ του βραχίονα (ή το MB) μέχρι το δεύτερο μεγαλύτερο αστεροειδές ομοπολυμερές (ΒΠ_{βραχίονα}=70) και μετά στο αστεροειδές ομοπολυμερές ΒΠ_{βραχίονα}=100 μειώνεται. Η αύξηση της απόδοσης της επιμόλυνσης σε σχέση με το MB παρατηρήθηκε επίσης από τους van de Wetering et al. (1997) και Godbey et al. (1999), οι οποίοι



Σχήμα 3.3. Εξάρτηση **(α)** της απόδοσης της επιμόλυνσης **(β)** της βιωσιμότητας των κυττάρων και **(γ)** της συνολικής απόδοσης επιμόλυνσης από το ΒΠ των βραχιόνων των «arm-first» αστεροειδών ομοπολυμερών του DMAEMA (άσπρο χρώμα). Ένα «arm-first» αστεροειδές ομοπολυμερές αντιστοιχεί σε κάθε τιμή του ΒΠ του βραχίονα στον άξονα χ. Με γκριζό χρώμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα του «in-out» αστεροειδούς πολυμερούς DMAEMA₂₀-star-DMAEMA₂₀. Για την επιμόλυνση, χρησιμοποιήθηκαν 15 μg αστεροειδούς ομοπολυμερούς και 1 μg πλασμιδιακού DNA.

παρατήρησαν αύξηση της απόδοσης επιμόλυνσης σε διάφορα κύτταρα, για ομοπολυμερή του DMAEMA με MB μεταξύ 4,000 και 817,000 g mol⁻¹ και γραμμικά καθώς και διακλαδωμένα πολυμερή της PEI με MB μεταξύ 600 το 70,000 g mol⁻¹, αντίστοιχα. Οι van de Wetering et al. (1997) εξήγησαν τα αποτελέσματα με την υπόθεση ότι σχηματίζουν τα μικρότερα σε μέγεθος σύμπλοκα DNA / πολυμερούς (που αυτό ευνοεί φυσικά την επιμόλυνση, αφού γίνεται μέσω ενδοκύτωσης ή/και μέσω αποσταθεροποίησης της κυτταρικής μεμβράνης – βλέπε Κεφάλαιο 1) τα μεγαλύτερα σε MB πολυμερή, ενώ οι Godbey et al. (1999) υπέθεσαν ότι ένα μεγαλύτερο πολυμερές μπορεί να είναι ένας καλύτερος ρυθμιστής του pH και μπορεί επίσης να προσφέρει καλύτερη προστασία στο συμπλοκοποιημένο DNA από νουκλεάσες (οι οποίες το αποικοδομούν / το καταστρέφουν πριν αυτό φτάσει στον πυρήνα του κυττάρου). Ένας άλλος πιθανός λόγος είναι ότι ένα μεγαλύτερο πολυμερές θα μπορεί πιο εύκολα να αποσταθεροποιήσει την κυτταρική μεμβράνη και, επομένως, να διευκολύνει την είσοδο του συμπλόκου DNA / πολυμερούς στο κύτταρο. Αύξηση της απόδοσης της επιμόλυνσης με το MB έχει επίσης παρατηρηθεί από τους Wolfert et al. (1999), οι οποίοι χρησιμοποίησαν pLL και πολυ[χλωριούχο μεθακρυλικό 2-(τριμεθυλαμμώνιο)αιθυλεστέρα] {poly[2-(trimethylammonio)ethyl methacrylate chloride], pTMAEM}.

Στο Σχήμα 3.3 (β) παρουσιάζεται η εξάρτηση της βιωσιμότητας των κυττάρων από το ΒΠ του βραχίονα (δηλαδή και από το MB των αστεροειδών πολυμερών). Η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώνεται μονοτονικά, σχηματίζοντας μία σιγμοειδή καμπύλη. Αυτή η μείωση μπορεί να αποδοθεί στην αποτελεσματικότερη αποσταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης από τα μεγαλύτερα πολυμερή, η οποία όμως μπορεί να οδηγήσει και στην καταστροφή του κυττάρου και άρα σε μικρότερη βιωσιμότητα. Μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων με αύξηση του MB των πολυμερών παρατηρήθηκε επίσης και από τους van de Wetering et al (1997) για γραμμικά ομοπολυμερή του DMAEMA. Από τα αποτελέσματα αυτής της γραφικής παράστασης φαίνεται ότι δύο μεγαλύτερα αστεροειδή πολυμερή, τα DMAEMA_{70-star} και DMAEMA_{100-star}, ήταν πολύ τοξικά με μη-αποδεκτή, πολύ χαμηλή, βιωσιμότητα των κυττάρων. Αντιθέτως, τα δύο μικρότερα αστεροειδή πολυμερή, τα DMAEMA_{10-star} και DMAEMA_{20-star}, παρουσίασαν βιωσιμότητα των κυττάρων κοντά στο 100 %.

Η εξάρτηση της συνολικής απόδοσης της επιμόλυνσης από το ΒΠ του βραχίονα και το MB των αστεροειδών ομοπολυμερών απεικονίζεται στη γραφική παράσταση του Σχήματος 3.3 (γ). Επειδή η συνολική απόδοση της επιμόλυνσης υπολογίζεται ως το γινόμενο απόδοσης της επιμόλυνσης επί τη βιωσιμότητα των κυττάρων, η γραφική αυτή παράσταση είναι ο συνδυασμός των γραφικών παραστάσεων στα Σχήματα 3.3 (α) και (β). Δεδομένου ότι ο ΒΠ του βραχίονα έχει πιο σημαντική επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων παρά στην απόδοση της επιμόλυνσης, η εξάρτηση της συνολικής απόδοσης της επιμόλυνσης από το ΒΠ του βραχίονα αντικατοπτρίζει περισσότερο τη συμπεριφορά της βιωσιμότητας των κυττάρων σε σχέση με το ΒΠ του βραχίονα. Έτσι, επειδή τα μικρότερα αστεροειδή ομοπολυμερή παρουσίασαν την υψηλότερη βιωσιμότητα των κυττάρων, παρουσίασαν επίσης και τη μεγαλύτερη συνολική απόδοση επιμόλυνσης.

Τα αποτελέσματα του «in-out» αστεροειδούς πολυμερούς με ΒΠ του βραχίονα 20, DMAEMA₂₀-star-DMAEMA₂₀, απεικονίζονται στο Σχήμα 3.3 με γκριζό χρώμα. Συγκρίνοντάς το με το «arm-first» αστεροειδές ομοπολυμερές ίδιου ΒΠ του βραχίονα DMAEMA₂₀-star, (που έχει μικρότερο MB και μικρότερο αριθμό βραχιόνων), το DMAEMA₂₀-star-DMAEMA₂₀ παρουσίασε μεγαλύτερη απόδοση επιμόλυνσης και μικρότερη βιωσιμότητα των κυττάρων (Σχήμα 3.3 (α) και (β), αντίστοιχα). Σαν αποτέλεσμα της ύπαρξης αυτών των δύο αντίθετων τάσεων στο «in-out» αστεροειδές πολυμερές, αυτό παρουσίασε την ίδια συνολική απόδοση επιμόλυνσης με το αντίστοιχο «arm-first» αστεροειδές πολυμερές (Σχήμα 3.3 (γ)).

Πρέπει να σημειωθεί ότι από τα τρία μεγέθη, απόδοση της επιμόλυνσης, βιωσιμότητα των κυττάρων, και συνολική απόδοση επιμόλυνσης, το καταλληλότερο για να αξιολογηθεί ένα όχημα μεταφοράς γενετικού υλικού είναι το τελευταίο, η συνολική απόδοση επιμόλυνσης γιατί συμπεριλαμβάνει τα δύο άλλα μεγέθη. Αυτό το μέγεθος είναι πιο κοντά στον πραγματικό απόλυτο αριθμό των φθοριζόντων κυττάρων (αυτά που έχουν εκφράσει την επιθυμητή πρωτεΐνη). Έτσι, από όλα τα αστεροειδή ομοπολυμερή του DMAEMA, αυτό που παρουσιάζεται σαν το αποδοτικότερο όχημα μεταφοράς γενετικού υλικού είναι το DMAEMA₁₀-star το οποίο παρουσίασε την υψηλότερη συνολική απόδοση (~ 3%) καθώς επίσης και την υψηλότερη βιωσιμότητα των κυττάρων. Για αυτό το λόγο, το συγκεκριμένο αστεροειδές πολυμερές επιλέγηκε για περαιτέρω πειράματα με

στόχο τη βελτιστοποίηση της απόδοσής του, μεταβάλλοντας συστηματικά τις ποσότητες του DNA και του ίδιου του πολυμερούς κατά την επιμόλυνση.

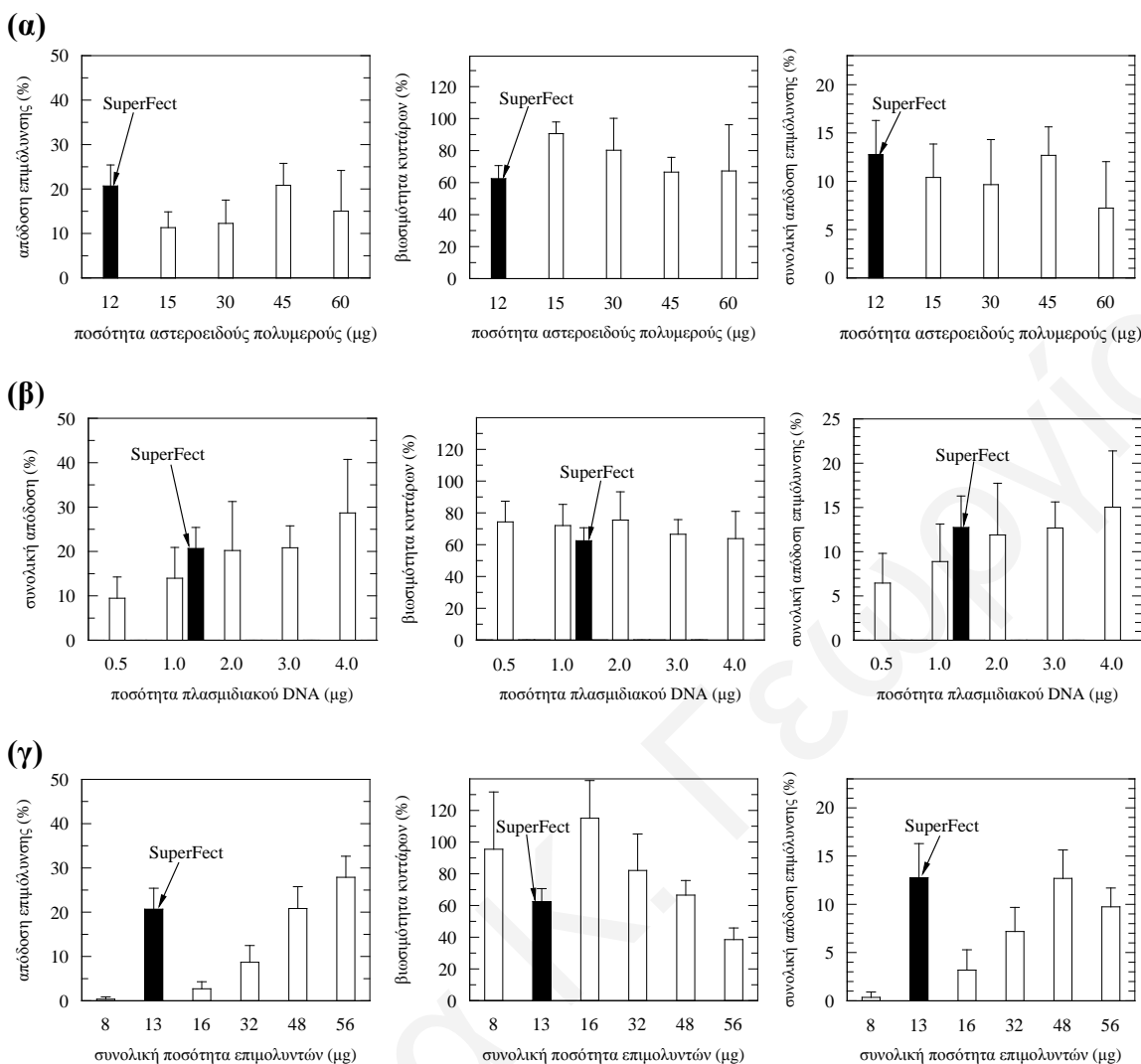
Στο Σχήμα 3.4 παρουσιάζεται η εξάρτηση της απόδοσης της επιμόλυνσης, της βιωσιμότητας των κυττάρων, και της συνολικής απόδοσης της επιμόλυνσης από (α) την ποσότητα του DMAEMA_{10-star} σε σταθερή ποσότητα DNA 3 μg, (β) την ποσότητα του πλασμιδιακού DNA σε σταθερή ποσότητα DMAEMA_{10-star} 4.5 μg και (γ) τη συνολική ποσότητα επιμολυντών για σταθερή αναλογία αστεροειδούς πολυμερούς : DNA ίση με 15 : 1 (μg : μg). Στο ίδιο Σχήμα, με μαύρο χρώμα παρουσιάζεται η εξάρτηση των ίδιων παραμέτρων για τον εμπορικά διαθέσιμο μεταφορέα SuperFect στις βέλτιστες συνθήκες της απόδοσής του.

Επίδραση της Ποσότητας του Αστεροειδούς Πολυμερούς.

Στο Σχήμα 3.4 (α) παρουσιάζεται η επίδραση της αύξησης της ποσότητας του πολυμερούς DMAEMA_{10-star} από 15 μέχρι 60 μg, σε σταθερή ποσότητα πλασμιδιακού DNA 3 μg, στην απόδοση της επιμόλυνσης, στη βιωσιμότητα των κυττάρων, και στη συνολική απόδοση της επιμόλυνσης. Στα πλαίσια του πειραματικού σφάλματος, για το εύρος τιμών της ποσότητας του πολυμερούς που εξετάστηκε, οι τρεις αυτές παράμετροι ήταν σχεδόν σταθερές. Παρόλα αυτά, μπορούν να διακριθούν ένα μικρό μέγιστο και ένα μικρό ελάχιστο στην απόδοση της επιμόλυνσης και στη συνολική απόδοση της επιμόλυνσης, αντίστοιχα. Το μικρό μέγιστο είναι σε συμφωνία με τους van de Wetering et al (1997) που παρατήρησαν όμως ένα έντονο μέγιστο της απόδοσης επιμόλυνσης σε σχέση με την ποσότητα γραμμικού ομοπολυμερούς του DMAEMA ($M_w = 309\ 000\ g\ mol^{-1}$).

Η ικανότητα επιμόλυνσης του DMAEMA_{10-star} ήταν παρόμοια με αυτή του εμπορικά διαθέσιμου προϊόντος SuperFect, το οποίο αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας το ίδιο πλασμιδιακό DNA και κύτταρα. Τα αποτελέσματα του SuperFect στις βέλτιστες συνθήκες απόδοσής του (12 μg SuperFect και 1 μg πλασμιδιακό DNA) παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.4 (α) με μαύρο χρώμα. Συγκριτικά, για τις ποσότητες αστεροειδούς πολυμερούς DMAEMA_{10-star} που δοκιμάστηκαν, οι τιμές της συνολικής απόδοσης επιμόλυνσης και της βιωσιμότητας των κυττάρων είναι μεταξύ 7 με 13% και 68 με 90%,

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Σχήμα 3.4. Η εξάρτηση της απόδοσης επιμόλυνσης, της βιωσιμότητας των κυττάρων, και της συνολικής απόδοσης επιμόλυνσης από **(α)** την ποσότητα του DMAEMA₁₀-star σε σταθερή ποσότητα DNA 3 μg, **(β)** την ποσότητα του πλασμιδιακού DNA σε σταθερή ποσότητα DMAEMA₁₀-star 4.5 μg και **(γ)** τη συνολική ποσότητα επιμολυτών για σταθερή αναλογία αστεροειδούς πολυμερούς : DNA ίση με 15 : 1 (μg : μg). Στο ίδιο Σχήμα, με μαύρο χρώμα παριστάνονται η απόδοση επιμόλυνσης, η βιωσιμότητα των κυττάρων και η συνολική απόδοση επιμόλυνσης για τον εμπορικά διαθέσιμο μεταφορέα SuperFect στις βέλτιστες συνθήκες απόδοσής του (12 μg SuperFect και 1 μg DNA).

αντίστοιχα, ενώ για το SuperFect οι αντίστοιχες τιμές στις βέλτιστές του συνθήκες είναι 13% και 62%.

Επίδραση της Ποσότητας του DNA.

Στο Σχήμα 3.4 (β) παρουσιάζεται η επίδραση της συνολικής ποσότητας του DNA στην απόδοση της επιμόλυνσης, στη βιωσιμότητα των κυττάρων, και στη συνολική απόδοση επιμόλυνσης, για σταθερή ποσότητα αστεροειδούς πολυμερούς ίση με 45 μg. Σε αντίθεση με το Σχήμα 3.4 (α) όπου μελετήθηκε η επίδραση της ποσότητας του πολυμερούς, στο Σχήμα 3.4 (β) φάνηκε μία καθαρά μονοτονική αύξηση στην απόδοση της επιμόλυνσης καθώς και στη συνολική απόδοση της επιμόλυνσης με αύξηση της ποσότητας του DNA. Η βιωσιμότητα των κυττάρων δεν φάνηκε να επηρεάστηκε από την ποσότητα του DNA. Συγκρίνοντας το εμπορικά διαθέσιμο SuperFect, του οποίου τα αποτελέσματα στην επιμόλυνση παρουσιάζονται επίσης στο Σχήμα 3.4 (β), με το DMAEMA_{10-star}, το δεύτερο παρουσίασε υψηλότερη συνολική απόδοση επιμόλυνσης όταν συμπλοκοποιείτο με τη μέγιστη ποσότητα DNA (4 μg) από ό,τι το SuperFect στις βέλτιστές του συνθήκες (12 μg SuperFect και 1 μg DNA).

Επίδραση της Συνολικής Ποσότητας των Επιμολυντών.

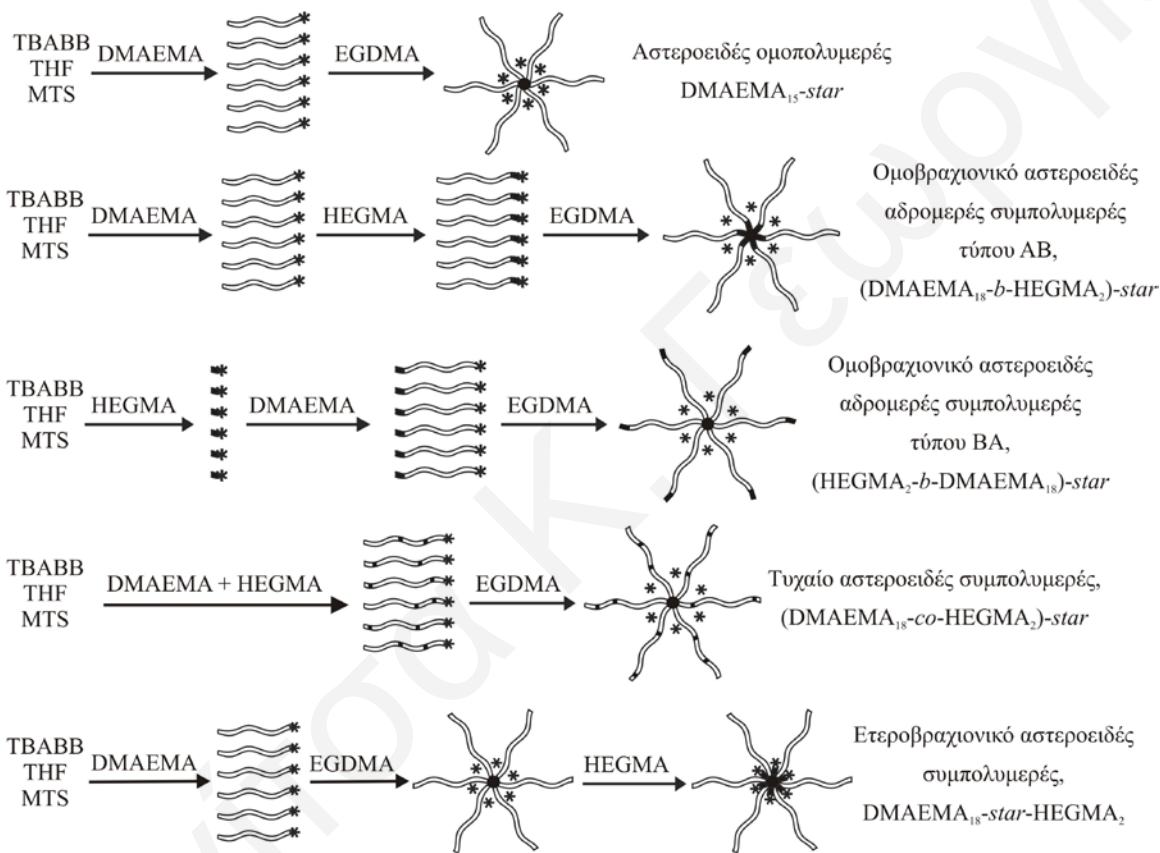
Στο Σχήμα 3.4 (γ) παρουσιάζεται η επίδραση της συνολικής ποσότητας των επιμολυντών (πολυμέρες και DNA) στην απόδοση της επιμόλυνσης, στη βιωσιμότητα των κυττάρων, και στη συνολική απόδοση επιμόλυνσης, για σταθερή αναλογία αστεροειδούς πολυμερούς : πλασμιδιακού DNA ίση με 15 : 1 (μg : μg). Όπως και στο Σχήμα 3.3 (β) όπου μελετήθηκε η επίδραση της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA, στο Σχήμα 3.3. (γ) η απόδοση επιμόλυνσης παρουσίασε μονοτονική αύξηση με αύξηση της συνολικής ποσότητας των επιμολυντών. Στο Σχήμα 3.4 (γ) η βιωσιμότητα των κυττάρων καθώς και η συνολική απόδοση επιμόλυνσης παρουσίασαν μέγιστο αυξάνοντας τη συνολική ποσότητα των επιμολυντών. Σε αυτό το Σχήμα, η τιμή στο μέγιστο της συνολικής απόδοσης της επιμόλυνσης του DMAEMA_{10-star} ήταν παρόμοια με την τιμή του SuperFect στις βέλτιστές του συνθήκες.

Επομένως, τα μικρότερου ΜΒ αστεροειδή ομοπολυμερή του DMAEMA έχουν την ικανότητα να επιμολύνουν ικανοποιητικά τα κύτταρα παρουσιάζοντας παρόμοια αποτελέσματα με αυτά του εμπορικά διαθέσιμου δενδριμερούς SuperFect, το οποίο είναι δύσκολο στην παρασκευή και δαπανηρό. Έτσι, επιβεβαιώνεται η αρχική μας υπόθεση ότι η παρόμοια δομή αστεροειδών και ενεργοποιημένων δενδριμερών διασφαλίζει παρόμοιες ικανότητες επιμόλυνσης.

3.1.2. Αστεροειδή Συμπολυμερή DMAEMA – HEGMA

3.1.2.1. Σύνθεση

Η πρώτη οικογένεια πολυμερών που συντέθηκε στα πλαίσια αυτής της Διδακτορικής Διατριβής αποτελείται από αστεροειδή συμπολυμερή του υδρόφιλου ιονιζόμενου DMAEMA και του υδρόφιλου μη ιοντικού HEGMA. Μετά τα θετικά αποτελέσματα στην επιμόλυνση με χρήση των αστεροειδών ομοπολυμερών του



Σχήμα 3.5. Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την παρασκευή των τεσσάρων αστεροειδών συμπολυμερών DMAEMA – HEGMA και ενός αστεροειδούς ομοπολυμερούς του DMAEMA. Οι μονάδες του DMAEMA συμβολίζονται με άσπρο, ενώ του HEGMA συμβολίζονται με μαύρο. Ο μαύρος κύκλος στο κέντρο κάθε αστεροειδούς πολυμερούς συμβολίζει τον υδρόφοβο πυρήνα από EGDMA και με μαύρο αστεράκι συμβολίζονται τα ενεργά κέντρα του πολυμερισμού.

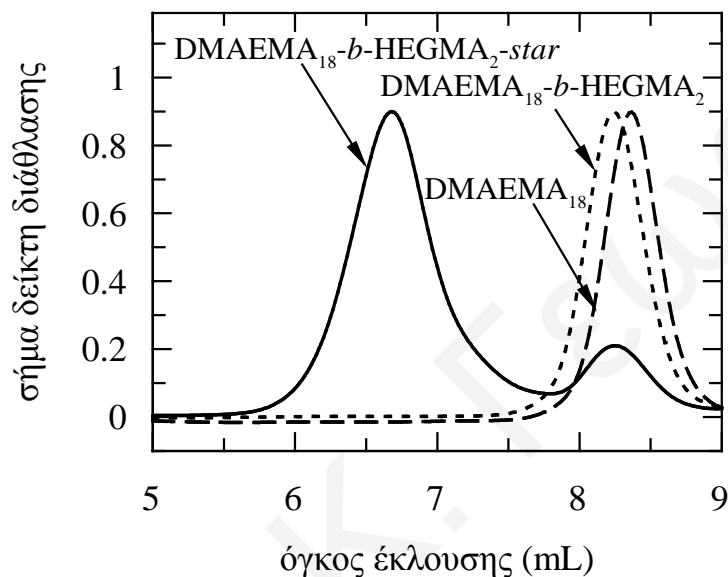
DMAEMA, το επόμενο βήμα ήταν η εισαγωγή ενός δεύτερου μονομερούς στα πολυμερή με αποτέλεσμα τη σύνθεση αστεροειδών συμπολυμερών διαφόρων αρχιτεκτονικών. Επιλέχθηκε ένα υδρόφιλο μονομερές, το οποίο θα μπορούσε να βοηθήσει στη σταθεροποίηση των συμπλόκων πολυμερούς – DNA (Merdan et al, 2002) και συγκεκριμένα το μη ιοντικό, υδρόφιλο μονομερές HEGMA, το οποίο περιέχει μονάδες PEG η παρουσία των οποίων σε γραμμικά κατιοντικά πολυμερή (van de Wetering et al 1998 και 2000, Deshpande et al 2004, Wakebayashi et al 2004, Pirotton et al 2004) καθώς και σε κατιοντικά δενδριμερή (Luo et al 2002 και Kim et al 2004) αποδείχθηκε ευεργετική για την επιμόλυνση αφού σε όλες τις περιπτώσεις αυξήθηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων σε σχέση με αντίστοιχα κατιοντικά ομοπολυμερή.

Για το λόγο αυτό, συντέθηκαν τέσσερα αστεροειδή συμπολυμερή DMAEMA – HEGMA, με 10% mol σε HEGMA διαφορετικών αρχιτεκτονικών. Στο Σχήμα 3.5 παρουσιάζονται οι σχηματικές αναπαραστάσεις της διαδικασίας σύνθεσης των τεσσάρων συμπολυμερών: δύο ομοβραχιονικών, ενός ετεροβραχιονικού και ενός τυχαίου, και τα αντίστοιχα συντομογραφικά τους ονόματα. Μαζί με αυτά τα πολυμερή συντέθηκε και ένα ομοπολυμερές του DMAEMA, ίδιου ΒΠ του βραχίονα με τα περισσότερα συμπολυμερή, 20, για σύγκριση τόσο στη σύνθεση και στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες αλλά περισσότερο για την αξιολόγησή τους σαν οχήματα μεταφοράς γενετικού υλικού. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η μελέτη είναι η πρώτη όσο αφορά την εφαρμογή αστεροειδών συμπολυμερών σαν επιμολυντές (Georgiou et al, 2005).

3.1.2.2. Μοριακά Βάρη και Σύσταση

Στο Σχήμα 3.6 απεικονίζονται τρία χρωματογραφήματα GPC του «arm-first» αστεροειδούς διαδρομερούς συμπολυμερούς (DMAEMA_{18-b}-HEGMA₂)-star και των δύο γραμμικών πρόδρομων μορίων του. Η κατανομή των μοριακών βαρών (KMB) του γραμμικού πρόδρομου ομοπολυμερούς του DMAEMA ήταν μονοδιάσπαρτη και αρκετά στενή, όπως ήταν αναμενόμενο. Η KMB του γραμμικού πρόδρομου διαδρομερούς συμπολυμερούς DMAEMA_{18-b}-HEGMA₂ ήταν επίσης μονοδιάσπαρτη και στενή χωρίς ίχνη από την κορυφή του γραμμικού ομοπολυμερούς. Αυτό επιβεβαιώνει ότι όλο το γραμμικό ομοπολυμερές αντέδρασε για να μετατραπεί σε γραμμικό διαδρομερές συμπολυμερές, κάτι που ήταν αναμενόμενο για μία ζωντανή μέθοδο πολυμερισμού, όπως

ο GTP. Η ΚΜΒ του «arm-first» αστεροειδούς διαδρομερούς συμπολυμερούς (DMAEMA₁₈-*b*-HEGMA₂)-*star* παρουσίασε δύο κορυφές. Η κορυφή σε μικρότερο όγκο έκλυσης αντιστοιχεί σε μεγαλύτερου ΜΒ πολυμερές και αυτό ήταν το αστεροειδές διαδρομερές συμπολυμερές, ενώ σε μεγαλύτερο όγκο έκλυσης αντιστοιχεί στο γραμμικό διαδρομερές συμπολυμερές το οποίο δεν μετατράπηκε σε αστεροειδές πολυμερές.



Σχήμα 3.6. Χρωματογραφήματα GPC του «arm-first» αστεροειδούς διαδρομερούς συμπολυμερούς (DMAEMA₁₈-*b*-HEGMA₂)-*star* και των δύο γραμμικών πρόδρομων μορίων του.

Ανάλογες ΚΜΒ παρατηρήθηκαν και στα χρωματογραφήματα GPC όλων των αστεροειδών πολυμερών. Σε όλες τις περιπτώσεις «arm-first» αστεροειδών πολυμερών παρατηρήθηκαν δύο κορυφές, μία για το αστεροειδές πολυμερές και μία μικρότερου σχετικού εμβαδού (< 10 %) για το γραμμικό πολυμερές. Η μη πλήρης μετατροπή των γραμμικών πολυμερών σε αστεροειδή πολυμερή μπορεί να οφείλεται στο αυξημένο ιξώδες του διαλύματος, στη μικρότερη κινητικότητα των αλυσίδων, σε τερματισμό του πολυμερισμού ή/και σε αντιδράσεις μεταφοράς (Vamvakaki et al 2001). Ατελής ενσωμάτωση των βραχιόνων παρατηρήθηκε επίσης σε ανιοντικό πολυμερισμό (Tsitsilianis et al 1997) καθώς και σε «ζωντανό» κατιοντικό (Kanaoka et al 1992), όπου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

παρασκευάστηκαν «arm-first» αστεροειδή πολυμερή με αποδόσεις ενσωμάτωσης των βραχιόνων κοντά στο 85 %.

Τα M_n , M_p και οι δείκτες πολυδιασποράς MB, ΔΠMB ή M_w/M_n για τα αστεροειδή πολυμερή DMAEMA-HEGMA και για τα πρόδρομα μόριά τους, όπως αυτά προσδιορίστηκαν από τη χρωματογραφία GPC, δίνονται στον Πίνακα 3.1. Τα M_n των γραμμικών πρόδρομων μορίων ήταν λίγο μεγαλύτερα από τα θεωρητικά αναμενόμενα MB, τα οποία επίσης δίνονται στον ίδιο πίνακα, λόγω μερικής απενεργοποίησης του

Πίνακας 3.1 MB και ΔΠMB των αστεροειδών συμπολυμερών DMAEMA-HEGMA και των πρόδρομων μορίων τους.

α/α	Πολυμερές	Θεωρητικό MW ¹	Αποτελέσματα GPC		
			M_n	M_p	M_w/M_n
1	DMAEMA ₂₀	3240	3170	3370	1.10
	DMAEMA ₂₀ -star	*	49500	56900	1.32
2	DMAEMA ₁₈	2930	3460	3650	1.12
	DMAEMA ₁₈ -b-HEGMA ₂	3630	4170	4530	1.12
	(DMAEMA ₁₈ -b-HEGMA ₂)-star	*	48300	55390	1.28
3	HEGMA ₂	800	1150	1910	1.45
	HEGMA ₂ -b-DMAEMA ₁₈	3680	5450	5620	1.09
	(HEGMA ₂ -b-DMAEMA ₁₈)-star	*	67100	68700	1.29
4	DMAEMA ₁₈ -co-HEGMA ₂	3630	3510	3750	1.11
	(DMAEMA ₁₈ -co-HEGMA ₂)-star	*	51200	56900	1.27
5	DMAEMA ₁₈	2930	4930	5050	1.08
	DMAEMA ₁₈ -star	*	81800	78600	1.38
	DMAEMA ₁₈ -star-HEGMA ₂	*	95400	89900	1.37

¹Συμπεριλαμβάνονται 100 g mol⁻¹ από τον εκκινητή τα οποία ενσωματώνονται στο πολυμερές

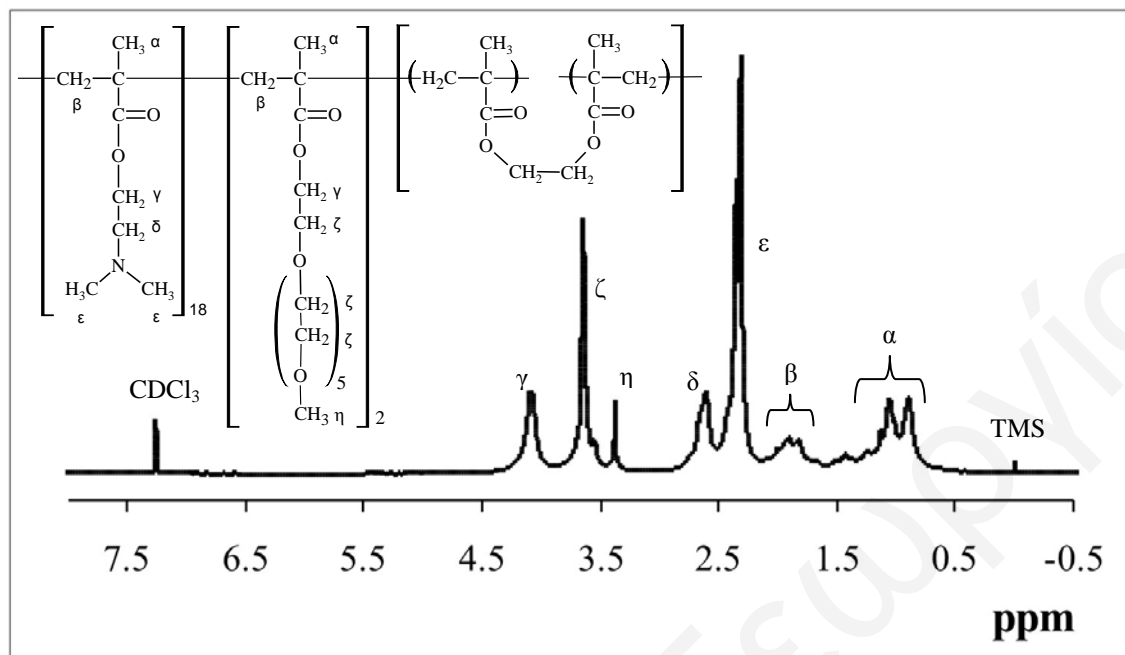
*Δεν μπορεί να υπολογισθεί γιατί ο αριθμός των βραχιόνων των αστεροειδών πολυμερών δεν είναι γνωστός *a priori*.

εκκινητή. Τα M_n των «arm-first» αστεροειδών πολυμερών κυμάνθηκαν μεταξύ 48300 και 81800 g mol⁻¹ και ήταν 11 – 17 φορές μεγαλύτερα από ό,τι τα αντίστοιχα γραμμικά πολυμερή. Το M_n του «in-out» αστεροειδούς συμπολυμερούς, DMAEMA₂₀-star-HEGMA₂, βρέθηκε ίσο με 95400 g mol⁻¹, μεγαλύτερο από αυτά όλων των «arm-first» πολυμερών. Οι ΔΠΜΒ των γραμμικών πρόδομων πολυμερών ήταν ίσοι ή μικρότεροι από 1.12, αρκετά χαμηλοί και κρίνονται ικανοποιητικοί για ζωντανή μέθοδο πολυμερισμού, με εξαίρεση το HEGMA₂, γραμμικό πρόδομο πολυμερές του αστεροειδούς συμπολυμερούς (HEGMA₂-b-DMAEMA₁₈)-star του οποίου ο ΔΠΜΒ βρέθηκε να ήταν ίσος με 1.45. Οι ΔΠΜΒ των αστεροειδών πολυμερών ήταν ίσοι ή μικρότεροι του 1.38, ικανοποιητικοί για αστεροειδή πολυμερή.

Τα φάσματα ¹H NMR των αστεροειδών συμπολυμερών επιβεβαίωσαν την παρουσία των αναμενόμενων χαρακτηριστικών κορυφών των μονάδων HEGMA και DMAEMA. Ένα χαρακτηριστικό φάσμα αυτών των συμπολυμερών όπου φαίνονται αυτές οι χαρακτηριστικές κορυφές παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.7. Στον Πίνακα 3.2 δίνονται οι θεωρητικά αναμενόμενες και οι πειραματικά προσδιορισθείσες από ¹H NMR συστάσεις των αστεροειδών πολυμερών DMAEMA – HEGMA. Για τον υπολογισμό της σύστασης των αστεροειδών συμπολυμερών επιλέγηκαν οι κορυφές ε (στα 2.3 ppm όπου αναλογούν 6 πρωτόνια) και η (στα 3.3 ppm όπου αναλογούν σε 3 πρωτόνια) των επαναλαμβανόμενων μονάδων DMAEMA και HEGMA, αντίστοιχα. Όλες οι πειραματικά προσδιορισθείσες συστάσεις δείχνουν τα συμπολυμερή να είναι λίγο περισσότερο εμπλουτισμένα σε HEGMA, από ό,τι αναμενόταν θεωρητικά.

Πίνακας 3.2 Σύσταση των αστεροειδών πολυμερών DMAEMA – HEGMA.

α/α	Πολυμερές	% mol σύσταση σε HEGMA	
		Πειραματικό, ¹ H NMR	Θεωρητικό
1	DMAEMA ₂₀ -star	0	0
2	(DMAEMA ₁₈ -b-HEGMA ₂)-star	14	10
3	(HEGMA ₂ -b-DMAEMA ₁₈)-star	12	10
4	(DMAEMA ₁₈ -co-HEGMA ₂)-star	15	10
5	DMAEMA ₁₈ -star-HEGMA ₂	12	10



Σχήμα 3.7. Φάσμα ^1H NMR του «arm-first» αστεροειδούς συμπολυμερούς $(\text{DMAEMA}_{18}\text{-}b\text{-HEGMA}_2)\text{-star}$ σε CDCl_3 .

3.1.2.3. Χαρακτηρισμός σε Υδατικά Διαλύματα

Τα αστεροειδή συμπολυμερή DMAEMA-HEGMA χαρακτηρίστηκαν σε 1% κ.β. υδατικά διαλύματα ως προς τις υδροδυναμικές τους διαμέτρους, τα M_w , τον αριθμό βραχιόνων τους, τα φαινόμενα pK και τις θερμοκρασίες νεφέλωσης. Τα αποτελέσματα συζητούνται στις επόμενες αντίστοιχες παραγράφους.

3.1.2.3.1. Υδροδυναμικές Διάμετροι

Οι πειραματικά προσδιορισθείσες υδροδυναμικές διάμετροι των αστεροειδών συμπολυμερών DMAEMA – HEGMA δίνονται στον Πίνακα 3.3. Στον ίδιο πίνακα δίνεται επίσης και το θεωρητικό ανώτατο όριο των υδροδυναμικών διαμέτρων των αστεροειδών συμπολυμερών, το οποίο προβλέπει ότι οι βραχίονες βρίσκονται σε πλήρως εκτεταμένη μορφή. Συγκεκριμένα, η μέγιστη διάμετρος των αστεροειδών πολυμερών ισοδυναμεί με το διπλάσιο του τοπογραφικού μήκους (contour length) της αλυσίδας ενός βραχίονα, το οποίο υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας το ΒΠ του βραχίονα επί τη συνεισφορά μίας μονάδας μονομερούς στο τοπογραφικό μήκος που είναι ίση με 0.254

nm (Hiemenz, 1984(α)). Όλα τα διαλύματα των αστεροειδών πολυμερών παρουσίασαν μία κατανομή υδροδυναμικών διαμέτρων με 2-3 μέγιστα, τα οποία αντιστοιχούν σε γραμμικά πρόδρομα πολυμερή, σε αστεροειδή πολυμερή, και σε συσσωματώματα των αστεροειδών πολυμερών. Παρόμοιες κατανομές υδροδυναμικών διαμέτρων παρατηρήθηκαν και στα αστεροειδή ομοπολυμερή του DMAEMA (Georgiou et al, 2004 (β)).

Πίνακας 3.3 Υδροδυναμικές διαμέτροι και φαινόμενα pK των αστεροειδών πολυμερών DMAEMA – HEGMA.

α/α	Πολυμερές	Υδροδυναμική Διάμετρος (nm)		pK
		Πειραματική ¹	Θεωρητική	
1	DMAEMA ₂₀ -star	6.7, 19.5 , 72.0	10.7	7.0
2	(DMAEMA ₁₈ -b-HEGMA ₂)-star	5.7, 15.4 , 53.4	10.7	7.2
3	(HEGMA ₂ -b-DMAEMA ₁₈)-star	2.3, 7.6, 29.0	10.7	7.1
4	(DMAEMA ₁₈ -co-HEGMA ₂)-star	8.4	10.7	7.2
5	DMAEMA ₁₈ -star-HEGMA ₂	8.3, 35.4 , 101.7	9.7	7.0

¹Η πειραματική υδροδυναμική διάμετρος που παρουσιάζεται με τονισμένα (bold) γράμματα αντιστοιχεί στην κορυφή της κατανομής των διαμέτρων που έχει το μεγαλύτερο εμβαδό για το κάθε αστεροειδές πολυμερές.

Στον Πίνακα 3.3 όπου δίνονται τα μέγιστα της κατανομής των υδροδυναμικών διαμέτρων με τονισμένα (bold) γράμματα δίνεται το μέγιστο της κορυφής με το μεγαλύτερο εμβαδό για κάθε δείγμα αστεροειδούς πολυμερούς. Σε όλες τις περιπτώσεις το μέγιστο αυτό αντιστοιχεί στα συσσωματώματα των αστεροειδών πολυμερών, με εξαίρεση το τυχαίο αστεροειδές συμπολυμερές (DMAEMA₁₈-co-HEGMA₂)-star, του οποίου η κορυφή με το μεγαλύτερο εμβαδό αντιστοιχεί στο αστεροειδές συμπολυμερές. Τα συσσωματώματα των αστεροειδών πολυμερών σχηματίζονται εύκολα λόγω της παρουσίας του υδρόφοβου EGDMA, όπως και παρατηρήθηκε για αστεροειδή ομοπολυμερή του DMAEMA (Georgiou et al, 2004 (β)). Οι υδροδυναμικές διαμέτροι που αντιστοιχούν στα αστεροειδή πολυμερή κυμάνθηκαν μεταξύ 5.7 και 8.4 nm,

μικρότερες από το ανώτατο θεωρητικό όριο γιατί οι βραχίονες τους δεν αναμένεται να είναι πλήρως εκτεταμένοι.

3.1.2.3.2. Φαινόμενα pK

Τα φαινόμενα pK των μονάδων του DMAEMA για τα αστεροειδή συμπολυμερή DMAEMA – HEGMA υπολογίστηκαν ως το pH που αντιστοιχεί όταν το 50% των μονάδων του DMAEMA είναι ιονισμένες. Τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 3.3. Οι τιμές των pK κυμάνθηκαν μεταξύ 7.0 και 7.2, και συμφωνούν με τις τιμές των pK γραμμικών συμπολυμερών τα οποία περιείχαν DMAEMA και παρουσίασαν $pK=7.5$ (Simmons και Patrekiος, 1998) και αντίστοιχων αστεροειδών ομοπολυμερών του DMAEMA που δίνουν pK από 6.6 ως 7.0 (Georgiou et al 2004).

3.1.2.3.3. M_w και Αριθμός Βραχιόνων

Τα M_w των αστεροειδών πολυμερών προσδιορίστηκαν με SLS. Επειδή όμως ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το νερό και τα πολυμερή αυτά, όπως διαπιστώθηκε και από την DLS στο νερό, σχηματίζουν συσσωματώματα, τα MB που προσδιορίστηκαν είναι πολύ μεγάλα και δεν ανταποκρίνονται στην πραγματική τους τάξη μεγέθους. Συγκεκριμένα, τα M_w κυμαίνονται μεταξύ 350 000 ως και 2 740 000 $g\ mol^{-1}$, τα οποία με διαίρεση τα με τα MB των αντίστοιχων πρόδρομών τους γραμμικών πολυμερών, δίνουν ένα εύρος τιμών για τον αριθμό βραχιόνων των αστεροειδών πολυμερών μεταξύ 110 και 550. Οι τιμές αυτές αποτελούν υπερεκτίμηση του αριθμού των βραχιόνων, καθώς αυτές δεν αντιστοιχούν σε αστεροειδή πολυμερή αλλά σε συσσωματώματά τους.

3.1.2.3.4. Θερμοκρασίες Νεφέλωσης

Κανένα από τα διαλύματα των αστεροειδών πολυμερών δεν παρουσίασε ένα εμφανές σημείο νεφέλωσης, δηλαδή το διάλυμα δεν παρουσίασε καταβύθιση πολυμερούς σε καμία θερμοκρασία μεταξύ 20 και 90 °C. Παρόλα, αυτά, όμως τα αστεροειδή συμπολυμερή και το ομοπολυμερές του DMAEMA παρουσίασαν μικρή θόλωση (~ 0.2 a.u.) μεταξύ 35 και 39 °C και στους 30 °C, αντίστοιχα.

3.1.2.4. Εφαρμογή στην Επιμόλυνση

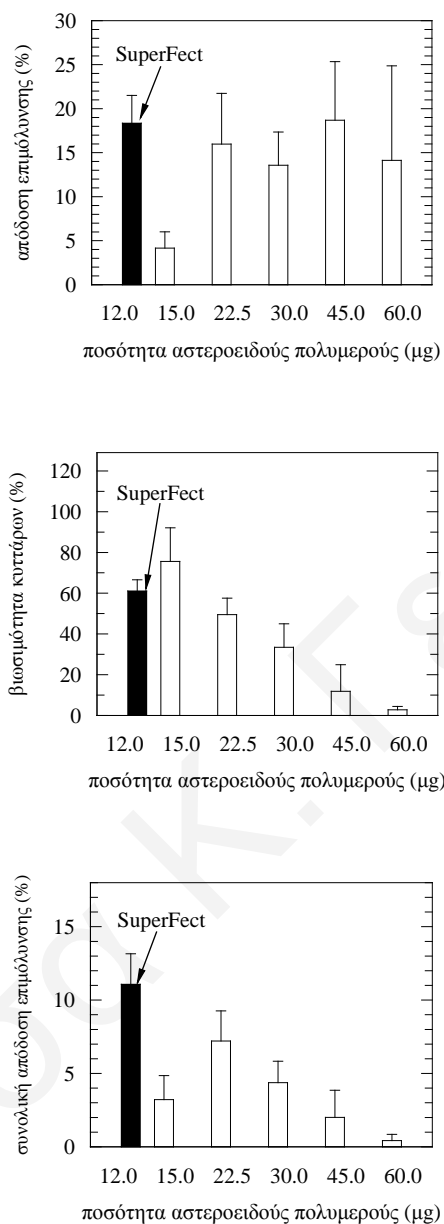
Τα αστεροειδή συμπολυμερή DMAEMA – HEGMA αξιολογήθηκαν στην επιμόλυνση. Είναι η πρώτη φορά που χρησιμοποιήθηκαν αστεροειδή συμπολυμερή σαν οχήματα μεταφοράς γενετικού υλικού (Georgiou et al, 2005), παρόλο που έχει αναφερθεί η συμπλοκοποίηση αστεροειδών συμπολυμερών PEI με το DNA (Petersen et al, 2002). Αυτά τα αστεροειδή πολυμερή τα οποία αποτελούνται από μονάδες PEG στον πυρήνα και PEI στο κέλυφος έχουν χρησιμοποιηθεί για συμπλοκοποίηση του DNA αλλά δεν έχουν δοκιμαστεί ακόμη στην επιμόλυνση. Τα αστεροειδή συμπολυμερή DMAEMA – HEGMA χρησιμοποιήθηκαν σαν οχήματα μεταφοράς γενετικού υλικού, χρησιμοποιώντας το ίδιο πλασμιδιακό DNA και κύτταρα όπως και τα αντίστοιχα αστεροειδή ομοπολυμερή του DMAEMA, και αξιολογήθηκαν προσδιορίζοντας την απόδοση επιμόλυνσης, τη βιωσιμότητα των κυττάρων και τη συνολική απόδοση της επιμόλυνσης ως προς την ποσότητα των αστεροειδών πολυμερών και την αρχιτεκτονική τους.

Επίδραση της Ποσότητας του Αστεροειδούς Πολυμερούς.

Στο Σχήμα 3.8 παρουσιάζεται η επίδραση της ποσότητας του αστεροειδούς πολυμερούς στην επιμόλυνση για το κάθε ένα από τα πολυμερή: (α) DMAEMA₂₀-star, (β) (DMAEMA₁₈-b-HEGMA₂)-star, (γ) (HEGMA₂-b-DMAEMA₁₈)-star, (δ) (DMAEMA₁₈-co-HEGMA₂)-star, και (ε) DMAEMA₁₈-star-HEGMA₂. Η ποσότητα του αστεροειδούς πολυμερούς που δοκιμάστηκε στα πειράματα της επιμόλυνσης κυμάνθηκε μεταξύ 15 και 60 ή 115 μg, ενώ η ποσότητα του πλασμιδιακού DNA που χρησιμοποιήθηκε κρατήθηκε σταθερή στα 3 μg. Τα αποτελέσματα στην επιμόλυνση του εμπορικά διαθέσιμου μεταφορέα SuperFect στις βέλτιστες συνθήκες απόδοσής του (12 μg SuperFect και 1 μg πλασμιδιακού DNA) παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα στο Σχήμα 3.8.

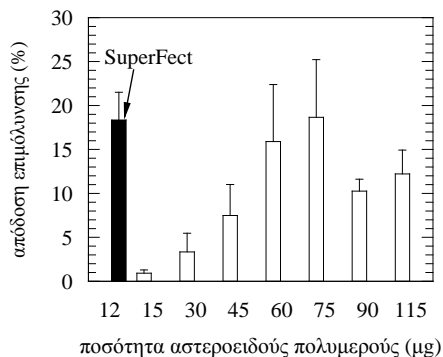
Η απόδοση επιμόλυνσης για όλα τα αστεροειδή πολυμερή της ομάδας DMAEMA-HEGMA ως προς την ποσότητα του αστεροειδούς πολυμερούς παρουσίασε ένα μικρό μέγιστο, το οποίο αντιστοιχεί στις συνθήκες όπου το σύμπλοκο DNA/πολυμερούς παρουσιάζει τις βέλτιστες φυσικοχημικές ιδιότητες δηλαδή το

(α) DMAEMA₂₀-star

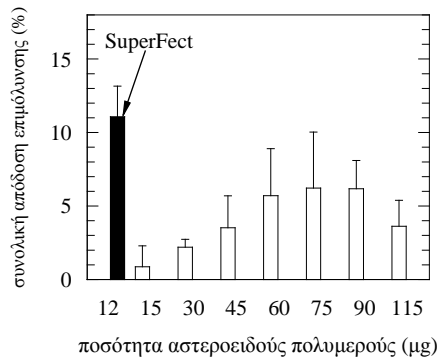
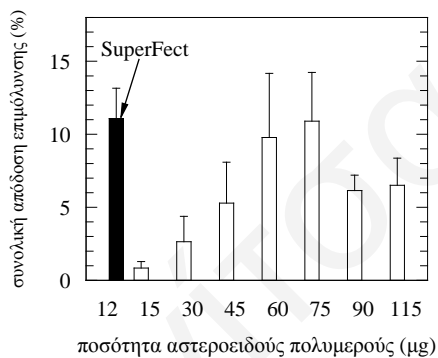
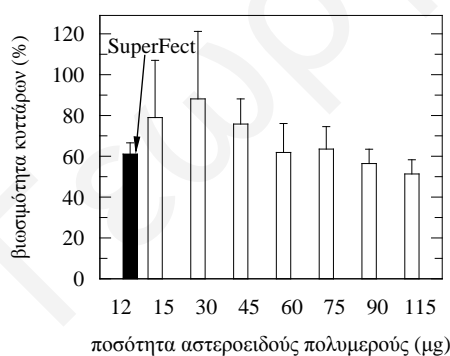
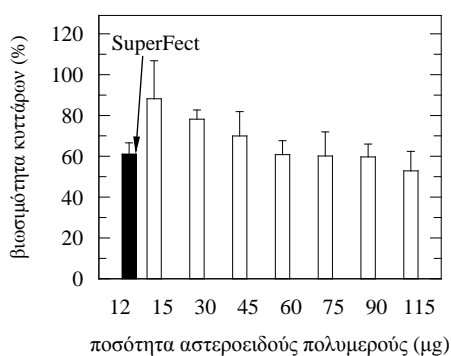
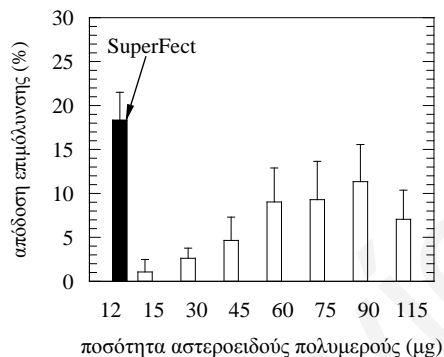


Σχήμα 3.8 (α) Εξάρτηση της απόδοσης της επιμόλυνσης, της βιωσιμότητας των κυττάρων και της συνολικής απόδοσης της επιμόλυνσης από την ποσότητα του αστεροειδούς πολυμερούς DMAEMA₂₀-star για σταθερή ποσότητα πλασμιδιακού DNA 3 μg (άσπρο χρώμα). Το δένδριμερές SuperFect στις βέλτιστές του συνθήκες (12 μg SuperFect και 1 μg πλασμιδιακό DNA) απεικονίζεται με μαύρο χρώμα στις αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις.

(β) (DMAEMA₁₈-*b*-HEGMA₂)-*star*

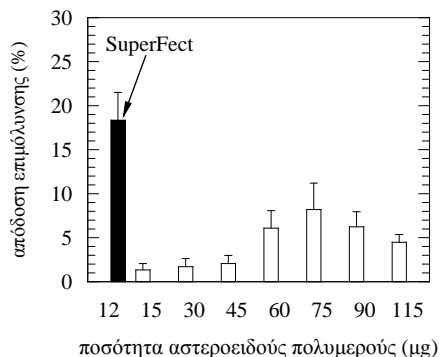


(γ) (HEGMA₂-*b*-DMAEMA₁₈)-*star*

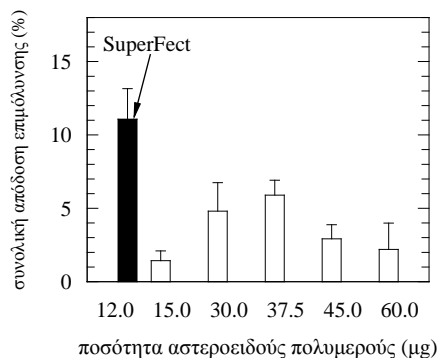
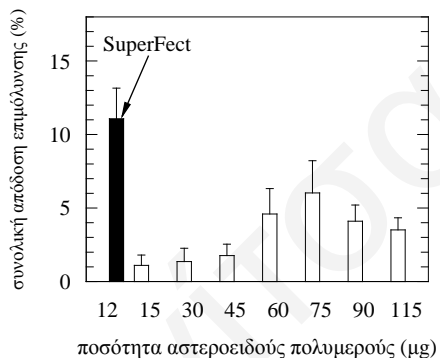
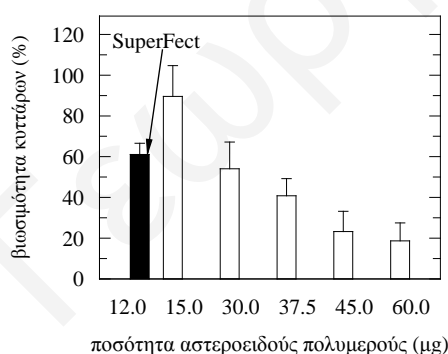
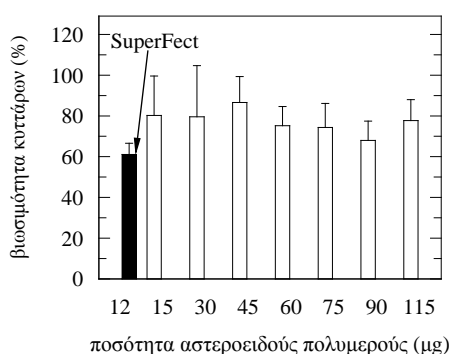
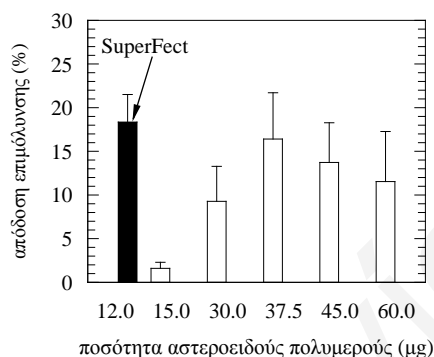


Σχήμα 3.8 (β) και (γ) Εξάρτηση της απόδοσης της επιμόλυνσης, της βιωσιμότητας των κυττάρων και της συνολικής απόδοσης της επιμόλυνσης από την ποσότητα του αστεροειδούς πολυμερούς (β) (DMAEMA₁₈-*b*-HEGMA₂)-*star* και (γ) (HEGMA₂-*b*-DMAEMA₁₈)-*star* για σταθερή ποσότητα πλασμιδιακού DNA 3 μg (άσπρο χρώμα). Το δενδριμερές SuperFect στις βέλτιστες του συνθήκες (12 μg SuperFect και 1 μg πλασμιδιακό DNA) απεικονίζεται με μαύρο χρώμα στις αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις.

(δ) (DMAEMA_{18-co}-HEGMA₂)-star



(ε) DMAEMA_{18-star}-HEGMA₂



Σχήμα 3.8 (δ) και (ε) Εξάρτηση της απόδοσης της επιμόλυνσης, της βιωσιμότητας των κυττάρων και της συνολικής απόδοσης της επιμόλυνσης από την ποσότητα του αστεροειδούς πολυμερούς (δ) (DMAEMA_{18-co}-HEGMA₂)-star και (ε) DMAEMA_{18-star}-HEGMA₂ για σταθερή ποσότητα πλασμιδιακού DNA 3 μg (άσπρο χρώμα). Το δενδριμερές SuperFect στις βέλτιστες του συνθήκες (12 μg SuperFect και 1 μg πλασμιδιακό DNA) απεικονίζεται με μαύρο χρώμα στις αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις.

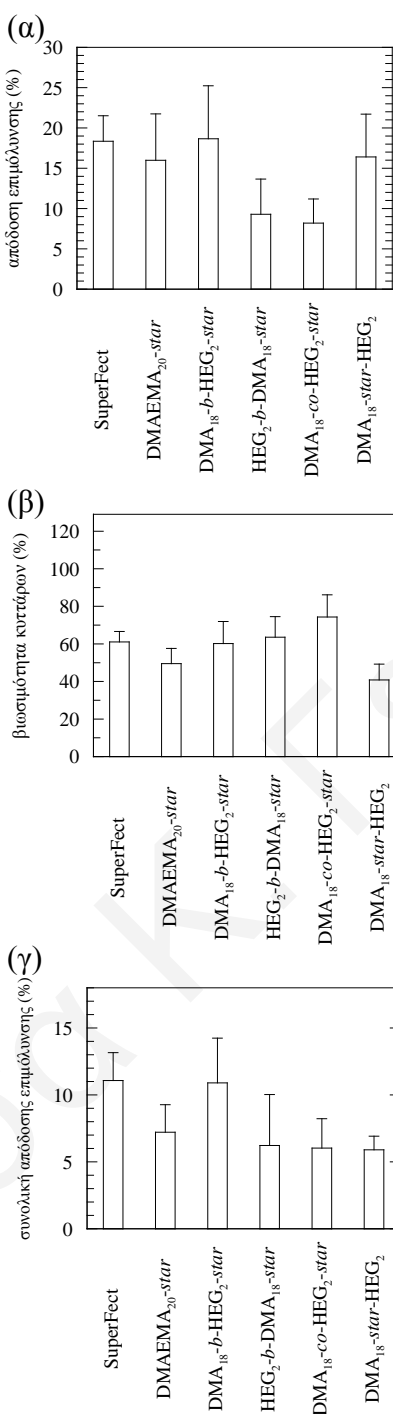
βέλτιστο φορτίο και μέγεθος (van de Wetering et al, 1998). Η απόδοση της επιμόλυνσης για τα τρία «arm-first» αστεροειδή συμπολυμερή, (DMAEMA₁₈-*b*-HEGMA₂)-*star*, (HEGMA₂-*b*-DMAEMA₁₈)-*star* και (DMAEMA₁₈-*co*-HEGMA₂)-*star* παρουσίασε μέγιστο στα ~ 75 μg, ενώ το μέγιστο της απόδοσης της επιμόλυνσης για τα άλλα δύο αστεροειδή πολυμερή, το ομοπολυμερές και το ετεροβραχιονικό, ήταν σε μικρότερες ποσότητες πολυμερούς ~ 40 μg. Η παρόμοια συμπεριφορά του ετεροβραχιονικού συμπολυμερούς με το αστεροειδές ομοπολυμερές του DMAEMA μπορεί να οφείλεται στη θέση των μονάδων του HEGMA στον πυρήνα του ετεροβραχιονικού πολυμερούς (βλέπε Σχήμα 3.5) οι οποίες δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν εύκολα με άλλα μόρια και, συγκεκριμένα, με το πλασμιδιακό DNA. Επομένως, το ετεροβραχιονικό αστεροειδές συμπολυμερές συμπεριφέρεται το ίδιο αποδοτικά με το αντίστοιχο ομοπολυμερές του DMAEMA.

Επιπρόσθετα, τα δύο αυτά αστεροειδή πολυμερή, το ομοπολυμερές του DMAEMA και το ετεροβραχιονικό συμπολυμερές, μαζί με το (DMAEMA₁₈-*b*-HEGMA₂)-*star* παρουσίασαν μέγιστη απόδοση επιμόλυνσης κοντά στο 17% η οποία είναι η ίδια με αυτή του SuperFect. Τα άλλα δύο αστεροειδή συμπολυμερή, (HEGMA₂-*b*-DMAEMA₁₈)-*star* και (DMAEMA₁₈-*co*-HEGMA₂)-*star*, παρουσίασαν μικρότερο μέγιστο απόδοσης επιμόλυνσης, κοντά στο 10%, το οποίο μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία των μονάδων του μη-ιοντικού HEGMA στην περιφέρεια αυτών των αστεροειδών συμπολυμερών και επομένως στο σχηματισμό συμπλόκων λιγότερο συμπαγούς δομής με το DNA.

Η παράμετρος της βιωσιμότητας των κυττάρων παρουσιάστηκε να μειώνεται με αύξηση της ποσότητας του αστεροειδούς πολυμερούς για όλα τα αστεροειδή πολυμερή, υποδεικνύοντας έτσι τη γνωστή τοξικότητα αυτών των συνθετικών οχημάτων μεταφοράς (van de Wetering et al 1999). Η μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων ήταν πιο απότομη για το αστεροειδές ομοπολυμερές του DMAEMA και το ετεροβραχιονικό αστεροειδές συμπολυμερές, λόγω ισχυρότερης αλληλεπίδρασης μεταξύ αυτών των κατιοντικών πολυμερών και των αρνητικά φορτισμένων κυτταρικών μεμβρανών, η οποία οδηγεί στην αποσταθεροποίησή τους και, επομένως, σε κυτταρικό θάνατο. Συμπεραίνεται, έτσι, ότι λόγω της αρχιτεκτονικής αυτών των δύο αστεροειδών συμπολυμερών στην οποία οι μονάδες του θετικά φορτισμένου DMAEMA είναι στο

εξωτερικό του πολυμερούς, αυτά τα πολυμερή αλληλεπιδρούν ισχυρά με αντίθετα φορτισμένα μόρια σχηματίζοντας έτσι σταθερότερα σύμπλοκα με το DNA. Τα άλλα τρία αστεροειδή συμπολυμερή παρουσίασαν μεγαλύτερες τιμές βιωσιμότητας των κυττάρων συγκριτικά με τα δύο πολυμερή που προαναφέρθηκαν, η οποία δεν παρουσιάστηκε να μειώνεται τόσο δραστικά με αύξηση της ποσότητας του πολυμερούς, λόγω της παρουσίας των μονάδων του HEGMA στην εξωτερική περιοχή των πολυμερών. Η αύξηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με την εισαγωγή μονάδων PEG σε συνθετικά οχήματα μεταφοράς γενετικού υλικού είναι κάτι που έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Deshpande et al 2004, Luo et al 2002, Kim et al 2004, Van de Wetering et al, 1998 και 2000, Wakebayashi et al, 2004). Εδώ πρέπει να αναφερθεί το γεγονός ότι οι τιμές της βιωσιμότητας των κυττάρων στα Σχήματα 3.8 (β), (γ) και (δ) σχεδόν σε όλες τις ποσότητες συμπολυμερών που δοκιμάστηκαν ήταν μεγαλύτερες από την αντίστοιχη τιμή της βιωσιμότητας των κυττάρων που παρουσίασε το SuperFect στις βέλτιστες του συνθήκες.

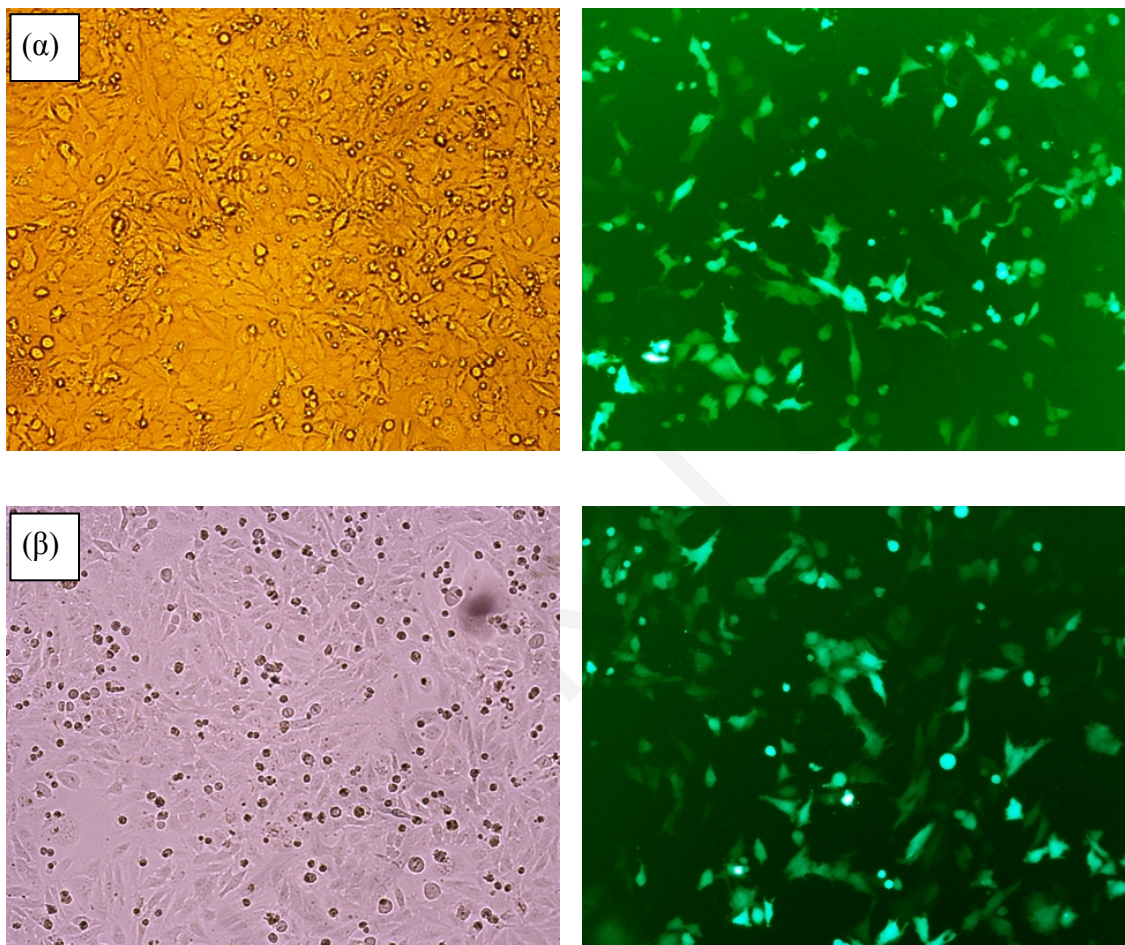
Η συνολική απόδοση της επιμόλυνσης, σε όλες τις περιπτώσεις (για όλα τα αστεροειδή πολυμερή), παρουσίασε μέγιστο σε σχέση με την ποσότητα του πολυμερούς. Αυτό οφείλεται στον ορισμό της παραμέτρου αυτής, η οποία, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ισούται με την απόδοση επιμόλυνσης επί τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Επομένως, αφού η απόδοση της επιμόλυνσης παρουσίασε μέγιστο ως προς την ποσότητα του πολυμερούς, ενώ η βιωσιμότητα κυττάρων, στις περισσότερες περιπτώσεις παρουσίασε μία μικρή μείωση με αύξηση της ποσότητας του πολυμερούς, η συνολική απόδοση επιμόλυνσης παρουσίασε μέγιστο. Τη μεγαλύτερη τιμή συνολικής απόδοσης της επιμόλυνσης, 11%, παρουσίασε το αστεροειδές συμπολυμερές (DMAEMA₁₈-b-HEGMA₂)-star σε ποσότητα 75 μg. Το SuperFect, στις βέλτιστες του συνθήκες, παρουσίασε ακριβώς την ίδια συνολική απόδοση επιμόλυνσης. Για καλύτερη σύγκριση των πολυμερών, από τις αντίστοιχες τιμές της συνολικής απόδοσης επιμόλυνσης στο μέγιστο για κάθε ένα από τα πολυμερή, συμπεριλαμβανομένου και του SuperFect, κατασκευάστηκε το Σχήμα 3.9.



Σχήμα 3.9. Εξάρτηση (α) της απόδοσης της επιμόλυνσης, (β) της βιωσιμότητας των κυττάρων και (γ) της συνολικής απόδοσης επιμόλυνσης από το είδος του πολυμερούς: του δενδριμερούς SuperFect, ενός αστεροειδούς ομοπολυμερούς του DMAEMA και των τεσσάρων αστεροειδών συμπολυμερών DMAEMA – HEGMA στις βέλτιστές τους συνθήκες.

Επίδραση της Αρχιτεκτονικής των Πολυμερών.

Στο Σχήμα 3.9 παρουσιάζεται η εξάρτηση της απόδοσης της επιμόλυνσης, της βιωσιμότητας των κυττάρων και της συνολικής απόδοσης της επιμόλυνσης από την αρχιτεκτονική των αστεροειδών πολυμερών DMAEMA – HEGMA που αξιολογήθηκαν



Σχήμα 3.10. Φωτογραφίες των κυττάρων κάτω από κανονικό φως (αριστερά) και κάτω από λάμπα φθορισμού (δεξιά) όταν τα κύτταρα επιμολύνθηκαν χρησιμοποιώντας (α) το πολυμερές (DMAEMA₁₈-*b*-HEGMA₂)-*star* και (β) το SuperFect. Τα κύτταρα που φθορίζουν (πράσινο χρώμα στις δεξιές εικόνες) είναι αυτά στα οποία το DNA έχει μεταφερθεί επιτυχώς στον πυρήνα και έχει μεταφραστεί στην πρωτεΐνη.

και του SuperFect, στο αντίστοιχο μέγιστο της συνολικής απόδοσης επιμόλυνσης για το κάθε πολυμερές, δηλαδή στις βέλτιστές τους συνθήκες. Παρατηρώντας τις αντίστοιχες

γραφικές παραστάσεις (α) και (β) στο Σχήμα 3.8, μπορούν να εξηγηθούν τα αποτελέσματα στη γραφική παράσταση του Σχήματος 3.9 (γ). Οι καλύτεροι μεταφορείς γενετικού υλικού είναι τα πολυμερή (DMAEMA₁₈-*b*-HEGMA₂)-*star* και SuperFect, με τις μεγαλύτερες αντίστοιχες τιμές συνολικής απόδοσης επιμόλυνσης, αφού παρουσίασαν τις καλύτερες τιμές απόδοσης επιμόλυνσης και τιμές της βιωσιμότητας των κυττάρων όχι πολύ χαμηλότερες από τα υπόλοιπα πολυμερή. Τα πολυμερή DMAEMA₂₀-*star* και DMAEMA₁₈-*star*-HEGMA₂ παρουσίασαν ένα συνδυασμό υψηλών τιμών απόδοσης επιμόλυνσης και χαμηλών τιμών βιωσιμότητας των κυττάρων, ενώ τα αστεροειδή συμπολυμερή (HEGMA₂-*b*-DMAEMA₁₈)-*star* και (DMAEMA₁₈-*co*-HEGMA₂)-*star* παρουσίασαν το αντίθετο, χαμηλές τιμές απόδοσης επιμόλυνσης και ψηλές τιμές βιωσιμότητας των κυττάρων.

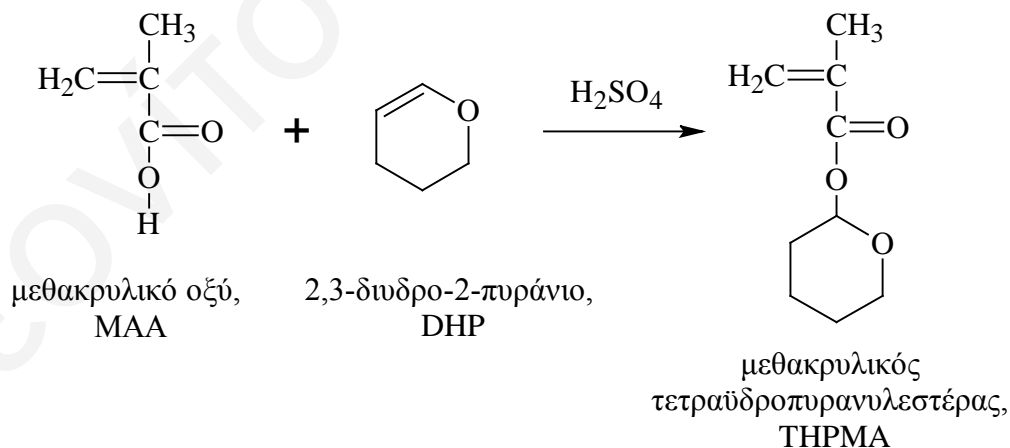
Στο Σχήμα 3.10 φαίνονται οι φωτογραφίες των κυττάρων κάτω από κανονικό φως (δεξιά) και κάτω από λάμπα φθορισμού (αριστερά) όταν τα κύτταρα επιμολύνθηκαν χρησιμοποιώντας τους δύο καλύτερους μεταφορείς: (α) το πολυμερές (DMAEMA₁₈-*b*-HEGMA₂)-*star* και (β) το SuperFect. Τα κύτταρα που φθορίζουν (πράσινο χρώμα στις δεξιές εικόνες) είναι αυτά στα οποία το DNA είχε μεταφερθεί επιτυχώς στον πυρήνα και είχε μεταφραστεί στην πρωτεΐνη.

Επομένως, από τα αποτελέσματα της επιμόλυνσης αστεροειδών πολυμερών DMAEMA – HEGMA παρατηρήθηκε, όπως και ήταν αναμενόμενο, ότι η εισαγωγή μονάδων HEGMA αυξάνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων (σύγκριση με το αντίστοιχο αστεροειδές ομοπολυμερές του DMAEMA). Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι η ποσότητα και η αρχιτεκτονική του αστεροειδούς πολυμερούς που χρησιμοποιείται είναι δύο σημαντικές παράμετροι για την επιμόλυνση. Ο καλύτερος μεταφορέας γενετικού υλικού από αυτή την ομάδα πολυμερών είναι το (DMAEMA₁₈-*b*-HEGMA₂)-*star*, που παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα, συγκρίσιμα με το SuperFect, έναν ακριβότερο, εμπορικά διαθέσιμο μεταφορέα.

3.1.3. Αστεροειδή Συμπολυμερή DMAEMA – MAA

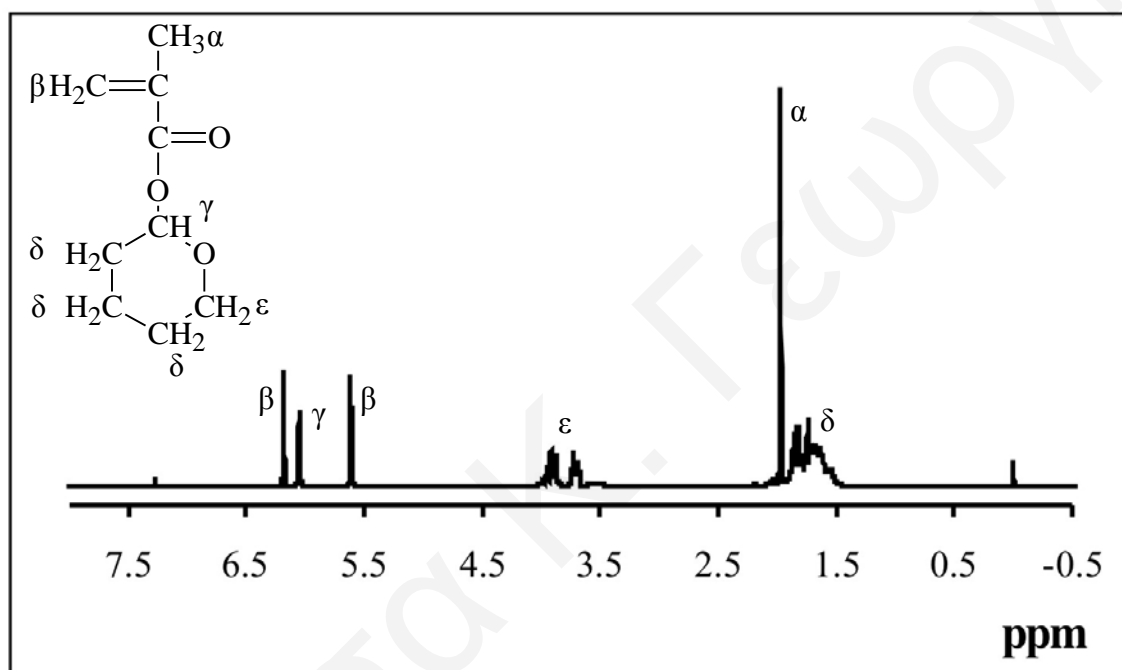
3.1.3.1. Σύνθεση

Η δεύτερη οικογένεια πολυμερών που συντέθηκε στα πλαίσια αυτής της Διδακτορικής Διατριβής αποτελείται από αστεροειδή συμπολυμερή του υδρόφιλου και θετικά ιονιζόμενου DMAEMA και του υδρόφιλου και αρνητικά ιονιζόμενου MAA. Μετά την εισαγωγή του υδρόφιλου μη ιοντικού μονομερούς HEGMA στα αστεροειδή πολυμερή και την ικανοποιητική απόδοσή τους στην επιμόλυνση, επιλέχθηκε η αντικατάσταση του μη ιοντικού υδρόφιλου μονομερούς με ένα υδρόφιλο ιονιζόμενο για να προσδιοριστεί αν η εισαγωγή ενός αρνητικού φορτίου θα επηρέαζε τη μεταφορά γενετικού υλικού στα κύτταρα. Η εισαγωγή ενός δεύτερου μονομερούς το οποίο έχει αρνητικό φορτίο ίσως να μη βοηθούσε στη συμπλοκοποίηση με το DNA αλλά θα μπορούσε να βοηθήσει στην απελευθέρωση του DNA από το σύμπλοκο και στη διέλευση του από τα ενδοσώματα μέσα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου μέσω του φαινομένου του «σφουγγαριού» των πρωτονίων (proton «sponge» effect) (βλέπε Κεφάλαιο 1: 1.4.4. σελ. 28) αυξάνοντας έτσι την απόδοση της επιμόλυνσης. Το γεγονός ότι πολυμερή με μονάδες MAA δεν έχουν χρησιμοποιηθεί σχεδόν καθόλου σαν συστατικά οχημάτων μεταφοράς γενετικού υλικού, και δεν έχει εξακριβωθεί ακριβώς ο τρόπος που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την επιμόλυνση, ήταν ένας ακόμη παράγοντας που μας ώθησε στη σύνθεση και τη μελέτη αυτών των αστεροειδών πολυμερών.



Σχήμα 3.11. Αντίδραση παρασκευής του μεθακρυλικού τετραϋδροπυρανυλεστέρα.

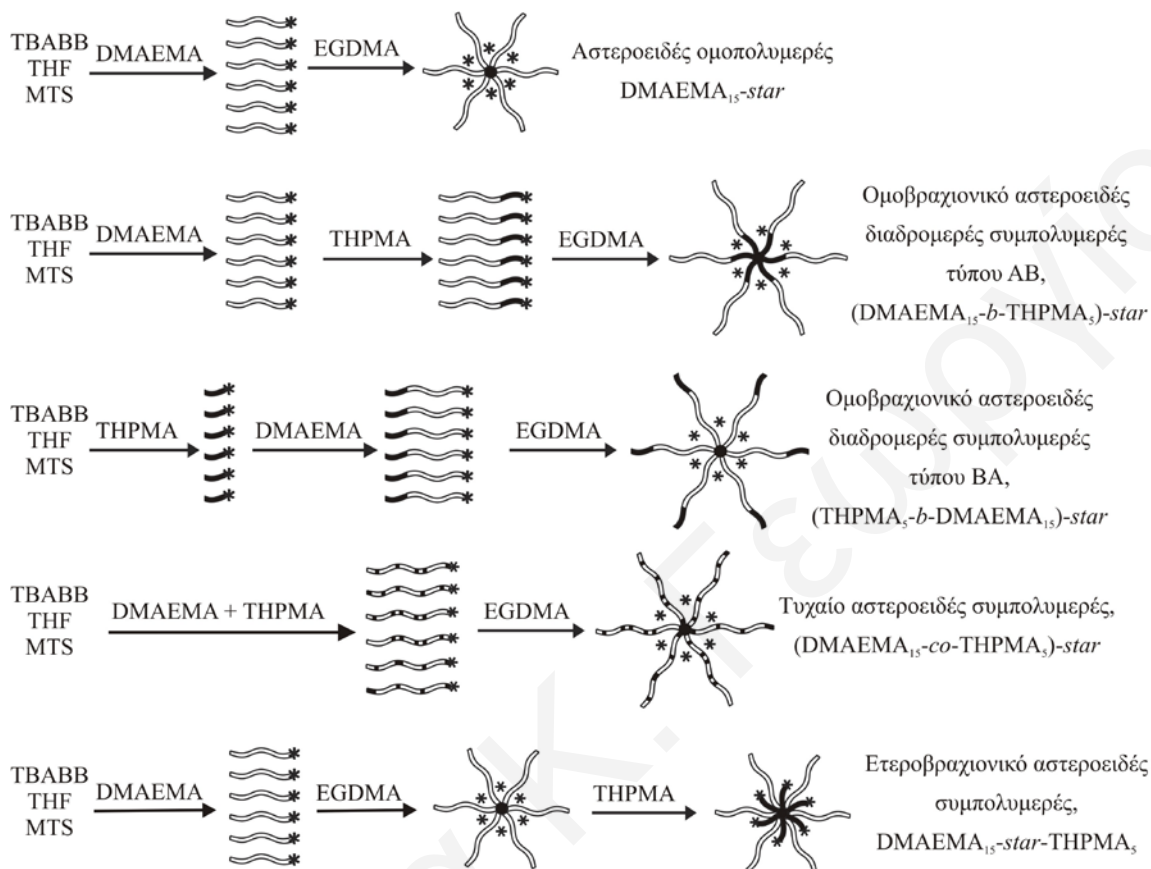
Επειδή το ΜΑΑ δεν μπορεί να πολυμεριστεί με GTP καθώς τα όξινα πρωτόνια τερματίζουν τον πολυμερισμό, για τη σύνθεση των αστεροειδών συμπολυμερών DMAEMA-ΜΑΑ ήταν απαραίτητη η προστασία του μονομερούς ΜΑΑ. Έτσι, συντέθηκε το υδρόφοβο μονομερές THPMA (βλέπε αντίδραση, Σχήμα 3.11), το οποίο ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία NMR (Σχήμα 3.12) και στη συνέχεια συμπολυμερίστηκε μαζί με το DMAEMA για να παρασκευαστούν αστεροειδή συμπολυμερή DMAEMA – THPMA.



Σχήμα 3.12. Φάσμα ¹H NMR του μονομερούς THPMA σε CDCl₃.

Συντέθηκαν τέσσερα αστεροειδή συμπολυμερή DMAEMA – THPMA, με 25% mol σε THPMA, διαφορετικών αρχιτεκτονικών. Στο Σχήμα 3.13 φαίνονται οι σχηματικές αναπαραστάσεις της διαδικασίας σύνθεσης των τεσσάρων συμπολυμερών: δύο ομοβραχιονικών, ενός ετεροβραχιονικού και ενός τυχαίου, και τα συντομογραφικά τους ονόματα. Μαζί με αυτά τα πολυμερή συντέθηκε και ένα ομοπολυμερές του DMAEMA, ανάλογου ΒΠ του βραχίονα, 15. Στη συνέχεια, οι μονάδες του THPMA των αστεροειδών συμπολυμερών DMAEMA – THPMA υδrolύθηκαν για να παρασκευαστούν τα επιθυμητά αστεροειδή συμπολυμερή DMAEMA – ΜΑΑ. Αυτά τα συμπολυμερή, μαζί με

το ομοπολυμερές του DMAEMA, χαρακτηρίστηκαν και στη συνέχεια αξιολογήθηκαν σαν οχήματα μεταφοράς γενετικού υλικού.

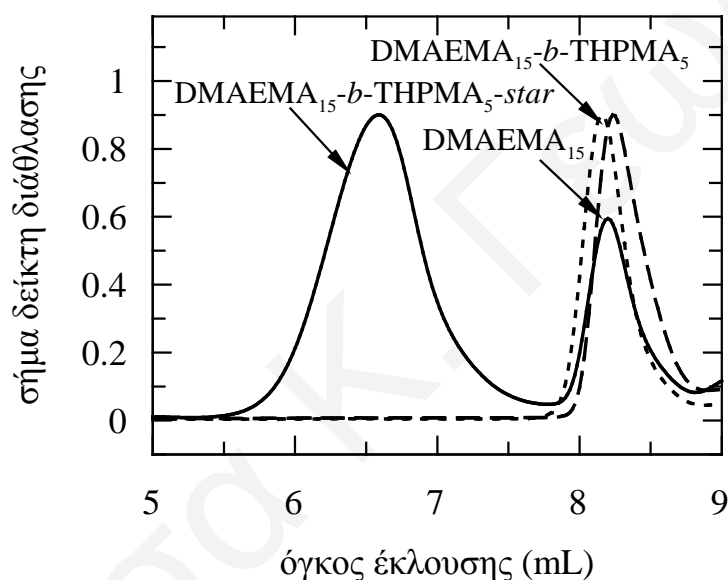


Σχήμα 3.13. Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την παρασκευή των τεσσάρων αστεροειδών συμπολυμερών DMAEMA – THPMA και ενός αστεροειδούς ομοπολυμερούς του DMAEMA. Οι μονάδες του DMAEMA συμβολίζονται με άσπρο, ενώ του THPMA συμβολίζονται με μαύρο. Ο μαύρος κύκλος στο κέντρο κάθε αστεροειδούς πολυμερούς συμβολίζει τον υδρόφοβο πυρήνα από EGDMA και με μαύρο αστεράκι συμβολίζονται τα ενεργά κέντρα του πολυμερισμού.

3.1.3.2. Μοριακά Βάρη και Σύσταση

Στο Σχήμα 3.14 απεικονίζονται τρία χρωματογραφήματα GPC του «arm-first» αστεροειδούς συμπολυμερούς (DMAEMA₁₅-b-THPMA₅)-star και των δύο γραμμικών πρόδρομων μορίων του. Η KMB των δύο γραμμικών, πρόδρομων πολυμερών

DMAEMA₁₅ και DMAEMA₁₅-*b*-THPMA₅ ήταν μονοδιάσπαρτη και αρκετά στενή όπως ήταν αναμενόμενο, με την KMB του συμπολυμερούς να μην έχει ίχνη από την κορυφή του γραμμικού ομοπολυμερούς. Αυτό επιβεβαιώνει ότι όλο το γραμμικό ομοπολυμερές αντέδρασε για να μετατραπεί σε γραμμικό συμπολυμερές όπως παρατηρήθηκε και για τα αστεροειδή συμπολυμερή DMAEMA – HEGMA. Η KMB του «arm-first» αστεροειδούς συμπολυμερούς (DMAEMA₁₅-*b*-THPMA₅)-*star* παρουσίασε δύο κορυφές. Η κορυφή σε μικρότερο όγκο έκλουσης αντιστοιχεί στο αστεροειδές συμπολυμερές ενώ αυτή σε μεγαλύτερο όγκο έκλουσης αντιστοιχεί στο γραμμικό συμπολυμερές το οποίο δεν μετατράπηκε σε αστεροειδές πολυμερές.



Σχήμα 3.14. Χρωματογραφήματα GPC του «arm-first» αστεροειδούς διαδρομερούς συμπολυμερούς (DMAEMA₁₅-*b*-THPMA₅)-*star* και των δύο γραμμικών πρόδρομων μορίων του.

Ανάλογες KMB παρατηρήθηκαν και για τα χρωματογραφήματα GPC όλων των αστεροειδών πολυμερών. Σε όλες τις περιπτώσεις «arm-first» αστεροειδών πολυμερών υπήρχαν δύο κορυφές, μία για το αστεροειδές πολυμερές και μία μικρότερου σχετικού εμβαδου για το γραμμικό πολυμερές όπως παρατηρήθηκε και για την προηγούμενη οικογένεια αστεροειδών πολυμερών DMAEMA – HEGMA (Georgiou et al, 2005).

Τα M_n , M_p και οι ΔΠΜΒ για τα αστεροειδή πολυμερή DMAEMA – MAA και για τα πρόδρομα μόριά τους, όπως αυτά προσδιορίστηκαν από τη χρωματογραφία GPC,

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

δίνονται στον Πίνακα 3.4. Τα M_n των γραμμικών πρόδρομων μορίων ήταν λίγο μεγαλύτερα από τα θεωρητικά αναμενόμενα MB, όπως και για τα DMAEMA – HEGMA (Georgiou et al, 2005). Τα M_n των «arm-first» αστεροειδών πολυμερών κυμάνθηκαν μεταξύ 40700 και 60700 $g\ mol^{-1}$ και ήταν 15 – 23 φορές μεγαλύτερα από ό,τι αυτά των αντίστοιχων γραμμικών πολυμερών. Οι ΔΠΜΒ των γραμμικών πρόδρομων πολυμερών ήταν χαμηλοί (≤ 1.10), ενώ οι ΔΠΜΒ των αστεροειδών πολυμερών ήταν υψηλότεροι (≤ 1.55), ικανοποιητικοί για αστεροειδή πολυμερή.

Πίνακας 3.4 MB και ΔΠΜΒ των αστεροειδών συμπολυμερών DMAEMA – THPMA και των πρόδρομων μορίων τους.

α/α	Πολυμερές	Θεωρητικό MW ¹	Αποτελέσματα GPC		
			M_n	M_p	M_w/M_n
1	DMAEMA ₁₅	2458	2280	2780	1.11
	DMAEMA ₁₅ -star	*	46600	59800	1.55
2	DMAEMA ₁₅	2458	2630	3150	1.09
	DMAEMA ₁₅ -b-THPMA ₅	3308	3210	3680	1.09
	(DMAEMA ₁₅ -b-THPMA ₅)-star	*	60700	67700	1.33
3	THPMA ₅	950	1270	1280	1.03
	THPMA ₅ -b-DMAEMA ₁₅	3308	3450	3670	1.07
	(THPMA ₅ -b-DMAEMA ₁₅)-star	*	51600	58000	1.27
4	DMAEMA ₁₅ -co-THPMA ₅	3308	3080	3560	1.10
	(DMAEMA ₁₅ -co-THPMA ₅)-star	*	48500	56200	1.32
5	DMAEMA ₁₅	2458	2160	2610	1.10
	DMAEMA ₁₅ -star	*	35500	48100	1.39
	DMAEMA ₁₅ -star-HEGMA ₅	*	40700	52800	1.40

¹Συμπεριλαμβάνονται 100 $g\ mol^{-1}$ από τον εκκινητή τα οποία ενσωματώνονται στο πολυμερές.

*Δεν μπορεί να υπολογισθεί γιατί ο αριθμός των βραχιόνων των αστεροειδών πολυμερών δεν είναι γνωστός *a priori*.

Τα φάσματα ^1H NMR των αστεροειδών συμπολυμερών επιβεβαίωσαν την παρουσία των αναμενόμενων χαρακτηριστικών κορυφών των μονάδων DMAEMA και THPMA. Στον Πίνακα 3.5 δίνονται οι θεωρητικά αναμενόμενες και οι πειραματικά προσδιορισθείσες από το ^1H NMR συστάσεις των αστεροειδών πολυμερών DMAEMA – THPMA. Για τον υπολογισμό της σύστασης των αστεροειδών συμπολυμερών επιλέγηκαν οι κορυφές στα 2.3 ppm που αντιστοιχεί σε 6 πρωτόνια (βλέπε κορυφή ε στο Σχήμα 3.7, σελ. 100) και στα 5.9 ppm που αντιστοιχεί σε 1 πρωτόνιο (βλέπε κορυφή γ στο Σχήμα 3.12, σελ. 113) των επαναλαμβανόμενων μονάδων DMAEMA και THPMA, αντίστοιχα. Όλες οι πειραματικά προσδιορισθείσες συστάσεις δείχνουν τα συμπολυμερή να είναι λίγο περισσότερο εμπλουτισμένα σε DMAEMA από ό,τι αναμενόταν.

Πίνακας 3.5 Σύσταση των αστεροειδών πολυμερών DMAEMA – THPMA.

α/α	Πολυμερές	% mol σύσταση σε THPMA	
		Πειραματικό, ^1H NMR	Θεωρητικό
1	DMAEMA ₁₅ -star	0	0
2	(DMAEMA ₁₅ -b-MAA ₅)-star	23	25
3	(MAA ₂ -b-DMAEMA ₁₅)-star	23	25
4	(DMAEMA ₁₅ -co-MAA ₅)-star	22	25
5	DMAEMA ₁₅ -star-MAA ₅	21	25

3.1.3.3. Χαρακτηρισμός σε Υδατικά Διαλύματα

Τα αστεροειδή συμπολυμερή DMAEMA – THPMA, αφού υδρολύθηκαν προς αστεροειδή συμπολυμερή DMAEMA – MAA, χαρακτηρίστηκαν σε 1% κ.β. υδατικά διαλύματα ως προς τις υδροδυναμικές τους διαμέτρους, τα M_w , τον αριθμό βραχιόνων τους, τα φαινόμενα pK και τις θερμοκρασίες νεφέλωσης. Τα αποτελέσματα συζητούνται στις επόμενες αντίστοιχες παραγράφους.

3.1.3.3.1. Υδροδυναμικές Διάμετροι

Οι πειραματικά προσδιορισθείσες υδροδυναμικές διαμέτροι των αστεροειδών συμπολυμερών DMAEMA – MAA δίνονται στον Πίνακα 3.6. Στον ίδιο πίνακα δίνεται

επίσης και το θεωρητικό ανώτατο όριο των υδροδυναμικών διαμέτρων των αστεροειδών συμπολυμερών, το οποίο υπολογίστηκε όπως αναφέρθηκε πιο πάνω (βλέπε 3.1.2.3.1, σελ. 98). Όλα τα διαλύματα των αστεροειδών πολυμερών παρουσίασαν μία κατανομή υδροδυναμικών διαμέτρων με 2-3 μέγιστα, τα οποία αντιστοιχούν σε γραμμικά πρόδρομα πολυμερή, σε αστεροειδή συμπολυμερή, και σε συσσωματώματα των αστεροειδών πολυμερών, όπως παρατηρήθηκε στα αστεροειδή ομοπολυμερή του DMAEMA (Georgiou et al, 2004(β)) και στα αστεροειδή συμπολυμερή DMAEMA – HEGMA (Georgiou et al, 2005). Με τονισμένα (bold) γράμματα δίνεται το μέγιστο της κορυφής με το μεγαλύτερο εμβαδό για κάθε δείγμα αστεροειδούς πολυμερούς. Σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός από το (DMAEMA₁₅-*b*-MAA₅)-*star* το μέγιστο αυτό αντιστοιχεί στα συσσωματώματα των αστεροειδών πολυμερών, αφού είναι μεγαλύτερο από το ανώτατο θεωρητικό όριο, κάτι που παρατηρήθηκε και στις προηγούμενες οικογένειες αστεροειδών πολυμερών.

Πίνακας 3.6 Υδροδυναμικές διάμετροι σε ουδέτερο νερό και φαινόμενα pK των αστεροειδών πολυμερών DMAEMA – MAA.

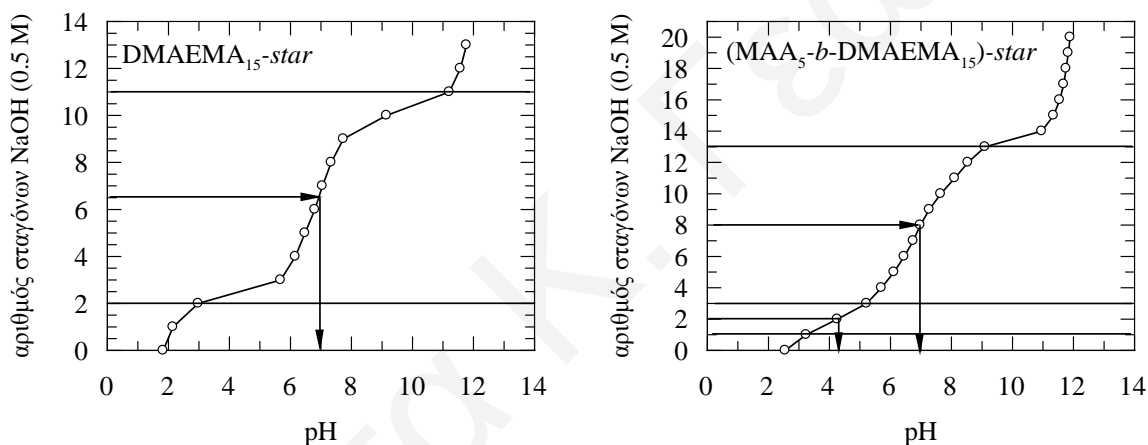
α/α	Πολυμερές	Υδροδυναμική Διάμετρος (nm)		pK
		Πειραματική ¹	Θεωρητική	
1	DMAEMA ₁₅ - <i>star</i>	10.0, 43.2 , 283.7	8.1	7.0
2	(DMAEMA ₁₅ - <i>b</i> -MAA ₅)- <i>star</i>	10.5 , 24.8,	10.7	-
3	(MAA ₅ - <i>b</i> -DMAEMA ₁₅)- <i>star</i>	5.8-7.0, 22.5 , 158.0	10.7	4.3, 6.9
4	(DMAEMA ₁₅ - <i>co</i> -MAA ₅)- <i>star</i>	5.7, 25.1	10.7	-
5	DMAEMA ₁₅ - <i>star</i> -MAA ₅	5.5, 33.8	8.1	-

¹Η πειραματική υδροδυναμική διάμετρος που παρουσιάζεται με τονισμένα (bold) γράμματα αντιστοιχεί στην κορυφή της κατανομής των διαμέτρων που έχει το μεγαλύτερο εμβαδό για το κάθε αστεροειδές πολυμερές.

3.1.3.3.2. Φαινόμενα pK

Στο Σχήμα 3.15 φαίνονται οι καμπύλες τιτλοδότησης του ομοπολυμερούς DMAEMA₁₅-*star* και του αστεροειδούς συμπολυμερούς (MAA₅-*b*-DMAEMA₁₅)-*star*.

Από την καμπύλη τιτλοδότησης του ομοπολυμερούς υπολογίστηκε το pK ίσο με 7.0 (Πίνακας 3.6), τιμή που ήταν αναμενόμενη (Georgiou et al 2004(β)). Στην καμπύλη τιτλοδότησης του συμπολυμερούς παρατηρήθηκε σαφής αλλαγή σε σχέση με αυτή του ομοπολυμερούς, ιδιαίτερα σε χαμηλά pH , λόγω της παρουσίας των μονάδων MAA. Υπολογίστηκαν τα pK των μονάδων του DMAEMA και MAA, για το αστεροειδές συμπολυμερές ($MAA_5-b-DMAEMA_{15}$)-star, τα οποία βρέθηκαν ίσα με 6.9 και 4.3, αντίστοιχα (Πίνακας 3.6). Για τα υπόλοιπα συμπολυμερή δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός των pK γιατί δεν υπήρχε εμφανές σημείο καμπής στα χαμηλά pH , παρόλο που ήταν σαφής η διαφοροποίηση της καμπύλης τιτλοδότησης σε σχέση με το ομοπολυμερές λόγω της παρουσίας των μονάδων του MAA.



Σχήμα 3.15. Οι καμπύλες τιτλοδότησης του κατιοντικού ομοπολυμερούς $DMAEMA_{15}$ -star και του αμφολυτικού πολυμερούς (MAA_5 - b - $DMAEMA_{15}$)-star.

3.1.3.3.3. M_w και Αριθμός Βραχιόνων

Τα M_w των αστεροειδών πολυμερών προσδιορίστηκαν με SLS σε ουδέτερο νερό. Τα πολυμερή αυτά, όπως διαπιστώθηκε και από την DLS στο νερό, σχηματίζουν συσσωματώματα. Επομένως, τα MB που προσδιορίστηκαν με SLS είναι πιθανώς υπερεκτιμημένα. Συγκεκριμένα, τα M_w κυμάνθηκαν μεταξύ 90 500 και 245 000 $g\ mol^{-1}$, τα οποία, διαιρεμένα με τα MB των αντίστοιχων πρόδρομων τους γραμμικών πολυμερών, δίνουν ένα εύρος τιμών για τον αριθμό βραχιόνων των αστεροειδών

πολυμερών μεταξύ 32 και 87. Οι τιμές αυτές του αριθμού βραχιόνων είναι σχετικά κοντά σε πραγματικές αναμενόμενες τιμές, όπως παρατηρήθηκαν και σε αστεροειδή πολυμερή του DMAEMA όπου έγινε SLS σε THF (Georgiou et al 2004(β)). Οι τιμές αυτές πιθανότατα να είναι λίγο μεγαλύτερες από τις πραγματικές επειδή το SLS έγινε σε νερό και όπως παρατηρήθηκε από την DLS τα πολυμερή έχουν τη τάση να συσσωματώνονται. Παρόλα αυτά μπορεί εύκολα να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι σε όλες τις περιπτώσεις που οι μονάδες του DMAEMA ήταν στο ενεργό άκρο του πολυμερούς που στη συνέχεια διασταυρώθηκε ο αριθμός των βραχιόνων είναι μεγαλύτερος. Αυτό ίσως να οφείλεται σε διαφορετική δραστηριότητα των μονομερών κατά τον πολυμερισμό.

Πίνακας 3.7 Τα M_w των αστεροειδών πολυμερών, των βραχιόνων τους, και οι μέσου βάρους αριθμοί βραχιόνων των αστεροειδών πολυμερών DMAEMA – MAA.

α/α	Πολυμερές	M_w αστεροειδούς πολυμερούς από SLS	M_w βραχίονα από GPC*	Αριθμός Βραχιόνων
1	DMAEMA ₁₅ -star	181 000	2280	84
2	(DMAEMA ₁₅ -b-MAA ₅)-star	90 500	2810	32
3	(MAA ₅ -b-DMAEMA ₁₅)-star	245 000	3020	81
4	(DMAEMA ₁₅ -co-MAA ₅)-star	100 000	2690	37
5	DMAEMA ₁₅ -star-MAA ₅	196 000	2260	87

* Έγινε προσαρμογή για τις μονάδες του THPMA που μετατραπήκαν σε MAA.

3.1.3.3.4. Θερμοκρασίες Νεφέλωσης

Κανένα από τα διαλύματα των αστεροειδών πολυμερών δεν παρουσίασε εμφανές σημείο νεφέλωσης, δηλαδή τα διαλύματα δεν παρουσίασαν θόλωση ή καταβύθιση πολυμερούς σε καμία θερμοκρασία μεταξύ 20 και 90 °C, εκτός από το ομοπολυμερές του DMAEMA όπως και ήταν αναμενόμενο.

3.1.3.4. Εφαρμογή στην Επιμόλυνση

Τα αστεροειδή συμπολυμερή DMAEMA – MAA χρησιμοποιήθηκαν στην επιμόλυνση και αποτελούν την πρώτη αναφορά πολυμερικών αμφολυτών και τη δεύτερη αναφορά χρήσης αστεροειδών συμπολυμερών σαν οχήματα μεταφοράς γενετικού υλικού μετά τα αστεροειδή συμπολυμερή DMAEMA – HEGMA (Georgiou et al, 2005). Τα αστεροειδή συμπολυμερή DMAEMA – MAA αξιολογήθηκαν σαν οχήματα μεταφοράς γενετικού υλικού, χρησιμοποιώντας το ίδιο πλασμιδιακό DNA και κύτταρα όπως και στα αντίστοιχα αστεροειδή ομοπολυμερή του DMAEMA και στα αστεροειδή συμπολυμερή DMAEMA – HEGMA. Προσδιορίστηκε η απόδοση της επιμόλυνσης, η βιωσιμότητα των κυττάρων και η συνολική απόδοση της επιμόλυνσης ως προς την ποσότητα των αστεροειδών πολυμερών και την αρχιτεκτονική τους.

Επίδραση της Ποσότητας του Αστεροειδούς Πολυμερούς.

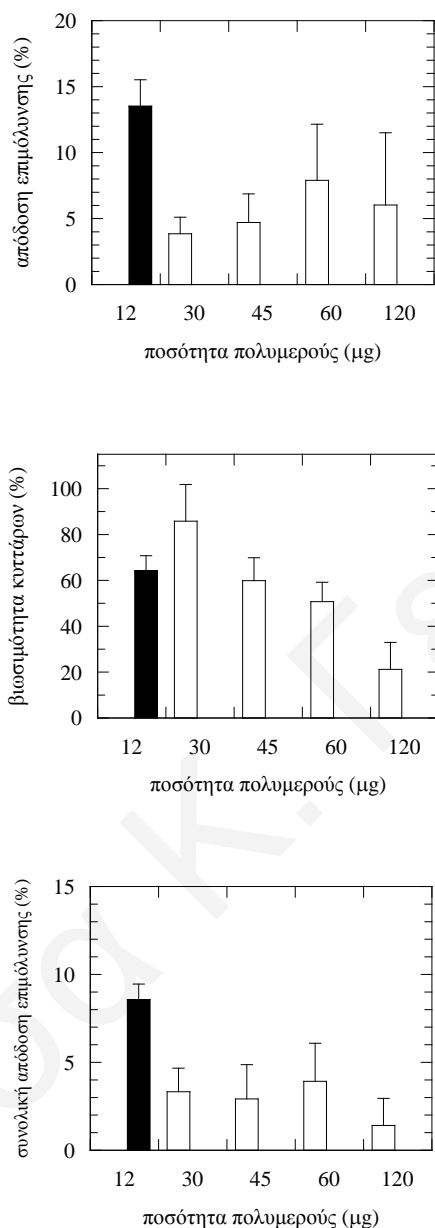
Στο Σχήμα 3.16 παρουσιάζεται η επίδραση της ποσότητας του αστεροειδούς πολυμερούς στην επιμόλυνση για το κάθε ένα από τα πολυμερή: (α) DMAEMA₁₅-star, (β) (DMAEMA₁₅-b-MAA₅)-star, (γ) (MAA₅-b-DMAEMA₁₅)-star, (δ) (DMAEMA₁₅-co-MAA₅)-star, και (ε) DMAEMA₁₅-star-MAA₅. Η ποσότητα του αστεροειδούς πολυμερούς που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της επιμόλυνσης μεταβλήθηκε συστηματικά, ενώ η ποσότητα του πλασμιδιακού DNA που χρησιμοποιήθηκε κρατήθηκε σταθερή στα 3 μg. Τα αποτελέσματα στην επιμόλυνση με χρήση του εμπορικά διαθέσιμου μεταφορέα SuperFect στις βέλτιστες συνθήκες απόδοσής του (12 μg SuperFect και 1 μg DNA) παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα στο Σχήμα 3.16.

Σε αντίθεση με τα αστεροειδή πολυμερή της ομάδας DMAEMA – HEGMA, η απόδοση της επιμόλυνσης των αστεροειδών πολυμερών DMAEMA – MAA ως προς την ποσότητα του αστεροειδούς πολυμερούς δεν παρουσίασε μέγιστο, σε όλες τις περιπτώσεις. Η απόδοση επιμόλυνσης για δύο συμπολυμερή, τα (DMAEMA₁₅-b-MAA₅)-star και (DMAEMA₁₅-co-MAA₅)-star, ήταν σχεδόν μηδέν για όλες τις ποσότητες πολυμερούς που μελετήθηκαν, ενώ για τα υπόλοιπα τρία αστεροειδή πολυμερή η απόδοση της επιμόλυνσης παρουσίασε το αναμενόμενο πλέον μέγιστο.

Συγκεκριμένα, η απόδοση επιμόλυνσης για αυτά τα τρία αστεροειδή πολυμερή,

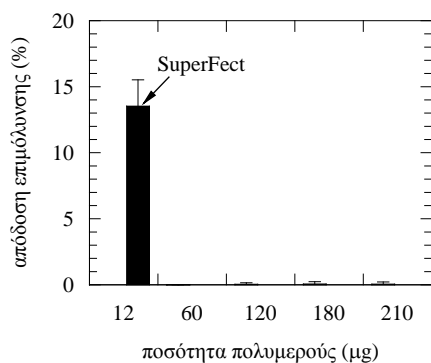
Θεονίτσα Κ. Γεωργίου

(α) DMAEMA₁₅-star

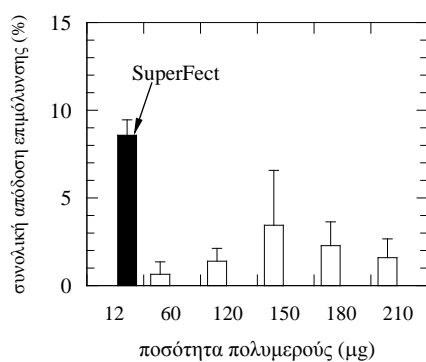
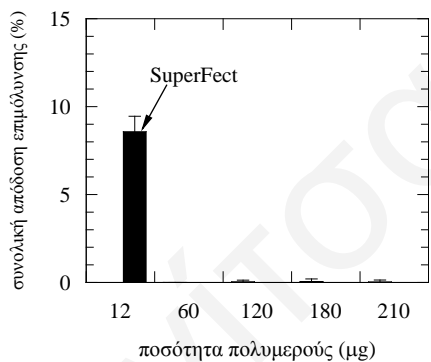
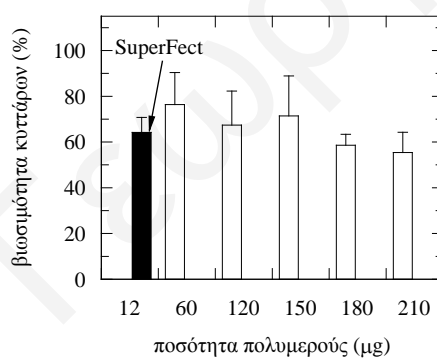
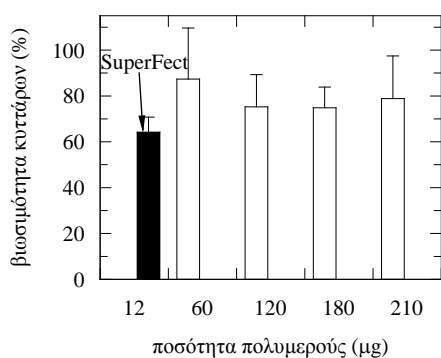
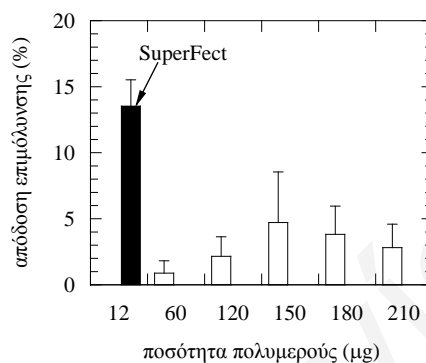


Σχήμα 3.16 (α) Εξάρτηση της απόδοσης της επιμόλυνσης, της βιωσιμότητας των κυττάρων και της συνολικής απόδοσης της επιμόλυνσης από την ποσότητα του αστεροειδούς πολυμερούς DMAEMA₁₅-star, για σταθερή ποσότητα πλασμιδιακού DNA 3 μg (άσπρο χρώμα). Το δενδριμερές SuperFect στις βέλτιστές του συνθήκες (12 μg SuperFect και 1 μg πλασμιδιακό DNA) απεικονίζεται με μαύρο χρώμα στις αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις.

(β) (DMAEMA₁₅-b-MAA₅)-star

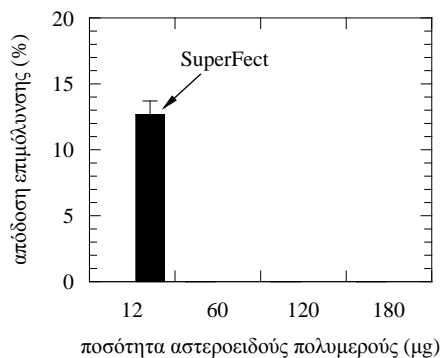


(γ) (MAA₅-b-DMAEMA₁₅)-star

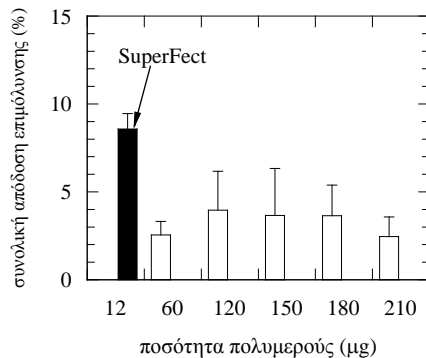
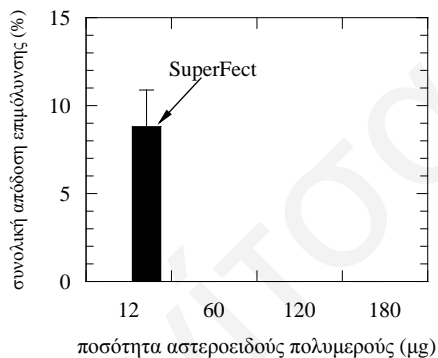
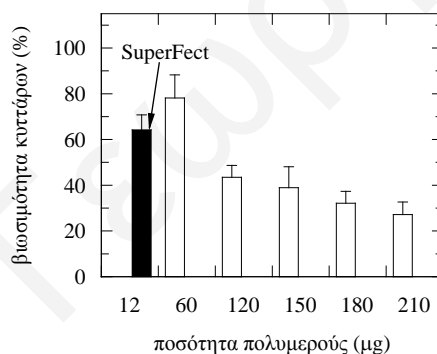
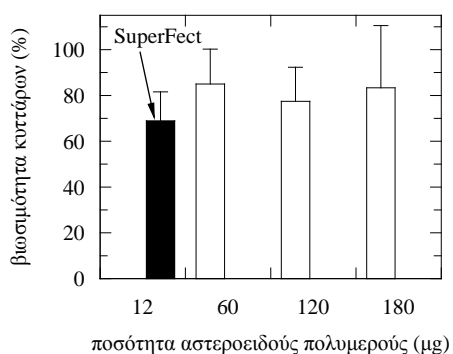
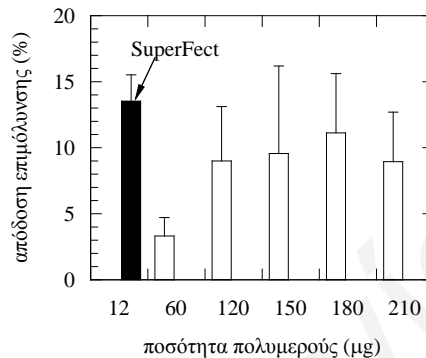


Σχήμα 3.16 (β) και (γ) Εξάρτηση της απόδοσης της επιμόλυνσης, της βιωσιμότητας των κυττάρων και της συνολικής απόδοσης της επιμόλυνσης από την ποσότητα του αστεροειδούς πολυμερούς (β) (DMAEMA₁₅-b-MAA₅)-star και (γ) (MAA₅-b-DMAEMA₁₅)-star για σταθερή ποσότητα πλασμιδιακού DNA 3 μg (άσπρο χρώμα). Το δενδριμερές SuperFect στις βέλτιστες του συνθήκες (12 μg SuperFect και 1 μg πλασμιδιακό DNA) απεικονίζεται με μαύρο χρώμα στις αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις.

(δ) (DMAEMA₁₅-co-MAA₂)-star



(ε) DMAEMA₁₅-star-MAA₅



Σχήμα 3.16 (δ) και (ε) Εξάρτηση της απόδοσης της επιμόλυνσης, της βιωσιμότητας των κυττάρων και της συνολικής απόδοσης της επιμόλυνσης από την ποσότητα του αστεροειδούς πολυμερούς (δ) (DMAEMA₁₅-co-MAA₅)-star και (ε) DMAEMA₁₅-star-MAA₅ για σταθερή ποσότητα πλασμιδιακού DNA 3 μg (άσπρο χρώμα). Το δενδριμερές SuperFect στις βέλτιστες του συνθήκες (12 μg SuperFect και 1 μg πλασμιδιακό DNA) απεικονίζεται με μαύρο χρώμα στις αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις.

DMAEMA₁₅-star, (MAA₅-b-DMAEMA₁₅)-star και DMAEMA₁₅-star-MAA₅, παρουσίασε μέγιστο στα 60 μg, 150 μg και 180 μg πολυμερούς, αντίστοιχα. Τα δύο συμπολυμερή παρουσίασαν μέγιστο σε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα πολυμερούς από το αστεροειδές ομοπολυμερές λόγω της παρουσίας των μονάδων MAA οι οποίες δυσχεραίνουν τη συμπλοκοποίηση του πολυμερούς με το DNA.

Όλα τα αστεροειδή παρουσίασαν μέγιστη απόδοση επιμόλυνσης μικρότερη από αυτή του SuperFect (13 %). Το DMAEMA₁₅-star-MAA₅ παρουσίασε τη μεγαλύτερη μέγιστη απόδοση επιμόλυνσης από όλα τα αστεροειδή πολυμερή, κοντά στο 11%. Η μέγιστη απόδοση επιμόλυνσης για τα αστεροειδή πολυμερή DMAEMA₁₅-star και (MAA₅-b-DMAEMA₁₅)-star ήταν στο 8 και 5%, αντίστοιχα.

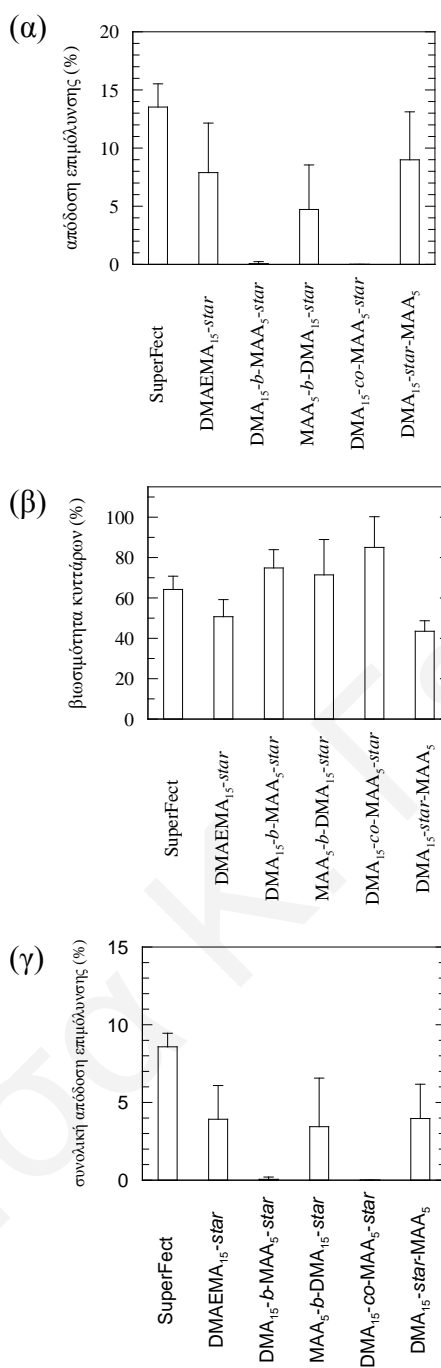
Η παράμετρος της βιωσιμότητας των κυττάρων παρουσιάστηκε να μειώνεται με αύξηση της ποσότητας του αστεροειδούς πολυμερούς για όλα τα αστεροειδή πολυμερή, όπως παρατηρήθηκε και στις προηγούμενες σειρές πολυμερών (Georgiou et al 2004(β) και 2005), εκτός από τα (DMAEMA₁₅-b-MAA₅)-star και (DMAEMA₁₅-co-MAA₅)-star. Φαίνεται ότι η θέση των μονάδων του MAA σε αυτά τα δύο πολυμερή (βλέπε Σχήμα 3.13) δεν εμποδίζει μόνο την αλληλεπίδραση μεταξύ των θετικών μονάδων των αστεροειδών πολυμερών και του αρνητικά φορτισμένου DNA αλλά και την αλληλεπίδραση των πολυμερών και των αρνητικά φορτισμένων κυτταρικών μεμβράνων, αποτρέποντας έτσι τη μεταφορά του DNA μέσα στα κύτταρα (μηδενική απόδοση επιμόλυνσης) και τον κυτταρικό θάνατο (υψηλή βιωσιμότητα), αντίστοιχα. Η μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων ήταν εντονότερη για το αστεροειδές ομοπολυμερές του DMAEMA και το ετεροβραχιονικό αστεροειδές συμπολυμερές, όπως παρατηρήθηκε και στα αστεροειδή πολυμερή DMAEMA – HEGMA, επιβεβαιώνοντας την επίδραση της αρχιτεκτονικής των πολυμερών και, συγκεκριμένα, της θέσης των μονάδων DMAEMA που φαίνεται ότι στο εξωτερικό μέρος του αστεροειδούς πολυμερούς αλληλεπιδρούν καλύτερα με το κύτταρο, όπως και ήταν αναμενόμενο.

Η συνολική απόδοση επιμόλυνσης για όλα τα αστεροειδή πολυμερή, εκτός από τα (DMAEMA₁₅-b-MAA₅)-star και (DMAEMA₁₅-co-MAA₅)-star τα οποία παρουσίασαν μηδενική συνολική απόδοση, ως προς την ποσότητα του πολυμερούς παρουσίασε μέγιστο, όπως και στα αστεροειδή πολυμερή DMAEMA – HEGMA. Συγκεκριμένα, τα πολυμερή DMAEMA₁₅-star, (MAA₅-b-DMAEMA₁₅)-star και

DMAEMA₁₅-star-MAA₅ παρουσίαζαν μέγιστο της συνολικής απόδοσης της επιμόλυνσης ίσο μη 3 έως και 4 % στα 60 μg, 150 μg και 120 μg, αντίστοιχα. Όλα τα πολυμερή στις βέλτιστές τους συνθήκες παρουσίασαν μικρότερες τιμές συνολικής απόδοσης της επιμόλυνσης από το εμπορικά διαθέσιμο SuperFect. Καλύτερη όμως σύγκριση των πολυμερών στις βέλτιστές τους συνθήκες, συμπεριλαμβανομένου και του SuperFect, παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.17.

Επίδραση της Αρχιτεκτονικής των Πολυμερών.

Στο Σχήμα 3.17 παρουσιάζεται η εξάρτηση της απόδοσης της επιμόλυνσης, της βιωσιμότητας των κυττάρων και της συνολικής απόδοσης της επιμόλυνσης από την αρχιτεκτονική των αστεροειδών πολυμερών DMAEMA – MAA που δοκιμάστηκαν και του SuperFect, στο αντίστοιχο μέγιστο της συνολικής απόδοσης επιμόλυνσης για το κάθε πολυμερές, δηλαδή στις βέλτιστές τους συνθήκες. Κανένα από τα αστεροειδή πολυμερή δεν πλησίασε τη συνολική απόδοση επιμόλυνσης του εμπορικά διαθέσιμου SuperFect. Συγκρίνοντας τα αστεροειδή πολυμερή μεταξύ τους, τα πολυμερή DMAEMA₁₅-star, (MAA₅-b-DMAEMA₁₅)-star και DMAEMA₁₅-star-MAA₅ παρουσίασαν τις καλύτερες συνολικές αποδόσεις επιμόλυνσης με το (MAA₅-b-DMAEMA₁₅)-star να παρουσιάζει την υψηλότερη βιωσιμότητα των κυττάρων, κάτι που το κάνει τον καλύτερο μεταφορέα από όλα τα αστεροειδή πολυμερή αυτής της ομάδας. Αξίζει να σημειωθεί ότι η βιωσιμότητα των κυττάρων του (MAA₅-b-DMAEMA₁₅)-star ήταν μεγαλύτερη από αυτή του SuperFect και είναι το μόνο αστεροειδές πολυμερές αυτής της οικογένειας πολυμερών που παρουσίασε σχετικά υψηλά επίπεδα συνολικής απόδοσης επιμόλυνσης και βιωσιμότητας των κυττάρων. Σε σύγκριση με τα αστεροειδή συμπολυμερή DMAEMA – HEGMA, τα συμπολυμερή DMAEMA – MAA δεν παρουσίασαν παρόμοια ικανοποιητικά αποτελέσματα. Γενικά, φαίνεται ότι η εισαγωγή του μονομερούς MAA στο σύστημα, αν και μειώνει την τοξικότητα διότι εμποδίζει την ισχυρή αλληλεπίδραση του πολυμερούς με τα κύτταρα που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο, εμποδίζει επίσης και την κατάλληλη συμπλοκοποίηση με το DNA που οδηγεί στην επιμόλυνση. Μη ικανοποιητικά αποτελέσματα συμπολυμερών του DMAEMA – MAA αναφερθήκαν και σε πρόσφατες μελέτες, κάτι που ανατρέπει την αρχική υπόθεση ότι το MAA θα βοηθά το σύμπλοκο να «αποδράσει» από το ενδόσωμα στο κυτταρόπλασμα (Dubruel et al, 2004).

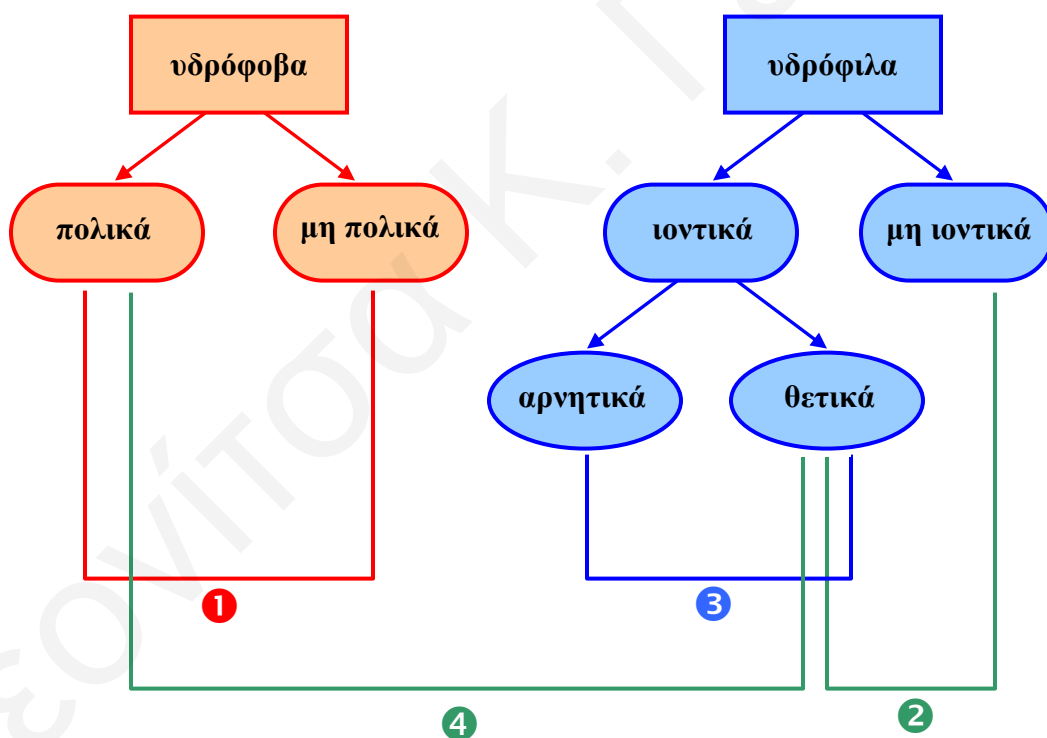


Σχήμα 3.17. Εξάρτηση **(α)** της απόδοσης της επιμόλυνσης, **(β)** της βιωσιμότητας των κυττάρων και **(γ)** της συνολικής απόδοσης της επιμόλυνσης από το είδος του πολυμερούς: του δενδριμερούς SuperFect, ενός αστεροειδούς ομοπολυμερούς του DMAEMA και των τεσσάρων αστεροειδών συμπολυμερών DMAEMA – MAA στις βέλτιστές τους συνθήκες.

Επομένως, από τα αποτελέσματα της επιμόλυνσης με χρήση των αστεροειδών πολυμερών DMAEMA – MAA παρατηρήθηκε, όπως και ήταν αναμενόμενο, ότι η εισαγωγή μονάδων MAA αυξάνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων (σύγκριση με το αντίστοιχο αστεροειδές ομοπολυμερές του DMAEMA), αλλά μειώνει την ικανότητά τους ως επιμολυντές. Όπως και στα αστεροειδή πολυμερή DMAEMA – HEGMA, εξάχθηκε το συμπέρασμα ότι η ποσότητα και η αρχιτεκτονική του αστεροειδούς πολυμερούς που χρησιμοποιείται είναι δύο σημαντικές παράμετροι για την επιμόλυνση. Καθοριστικός παράγοντας αναδεικνύεται επίσης και το είδος του συμμονομερούς, κάτι που ήταν αναμενόμενο. Οι μονάδες του συμμονομερούς HEGMA βοηθούν την επιμόλυνση ενώ οι μονάδες του συμμονομερούς MAA όχι, κάτι που πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι το πρώτο συμμονομερές είναι μη ιοντικό και το άλλο αρνητικά ιονιζόμενο μονομερές.

3.2. Αστεροειδή Πολυμερικά Πλέγματα

Τα πολυμερικά πλέγματα τα οποία βασίζονται σε αστεροειδή πολυμερή είναι μία καινούργια κατηγορία πρότυπων πλεγμάτων που αναπτύχθηκε πρόσφατα από την Ερευνητική Ομάδα Χημείας Πολυμερών του Πανεπιστημίου Κύπρου (Vamvakaki et al 2001, Vamvakaki και Πατρικιος 2002, Georgiades et al 2002). Μέσα στα πλαίσια αυτής της Διδακτορικής Διατριβής μελετήθηκε η μεταβολή των ιδιοτήτων αυτών των πλεγμάτων μεταβάλλοντας τα μονομερή και κατ' επέκταση τη συμβατότητα των πλεγμάτων σε διάφορους διαλύτες. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν τέσσερις ομάδες πολυμερών, μία ομάδα διπλά υδρόφοβων (αριθμός ❶, Σχήμα 3.18), μία ομάδα αμφολυτών (αριθμός ❸) και δύο ομάδες αμφιφιλικών αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων (αριθμοί ❷ και ❹).



Σχήμα 3.18. Οι τέσσερις συνδυασμοί των μονομερών των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων που παρασκευάστηκαν σε αυτή τη Διδακτορική Εργασία.

3.2.1. Διπλά Υδρόφοβα Αστεροειδή Πλέγματα BuMA – MMA

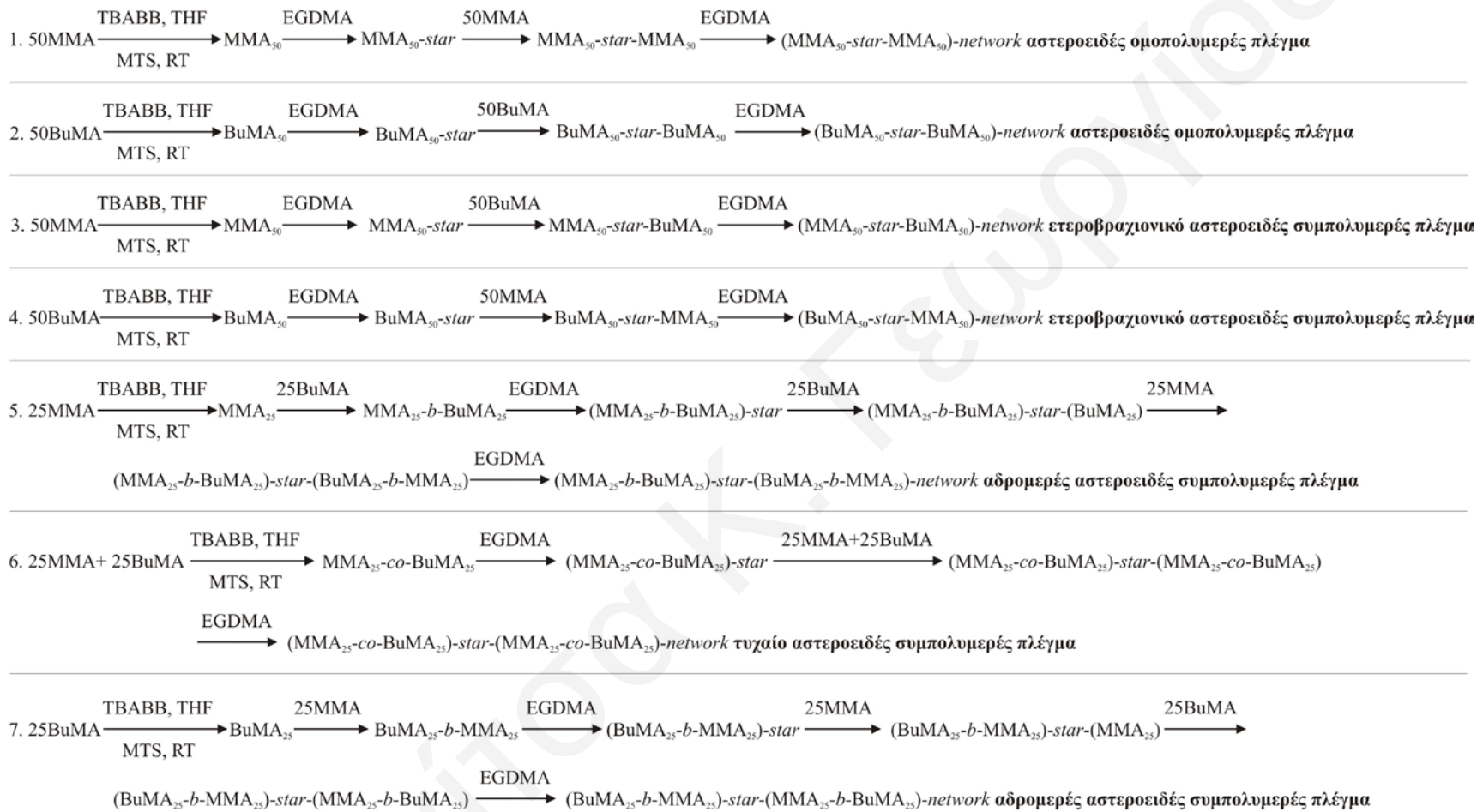
3.2.1.1. Σύνθεση

Στις περισσότερες ερευνητικές μελέτες που αφορούν πολυμερικά πλέγματα παρασκευάζονται αμφιφιλικά πολυμερικά πλέγματα ή ιοντικά πλέγματα ή και ιοντικά (ή ιοντιζόμενα) αμφιφιλικά πλέγματα. Για την πρώτη μελέτη αυτή της Διδακτορικής Διατριβής σε αστεροειδή πολυμερικά πλέγματα, επιλέγηκε ένα απλό σύστημα δύο υδρόφοβων μη-ιοντικών μονομερών για να μπορέσει να γίνει με μεγαλύτερη ευκολία η μελέτη των ΒΔ χωρίς την παρουσία άλλων αλληλεπιδράσεων όπως δεσμών υδρογόνου και η σύγκρισή τους με θεωρητικά προβλεπόμενους ΒΔ (Georgiou και Patrickios, 2006).

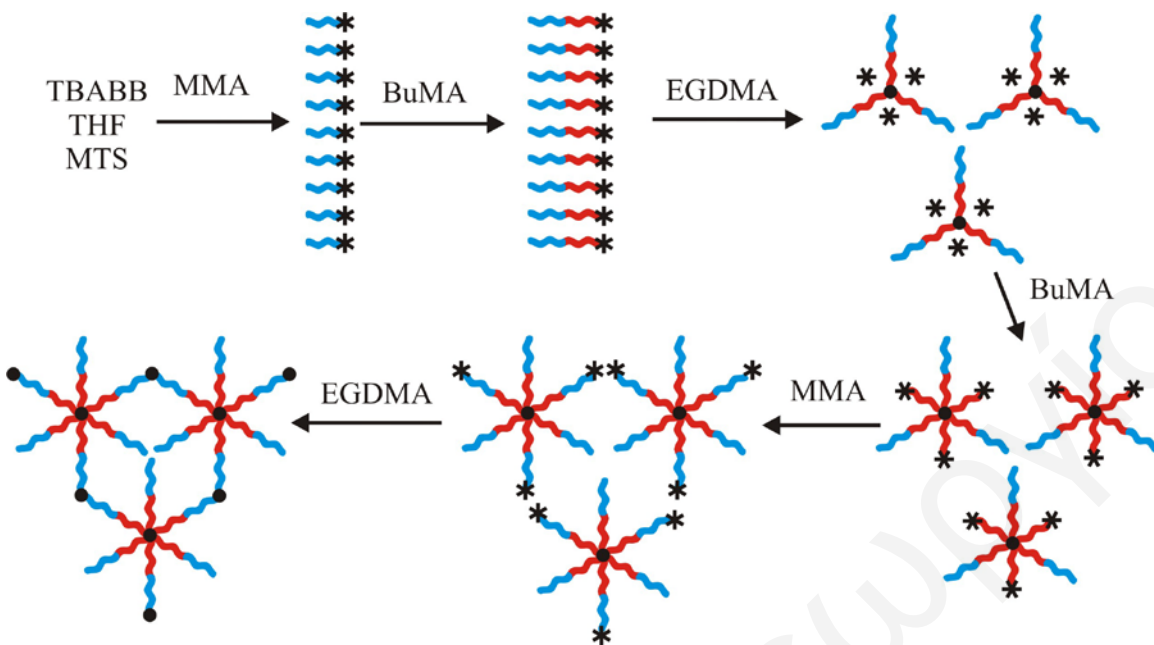
Οι διαδικασίες σύνθεσης όλων των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων BuMA – MMA παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.19. Η σύνθεση με GTP αστεροειδών πλεγμάτων περιλάμβανε 4 ή 6 στάδια προσθήκης. Τα ομοπολυμερή αστεροειδή πολυμερικά πλέγματα συντέθηκαν με τις διαδοχικές προσθήκες: μονομερούς – διασταυρωτή – μονομερούς – διασταυρωτή, όπου πάντα προστίθεται το ίδιο μονομερές. Στο πρώτο στάδιο σχηματίζονται γραμμικά πολυμερή, στο δεύτερο «arm-first» αστεροειδή πολυμερή, στο τρίτο «in-out» αστεροειδή πολυμερή και στο τελευταίο βήμα το πλέγμα. Με την προσθήκη διαφορετικού μονομερούς στα δύο βήματα του μονομερούς συντέθηκαν τα ετεροβραχιονικά πολυμερικά πλέγματα. Με την ταυτόχρονη προσθήκη δύο μονομερών πριν και μετά την πρώτη προσθήκη διασταυρωτή παρασκευάστηκε το τυχαίο αστεροειδές πολυμερικό πλέγμα. Για τη σύνθεση των αδρομερών αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων έγινε διαδοχική προσθήκη των δύο μονομερών πριν και μετά την πρώτη προσθήκη του διασταυρωτή EGDMA.

Η σχηματική απεικόνιση της συνθετικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την παρασκευή ενός από τα δύο αδρομερή αστεροειδή πολυμερικά πλέγματα, του [(MMA₂₅-*b*-BuMA₂₅)-*star*-(BuMA₂₅-*b*-MMA₂₅)]-*network*, παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.20. Με μπλε και κόκκινο χρώμα συμβολίζονται τα τμήματα των μονάδων του MMA και του BuMA, αντίστοιχα. Τα ενεργά κέντρα των πολυμερικών αλυσίδων συμβολίζονται με μαύρα αστεράκια ενώ με μαύρους κύκλους συμβολίζονται οι κόμβοι. Με τη διαδοχική προσθήκη των δύο μονομερών, MMA και BuMA, σε μία φιάλη η οποία περιείχε

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Σχήμα 3.19. Συνθετικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή των διάφορων αρχιτεκτονικών των αστεροειδών πλεγμάτων BuMA – MMA.



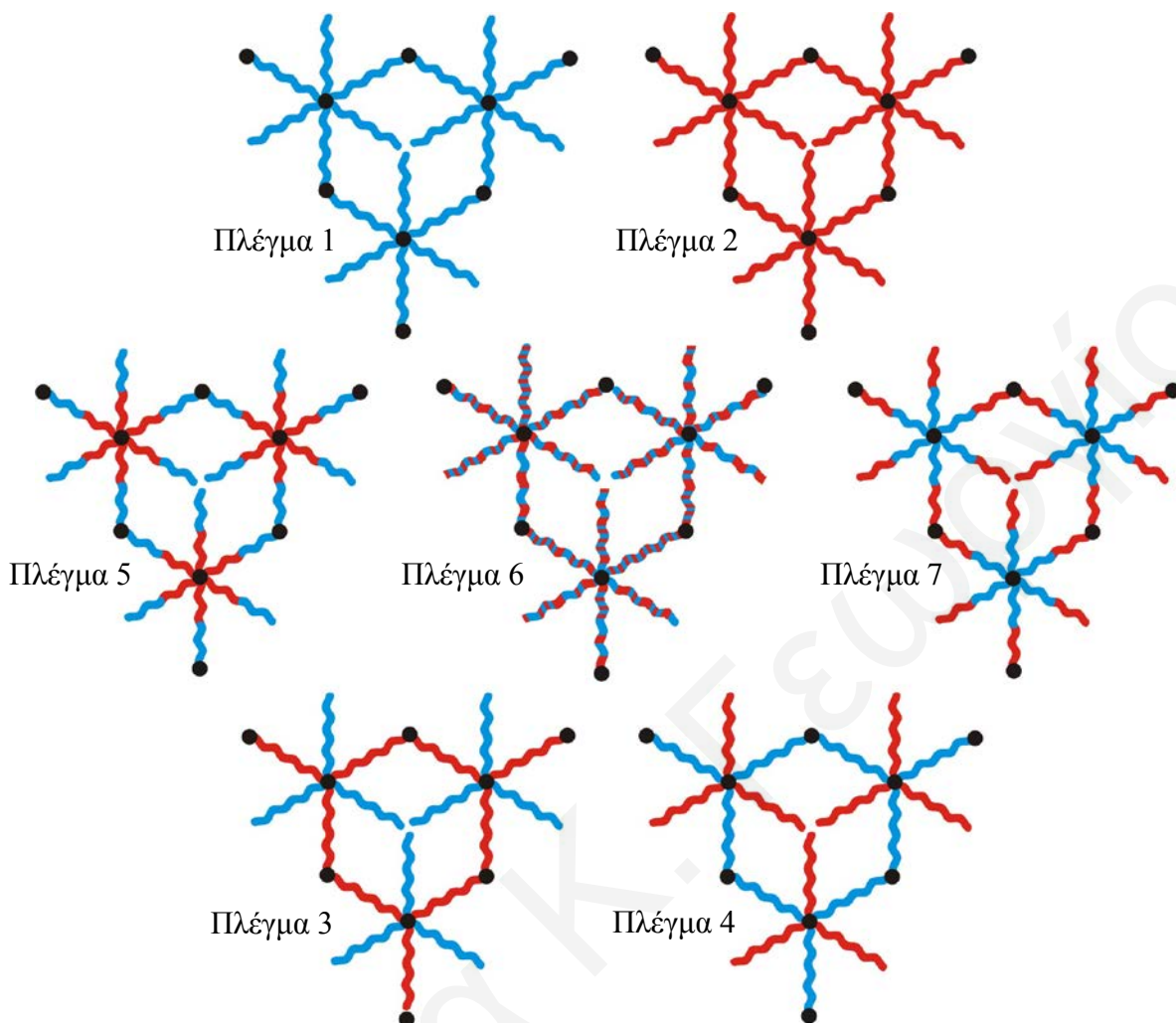
Σχήμα 3.20. Σχηματική απεικόνιση της συνθετικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του πλέγματος [(MMA₂₅-*b*-BuMA₂₅)-*star*-(BuMA₂₅-*b*-MMA₂₅)]-*network*, το οποίο είναι βασισμένο σε αδρομερή αστεροειδή συμπολυμερή. Ο αριθμός των βραχιόνων των αστεροειδών πολυμερών δεν είναι 3 / 6, όπως υποδεικνύεται στο σχήμα, αλλά μεγαλύτερος. Με μπλε και κόκκινο συμβολίζονται τα τμήματα των μονάδων MMA και BuMA, αντίστοιχα, ενώ με μαύρους κύκλους και μαύρους αστερίσκους συμβολίζονται οι κόμβοι και τα ενεργά κέντρα των πολυμερών, αντίστοιχα.

καταλύτη, διαλύτη και εκκινητή σχηματίστηκαν αρχικά γραμμικά ομοπολυμερή του MMA, και μετέπειτα γραμμικά διαδρομερή συμπολυμερή MMA₂₅-*b*-BuMA₂₅ (τα οποία αργότερα αποτέλεσαν τους πρωτοταγείς βραχιόνες των πρόδρομων αστεροειδών πολυμερών και τις ελεύθερες αλυσίδες στο τελικό πλέγμα που παρασκευάστηκε). Με την προσθήκη του διασταυρωτή EGDMA, ενός διδραστικού μορίου, σχηματίστηκαν «arm-first» αδρομερή αστεροειδή συμπολυμερή, όπου τα ενεργά κέντρα βρίσκονταν στον πυρήνα, και με τη δεύτερη διαδοχική προσθήκη των δύο μονομερών τα «in-out» αδρομερή αστεροειδή συμπολυμερή. Στα «in-out» αστεροειδή συμπολυμερή τα ενεργά

κέντρα βρίσκονται στο «κέλυφος», δηλαδή στο εξωτερικό μέρος των αστεροειδών πολυμερών, και, πιο συγκεκριμένα στο τέλος κάθε δευτεροταγούς βραχίονα (secondary arm, οι δευτεροταγείς βραχίονες που μετατράπηκαν στο επόμενο στάδιο στις ελαστικές αλυσίδες του πλέγματος) που σχηματίζεται από το κέντρο του αστεριού προς τα έξω. Με τη δεύτερη προσθήκη του διασταυρωτή, αυτά τα «in-out» αστεροειδή συμπολυμερή ενώθηκαν μεταξύ τους για να δώσουν το πλέγμα.

Πρέπει να σημειωθεί ότι ο αριθμός των αλυσίδων / βραχιόνων σε κάθε κόμβο δεν είναι 3 και 6 όπως συμβολίζεται στο Σχήμα 3.20 αλλά πολύ μεγαλύτερος (Vamvakaki et al 2002) γιατί το EGDMA έχει την ικανότητα να προστίθεται επανειλημμένα στον πυρήνα, φέρνοντας έτσι μαζί ένα μεγάλο αριθμό αλυσίδων. Στη συγκεκριμένη μελέτη (Vamvakaki et al 2002) χρησιμοποιήθηκε η SLS για να προσδιοριστεί ο αριθμός των αλυσίδων για «arm-first» και «in-out» αστεροειδή πολυμερή, τα οποία συντέθηκαν με GTP και βρέθηκε να είναι περίπου 30 και 60, αντίστοιχα.

Στο Σχήμα 3.21 απεικονίζονται όλα τα διπλά υδρόφοβα αστεροειδή πλέγματα που συντέθηκαν σε αυτή τη μελέτη. Όλα τα πλέγματα έχουν θεωρητικό ΒΠ του βραχίονα ίσο με 50. Από τα επτά, τα δύο είναι ομοπολυμερή και τα πέντε ισομοριακά συμπολυμερή των MMA – BuMA. Οι μονάδες του MMA και BuMA συμβολίζονται με μπλε και κόκκινο, αντίστοιχα, όπως και στο Σχήμα 3.20. Οι δύο σχηματικές απεικονίσεις που βρίσκονται στο πάνω μέρος του σχήματος, Πλέγμα 1 και Πλέγμα 2, είναι τα δύο ομοπολυμερικά αστεροειδή πλέγματα του MMA και BuMA, αντίστοιχα. Το Πλέγμα 3 (κάτω αριστερά) είναι ένα ετεροβραχιονικό αστεροειδές πλέγμα όπου τα δύο είδη βραχιόνων, οι ελεύθερες και οι ελαστικές αλυσίδες, είναι δύο διαφορετικά ομοπολυμερή. Το Πλέγμα 4 (κάτω δεξιά) είναι επίσης ετεροβραχιονικό με την αντίστροφη δομή από το Πλέγμα 3, οι ελεύθερες αλυσίδες είναι το BuMA και όχι το MMA και οι ελαστικές αλυσίδες το MMA αντί το BuMA. Το Πλέγμα 5 και το Πλέγμα 7 είναι αδρομερή αστεροειδή πλέγματα των οποίων οι βραχίονες είναι αδρομερή διαδρομερή συμπολυμερή. Τέλος, το Πλέγμα 6 είναι τυχαίο αστεροειδές πλέγμα όπου οι βραχίονες είναι τυχαία συμπολυμερή.

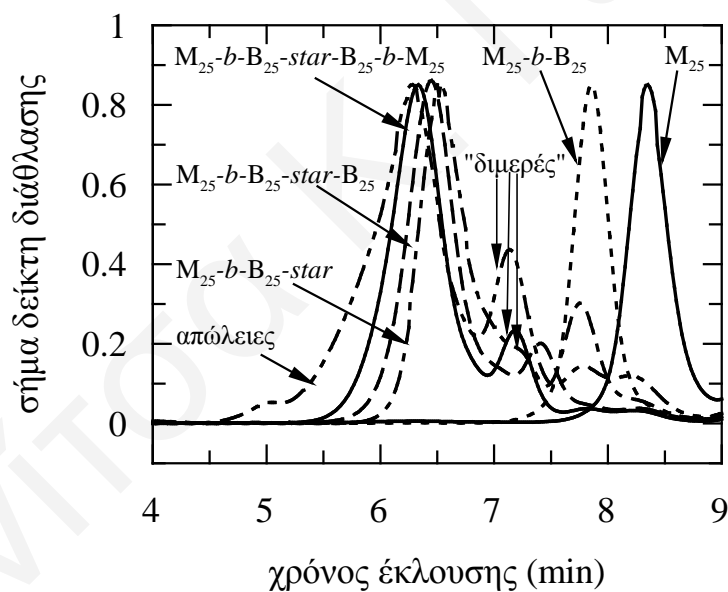


Σχήμα 3.21. Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων αρχιτεκτονικών των πλεγμάτων BuMA – MMA βασισμένων σε αστεροειδή πολυμερή που συντέθηκαν. Με μπλε και κόκκινο συμβολίζονται τα τμήματα των μονάδων MMA και BuMA, αντίστοιχα. Με μαύρο χρώμα συμβολίζονται οι κόμβοι των πλεγμάτων οι οποίοι αποτελούνται από το διασταυρωτή EGDMA.

3.2.1.2. Μοριακά Βάρη

Τα χρωματογραφήματα GPC των πέντε πρόδρομων μορίων και των απωλειών του αδρομερούς αστεροειδούς πλέγματος [(MMA₂₅-*b*-BuMA₂₅)-*star*-(BuMA₂₅-*b*-MMA₂₅)]-*network*, Πλέγματος 5, φαίνονται στο Σχήμα 3.22. Οι KMB του γραμμικού ομοπολυμερούς του MMA (M₂₅) και του γραμμικού διαδρομερούς συμπολυμερούς

MMA-BuMA (M_{25} - b - B_{25}) ήταν στενές και μονοδιάσπαρτες, όπως ήταν αναμενόμενο. Η KMB της κύριας κορυφής του χρωματογραφήματος του «arm-first» αστεροειδούς συμπολυμερούς (M_{25} - b - B_{25} - $star$) ήταν επίσης στενή αλλά το χρωματογράφημα παρουσίασε ακόμη δύο κορυφές. Η πρώτη κορυφή αντιστοιχούσε στους βραχίονες που δεν συνδέθηκαν με το αστεροειδές πολυμερές (και παρουσίασαν τον ίδιο χρόνο έκλυσης με το M_{25} - b - B_{25}) και η δεύτερη, που ήταν ένας μικρός «ώμος» και παρουσιάστηκε σε μικρότερο χρόνο έκλυσης από την πρώτη, πιθανότατα σχηματίστηκε από την αντίδραση ενός μορίου διασταυρωτή και δύο ζωντανών γραμμικών συμπολυμερών (βραχίονες) και υποδεικνύεται στο Σχήμα ως «διμερές». Οι βραχίονες οι οποίοι δεν συνδέθηκαν για να δώσουν αστεροειδές πολυμερές είναι πιθανό να αποτελούνταν από «ζωντανές» και «μη-ζωντανές» γραμμικές αλυσίδες. Οι «μη-ζωντανές» αλυσίδες οφείλονται σε τυχαία απενεργοποίηση κατά τη σύνθεση όπου τα



Σχήμα 3.22. Χρωματογραφήματα GPC των διαλυτών πρόδρομων πολυμερών απωλειών του αστεροειδούς συμπολυμερούς Πλέγματος 5, [(MMA₂₅- b -BuMA₂₅)- $star$ -(BuMA₂₅- b -MMA₂₅)]- $network$, και των απωλειών του. Τα γράμματα M και B είναι περαιτέρω συντομογραφίες για τις μονάδες MMA και BuMA, αντίστοιχα.

Πίνακας 3.8 ΜΒ και ΔΠΜΒ των πρόδρομων μορίων των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων ΒuΜΑ – ΜΜΑ.

Πλέγμα	Πολυμερές ¹	Θεωρητικό ΜW ²	Αποτελέσματα GPC		
			M _n	M _w /M _n	M _p
1	M ₅₀	5110	7220	1.11	7840
	M _{50-star}	*	120000	1.17	140000
	M _{50-star} -M ₅₀	*	238000	1.28	228000
2	B ₅₀	7310	9370	1.12	9810
	B _{50-star}	*	35600	2.45	126000
	B _{50-star} -B ₅₀	*	89200	1.86	181000
3	M ₅₀	5110	8000	1.11	8600
	M _{50-star}	*	83600	1.28	111000
	M _{50-star} -B ₅₀	*	171000	1.18	181000
4	B ₅₀	7310	9500	1.11	9810
	B _{50-star}	*	41800	2.64	140000
	B _{50-star} -M ₅₀	*	97900	1.67	164000
5	M ₂₅	2600	3210	1.13	3440
	M _{25-b} -B ₂₅	6210	8430	1.13	9190
	M _{25-b} -B ₂₅ -star	*	89000	1.31	126000
	M _{25-b} -B ₂₅ -star-B ₂₅	*	75700	1.83	144000
	M _{25-b} -B ₂₅ -star-B ₂₅ -b-M ₂₅	*	110000	1.73	181000
6	M _{25-co} -B ₂₅	6210	8620	1.13	9190
	M _{25-co} -B ₂₅ -star	*	103000	1.25	131000
	M _{25-co} -B ₂₅ -star-M _{25-co} -B ₂₅	*	95100	1.64	149000
7	B ₂₅	3600	3390	1.12	3550
	B _{25-b} -M ₂₅	6210	8850	1.12	9190
	B _{25-b} -M ₂₅ -star	*	88800	1.23	107000
	B _{25-b} -M ₂₅ -star-M ₂₅	*	146000	1.17	159000
	B _{25-b} -M ₂₅ -star-M ₂₅ -b-B ₂₅	*	189000	1.17	194000

¹Το Μ και το Β είναι συντομογραφίες των μονάδων ΜΜΑ και ΒuΜΑ, αντίστοιχα.

²Συμπεριλαμβάνονται 100 g mol⁻¹ από τον εκκινητή που ενσωματώνονται στο πολυμερές.

*Δεν μπορεί να υπολογισθεί γιατί ο αριθμός των βραχιόνων των αστεροειδών πολυμερών δεν είναι γνωστός *a priori*.

ενεργά κέντρα καταστρέφονται και έτσι οι αλυσίδες δεν μπορούν πλέον να μεγαλώσουν, να πολυμεριστούν με περαιτέρω προσθήκη μονομερούς ή διασταυρωτή. Οι «ζωντανές» αλυσίδες απλώς δεν αντέδρασαν με το EGDMA για να δώσουν αστεροειδές πολυμερές αλλά θα μπορούσαν να συνεχίσουν να πολυμερίζονται. Τα χρωματογράφημα των «in-out» αστεροειδών συμπολυμερών (M_{25} -*b*- B_{25} -*star*- B_{25} και M_{25} -*b*- B_{25} -*star*- B_{25} -*b*- M_{25}) παρουσίασαν και αυτά περισσότερες από δύο κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν στις ανάλογες κορυφές όπως του «arm-first» αστεροειδούς συμπολυμερούς, με τις κορυφές που αντιστοιχούν στα αστεροειδή πολυμερή να παρουσιάζουν στενή KMB. Τα MB των κύριων κορυφών των πέντε χρωματογραφήματων, από το ομοπολυμερές M_{25} μέχρι και το «in-out» αστεροειδές συμπολυμερές, M_{25} -*b*- B_{25} -*star*- B_{25} -*b*- M_{25} , αυξάνονται όπως και ήταν αναμενόμενο, υποδεικνύοντας την συνολική αύξηση της δομής του πολυμερούς και ότι ο πολυμερισμός συνέχισε να είναι «ζωντανός» ακόμη και μετά από τα πέντε στάδια. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για τα υπόλοιπα πρόδρομα πολυμερή των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων αυτής της ομάδας.

Στον Πίνακα 3.8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα χαρακτηρισμού με GPC των πρόδρομων μορίων των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων MMA – BuMA καθώς και τα θεωρητικά προβλεπόμενα MB. Τα αποτελέσματα από το GPC περιλαμβάνουν τα MB (M_n και M_p) και το ΔΠΜΒ (M_w/M_n). Οι ΔΠΜΒ όλων των γραμμικών πολυμερών ήταν χαμηλοί (≤ 1.13) αλλά τα M_n ήταν λίγο μεγαλύτερα από τα θεωρητικά προβλεπόμενα λόγω μερικής απενεργοποίησης του εκκινητή. Οι ΔΠΜΒ των «arm-first» αστεροειδών πολυμερών ήταν αρκετά χαμηλοί (≤ 1.31), ικανοποιητικοί για αστεροειδή πολυμερή, με δύο εξαιρέσεις: το Πλέγμα 2 και το Πλέγμα 4, όπου υπήρχε επικάλυψη των κορυφών, του αστεροειδούς πολυμερούς με το «διμερές» στην πρώτη περίπτωση (Πλέγμα 2) και του αστεροειδούς πολυμερούς με το «διμερές» και το γραμμικό πολυμερές (μη προστιθέμενος βραχίονας) στην περίπτωση του Πλέγματος 4. Τα «in-out» πρόδρομα αστεροειδή πολυμερή τεσσάρων πλεγμάτων (Πλέγματα 2, 4, 5 και 6) παρουσίασαν πλατιές KMB λόγω επικάλυψης των κορυφών, ενώ τα υπόλοιπα τρία «in-out» αστεροειδή πολυμερή παρουσίασαν σχετικά στενή KMB, με ΔΠΜΒ μικρότερο από 1.28. Τα M_n των «in-out» αστεροειδών πολυμερών ήταν μεγαλύτερα από αυτά των αντίστοιχων «arm-first» αστεροειδών πολυμερών, όπως ήταν αναμενόμενο, με εξαίρεση τα Πλέγματα 5 και 6, όπου παρουσιάστηκε αλληλεπικάλυψη των κορυφών. Τα

αντίστοιχα M_p τα οποία παρουσιάζονται επίσης στον Πίνακα 3.8 αποδεικνύουν ότι μετά από την κάθε προσθήκη αντιδραστηρίου τα MB αυξάνονταν. Πρέπει να σημειωθεί ότι η μέθοδος GPC δεν υπολογίζει με ακρίβεια τα M_n καθώς η βαθμονόμησή της γίνεται με γραμμικά PMMA και όχι αστεροειδή πολυμερή και ότι τα MB που υπολογίζονται είναι μικρότερα από τα πραγματικά (Simms, 1991 και Kanaoka et al, 1992). Παρόλα αυτά, αυτές οι τιμές των MB που προσδιορίζει η GPC είναι ικανοποιητικές αφού είναι ποιοτικά ενδεικτικές για την αύξηση των MB σε κάθε συνθετικό στάδιο.

3.2.1.3. Ποσοστό Μάζας, MB και Σύσταση των Απωλειών των Πλεγμάτων

Στον Πίνακα 3.9 παρουσιάζονται τα ποσοστά μάζας, τα MB, οι ΔΠMB και οι συστάσεις των απωλειών των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων BuMA – MMA όπως αυτά προσδιορίστηκαν από GPC και ^1H NMR. Με εξαίρεση το (BuMA₅₀-star-MMA₅₀)-network και το [(MMA₂₅-b-BuMA₂₅)-star-(BuMA₂₅-b-MMA₂₅)]-network τα οποία παρουσίασαν ποσοστό απωλειών 15.2 % και 20.4 % κ.β., αντίστοιχα, τα υπόλοιπα πλέγματα παρουσίασαν ικανοποιητικά χαμηλά ποσοστά απωλειών (≤ 11 %). Οι μικρές αυτές τιμές των απωλειών των πλεγμάτων συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες (Vamvakaki et al, 2001, Vamvakaki και Patrickios, 2002, Georgiades et al, 2002). Στην πρώτη από αυτές τις μελέτες προσδιορίστηκε η αναλογία 4 : 1 του διασταυρωτή EGDMA προς τον εκκινητή ως η καλύτερη, για ικανοποιητική μετατροπή των γραμμικών πολυμερών σε αστεροειδή πολυμερή (στο στάδιο σύνθεσης των «arm-first» αστεροειδών πολυμερών). Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι αυτά τα γραμμικά πολυμερή που δεν συνενώθηκαν για να δώσουν αστεροειδή αποτελούν συνήθως και το μεγαλύτερο μέρος των απωλειών. Παρόμοια αποτελέσματα, μη αποτελεσματικής συνένωσης των γραμμικών πολυμερών σε αστεροειδή, παρουσιάστηκαν και σε άλλες μελέτες «arm-first» αστεροειδών πολυμερών χρησιμοποιώντας «ζωντανό» ανιοντικό πολυμερισμό (Tsitsilianis, 1997) και «ζωντανό» κατιοντικό πολυμερισμό (Kanaoka et al, 1992), όπου επίσης παρουσιάστηκαν σχετικά υψηλά ποσοστά μετατροπής (> 85%). Επομένως, αυτές οι τιμές των απωλειών των αστεροειδών πλεγμάτων υποδεικνύουν ικανοποιητικό έλεγχο της αρχιτεκτονικής των πλεγμάτων κατά τη σύνθεση.

Πίνακας 3.9 Ποσοστιαία μάζα, MB, ΔΠMB και σύσταση των απωλειών των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων BuMA – MMA.

Πλέγμα	Πολυμερές ¹	w/w %	Αποτελέσματα GPC			¹ H NMR
		Απωλ.	M _n	M _w /M _n	M _p	% mol M
1	(M ₅₀ -star-M ₅₀)-network	11.0	357000	2.10	252000	100
2	(B ₅₀ -star-B ₅₀)-network	3.5	41200	1.05	41500	0
3	(M ₅₀ -star-B ₅₀)-network	5.8	6100	1.19	7550	76
4	(B ₅₀ -star-M ₅₀)-network	15.2	237000	1.34	221000	49
5	[(M ₂₅ -b-B ₂₅)-star-(B ₂₅ -b-M ₂₅)]-network	20.4	220000	1.37	207000	54
6	[(M ₂₅ -co-B ₂₅)-star-(M ₂₅ -co-B ₂₅)]-network	5.1	8930	1.12	10500	54
7	[(B ₂₅ -b-M ₂₅)-star-(M ₂₅ -b-B ₂₅)]-network	5.3	7960	1.45	9500	44

¹Το M και το B είναι περαιτέρω συντομογραφίες των μονάδων MMA και BuMA, αντίστοιχα.

Στον Πίνακα 3.9 μαζί με τα ποσοστά μάζας των απωλειών παρουσιάζονται και τα σχετικά M_p των μεγαλύτερων σε εμβαδό κορυφών στα αντίστοιχα χρωματογράφηματα GPC και η σύσταση των απωλειών. Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι η θεωρητικά αναμενόμενη σύσταση των συμπολυμερικών πλεγμάτων είναι 50 % σε MMA. Από αυτά τα αποτελέσματα είναι εφικτός ο προσδιορισμός του πρόδρομου πολυμερούς του πλέγματος από το οποίο αποτελείται το μεγαλύτερο μέρος των απωλειών. Για τα Πλέγματα 1, 4 και 5 το πρόδρομο αυτό πολυμερές ήταν το «in-out» αστεροειδές πολυμερές, αφού τα M_p αυτών των απωλειών αντιστοιχούν στα M_p των «in-out» αστεροειδών πολυμερών (σύγκριση με τον Πίνακα 3.8). Για τα Πλέγματα 3, 6 και 7 φαίνεται ότι το μεγαλύτερο μέρος των απωλειών αποτελείτο από γραμμικά πολυμερή, διότι τα M_p ήταν μικρά και αντιστοιχούν σε αυτά των γραμμικών πρόδρομων μορίων. Οι απώλειες του Πλέγματος 2 αποτελούνται κυρίως από το «διμερές» και το «arm-first» αστεροειδές πολυμερές. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα Πλέγματα 1, 4 και 5, των οποίων οι

απώλειες παρουσίασαν τα μεγαλύτερα MB, παρουσίασαν και τις μεγαλύτερες τιμές ποσοστών μαζών των απωλειών.

3.2.1.4. Βαθμοί Διόγκωσης

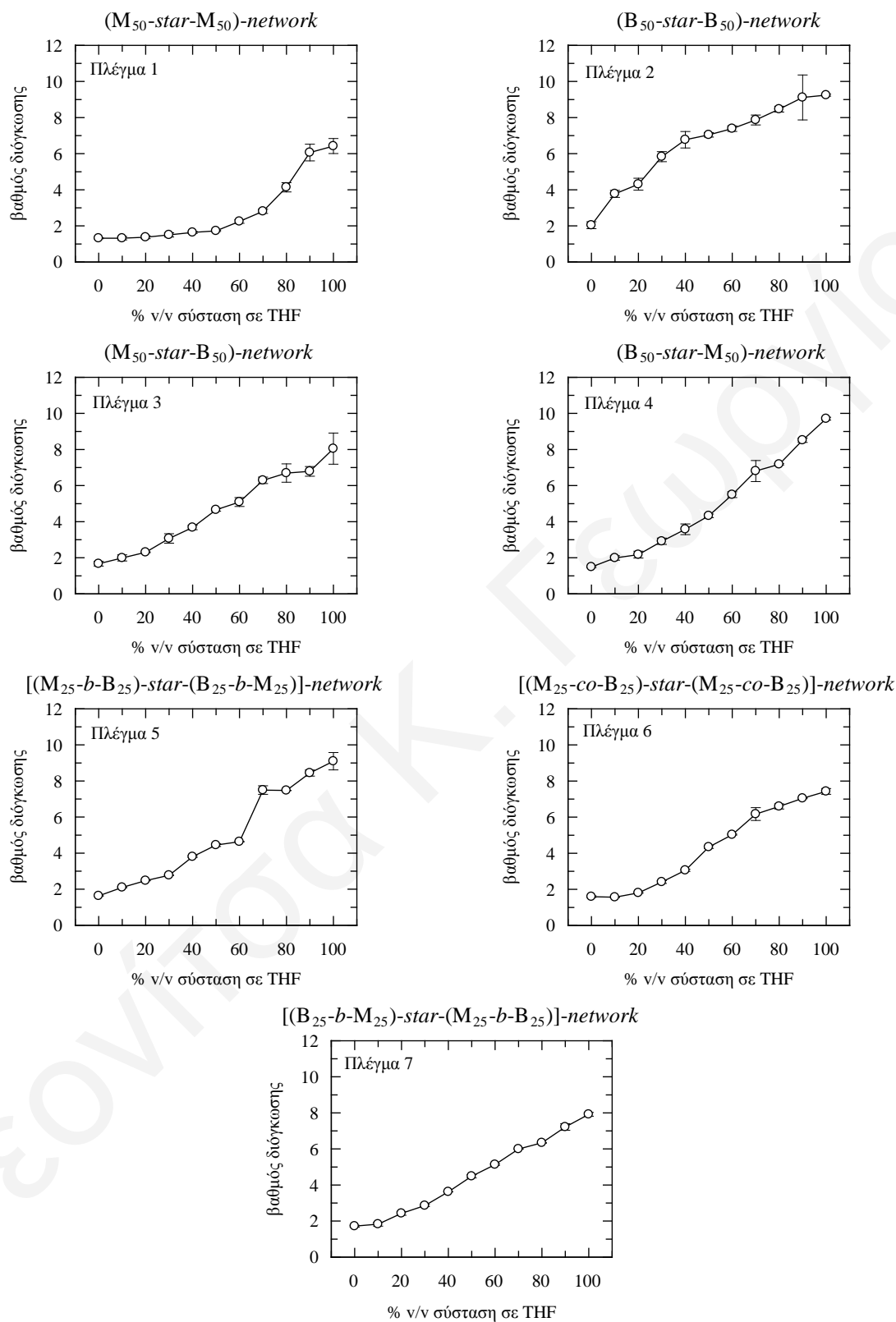
Στο Σχήμα 3.23 παρουσιάζονται οι ΒΔ των αστεροειδών πλεγμάτων BuMA – MMA σε THF / κ-εξάνιο σαν συνάρτηση της % κ.ο. σύστασης του διαλύτη σε THF. Καθώς αυξανόταν το ποσοστό του διαλύτη σε THF, οι ΒΔ όλων των αστεροειδών πλεγμάτων αυξάνονταν. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι και οι δύο επαναλαμβανόμενες μονάδες των πλεγμάτων, MMA και BuMA, είναι πιο συμβατές με το THF παρά στο κ-εξάνιο, όπως αποδεικνύεται και από τις τιμές των παραμέτρων διαλυτότητας, δ , στον Πίνακα 2.1 (βλέπε Πειραματικό Μέρος: 2.1, σελ 80). Το THF είναι καλός διαλύτης και για τα δύο μονομερή, MMA και BuMA, παρουσιάζοντας μία τιμή της δ που είναι κοντά και μεταξύ αυτών των δύο μονομερών. Από την άλλη, το κ-εξάνιο είναι μη-διαλύτης και για τα δύο μονομερή με μία τιμή δ πολύ μικρότερη από αυτές και των δύο μονομερών.

Η εξάρτηση των ΒΔ των ομοπολυμερικών πλεγμάτων από τη σύσταση του διαλύτη σε THF δεν είναι γραμμική. Ο ΒΔ του (MMA₅₀-star-MMA₅₀)-network άρχισε να αυξάνεται μόνο όταν η σύσταση του διαλύτη ξεπέρασε το 50% THF, σε αντίθεση με το (BuMA₅₀-star-BuMA₅₀)-network του οποίου ο ΒΔ αυξήθηκε σημαντικά μόλις η σύσταση του διαλύτη αυξήθηκε από 0 σε 10% THF. Η καμπύλη εξάρτησης του ΒΔ από τη σύσταση του διαλύτη σε THF για το τυχαίο αστεροειδές συμπολυμερικό πλέγμα δεν ήταν ούτε αυτή γραμμική και είχε σιγμοειδή μορφή, ενώ οι καμπύλες εξάρτησης του ΒΔ για τα υπόλοιπα πέντε συμπολυμερικά αστεροειδή πλέγματα τα οποία όλα αποτελούνται από τμήματα (segments) των δύο μονομερών (ετεροβραχιονικά ή αδρομερή) ήταν σχεδόν γραμμικές υποδεικνύοντας ότι η μη-τυχαία αρχιτεκτονική ομαλοποιεί τη διόγκωση των πλεγμάτων.

Στο Σχήμα 3.24 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα από το προηγούμενο σχήμα για ευκολότερη σύγκριση. Συγκεκριμένα, στο Σχήμα 3.24 δίνονται οι τιμές των ΒΔ για όλα τα πολυμερικά πλέγματα σε τρεις συστάσεις του διαλύτη (THF / κ-εξάνιο), σε 100%, 50% και 0% THF καθώς και σε νερό. Οι τιμές των ΒΔ όλων των πλεγμάτων σε νερό ήταν πολύ μικρές, μεταξύ 1.5 και 2.2, γιατί και τα δύο μονομερή είναι υδρόφοβα και μη-συμβατά με το νερό. Οι τιμές των ΒΔ σε 100% THF κυμάνθηκαν από

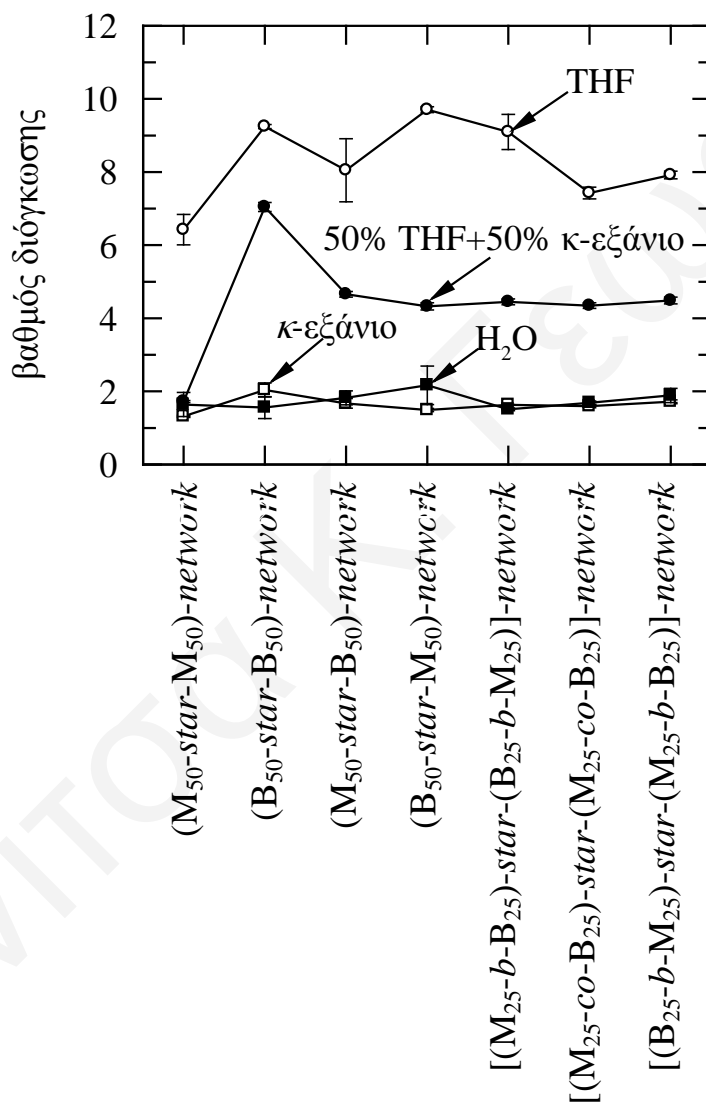
6.4 ως 9.7, ενώ οι τιμές των ΒΔ σε 100% κ-εξάνιο κυμάνθηκαν από 1.3 ως 2.0. Όπως έχει

Θεονίτσα Κ. Γεωργίου



Σχήμα 3.23. Οι βαθμοί διόγκωσης των αστεροειδών πλεγμάτων BuMA – MMA σαν συνάρτηση της σύστασης του διαλύτη σε THF.

προαναφερθεί, όλα τα πολυμερικά πλέγματα είναι συμβατά με το THF αλλά όχι με το κ-εξάνιο, και επομένως διογκώνονται περισσότερο στο THF από ό,τι στο κ-εξάνιο. Οι τιμές των ΒΔ στο 50-50 μίγμα THF-κ-εξανίου ήταν μεταξύ αυτών των δύο καθαρών διαλυτών. Πρέπει να σημειωθεί ότι όλα τα συμπολυμερικά πλέγματα και το ομοπολυμερικό πλέγμα του BuMA διογκώνονται σε αυτή τη σύσταση του μίγματος των διαλυτών, ενώ το ομοπολυμερικό πλέγμα του MMA βρίσκεται σε συρρικνωμένη μορφή. Επιπρόσθετα, το



Σχήμα 3.24. Βαθμοί διόγκωσης των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων BuMA – MMA σε διάφορους διαλύτες συναρτήσει του τύπου του πολυμερικού πλέγματος.

ομοπολυμερικό πλέγμα του BuMA παρουσίασε τη μεγαλύτερη τιμή ΒΔ σε αυτό το μίγμα, ενώ όλα τα συμπολυμερικά πλέγματα παρουσίασαν παρόμοιες τιμές, ανεξάρτητες από την αρχιτεκτονική του πλέγματος, πάντα ανάμεσα σε αυτές των δύο ομοπολυμερών.

Όλες οι πιο πάνω παρατηρήσεις μπορούν να εξηγηθούν με βάση τις παραμέτρους αλληλεπίδρασης Flory-Huggins, χ , των ομοπολυμερών του BuMA και του MMA καθώς και του 50-50 συμπολυμερούς των δύο μονομερών σε τέσσερις διαφορετικούς διαλύτες, THF, κ-εξάνιο, 50-50 κ-εξάνιο-THF, και νερό, οι οποίες δίνονται στον Πίνακα 3.10. Αυτές οι τιμές των παραμέτρων αλληλεπίδρασης χ υπολογίστηκαν από τις παραμέτρους διαλυτότητας δ οι οποίες δόθηκαν στον Πίνακα 2.1 (Brandrup et al 1999) χρησιμοποιώντας την Εξίσωση [2.4] (Van Krevelen, 1990) στο Πειραματικό Μέρος (Σελίδα 82). Οι τιμές των χ και για τα τρία πολυμερή σε νερό και κ-εξάνιο είναι, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.10, μεγαλύτερες του 0.5, που είναι η τιμή για ένα θ -διαλύτη, επιβεβαιώνοντας ότι τα δύο αυτά υγρά δεν αποτελούν διαλύτες αυτών των πολυμερών. Αντίθετα, οι τιμές των χ και για τα τρία πολυμερή σε THF είναι όλες μικρότερες από 0.5, υποδεικνύοντας ότι το THF είναι καλός διαλύτης για τα τρία πολυμερή. Τέλος, οι τιμές των χ για το 50-50 μίγμα κ-εξάνιου-THF υποδεικνύουν καλή διαλυτότητα – συμβατότητα για το ομοπολυμερές του BuMA, κακή διαλυτότητα για το ομοπολυμερές του MMA και σχεδόν θ -συμπεριφορά (διαλυτότητα) για το συμπολυμερές.

Πίνακας 3.10 Οι παράμετροι αλληλεπίδρασης Flory – Huggins για δώδεκα συνδυασμούς μεταξύ τεσσάρων διαλύτων και τριών πολυμερών.

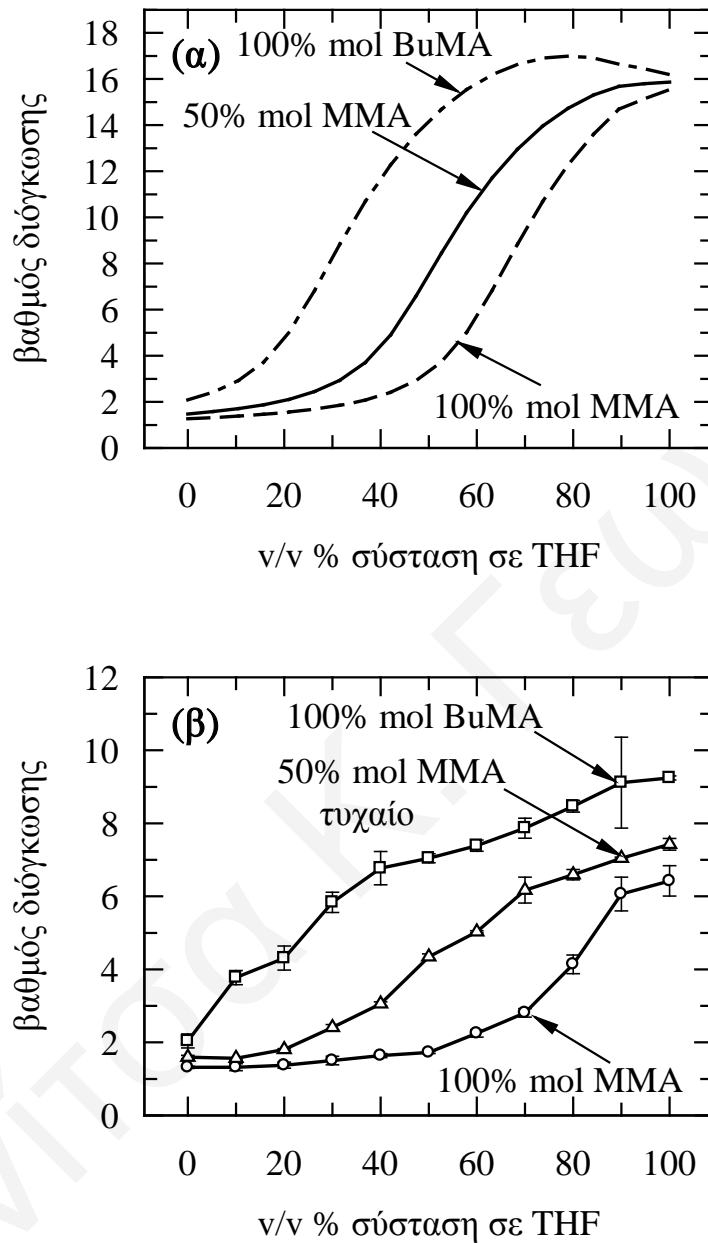
Παράμετρος αλληλεπίδρασης Flory – Huggins χ				
	Πολυμερές	BuMA	MMA	50-50 BuMA-MMA
Διαλύτης				
<i>n</i> -hexane		0.752	1.227	0.989
THF		0.356	0.369	0.362
50-50 <i>n</i> -hexane- THF		0.406	0.650	0.528
H ₂ O		39.391	35.736	37.563

Ακριβώς λόγω αυτής της ασυμβατότητας των δύο μονομερών σε αυτό το μίγμα διαλύτη, 50-50 κ-εξάνιου-THF, υπήρχε η πιθανότητα τα συμπολυμερικά τμηματικά πλέγματα (αδρομερή και ετεροβραχιονικά) να παρουσιάζουν μικροφασικό διαχωρισμό. Αυτή η πιθανότητα διερευνήθηκε θεωρητικά με τη χρήση ενός θερμοδυναμικού μοντέλου, το οποίο προβλέπει τη διόγκωση των πλεγμάτων, και περιγράφεται πιο κάτω.

3.2.1.5. Θεωρητικά Προβλεπόμενοι Βαθμοί Διόγκωσης

Στο Σχήμα 3.25(α) παρουσιάζονται οι θεωρητικά προβλεπόμενοι ΒΔ σαν συνάρτηση της σύστασης του διαλύτη σε THF για τα δύο ομοπολυμερή των MMA και BuMA καθώς και για το 50-50 συμπολυμερές τους. Καθώς η σύσταση του διαλύτη σε THF αυξάνεται, οι ΒΔ όλων των πλεγμάτων αυξάνονται, με τα ομοπολυμερή του MMA και του BuMA να παρουσιάζουν τις μικρότερες και τις μεγαλύτερες τιμές ΒΔ, αντίστοιχα, και το συμπολυμερές να παρουσιάζει ενδιάμεσες τιμές ΒΔ. Αυτή η προβλεπόμενη συμπεριφορά είναι ποιοτικά πολύ παρόμοια με τα πειραματικά δεδομένα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.23 και συγκεντρώνονται στο Σχήμα 3.25(β) για καλύτερη σύγκριση. Σε αυτό το Σχήμα οι τιμές των πειραματικών ΒΔ είναι περίπου κατά 50% μικρότερες από τις θεωρητικά αναμενόμενες πιθανότατα λόγω εμπλοκών (entanglements) των πολυμερικών αλυσίδων μεταξύ τους, οι οποίες δημιουργούν έτσι επιπρόσθετους «φυσικούς» κόμβους διασταύρωσης.

Το θεωρητικό μοντέλο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη για να εξεταστεί η περίπτωση που τα τμηματικά αστεροειδή πολυμερή παρουσιάζουν μικροφασικό διαχωρισμό, λαμβάνει υπόψη τρεις πιθανές μικροφασικά διαχωρισμένες μορφολογίες του πλέγματος: τη σφαιρική, την κυλινδρική και τη φυλλώδη (lamellar) μορφολογία (Georgiou et al, 2004(α)). Οι υπολογισμοί έδειξαν ότι η ελεύθερη ενέργεια Gibbs του συστήματος στη διαταραγμένη μορφή (μη-μικροφασικά διαχωρισμένη) ήταν μικρότερη από αυτές που αντιστοιχούσαν στις μικροφασικά διαχωρισμένες μορφολογίες. Εξάχθηκε έτσι το συμπέρασμα ότι το συγκεκριμένο σύστημα δεν παρουσίασε καμία από τις μικροφασικά διαχωρισμένες μορφολογίες που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με την τιμή του $\chi = 0.65$ για την αλληλεπίδραση μεταξύ των μονάδων του MMA και του 50-50 μίγματος κ-εξάνιου-THF στον Πίνακα 3.10, η οποία



Σχήμα 3.25. Εξάρτηση του βαθμού διόγκωσης των δύο ομοπολυμερών πλεγμάτων και του 50-50 συμπολυμερούς πλέγματος από τη σύσταση του διαλύτη σε THF. **(α)** Θεωρητικά προβλεπόμενοι βαθμοί διόγκωσης **(β)** Πειραματικά προσδιορισμένοι βαθμοί διόγκωσης.

υποδεικνύει μία μικρή ασυμβατότητα μεταξύ των δύο, που δεν είναι ωστόσο αρκετή για να οδηγήσει το σύστημα / πλέγμα σε μία μικροφασικά διαχωρισμένη κατάσταση. Η απουσία του μικροφασικού διαχωρισμού υποστηρίζεται και πειραματικά από τη μη διαφοροποίηση των ΒΔ των τμηματικών συμπολυμερικών πλεγμάτων συγκριτικά με τους ΒΔ του τυχαίου συμπολυμερικού πλέγματος (Σχήμα 3.24), αφού το τελευταίο δεν μπορεί να διαχωριστεί μικροφασικά και δεν παρουσίασε καμία διαφορά κατά τη διόγκωσή του από τα υπόλοιπα τέσσερα πλέγματα. Σε προηγούμενες μελέτες που έχουν γίνει σε αμφιφιλικά αστεροειδή πολυμερικά πλέγματα τα τμηματικά πλέγματα που μπορούσαν να παρουσιάσουν μικροφασικό διαχωρισμό διογκώθηκαν στην ιοντισμένη τους μορφή σημαντικά λιγότερο από το τυχαίο πλέγμα (Vamvakaki και Patrickios, 2001), κάτι που παρατηρήθηκε και σε αυτή τη Διδακτορική Εργασία στις μελέτες που αναφέρονται στη συνέχεια.

Συμπερασματικά, λοιπόν, πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η σύνθεση διπλά υδρόφοβων αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων, MMA και BuMA, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο πολυμερισμού GTP, ο οποίος παρέμεινε ενεργός και μετά από έξι συνθετικά στάδια. Όλα τα πολυμερικά πλέγματα διογκώνονται στο THF, ένα καλό διαλύτη και για τα δύο μονομερή, ενώ στο κ-εξάνιο που δεν αποτελεί καλό διαλύτη για κανένα από τα δύο μονομερή τα πλέγματα δεν διογκώνονται. Στο 50-50 μίγμα κ-εξανίου-THF, τα ομοπολυμερή πλέγματα του BuMA και του MMA παρουσίασαν το μεγαλύτερο και το μικρότερο ΒΔ, αντίστοιχα, ενώ όλα τα συμπολυμερή πλέγματα παρουσίασαν ΒΔ μεταξύ των ΒΔ αυτών των δύο ομοπολυμερικών πλεγμάτων, υποδεικνύοντας μη εξάρτηση των ΒΔ από την αρχιτεκτονική των πλεγμάτων. Η απουσία της διαφοροποίησης της διόγκωσης του τυχαίου αστεροειδούς πλέγματος συγκριτικά με τα τέσσερα τμηματικά συμπολυμερικά πλέγματα (ετεροβραχιονικά και αδρομερή) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν υπήρξε μικροφασικός διαχωρισμός στα τμηματικά πλέγματα, κάτι που υποστηρίζεται και θεωρητικά από το θερμοδυναμικό μοντέλο.

3.2.2. Αστεροειδή Πλέγματα DEAEEMA – HEGMA

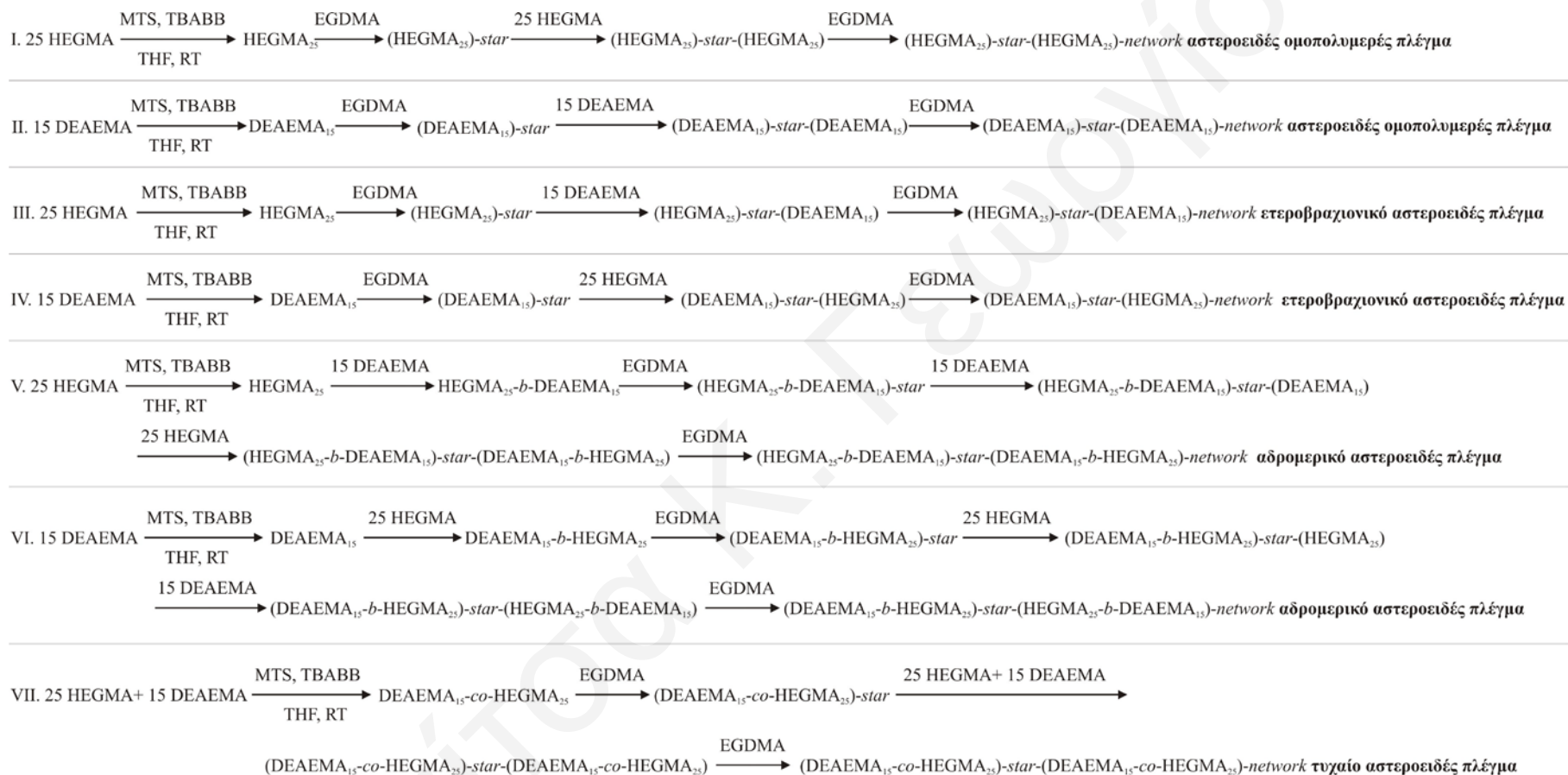
3.2.2.1. Σύνθεση

Η δεύτερη οικογένεια αστεροειδών πλεγμάτων που συντέθηκε μέσα στα πλαίσια αυτής της Διδακτορικής Εργασίας είναι τα αμφιφιλικά πολυμερικά πλέγματα DEAEEMA – HEGMA. Αυτός ο συνδυασμός μονομερών στα πλέγματα δεν αποτελεί ένα συνηθισμένο συνδυασμό για την παρασκευή αμφιφιλικών πλεγμάτων. Συνήθως τα μονομερή που χρησιμοποιούνται είναι ένα υδρόφοβο και ένα υδρόφιλο είτε μη ιοντικό είτε ιονιζόμενο μονομερές (Patrickios και Georgiou, 2004). Ο συγκεκριμένος συνδυασμός μονομερών έχει χρησιμοποιηθεί σε μερικές περιπτώσεις από την ομάδα του Peppas (Podual 2000(α), (β), (γ) και 2005) για τη σύνθεση πλεγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη απόδοση γλυκόζης, χωρίς όμως να έχει γίνει συστηματική μελέτη που να αναφέρεται μόνο στο χαρακτηρισμό των πλεγμάτων και συγκεκριμένα των ΒΔ τους σε διάφορα pH, αφού αυτά τα πλέγματα από αμφιφιλικά σε ψηλά pH μετατρέπονται σε διπλά-υδρόφιλα και ιοντισμένα πλέγματα σε χαμηλά pH, λόγω της πρωτονίωσης των μονάδων του DEAEEMA που από υδρόφοβο γίνεται υδρόφιλο και θετικά φορτισμένο.

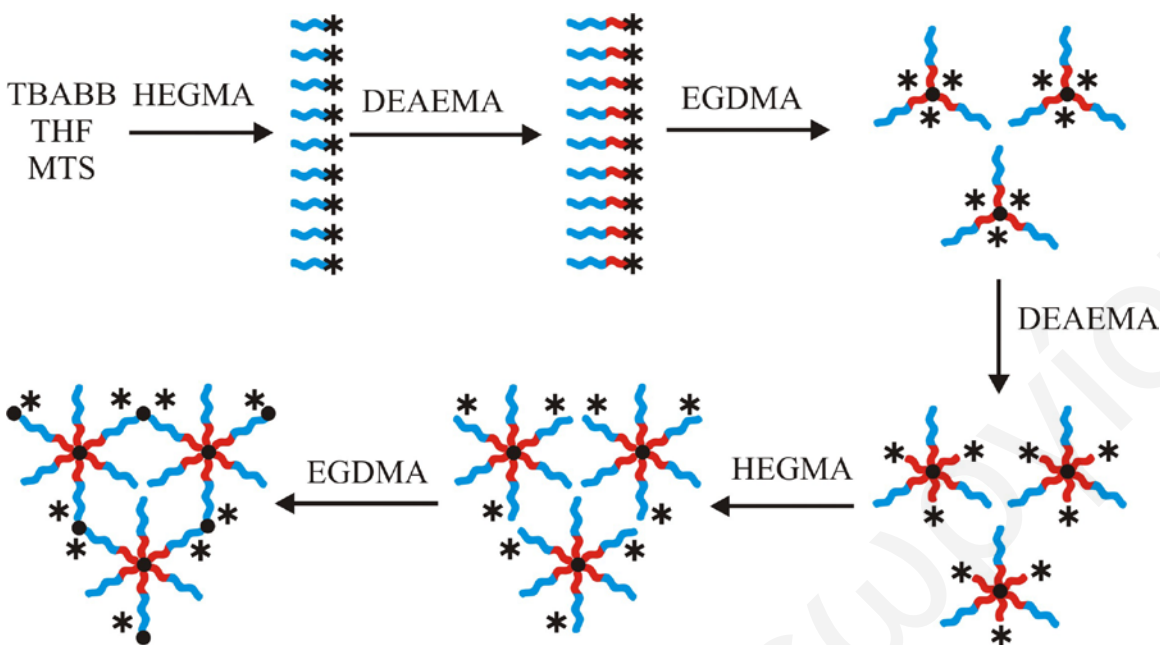
Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή αυτών των αμφιφιλικών αστεροειδών πλεγμάτων DEAEEMA – HEGMA ήταν η ίδια με αυτή των διπλά – υδρόφοβων αστεροειδών πλεγμάτων MMA – BuMA, με τη διαφορά ότι σε αυτά τα πλέγματα η σύσταση στα δύο μονομερή δεν ήταν 50-50, αλλά 38 και 62 % σε DEAEEMA – HEGMA, αντίστοιχα. Όπως και στην πρώτη οικογένεια αστεροειδών πλεγμάτων, συντέθηκαν επτά πλέγματα, δύο ομοπολυμερή, δύο βασισμένα σε ετεροβραχιονικά αστεροειδή πολυμερή, δύο βασισμένα σε αδρομερή συμπολυμερή και ένα βασισμένο σε τυχαίο αστεροειδές συμπολυμερές. Οι συνθετικές πορείες παρασκευής αυτών των αστεροειδών πλεγμάτων συνοψίζονται στο Σχήμα 3.26.

Ένα σχηματικό παράδειγμα της συνθετικής διαδικασίας από αυτή την οικογένεια πολυμερών δίνεται στο Σχήμα 3.27, ενώ στο Σχήμα 3.28 παρουσιάζονται οι σχηματικές απεικονίσεις όλων των αστεροειδών πλεγμάτων DEAEEMA – HEGMA. Και στα δύο σχήματα με κόκκινο συμβολίζεται το DEAEEMA, με μπλε το HEGMA, με μαύρους κύκλους οι κόμβοι οι οποίοι αποτελούνται από EGDMA και τέλος με μαύρο αστεράκι τα ενεργά κέντρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ



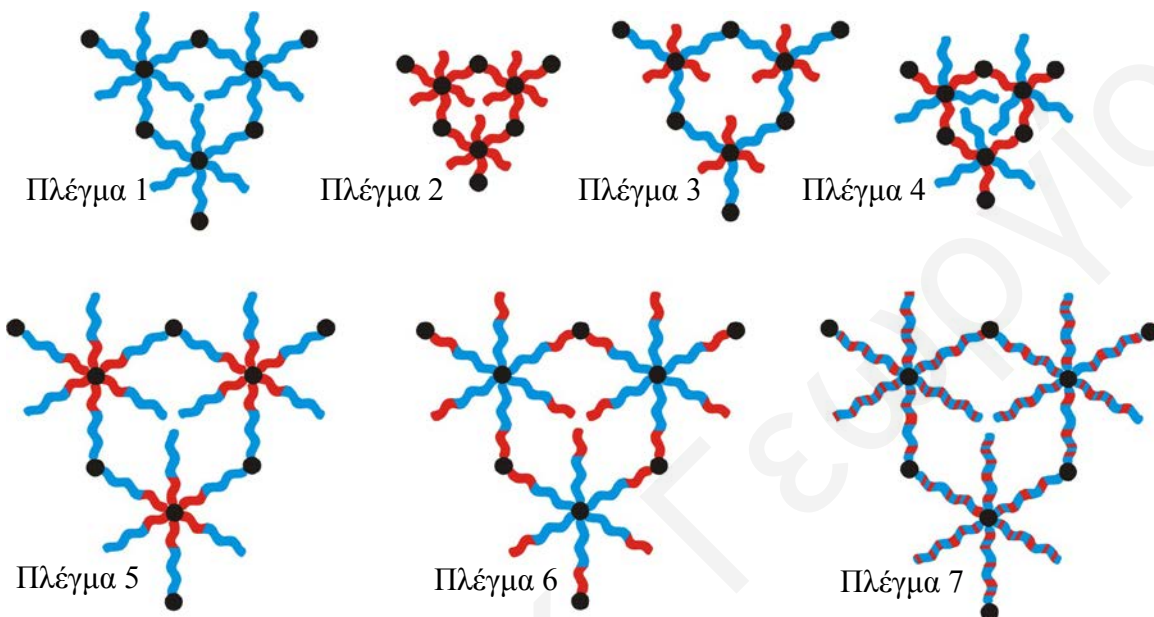
Σχήμα 3.26. Συνθετικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή των διάφορων αρχιτεκτονικών των αστεροειδών πλεγμάτων DEAEAMA – HEGMA.



Σχήμα 3.27. Σχηματική απεικόνιση της συνθετικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του πλέγματος [(HEGMA₂₅-*b*-DEAEEMA₁₅)-*star*-(DEAEEMA₁₅-*b*-HEGMA₂₅)]-*network*, το οποίο είναι βασισμένο σε αδρομερή αστεροειδή συμπολυμερή. Ο αριθμός των βραχιόνων των αστεροειδών πολυμερών δεν είναι 3 / 6, όπως υποδεικνύεται στο σχήμα, αλλά μεγαλύτερος. Με μπλε και κόκκινο συμβολίζονται τα τμήματα των μονάδων HEGMA και DEAEEMA, αντίστοιχα, ενώ με μαύρους κύκλους και μαύρους αστερίσκους συμβολίζονται οι κόμβοι και τα ενεργά κέντρα των πολυμερών, αντίστοιχα.

Οι διάφορες αρχιτεκτονικές των αστεροειδών πλεγμάτων DEAEEMA – HEGMA που παρασκευάστηκαν είναι αντίστοιχες με αυτές των αστεροειδών πλεγμάτων MMA – BuMA με τη διαφορά ότι οι ΒΠ για το DEAEEMA και HEGMA είναι 15 και 25, αντίστοιχα, αντί 25 και 25 που ήταν για τα MMA και BuMA στην περίπτωση των πλεγμάτων MMA – BuMA. Έτσι, πάνω αριστερά στο Σχήμα 3.28 παρουσιάζονται οι σχηματικές απεικονίσεις των δύο ομοπολυμερικών (Πλέγματα 1 και 2), πάνω δεξιά των δύο ετεροβραχιονικών (Πλέγματα 3 και 4), κάτω δεξιά του τυχαίου (Πλέγμα 7) και κάτω αριστερά των δύο αδρομερών αστεροειδών πλεγμάτων (Πλέγματα 5 και 6). Πρέπει να

σημειωθεί ότι αν και η σύσταση των δύο μονομερών στα συμπολυμερικά πλέγματα κρατήθηκε σταθερή, ο ΒΠ των ελαστικών αλυσίδων, δηλαδή το μήκος μεταξύ δύο κόμβων, δεν κρατήθηκε σταθερό.



Σχήμα 3.28. Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων αρχιτεκτονικών των πλεγμάτων DEAEEMA – HEGMA που συντέθηκαν βασισμένα σε αστεροειδή πολυμερή. Με κόκκινο και μπλε συμβολίζονται τα τμήματα των μονάδων DEAEEMA και HEGMA, αντίστοιχα. Με μαύρο χρώμα συμβολίζονται οι κόμβοι των πλεγμάτων οι οποίοι αποτελούνται από το διασταυρωτή EGDMA.

3.2.2.2. Μοριακά Βάρη

Στον Πίνακα 3.11 δίνονται τα MB και οι ΔΠΜΒ των αμφιφιλικών αστεροειδών πλεγμάτων DEAEEMA – HEGMA όπως αυτά προσδιορίστηκαν από το GPC. Για όλα τα γραμμικά πρόδρομα πολυμερή ο ΔΠΜΒ είναι χαμηλός (< 1.15) και τα M_n τους είναι στις πλείστες περιπτώσεις κοντά στα θεωρητικά αναμενόμενα MB τα οποία δίνονται και αυτά στον ίδιο πίνακα. Ο ΔΠΜΒ για τα «arm-first» αστεροειδή πολυμερή ήταν μεγάλος γιατί υπήρξε αλληλοεπικάλυψη των κορυφών του αστεροειδούς πολυμερούς και του

Πίνακας 3.11 MB και ΔΠMB των πρόδρομων μορίων των αστεροειδών πλεγμάτων DEAEEMA – HEGMA.

Πλέγμα	Πολυμερές ¹	Θεωρητικό MW ²	Αποτελέσματα GPC		
			M _n	M _w /M _n	M _p
1	H ₂₅	8850	8500	1.08	8900
	H ₂₅ -star	*	18900	1.41	31600
	H ₂₅ -star-H ₂₅	*	13900	1.72	25000
2	D ₁₅	2879	3400	1.08	3600
	D ₁₅ -star	*	29100	1.30	42300
	D ₁₅ -star-D ₁₅	*	49000	1.19	53600
3	H ₂₅	8850	10100	1.10	12300
	H ₂₅ -star	*	12100	1.25	15500
	H ₂₅ -star-D ₁₅	*	10700	1.13	15100
4	D ₁₅	2879	3900	1.07	4100
	D ₁₅ -star	*	33700	1.28	45700
	D ₁₅ -star-H ₂₅	*	12100	1.45	19700
5	H ₂₅	8850	8700	1.10	10500
	H ₂₅ -b-D ₁₅	11629	10700	1.12	13300
	H ₂₅ -b-D ₁₅ -star	*	12800	1.37	17700
	H ₂₅ -b-D ₁₅ -star-D ₁₅	*	13400	1.45	18200
	H ₂₅ -b-D ₁₅ -star-D ₁₅ -b-H ₂₅	*	12300	1.45	16400
6	D ₁₅	2879	3600	1.08	3700
	D ₁₅ -b-H ₂₅	11629	11300	1.15	14400
	D ₁₅ -b-H ₂₅ -star	*	13800	1.34	19700
	D ₁₅ -b-H ₂₅ -star-H ₂₅	*	9500	1.40	12300
	D ₁₅ -b-H ₂₅ -star-H ₂₅ -b-D ₁₅	*	10400	1.43	13300
7	D ₁₅ -co-H ₂₅	11629	17300	1.08	19200
	D ₁₅ -co-H ₂₅ -star	*	22500	1.25	31600
	D ₁₅ -co-H ₂₅ -star-H ₂₅ -co-D ₁₅	*	19000	1.42	30000

¹Το D και το H είναι συντομογραφίες των μονάδων DEAEEMA και HEGMA, αντίστοιχα.

²Συμπεριλαμβάνονται 100 g mol⁻¹ από τον εκκινητή που ενσωματώνονται στο πολυμερές.

*Δεν μπορεί να υπολογισθεί γιατί ο αριθμός των βραχιόνων των αστεροειδών πολυμερών δεν είναι γνωστός *a priori*.

γραμμικού πολυμερούς που δεν αντέδρασε περαιτέρω για να ενσωματωθεί στο αστεροειδές πολυμερές. Παρόμοιες κατανομές παρατηρήθηκαν και για τα «in-out» αστεροειδή πολυμερή.

3.2.2.3. Ποσοστό Μάζας, MB και Σύσταση των Απωλειών των Πλεγμάτων

Στον Πίνακα 3.12 παρουσιάζονται τα ποσοστά μάζας, τα MB, οι ΔΠΜΒ και οι συστάσεις των απωλειών των αμφιφιλικών αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DEAEEMA – HEGMA όπως αυτά προσδιορίστηκαν από το GPC και το ^1H NMR. Τα ποσοστά μάζας των απωλειών κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα με αυτά των αστεροειδών πολυμερών MMA – BuMA, από 5 ως 11.5 % με τα ποσοστά αυτών των πλεγμάτων, DEAEEMA – HEGMA, να είναι λίγο χαμηλότερα. Αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι τα ενεργά κέντρα των πολυμερών που περιέχουν μονάδες MMA και BuMA είναι αρκετά δραστικότερα από τα αντίστοιχα ενεργά κέντρα των πολυμερών των μονομερών DEAEEMA και HEGMA και αντιδρούν γρηγορότερα με το διασταυρωτή EGDMA για να δώσουν το πλέγμα. Κατά συνέπεια παραμένουν κάποιες περιοχές που δεν προλαβαίνουν να αντιδράσουν. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από το γεγονός ότι για να μπορέσει να γίνει η σύνθεση των διπλά υδρόφοβων αστεροειδών πολυμερών MMA – BuMA η φιάλη πολυμερισμού βρισκόταν σε υδατόλουτρο διαφορετικά η θερμοκρασία ανέβαινε πολύ, με κίνδυνο εξάτμισης του διαλύτη διεξαγωγής του πολυμερισμού, ενώ για τα αστεροειδή πολυμερή DEAEEMA – HEGMA και στις υπόλοιπες οικογένειες πολυμερών αυτής της Διδακτορικής Διατριβής δεν χρησιμοποιήθηκε αυτή η πειραματική διαδικασία. Στον Πίνακα 3.12 παρατηρείται επίσης ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά απωλειών τα παρουσίασαν τα πλέγματα με τις πιο πολύπλοκες αρχιτεκτονικές, δηλαδή αυτά που απαιτούσαν περισσότερα συνθετικά στάδια, όπως και ήταν αναμενόμενο. Από τα MB και τις συστάσεις των απωλειών (η θεωρητικά αναμενόμενη σύσταση των αστεροειδών συμπολυμερικών πλεγμάτων είναι 62.5 % σε HEGMA) συμπεραίνεται ότι όλες οι απώλειες αποτελούνταν περισσότερο από τα πρόδρομα γραμμικά πολυμερή αφού οι απώλειες των δύο ετεροβραχιονικών πλεγμάτων αποτελούνταν περισσότερο από τις μονάδες του αντίστοιχου γραμμικού πρόδρομου ομοπολυμερούς.

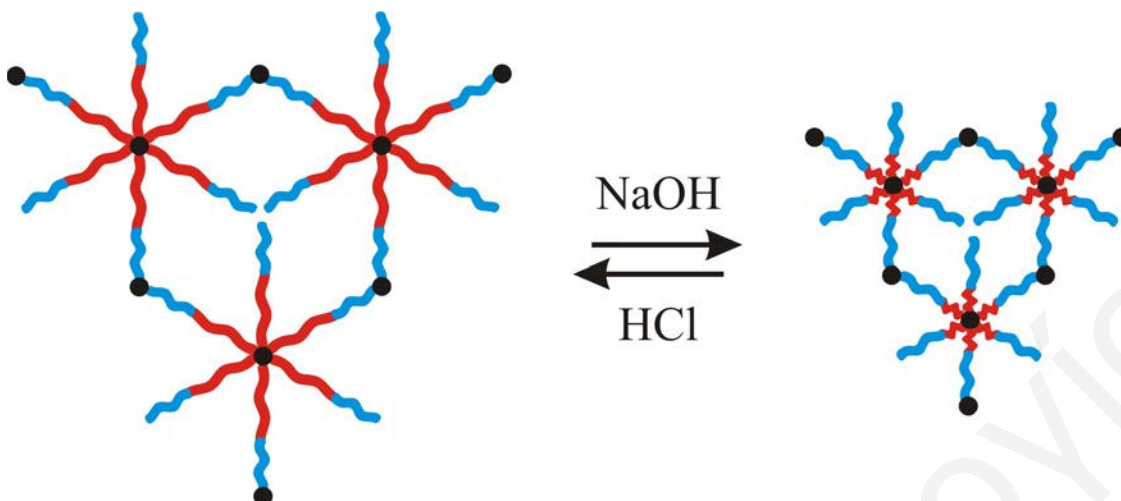
Πίνακας 3.12 Ποσοστιαία μάζα, MB, ΔΠΜΒ και σύσταση των απωλειών των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DEAEμα – HEGMA.

Πλέγμα	Πολυμερές ¹	w/w %	Αποτελέσματα GPC			¹ H NMR
		Απωλ.	M _n	M _w /M _n	M _p	% mol H
1	(H ₂₅ -star-H ₂₅)-network	11.5	10500	1.28	10400	100
2	(D ₁₅ -star-D ₁₅)-network	5.0	4200	1.36	3480	0
3	(H ₂₅ -star-D ₁₅)-network	9.5	9700	1.20	11600	57
4	(D ₁₅ -star-H ₂₅)-network	5.8	8800	1.60	10500	33
5	[(H ₂₅ -b-D ₁₅)-star-(D ₁₅ -b-H ₂₅)]-network	12.8	13200	1.37	13700	41
6	[(D ₁₅ -b-H ₂₅)-star-(H ₂₅ -b-D ₁₅)]-network	12.0	10100	1.53	14800	32
7	[(D ₁₅ -co-H ₂₅)-star-(H ₂₅ -co-D ₁₅)]-network	11.3	6400	1.27	9328	42

¹Το D και το H είναι περαιτέρω συντομογραφίες των μονάδων DMAEMA και HEGMA, αντίστοιχα.

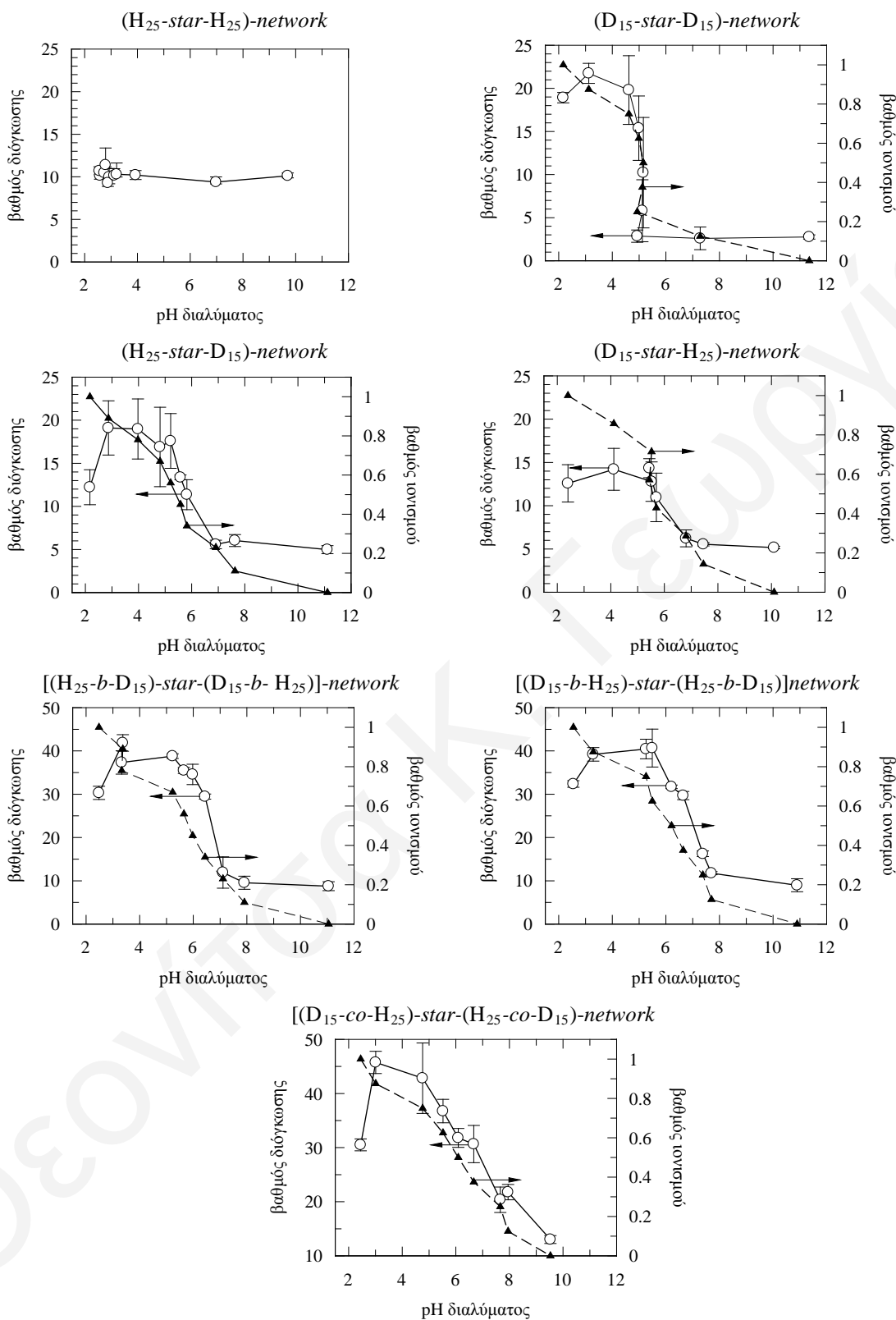
3.2.2.4. Βαθμοί Διόγκωσης

Τα αμφιφιλικά αυτά αστεροειδή πλέγματα, DEAEμα – HEGMA σε αντίθεση με τον χαρακτηρισμό των διπλά υδρόφοβων αστεροειδών πολυμερών MMA – BuMA σε μίγμα οργανικών διαλυτών, χαρακτηρίστηκαν σε νερό διαφόρων pH και σε THF. Το νερό είναι ο πιο συνηθισμένος διαλύτης που χρησιμοποιείται για το χαρακτηρισμό αμφιφιλικών πλεγμάτων, ιδιαίτερα αν αυτά έχουν την ικανότητα να ιοντίζονται. Σε σχέση όμως με τα περισσότερα πλέγματα, αυτή η οικογένεια πλεγμάτων έχει μία ιδιαιτερότητα λόγω του μονομερούς DEAEμα. Αυτό το μονομερές είναι υδρόφοβο σε ψηλά pH ενώ σε χαμηλά pH ιοντίζεται και γίνεται υδρόφιλο. Έτσι, τα πλέγματα αυτά σε ψηλά pH είναι αμφιφιλικά ενώ σε χαμηλά pH γίνονται ιοντισμένα διπλά υδρόφιλα πλέγματα, όπως απεικονίζεται σχηματικά στο Σχήμα 3.29.



Σχήμα 3.29. Σχηματική απεικόνιση της αλλαγής της διόγκωσης του αδρομερικού αμφιφιλικού πλέγματος, [(HEGMA₂₅-*b*-DEAEMA₁₅)-*star*-(DEAEMA₁₅-*b*-HEGMA₂₅)]-*network* σε σχέση με το pH. Με κόκκινο και μπλε συμβολίζονται τα τμήματα των μονάδων DEAEMA και HEGMA, αντίστοιχα. Με μαύρο χρώμα συμβολίζονται οι κόμβοι των πλεγμάτων οι οποίοι αποτελούνται από το διασταυρωτή EGDMA.

Στο Σχήμα 3.30 παρουσιάζονται οι ΒΔ και οι βαθμοί ιονισμού (BI) όλων των αστεροειδών πλεγμάτων DEAEMA – HEGMA σε σχέση με το pH του υπερκείμενου διαλύματος. Οι ΒΔ όλων των αστεροειδών πλεγμάτων, εκτός από το ομοπολυμερές του HEGMA, παρουσίασαν την ίδια εξάρτηση από το pH. Καθώς το pH μειωνόταν οι ΒΔ αυξάνονταν, αφού οι μονάδες του DEAEMA ιονίζονταν και από υδρόφοβες γίνονταν θετικά φορτισμένες υδρόφιλες. Η ίδια εξάρτηση των ΒΔ από το pH παρατηρήθηκε και σε άλλες μελέτες πλεγμάτων που περιείχαν το επίσης ιονιζόμενο DMAEMA και το υδρόφοβο μονομερές MMA (Vamvakaki και Patrickios, 2002 και Triftaridou et al, 2002). Το ομοπολυμερές του HEGMA το οποίο είναι υδρόφιλο και μη φορτισμένο για όλα τα pH, αφού το HEGMA είναι υδρόφιλο μη ιονιζόμενο μονομερές, παρουσίασε τους ίδιους ΒΔ για όλα τα pH, ~11. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για τα διπλά υδρόφιλα αστεροειδή πολυμερή HEGMA – MAA όπου το ομοπολυμερές του



Σχήμα 3.30. Οι βαθμοί διόγκωσης και οι βαθμοί ιονισμού των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – HEGMA σαν συνάρτηση του pH.

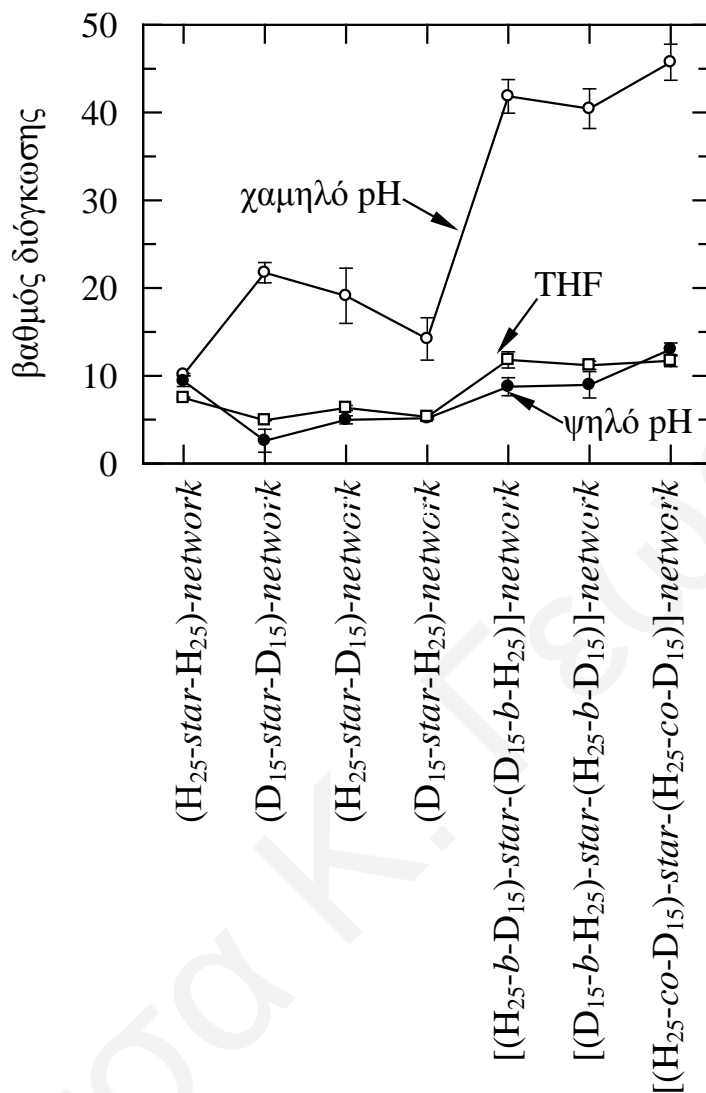
HEGMA παρουσίασε τους ίδιους ΒΔ (~12) σε όλα τα pH, ενώ τα υπόλοιπα πλέγματα που περιείχαν το ιονιζόμενο ΜΑΑ παρουσίασαν εξάρτηση των ΒΔ με το pH του διαλύματος (Georgiades et al, 2002).

Τα αστεροειδή πλέγματα DEAEEMA παρουσιάζουν μία ιδιαιτερότητα σε σχέση με τα άλλα αμφιφιλικά πλέγματα που έχουν μελετηθεί. Συγκεκριμένα, τα πλέγματα αυτά με μείωση του pH από αμφιφιλικά μετατρέπονται σε διπλά-υδρόφιλα, ενώ τα περισσότερα αμφιφιλικά πλέγματα που μελετήθηκαν από διπλά – υδρόφοβα μετατρέπονται σε αμφιφιλικά (Vamvakaki και Patrickios, 2002 και Triftaridou et al, 2002). Έτσι, οι ΒΔ σε υψηλά pH, σε αντίθεση με τα συνηθισμένα αμφιφιλικά πλέγματα, δεν ήταν της τάξης του 2, αλλά κυμαίνονταν από 5 έως 10 αφού τα πλέγματα ήταν αμφιφιλικά και δεν βρίσκονταν σε πλήρως συρρικνωμένη κατάσταση.

Στο Σχήμα 3.31 παρουσιάζονται οι ΒΔ των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DEAEEMA – HEGMA σε τρεις διαλύτες, νερό χαμηλού και υψηλού pH και THF, συναρτήσει του τύπου του πολυμερικού πλέγματος. Οι τιμές αυτών των ΒΔ λήφθηκαν από το προηγούμενο σχήμα και χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή αυτού του γραφήματος για να μπορεί να γίνει καλύτερη σύγκριση των ΒΔ των διαφόρων πλεγμάτων μεταξύ τους, στα διαφορετικά συστήματα διαλυτών.

Οι ΒΔ σε υψηλά pH ήταν σχετικά μικροί και παρουσίασαν εξάρτηση από την αρχιτεκτονική των αστεροειδών πλεγμάτων. Το ομοπολυμερικό πλέγμα του HEGMA παρουσίασε μεγαλύτερο ΒΔ από τον αντίστοιχο ΒΔ του DEAEEMA και από τα δύο ετεροβραχιονικά συμπολυμερικά πλέγματα, όπως και ήταν αναμενόμενο αφού αποτελείται μόνο από μονάδες HEGMA οι οποίες είναι μη ιονιζόμενες και υδρόφιλες για όλο το εύρος pH. Τα αδρομερικά συμπολυμερικά πλέγματα καθώς και το τυχαίο πλέγμα παρουσίασαν μεγαλύτερους ΒΔ σε υψηλά pH συγκριτικά με το ομοπολυμερικό πλέγμα του HEGMA επειδή έχουν μεγαλύτερο ΒΠ της αλυσίδας και μικρότερο ποσοστό του υδρόφοβου διασταυρωτή. Χαμηλότερος ΒΔ σε υψηλά pH παρουσιάστηκε από το (DEAEEMA₁₅-star-DMAEMA₁₅)-network, όπως και ήταν αναμενόμενο, λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα των μη-πρωτονιωμένων μονάδων DEAEEMA.

Σε χαμηλά pH όλα τα αστεροειδή πολυμερικά πλέγματα παρουσίασαν μεγαλύτερους ΒΔ από ό,τι σε υψηλά pH λόγω της πρωτονίωσης των μονάδων του



Σχήμα 3.31. Βαθμοί διόγκωσης των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DEAEEMA – HEGMA σε διάφορους διαλύτες συναρτήσει του τύπου του πολυμερικού πλέγματος.

DEAEEMA το οποίο αύξανε τόσο την υδροφιλικότητα του πλέγματος αλλά και τις ηλεκτροστατικές απωστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των θετικά φορτισμένων μονάδων (βλέπε Σχήμα 3.29), με εξαίρεση φυσικά το (HEGMA₂₅-star-HEGMA₂₅)-network το οποίο δεν περιείχε DEAEEMA. Για τον ίδιο λόγο το τελευταίο διογκώθηκε λιγότερο με ελάττωση του pH από όλα τα υπόλοιπα πλέγματα αφού μπορεί να είναι υδρόφιλο αλλά είναι μη-ιοντιζόμενο. Το ομοπολυμερές αυτό παρουσίασε παρόμοιο ΒΔ σε χαμηλό pH με

το (DEAEMA₁₅-star-HEGMA₂₅)-network το οποίο έχει ίσου μήκους ελαστική αλυσίδα που αποτελείται επίσης μόνο από μονάδες HEGMA. Αυτό υποδεικνύει ότι οι ελαστικές αλυσίδες είναι ένας καθοριστικός παράγοντας στην διόγκωση των αστεροειδών πλεγμάτων, αφού η διαφορά των ελεύθερων αλυσίδων των δύο πλεγμάτων, ομοπολυμερική αλυσίδα του HEGMA αντί το ομοπολυμερές πλέγμα, και μικρότερου μήκους πρωτονιωμένη ομοπολυμερική αλυσίδα του DEAEMA αντί τα το ετεροβραχιονικό συμπολυμερικό πλέγμα, δεν φαίνεται να διαφοροποιούν τη διόγκωση του πλέγματος.

Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι το ομοπολυμερές πλέγμα (DEAEMA₁₅-star-DEAEMA₁₅)-network παρουσίασε μεγαλύτερο ΒΔ σε χαμηλά pH συγκριτικά με πλέγματα ίδιας ή μεγαλύτερης περιεκτικότητας σε διασταυρωτή. Επίσης, ο ΒΔ του σε χαμηλά pH ήταν συγκρίσιμος με αυτό του ετεροβραχιονικού πλέγματος (HEGMA₂₅-star-DEAEMA₁₅)-network, του οποίου οι ελαστικές αλυσίδες αποτελούνταν επίσης από μονάδες DEAEMA, ενώ οι ελεύθερες αλυσίδες από μονάδες HEGMA, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι πρωτονιωμένες ελεύθερες αλυσίδες μικρότερου ΒΠ έχουν την ίδια επίδραση στη διόγκωση του πλέγματος με ελεύθερες αλυσίδες μεγαλύτερου μήκους που αποτελούνται από υδρόφιλες μη ιονιζόμενες ομάδες.

Το τυχαίο αστεροειδές συμπολυμερικό πλέγμα παρουσίασε το μεγαλύτερο ΒΔ σε χαμηλό pH από όλα τα πλέγματα. Αυτό οφείλεται στο μικρότερο ποσοστό του υδρόφοβου διασταυρωτή στο πλέγμα (μεγαλύτερο ΒΠ) σε σύγκριση με τα ομοπολυμερή και τα ετεροβραχιονικά πλέγματα.

Συγκρίνοντας τους ΒΔ σε χαμηλό pH των δύο ετεροβραχιονικών πλεγμάτων, (HEGMA₂₅-star-DEAEMA₁₅)-network και (DEAEMA₁₅-star-HEGMA₂₅)-network, το πρώτο παρουσιάζει μεγαλύτερο ΒΔ γιατί οι απωστικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των πρωτονιωμένων ελαστικών αλυσίδων φαίνεται να έχουν σημαντικότερο ρόλο στη διόγκωση του πλέγματος από ό,τι οι ελεύθερες πρωτονιωμένες αλυσίδες, όπως παρατηρήθηκε και στη μελέτη των Vamvakaki et al (2001), των Vamvakaki και Patrickios (2002) και των Georgiades et al (2002) σε υδρόφιλα ομοπολυμερικά, αμφιφιλικά συμπολυμερικά και διπλά υδρόφιλα συμπολυμερικά αστεροειδή πλέγματα, αντίστοιχα.

Τέλος, τα αδρομερή αστεροειδή πλέγματα και το τυχαίο αστεροειδές πλέγμα παρουσίασαν τους υψηλότερους ΒΔ σε χαμηλά pH, λόγω του μεγαλύτερου ΒΠ του βραχίονα και της παρουσίας των πρωτονιωμένων μονάδων DEAEEMA στις ελαστικές αλλά και στις ελεύθερες αλυσίδες σε αντίθεση με τα υπόλοιπα άλλα πλέγματα (Σχήμα 3.28).

Σε αντίθεση όμως με τις δύο προηγούμενες μελέτες αστεροειδών συμπολυμερικών πλεγμάτων (Vamvakaki και Patrickios, 2002 και Georgiades et al, 2002), τα δύο αδρομερή αστεροειδή πλέγματα δεν διογκώθηκαν λιγότερο από το τυχαίο αστεροειδές πλέγμα, με τα τρία αυτά πλέγματα να παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές των ΒΔ (στα πλαίσια του πειραματικού σφάλματος). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα πλέγματα που συντέθηκαν σε αυτή τη μελέτη δεν είναι αμφιφιλικά σε χαμηλά pH, όπως εκείνα στις δύο παλαιότερες μελέτες, αλλά διπλά – υδρόφιλα πλέγματα, αφού το μονομερές DEAEEMA σε χαμηλά pH ιοντίζεται και μετατρέπεται σε υδρόφιλο μονομερές, και έτσι δεν μπορεί να γίνει ο μικροφασικός διαχωρισμός των πλεγμάτων. Σε υψηλά pH, όπου τα πλέγματα είναι αμφιφιλικά, τα αδρομερή συμπολυμερικά πλέγματα παρουσιάζουν λίγο μικρότερους ΒΔ από το αντίστοιχο τυχαίο συμπολυμερικό πλέγμα και αυτό ίσως να οφείλεται σε μικροφασικό διαχωρισμό.

Οι ΒΔ των αστεροειδών πλεγμάτων σε THF (Σχήμα 3.31), ο οποίος είναι μη εκλεκτικός διαλύτης και για τα δύο μονομερή, DEAEEMA και HEGMA, εξαρτάται από την πυκνότητα των κόμβων διασταύρωσης στα πλέγματα δηλαδή τη σύσταση των πλεγμάτων σε διασταυρωτή που εξαρτάται από το ΒΠ των βραχιόνων, όπως και είναι αναμενόμενο. Επομένως, τα δύο αδρομερή αστεροειδή πλέγματα και το τυχαίο αστεροειδές πλέγμα παρουσίασαν μεγαλύτερους ΒΔ από τα υπόλοιπα πλέγματα αφού έχουν μικρότερη πυκνότητα διασταύρωσης και τα υπόλοιπα πλέγματα παρουσίασαν μικρότερους ΒΔ. Συγκεκριμένα, το (HEGMA₂₅-star-HEGMA₂₅)-network παρουσίασε ΒΔ γύρω στο 7.5, μεγαλύτερο από τα δύο ετεροβραχιονικά αστεροειδή πλέγματα τα οποία αποτελούνται από μικρότερες αλυσίδες DEAEEMA (ελεύθερες ή ελαστικές αλυσίδες), και από το (DEAEEMA₁₅-star-DEAEEMA₁₅)-network που αποτελείται μόνο από μικρότερου ΒΠ αλυσίδες DEAEEMA (ελεύθερες και ελαστικές αλυσίδες) και παρουσίασε το μικρότερο ΒΔ, γύρω στο 5.0.

3.2.2.5. Φαινόμενα pK

Στον Πίνακα 3.13 δίνονται οι τιμές των φαινόμενων pK των μονάδων DEAEEMA για όλα τα πλέγματα της οικογένειας των αστεροειδών πλεγμάτων HEGMA – DEAEEMA τα οποία περιείχαν DEAEEMA. Το pK λήφθηκε ως το pH στο οποίο το πλέγμα είναι κατά 50% ιονισμένο. Όλες οι τιμές των φαινόμενων pK κυμαίνονταν μεταξύ 5.1 και 6.2, χαμηλότερες από το φαινόμενο pK του γραμμικού ομοπολυμερούς του DEAEEMA το οποίο ήταν γύρω στο 7, όπως και ήταν αναμενόμενο, λόγω της κατανομής των αντισταθμιστικών ιόντων (counterion partitioning) μέσα στο πλέγμα.

Πίνακας 3.13 Τα φαινόμενα pK των αστεροειδών πλεγμάτων DEAEEMA-HEGMA.

Πλέγμα	Πολυμερές ¹	pK
1	(H ₂₅ -star-H ₂₅)-network	—
2	(D ₁₅ -star-D ₁₅)-network	5.1
3	(H ₂₅ -star-D ₁₅)-network	5.4
4	(D ₁₅ -star-H ₂₅)-network	5.6
5	[(H ₂₅ -b-D ₁₅)-star-(D ₁₅ -b-H ₂₅)]-network	5.8
6	[(D ₁₅ -b-H ₂₅)-star-(H ₂₅ -b-D ₁₅)]-network	6.2
7	[(D ₁₅ -co-H ₂₅)-star-(H ₂₅ -co-D ₁₅)]-network	6.1

¹Το D και το H είναι περαιτέρω συντομογραφίες των μονάδων DEAEEMA και HEGMA, αντίστοιχα.

Οι τιμές των pK παρουσίασαν εξάρτηση μόνο από τη σύσταση των πλεγμάτων σε υδρόφοβο συστατικό (DEAEEMA ή/και EGDMA) και όχι από την αρχιτεκτονική των πλεγμάτων. Συγκεκριμένα, το πιο υδρόφοβο ομοπολυμερικό πλέγμα του DEAEEMA παρουσίασε το χαμηλότερο pK , τα δύο ετεροβραχιονικά συμπολυμερικά πλέγματα παρουσίασαν παρόμοιες τιμές pK κοντά στο 5.5 αλλά ελαφρώς μεγαλύτερες από το ομοπολυμερικό πλέγμα του DEAEEMA και, τέλος, τις μεγαλύτερες τιμές pK παρουσίασαν τα δύο αδρομερικά πλέγματα και το τυχαίο συμπολυμερικό πλέγμα, αφού τα πλέγματα αυτά περιείχαν λιγότερο υδρόφοβο διασταυρωτή. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν σε

συμφωνία με αυτά που παρατηρήθηκαν για αμφιφιλικά πλέγματα βασισμένα σε τριαδρομερή συμπολυμερή MMA-*b*-DMAEMA-*b*-MMA (Triftaridou et al 2002) όπου παρατηρήθηκε εξάρτηση του pK από τη σύσταση του πλέγματος στο υδρόφοβο MMA και όχι από την αρχιτεκτονική. Η αύξηση του υδρόφοβου συστατικού στο πλέγμα οδηγεί σε μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς και ενδυνάμωση των αλληλεπιδράσεων Coulomb καθιστώντας έτσι δυσκολότερο τον ιοντισμό των πλεγμάτων (Philippova et al 1997).

Συμπερασματικά, έγινε επιτυχημένη σύνθεση αμφιφιλικών αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DMAEMA και HEGMA, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο πολυμερισμού GTP ο οποίος παρέμεινε ενεργός ακόμη και μετά από έξι συνθετικά στάδια. Οι ΒΔ των πλεγμάτων DEAEMA – HEGMA σε νερό παρουσίασαν εξάρτηση από την αρχιτεκτονική των πλεγμάτων και από το pH του διαλύτη. Συγκεκριμένα, σε υψηλά pH παρατηρήθηκε εξάρτηση των ΒΔ κυρίως από το ΒΠ των ελαστικών αλυσίδων και επομένως από τη σύσταση των πλεγμάτων σε διασταυρωτή, ενώ σε χαμηλά pH οι ΒΔ παρουσίασαν εξάρτηση από το ΒΠ των ελαστικών αλυσίδων, καθώς από την παρουσία ή μη και την κατανομή των μονάδων του DEAEMA στις ελαστικές αλυσίδες των πλεγμάτων.

3.2.3. Αστεροειδή Πλέγματα DMAEMA – THPMA (MAA)

3.2.3.1. Σύνθεση

Μετά από τη μελέτη διπλά – υδρόφοβων και αμφιφιλικών αστεροειδών πλεγμάτων το επόμενο βήμα ήταν η σύνθεση διπλά – υδρόφιλων αστεροειδών πλεγμάτων. Επειδή στη βιβλιογραφία υπήρχε ήδη μία αναφορά διπλά – υδρόφιλων πλεγμάτων όπου το ένα μονομερές να είναι μη-ιοντικό και το άλλο αρνητικά φορτισμένο (Georgiades et al, 2002) αποφασίστηκε για αυτή την Εργασία να συντεθούν διπλά – υδρόφιλα πλέγματα με δύο μονομερή τα οποία και τα δύο να φέρουν φορτίο. Συγκεκριμένα, συντέθηκαν πολυαμφολυτικά πλέγματα, τα οποία αποτελούνται από θετικά και αρνητικά φορτισμένες μονάδες και για τα οποία δεν υπάρχουν πολλές αναφορές (Demosthenous et al 2002). Στην παρούσα Διατριβή χρησιμοποιήθηκε το υδρόφιλο θετικά ιονιζόμενο μονομερές DMAEMA και το υδρόφιλο αρνητικά ιονιζόμενο μονομερές MAA.

Όπως προαναφέρθηκε, το μονομερές MAA δεν μπορεί να πολυμεριστεί απευθείας με GTP και για αυτό γίνεται προστασία της ομάδας του οξέος. Έτσι, αρχικά παρασκευάστηκε το μονομερές THPMA το οποίο ταυτοποιήθηκε με ^1H NMR (βλέπε Σχήματα 3.11 και 3.12). Τα βήματα που ακολουθήθηκαν κατά τον πολυμερισμό δίνονται στο Σχήμα 3.32 και είναι ανάλογα με την πρώτη σειρά αστεροειδών πολυμερών BuMA – MMA.

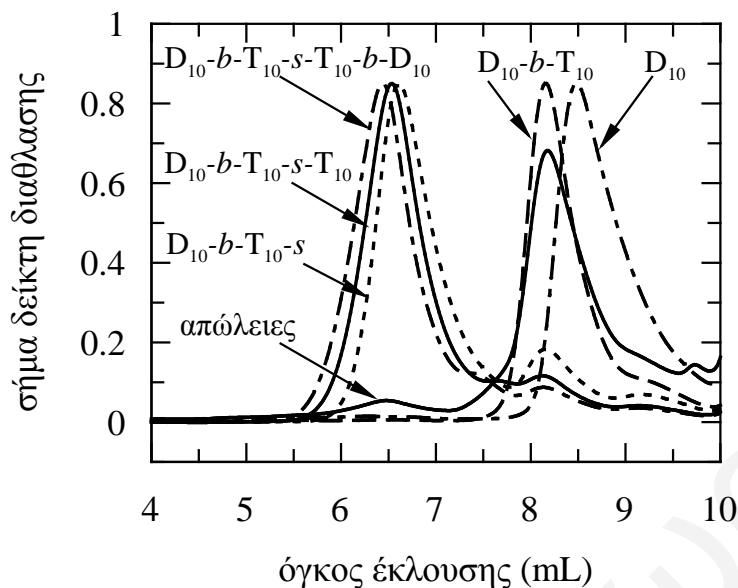
3.2.3.2. Μοριακά Βάρη

Τα χρωματογραφήματα GPC των πέντε πρόδρομων μορίων και των απωλειών του αδρομερούς αστεροειδούς πλέγματος [(DMAEMA₁₀-b-THPMA₁₀)-star-(THPMA₁₀-b-DMAEMA₁₀)]-network, Πλέγματος 3, φαίνονται στο Σχήμα 3.33. Οι ΚΜΒ του γραμμικού ομοπολυμερούς του DMAEMA (D₁₀) και του γραμμικού διαδρομερούς συμπολυμερούς DMAEMA – THPMA (D₁₀-b-T₁₀) ήταν στενές και μονοδιάσπαρτες, όπως ήταν αναμενόμενο. Η ΚΜΒ της κύριας κορυφής του χρωματογραφήματος του «arm-first» αστεροειδούς συμπολυμερούς (D₁₀-b-T₁₀-star) ήταν επίσης στενή, παρουσιάζοντας ακόμη μία μικρότερη κορυφή, η οποία αντιστοιχούσε στους βραχίονες που δεν συνδέθηκαν με το αστεροειδές πολυμερές (και παρουσίασε τον ίδιο χρόνο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Σχήμα 3.32. Συνθετικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή των διαφόρων αρχιτεκτονικών των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – THPMA.



Σχήμα 3.33. Χρωματογραφήματα GPC των διαλυτών πρόδρομων πολυμερών του αστεροειδούς συμπολυμερούς Πλέγματος 3, [(DMAEMA₁₀-b-THPMA₁₀)-star-(THPMA₁₀-b-DMAEMA₁₀)]-network και των απωλειών του. Τα γράμματα D και T είναι περαιτέρω συντομογραφίες για τις μονάδες DMAEMA και THPMA, αντίστοιχα.

έκλουσης με το D₁₀-b-T₁₀). Τα χρωματογράφημα των «in-out» αστεροειδών συμπολυμερών (D₁₀-b-T₁₀-star-T₁₀ και D₁₀-b-T₁₀-star-T₁₀-b-D₁₀) παρουσίασαν και αυτά από δύο κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν στις ανάλογες κορυφές όπως του «arm-first» αστεροειδούς συμπολυμερούς, με τις κορυφές που αντιστοιχούν στα αστεροειδή πολυμερή να παρουσιάζουν στενή KMB. Τα MB των κύριων κορυφών των πέντε χρωματογραφήματων, από το ομοπολυμερές D₁₀ μέχρι και το «in-out» αστεροειδές συμπολυμερές, D₁₀-b-T₁₀-star-T₁₀-b-D₁₀, αυξάνονται όπως και ήταν αναμενόμενο, υποδεικνύοντας την συνολική αύξηση της δομής του πολυμερούς και ότι ο πολυμερισμός συνέχισε να είναι «ζωντανός» ακόμη και μετά από τα πέντε στάδια. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για όλα τα πλέγματα αυτής της ομάδας αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων.

Πίνακας 3.14 MB και ΔΠΜΒ των πρόδρομων μορίων των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – THPMA.

Πλέγμα	Πολυμερές ¹	Θεωρητικό MW ²	Αποτελέσματα GPC		
			M _n	M _w /M _n	M _p
1	D ₂₀	3240	4460	1.12	5380
	D ₂₀ - <i>star</i>	*	41900	1.25	56700
	D ₂₀ - <i>star</i> -D ₂₀	*	68100	1.20	73700
2	T ₂₀	3500	4620	1.13	5520
	T ₂₀ - <i>star</i>	*	52000	1.25	66400
	T ₂₀ - <i>star</i> -T ₂₀	*	88900	1.28	90900
3	D ₁₀	1670	2480	1.18	3360
	D ₁₀ - <i>b</i> -T ₁₀	3370	4570	1.13	5530
	D ₁₀ - <i>b</i> -T ₁₀ - <i>star</i>	*	47800	1.25	63000
	D ₁₀ - <i>b</i> -T ₁₀ - <i>star</i> -T ₁₀	*	61700	1.23	69900
	D ₁₀ - <i>b</i> -T ₁₀ - <i>star</i> -T ₁₀ - <i>b</i> -D ₁₀	*	75700	1.22	81900
4	T ₁₀	1800	2180	1.22	3020
	T ₁₀ - <i>b</i> -D ₁₀	3370	4360	1.16	5520
	T ₁₀ - <i>b</i> -D ₁₀ - <i>star</i>	*	42400	1.27	58200
	T ₁₀ - <i>b</i> -D ₁₀ - <i>star</i> -D ₁₀	*	55100	1.20	66400
	T ₁₀ - <i>b</i> -D ₁₀ - <i>star</i> -D ₁₀ - <i>b</i> -T ₁₀	*	70500	1.18	77700
5	D ₁₀ - <i>co</i> -T ₁₀	3370	3910	1.15	4850
	D ₁₀ - <i>co</i> -T ₁₀ - <i>star</i>	*	38600	1.25	52500
	D ₁₀ - <i>co</i> -T ₁₀ - <i>star</i> -D ₁₀ - <i>co</i> -T ₁₀	*	63600	1.19	71820
6	D ₂₀	3240	3940	1.15	4980
	D ₂₀ - <i>star</i>	*	33900	1.26	48500
	D ₂₀ - <i>star</i> -T ₂₀	*	59000	1.17	68200
7	T ₂₀	3500	4960	1.14	5970
	T ₂₀ - <i>star</i>	*	62000	1.26	73700
	T ₂₀ - <i>star</i> -D ₂₀	*	95200	1.29	95800

¹Το D και το T είναι συντομογραφίες των μονάδων DMAEMA και THPMA, αντίστοιχα.

²Συμπεριλαμβάνονται 100 g mol⁻¹ από τον εκκινητή που ενσωματώνονται στο πολυμερές.

*Δεν μπορεί να υπολογισθεί γιατί ο αριθμός των βραχιόνων των αστεροειδών πολυμερών δεν είναι γνωστός *a priori*.

Στον Πίνακα 3.14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα χαρακτηρισμού με GPC των πρόδρομων μορίων των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DMAEMA – THPMA καθώς και τα θεωρητικά προβλεπόμενα MB. Όλα τα αποτελέσματα ήταν ανάλογα με τις δύο προηγούμενες σειρές αστεροειδών πλεγμάτων. Συγκεκριμένα, οι ΔΠΜΒ όλων των γραμμικών πολυμερών ήταν χαμηλοί (≤ 1.22) με τα M_n να ήταν λίγο μεγαλύτερα από τα θεωρητικά προβλεπόμενα λόγω μερικής απενεργοποίησης του εκκινητή. Οι ΔΠΜΒ των «arm-first» αστεροειδών πολυμερών ήταν επίσης ικανοποιητικά χαμηλοί (≤ 1.29) για αστεροειδή πολυμερή, με τα M_n να κυμαίνονται από 33900 έως 95200 g mol⁻¹.

3.2.3.3. Ποσοστό Μάζας, MB και Σύσταση των Απωλειών των Πλεγμάτων

Στον Πίνακα 3.15 παρουσιάζονται τα ποσοστά μάζας, τα MB, οι ΔΠΜΒ και οι συστάσεις των απωλειών των αμφιφιλικών αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DMAEMA – THPMA όπως αυτά προσδιορίστηκαν από το GPC και το ¹H NMR. Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι η θεωρητικά αναμενόμενη σύσταση των συμπολυμερικών πλεγμάτων ήταν 50 % σε DMAEMA. Τα ποσοστά μάζας των απωλειών κυμάνθηκαν στα

Πίνακας 3.15 Ποσοστιαία μάζα, MB, ΔΠΜΒ και σύσταση των απωλειών των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DMAEMA – THPMA.

Πλέγμα	Πολυμερές ¹	w/w % Απωλ.	Αποτελέσματα GPC			¹ H NMR
			M_n	M_w/M_n	M_p	% mol D
1	(D ₂₀ -star-D ₂₀)-network	5.4	5290	1.30	5970	100
2	(T ₂₀ -star-T ₂₀)-network	13.8	4410	1.13	5500	0
3	[(D ₁₀ -b-T ₁₀)-star-(T ₁₀ -b-D ₁₀)]-network	9.6	4370	1.19	5380	83
4	[(T ₁₀ -b-D ₁₀)-star-(D ₁₀ -b-T ₁₀)]-network	8.9	2900	1.30	4180	44
5	[(D ₁₀ -co-T ₁₀)-star-(D ₁₀ -co-T ₁₀)]-network	8.0	4070	1.12	4850	53
6	(D ₂₀ -star-T ₂₀)-network	7.3	5250	1.32	5250	82
7	(T ₂₀ -star-D ₂₀)-network	14.0	2580	1.50	4800	20

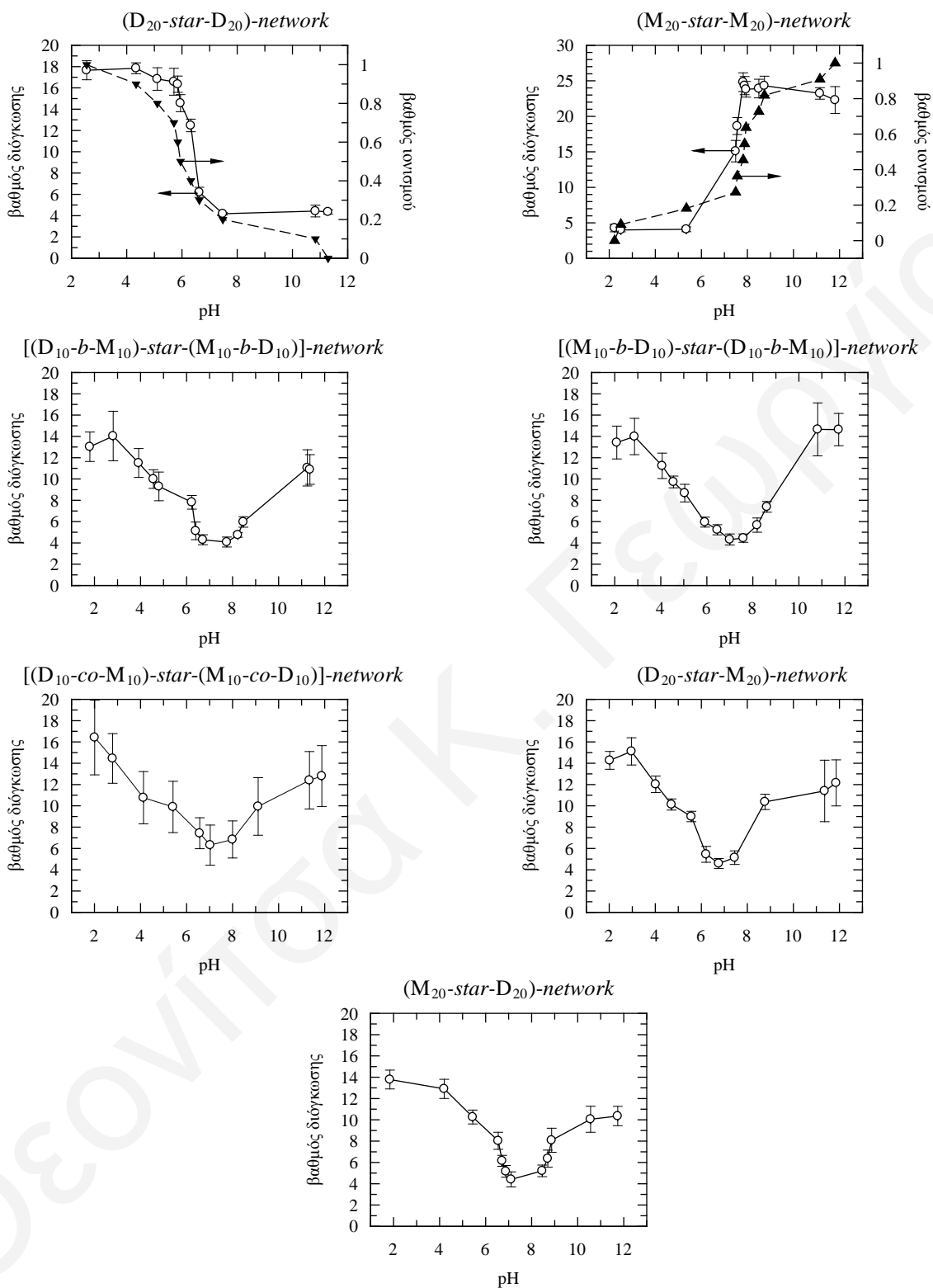
¹Το D και το T είναι περαιτέρω συντομογραφίες των μονάδων DMAEMA και THPMA, αντίστοιχα.

ίδια επίπεδα με αυτά των MMA – BuMA και DEAEMA – HEGMA αστεροειδών πολυμερών πλεγμάτων, από 5.4 έως 14 %. Από τα M_n της κυριότερης κορυφής (μεγαλύτερης σε εμβადό) σε κάθε χρωματογράφημα GPC και της σύστασης των απωλειών παρατηρήθηκε ότι οι απώλειες των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – THPMA αποτελούνταν κυρίως από τα πρόδρομα γραμμικά πολυμερή και λιγότερο από πρόδρομα αστεροειδή πολυμερή, κάτι που ήταν αναμενόμενο λαμβάνοντας υπόψη τα χρωματογραφήματα GPC των πρόδρομων αστεροειδών πολυμερών όπου πάντα παρατηρείται κορυφή που αντιστοιχεί σε γραμμικά πολυμερή που δεν συνενώθηκαν για να γίνουν αστεροειδή πολυμερή, όπως παρατηρήθηκε και για τις προηγούμενες οικογένειες αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων.

3.2.3.4. Βαθμοί Διόγκωσης

Τα αστεροειδή πλέγματα DMAEMA – THPMA μετά από την επιτυχή σύνθεσή τους υδρολύθηκαν και έτσι μετατράπηκαν στα επιθυμητά αμφολυτικά αστεροειδή πλέγματα DMAEMA – MAA. Τα διπλά υδρόφιλα αυτά πλέγματα χαρακτηρίστηκαν, όπως και τα αστεροειδή πλέγματα DEAEMA – HEGMA, σε νερό διαφόρων pH. Οι δύο οικογένειες πλεγμάτων παρουσίασαν διαφορετική συμπεριφορά διόγκωσης αλλάζοντας το pH του διαλύτη. Τα αμφιφιλικά αστεροειδή πλέγματα DEAEMA – HEGMA με αύξηση του pH παρουσίασαν μειωμένο ΒΔ, όπως προαναφέρθηκε, ενώ τα αμφολυτικά αστεροειδή πλέγματα παρουσίασαν ένα ελάχιστο στο ΒΔ τους σε μία ενδιάμεση τιμή του pH του διαλύματος η οποία αντιστοιχεί στο ισοηλεκτρικό σημείο, pI , του πλέγματος, δηλαδή το pH στο οποίο το πλέγμα έχει συνολικό φορτίο μηδέν. Οι ΒΔ των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA-MAA παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.34.

Οι ΒΔ του ομοπολυμερούς αστεροειδούς πλέγματος του DMAEMA αυξάνονταν με μείωση του pH, επειδή το DMAEMA ιοντίζεται σε χαμηλά pH και γίνεται πιο υδρόφιλο, όπως παρατηρήθηκε σε παλαιότερη μελέτη αστεροειδών ομοπολυμερών πλεγμάτων του DMAEMA (Vamvakaki et al, 2001). Το ομοπολυμερές αστεροειδές πλέγμα του MAA παρουσίασε την αντίστροφη εξάρτηση, δηλαδή μείωση του ΒΔ με μείωση του pH του διαλύματος όπως και ήταν αναμενόμενο αφού το MAA, σε αντίθεση με το DMAEMA, είναι ιοντισμένο και έτσι πιο υδρόφιλο σε υψηλά pH και όχι σε

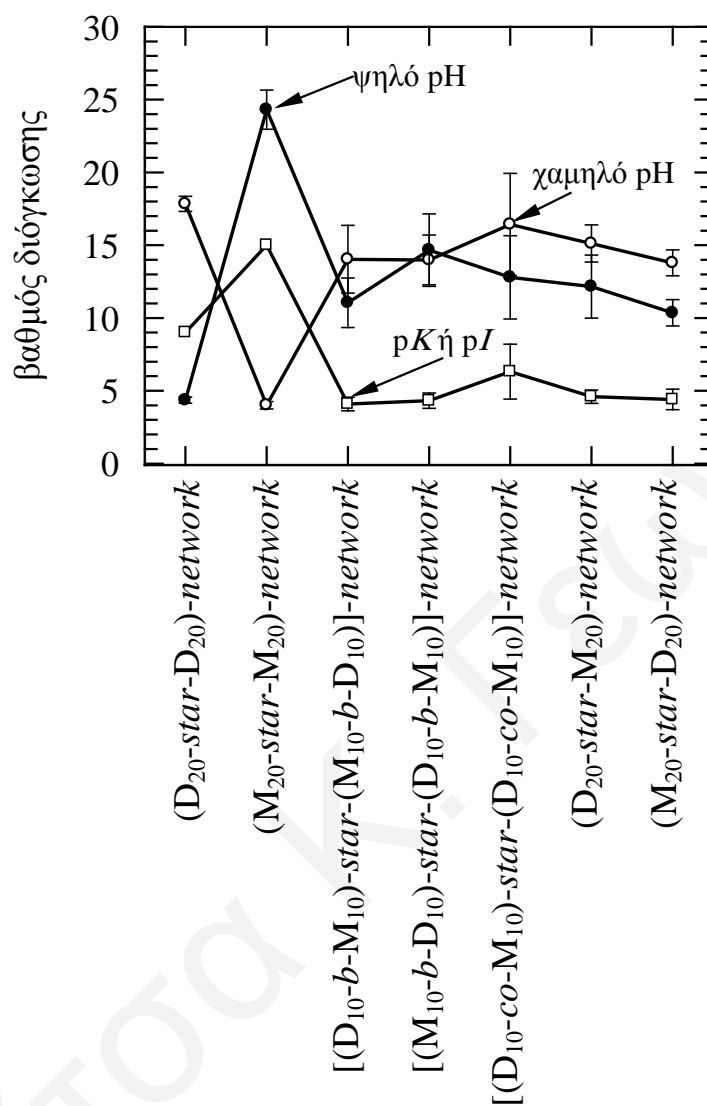


Σχήμα 3.34. Οι βαθμοί διόγκωσης των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA-MAA σαν συνάρτηση του pH.

χαμηλά pH. Τα πέντε αμφολυτικά αστεροειδή πλέγματα DMAEMA – MAA παρουσίασαν την εξής (ίδια) εξάρτηση του ΒΔ από το pH του διαλύματος. Συγκεκριμένα, ο ΒΔ παρουσίασε ελάχιστο σε ενδιάμεσες τιμές pH, όπως και ήταν αναμενόμενο αφού τα πλέγματα είναι πλήρως ιοντισμένα στα δύο ακραία pH και έχουν συνολικά μηδενικό φορτίο σε ενδιάμεσα pH. Την ίδια εξάρτηση του ΒΔ από το pH του διαλύματος παρουσίασαν αμφολυτικά πλέγματα DMAEMA – MAA τα οποία ήταν βασισμένα σε γραμμικά πρόδρομα πολυμερή (Demosthenous et al, 2002). Τα πρόδρομα αυτά πολυμερή ήταν γραμμικά τριαδρομερή συμπολυμερή MAA-*b*-DMAEMA-*b*-MAA με σταθερό το ΒΠ του τμήματος του DMAEMA και με διαφορετικούς ΒΠ των τμημάτων του MAA. Στην προηγούμενη μελέτη ο ΒΔ σε όλα τα pH αυξανόταν με αύξηση του ΒΠ της ελαστικής αλυσίδας. Για ΒΠ της ελαστικής αλυσίδας της προηγούμενης αυτής εργασίας παρόμοιο με αυτούς των αστεροειδών πλεγμάτων της παρούσας μελέτης, οι ΒΔ στη πρώτη περίπτωση ήταν μικρότεροι, κάτι που αναδεικνύει τον καθοριστικό ρόλο της αστεροειδούς αρχιτεκτονικής του πλέγματος και την επίδραση των επιπρόσθετων ελεύθερων αλυσίδων που υπάρχουν σε αυτή την πιο πολύπλοκη αρχιτεκτονική.

Στο Σχήμα 3.35 παρουσιάζονται οι ΒΔ των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DMAEMA – MAA σε τρεις διαλύτες, νερό χαμηλού και υψηλού pH και στο pI για τα συμπολυμερή πλέγματα ή στο pK για τα δύο ομοπολυμερή πλέγματα, συναρτήσει του τύπου του πολυμερικού πλέγματος. Οι τιμές αυτών των ΒΔ λήφθηκαν από το προηγούμενο σχήμα και χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή αυτού του γραφήματος για να μπορεί να γίνει καλύτερη σύγκριση των ΒΔ των διαφόρων πλεγμάτων μεταξύ τους.

Οι ΒΔ σε υψηλά pH για όλα τα συμπολυμερή πλέγματα κυμαίνονταν από 10 έως 15, ανάμεσα δηλαδή στις τιμές των ΒΔ σε υψηλά pH των δύο ομοπολυμερών πλεγμάτων DMAEMA και MAA, ~5 και ~25, αντίστοιχα. Όπως ήταν αναμενόμενο, το ιονιζόμενο σε υψηλά pH ομοπολυμερές πλέγμα του MAA παρουσίασε το μεγαλύτερο ΒΔ, ενώ το μη-ιοντισμένο σε υψηλά pH ομοπολυμερές του DMAEMA παρουσίασε το μικρότερο ΒΔ, και τα συμπολυμερή πλέγματα παρουσίασαν τιμές ΒΔ μεταξύ των ΒΔ των δύο ομοπολυμερών πλεγμάτων. Οι ΒΔ των αμφολυτικών πλεγμάτων DMAEMA – MAA σε υψηλά pH ήταν όλοι σχεδόν ίσοι στα πλαίσια του πειραματικού σφάλματος.



Σχήμα 3.35. Βαθμοί διόγκωσης των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DMAEMA-MAA σε διάφορους διαλύτες συναρτήσει του τύπου του πολυμερικού πλέγματος.

Σε χαμηλά pH, όλα τα συμπολυμερή πλέγματα παρουσίασαν ΒΔ που κυμαίνονταν από 14 έως 17, ανάμεσα στις τιμές των ΒΔ σε χαμηλό pH των δύο ομοπολυμερών πλεγμάτων DMAEMA και MAA, ~18 και ~4, αντίστοιχα, όπως και ήταν αναμενόμενο. Οι τιμές των ΒΔ των πλεγμάτων σε χαμηλά pH ήταν μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες τιμές των ΒΔ σε υψηλά pH (εκτός του ομοπολυμερούς του MAA που ήταν

φορτισμένο σε υψηλό pH) επειδή το MAA στη μη ιοντισμένη μορφή του (χαμηλά pH) είναι λιγότερο υδρόφοβο από το DMAEMA στη μη ιοντισμένη μορφή του (υψηλά pH).

Στο pI , όλα τα συμπολυμερή πλέγματα παρουσίασαν τιμές των ΒΔ χαμηλότερες από αυτές σε υψηλό ή χαμηλό pH. Οι τιμές αυτές των ΒΔ στο pI των αμφολυτικών συμπολυμερών πλεγμάτων, ήταν ίσες (στα πλαίσια του πειραματικού σφάλματος) με τις τιμές των δύο ομοπολυμερών στη μη φορτισμένη τους κατάσταση (χαμηλό pH για το ομοπολυμερές πλέγμα του MAA και σε υψηλό pH για το ομοπολυμερές πλέγμα του DMAEMA), όπως ήταν αναμενόμενο, αφού ο συνολικός ΒΠ των αλυσίδων είναι ο ίδιος για όλα τα πολυμερικά πλέγματα αυτής της οικογένειας.

3.2.3.5. Φαινόμενα pI και pK

Στον Πίνακα 3.16 δίνονται οι τιμές των φαινομένων pK για τα δύο αστεροειδή ομοπολυμερή πλέγματα DMAEMA και MAA και οι τιμές των pI όλων των αμφολυτικών αστεροειδών συμπολυμερικών πλεγμάτων. Το pI προσδιορίστηκε πειραματικά ως το pH όπου το πλέγμα παρουσίασε τον ελάχιστο ΒΔ αφού σε αυτό το σημείο το πλέγμα θα έχει συνολικό φορτίο μηδέν. Τα pK για τα δύο ομοπολυμερή DMAEMA και MAA είναι 6.0

Πίνακας 3.16 Τα φαινόμενα pK και pI των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA-MAA.

Πλέγμα	Πολυμερές ¹	pK ή pI
1	(D ₂₀ -star-D ₂₀)-network	6.0
2	(M ₂₀ -star-M ₂₀)-network	7.9
3	[(D ₁₀ -b-M ₁₀)-star-(M ₁₀ -b-D ₁₀)]-network	7.2
4	[(M ₁₀ -b-D ₁₀)-star-(D ₁₀ -b-M ₁₀)]-network	7.0
5	[(D ₁₀ -co-M ₁₀)-star-(D ₁₀ -co-M ₁₀)]-network	7.0
6	(D ₂₀ -star-M ₂₀)-network	6.8
7	(M ₂₀ -star-D ₂₀)-network	7.1

¹Το D και το M είναι περαιτέρω συντομογραφίες των μονάδων DMAEMA και MAA, αντίστοιχα.

και 7.9, ενώ οι τιμές των pI για τα συμπολυμερικά πλέγματα κυμάνθηκαν μεταξύ των δύο pK και, συγκεκριμένα, από 6.8 έως 7.2, όπως ήταν αναμενόμενο και σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Demosthenous et al, 2002).

3.2.3.6. Συμπλοκοποίηση με DNA

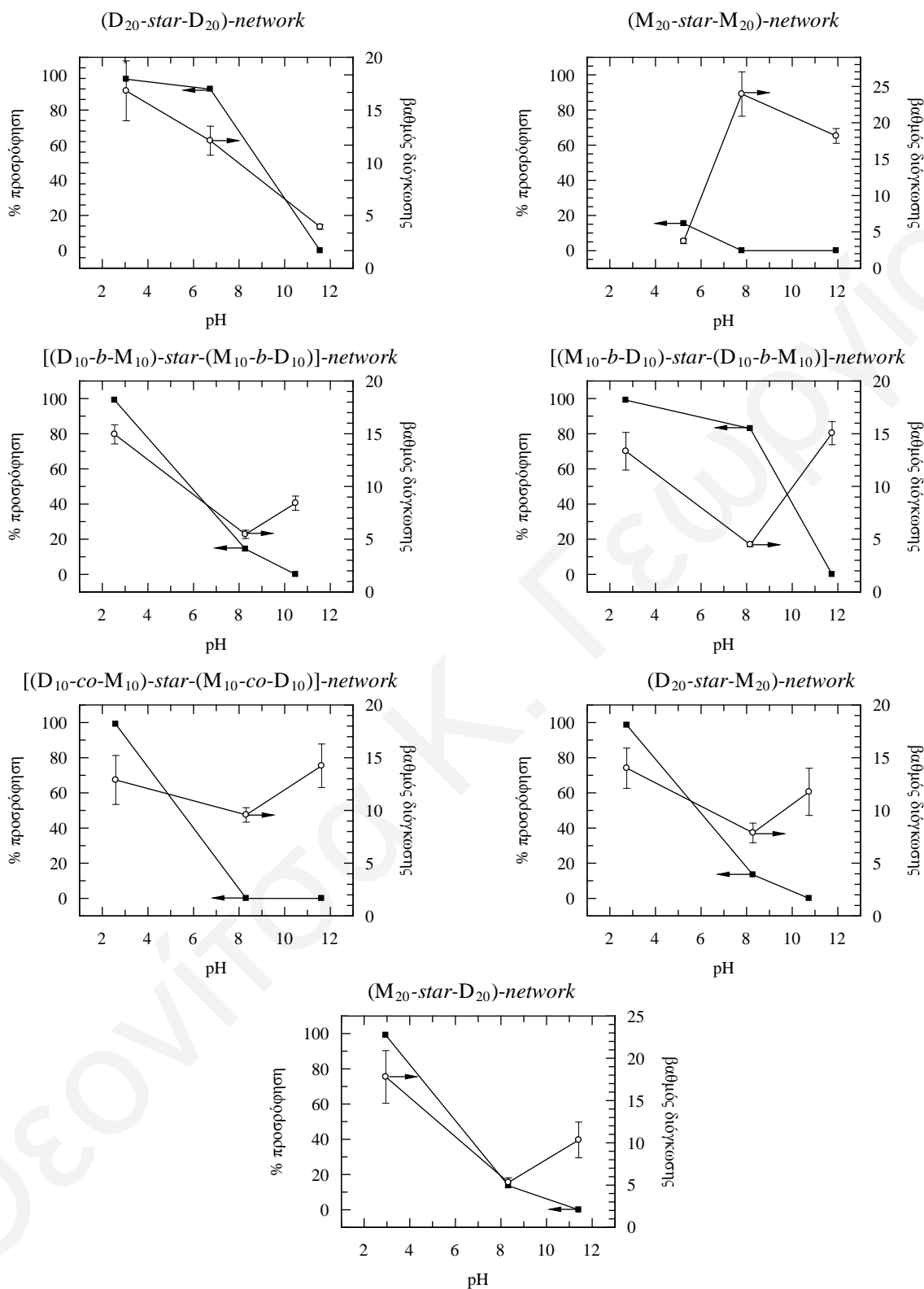
Τα διπλά υδρόφιλα, αμφολυτικά αστεροειδή πλέγματα DMAEMA-MAA μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να προσροφούν το DNA. Στο Σχήμα 3.36 παρουσιάζονται τα ποσοστά προσρόφησης DNA και οι ΒΔ (στην παρουσία DNA) των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – MAA σε τρία διαφορετικά pH.

Η συμπλοκοποίηση με το αρνητικά φορτισμένο DNA φάνηκε ότι καθορίζεται από την παρουσία θετικά φορτισμένων μονάδων του DMAEMA. Όταν το pH είναι χαμηλό, κάτω από το pK για το ομοπολυμερές πλέγμα του DMAEMA ή κάτω από το pI για τα αμφολυτικά πλέγματα, η προσρόφηση του DNA ήταν ποσοτική. Η προσρόφηση του DNA από το ομοπολυμερές πλέγμα του MAA κυμάνθηκε σε χαμηλά έως και μηδενικά επίπεδα και για τα τρία διαφορετικά pH, υποδεικνύοντας ότι απαραίτητη προϋπόθεση για τη δέσμευση DNA από τα πλέγματα είναι η παρουσία μονάδων του DMAEMA. Φάνηκε έτσι ότι η προσρόφηση του DNA είναι καθαρά ηλεκτροστατική.

Συγκρίνοντας τους ΒΔ των πλεγμάτων DMAEMA – MAA στα τρία διαφορετικά pH στην παρουσία του DNA με τους αντίστοιχους ΒΔ σε καθαρό νερό, φάνηκε ότι κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα. Συμπεραίνεται, έτσι, ότι η παρουσία του DNA δεν επηρέασε ιδιαίτερα τη διόγκωση των πλεγμάτων.

Συμπερασματικά, έγινε επιτυχημένη σύνθεση των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DMAEMA – THPMA με GTP και υδρόλυσή τους σε αμφολυτικά πλέγματα DMAEMA – MAA. Οι ΒΔ των πλεγμάτων DMAEMA – MAA σε νερό δεν εξαρτώνται ισχυρά από την αρχιτεκτονική των πλεγμάτων, ενώ εξαρτώνται ισχυρά εξάρτηση από το pH του διαλύτη. Όλα τα πλέγματα αυτής της οικογένειας μελετήθηκαν

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Σχήμα 3.36. Τα ποσοστά προσρόφησης DNA και οι βαθμοί διόγκωσης των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – MAA παρουσία DNA σε τρία διαφορετικά pH.

ως προς την ικανότητά τους να προσροφούν DNA και εξάχθηκε το συμπέρασμα ότι η προσρόφηση είναι καθαρά ηλεκτροστατική αφού παρατηρήθηκε προσρόφηση στην παρουσία μόνο θετικά ιοντισμένων μονάδων DMAEMA.

Θεονίτσα Κ. Γεωργίου

3.2.4. Αστεροειδή Πλέγματα DMAEMA – BzMA

3.2.4.1. Σύνθεση

Τα τελευταία αστεροειδή πλέγματα που συντέθηκαν και μελετήθηκαν στα πλαίσια αυτής της Διδακτορικής Διατριβής ήταν αμφιφιλικά, βασισμένα στο υδρόφιλο ιονιζόμενο μονομερές DMAEMA και το υδρόφοβο μη-ιοντικό BzMA. Ο συνδυασμός αυτών των μονομερών υδρόφιλου - ιονιζόμενου μονομερούς και υδρόφοβου – μη ιοντικού μονομερούς αποτελεί ένα σχετικά συνηθισμένο συνδυασμό μονομερών, που δεν θα μπορούσε όμως να λείπει για την ολοκλήρωση της μελέτης των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων αυτού του Διδακτορικού αφού τα αμφιφιλικά πολυμερικά πλέγματα είναι αυτά που προς το παρόν μονοπωλούν το ενδιαφέρον των ερευνητών (Patrickios και Georgiou, 2004) λόγω της πληθώρας των εφαρμογών τους.

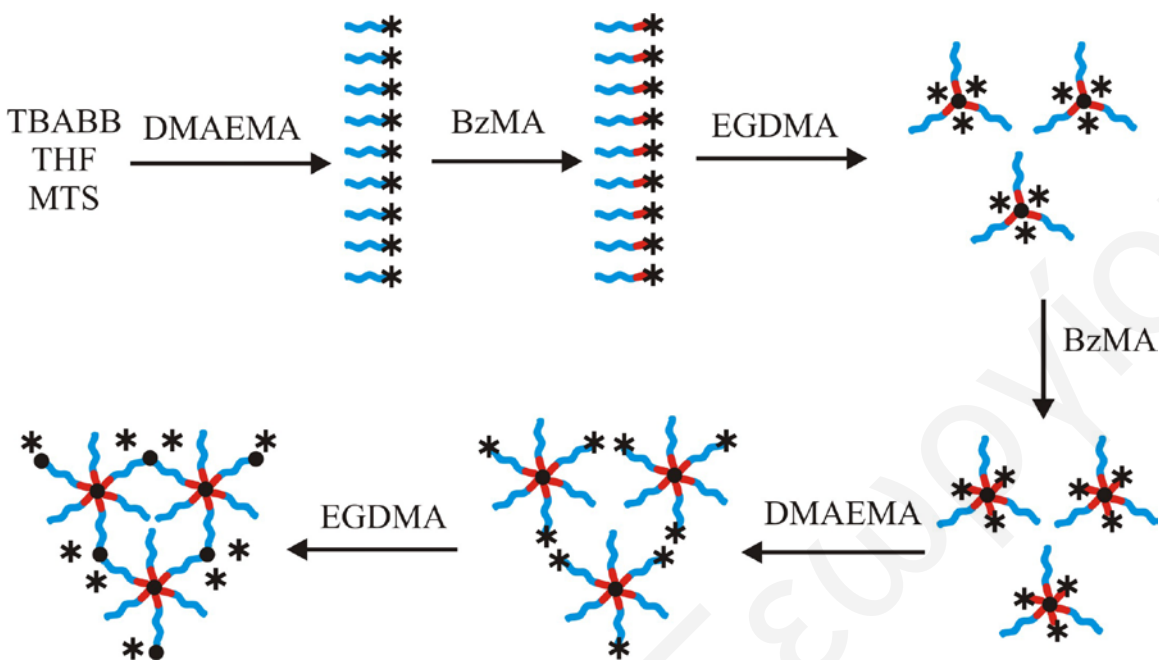
Η διαδικασία σύνθεσης όλων των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DMAMA – BzMA παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.37. Η σύνθεση με GTP αυτών των αστεροειδών πλεγμάτων περιελάβανε 4, 5 ή 6 επιτυχημένα στάδια/προσθήκες, μερικές από τις οποίες έχουν προαναφερθεί. Σε αυτήν την ομάδα πλεγμάτων συντέθηκαν όμως και πλέγματα με αρχιτεκτονικές που δεν έχουν ξαναγίνει και για αυτές ακολουθεί εκτενέστερη περιγραφή της σύνθεσής. Τα ομοπολυμερή αστεροειδή πολυμερικά πλέγματα συντέθηκαν με τις διαδοχικές προσθήκες: μονομερούς – διασταυρωτή – μονομερούς – διασταυρωτή, όπου πάντα προστίθεται το ίδιο μονομερές, όπως προαναφέρθηκε. Σε αντίθεση με τις προηγούμενες μελέτες όπου συντέθηκαν δύο ετεροβραχιονικά συμπολυμερικά πλέγματα, σε αυτή συντέθηκαν τρία. Το ένα περιελάβανε την παρασκευή

των ελαστικών και των ελεύθερων αλυσίδων από δύο διαφορετικά ομοπολυμερή (Πλέγμα 5) όπως και στις προηγούμενες οικογένειες πλεγμάτων, ενώ στα άλλα δύο ετεροβραχιονικά πλέγματα οι ελαστικές αλυσίδες ήταν ομοπολυμερή ενώ οι ελεύθερες ήταν είτε αδρομερή (Πλέγμα 6) είτε τυχαία (Πλέγμα 7) συμπολυμερή. Τα υπόλοιπα τρία αστεροειδή συμπολυμερικά πλέγματα ήταν ομοβραχιονικά: ένα τυχαίο (Πλέγμα 4) και δύο αδρομερή (Πλέγματα 2 και 3). Με την ταυτόχρονη προσθήκη των δύο μονομερών πριν και μετά την πρώτη προσθήκη διασταυρωτή παρασκευάστηκε το τυχαίο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ



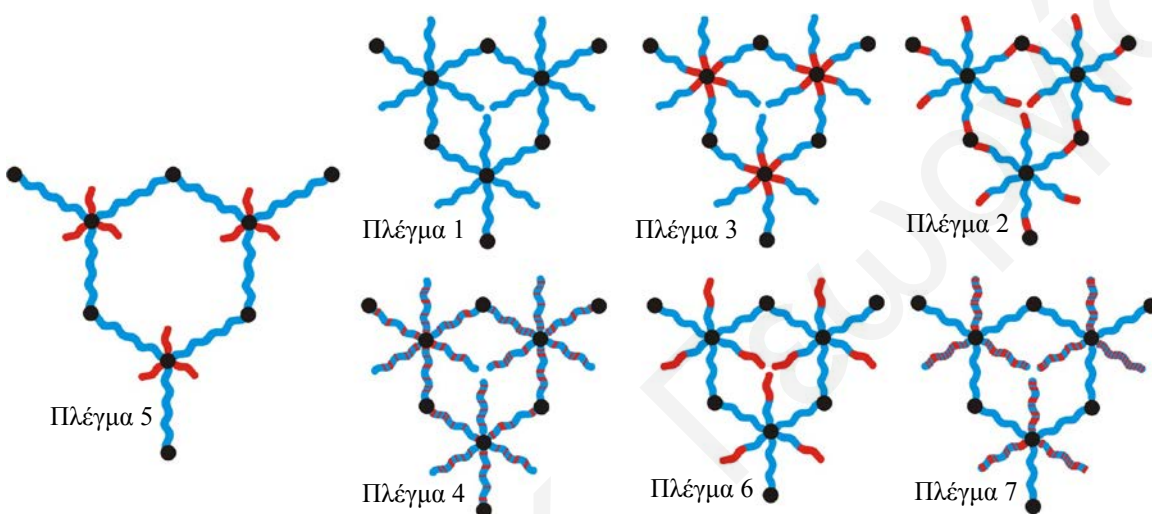
Σχήμα 3.37. Συνθετικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή των διάφορων αρχιτεκτονικών των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA.



Σχήμα 3.38. Σχηματική απεικόνιση της συνθετικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του πλέγματος $[(DMAEMA_{22.5}-b-BzMA_{7.5})-star-(BzMA_{7.5}-b-DMAEMA_{22.5})]-network$, το οποίο είναι βασισμένο σε αδρομερή αστεροειδή συμπολυμερή. Ο αριθμός των βραχιόνων των αστεροειδών πολυμερών δεν είναι 3 / 6, όπως υποδεικνύεται στο σχήμα αλλά μεγαλύτερος. Με μπλε και κόκκινο συμβολίζονται τα τμήματα των μονάδων DMAEMA και BzMA, αντίστοιχα, ενώ με μαύρους κύκλους και μαύρους αστερίσκους συμβολίζονται οι κόμβοι και τα ενεργά κέντρα των πολυμερών, αντίστοιχα.

αστεροειδές πολυμερικό πλέγμα (Πλέγμα 4). Τέλος, για τη σύνθεση των αδρομερών αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων (Πλέγματα 2 και 3) έγινε διαδοχική προσθήκη των δύο μονομερών πριν και μετά την προσθήκη του διασταυρωτή EGDMA, όπως προαναφέρθηκε. Στο Σχήμα 3.38 δίνεται σχηματική απεικόνιση της συνθετικής διαδικασίας για ένα από τα αδρομερή αμφιφιλικά πλέγματα DMAEMA – BzMA, το $[(DMAEMA_{22.5}-b-BzMA_{7.5})-star-(BzMA_{7.5}-b-DMAEMA_{22.5})]-network$.

Στο Σχήμα 3.39 δίνεται σχηματική απεικόνιση των διαφόρων αρχιτεκτονικών όλων των αστεροειδών πολυμερών DMAEMA – BzMA που συντέθηκαν. Το Πλέγμα 1 είναι το ομοπολυμερικό αστεροειδές πλέγμα του DMAEMA, τα Πλέγματα 2 και 3 είναι αδρομερή συμπολυμερικά πλέγματα, το Πλέγμα 4 είναι το τυχαίο αστεροειδές πλέγμα και τα Πλέγματα 5, 6 και 7 είναι ετεροβραχιονικά αστεροειδή πλέγματα.

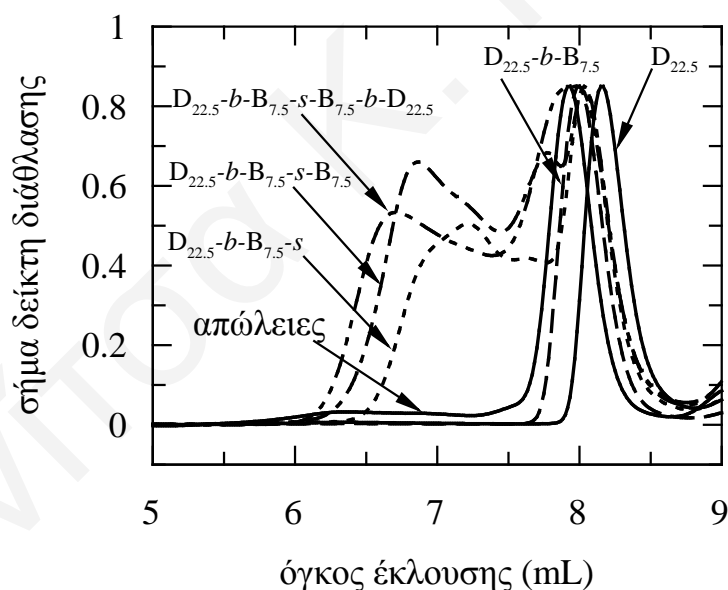


Σχήμα 3.39. Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων αρχιτεκτονικών των πλεγμάτων DMAEMA – BzMA που συντέθηκαν βασισμένα σε αστεροειδή πολυμερή. Με χρώματα μπλε και κόκκινο συμβολίζονται τα τμήματα των μονάδων DMAEMA και BzMA, αντίστοιχα. Με μαύρο χρώμα συμβολίζονται οι κόμβοι των πλεγμάτων οι οποίοι αποτελούνται από το διασταυρωτή EGDMA.

3.2.4.2. Μοριακά Βάρη

Τα χρωματογραφήματα GPC των πέντε πρόδρομων μορίων και των απωλειών του αδρομερούς αστεροειδούς πλέγματος [(DMAEMA_{22.5}-*b*-BzMA_{7.5})-*star*-(BzMA_{7.5}-*b*-DMAEMA_{22.5})]-*network*, Πλέγματος 3, φαίνονται στο Σχήμα 3.40. Οι ΚΜΒ του γραμμικού ομοπολυμερούς του DMAEMA (D_{22.5}) και του γραμμικού διαδρομερούς συμπολυμερούς DMAEMA – BzMA (D_{22.5}-*b*-B_{7.5}) ήταν στενές και μονοδιάσπαρτες όπως και ήταν αναμενόμενο. Το χρωματογράφημα του «arm-first» αστεροειδούς συμπολυμερούς (D_{22.5}-*b*-B_{7.5}-*s*) παρουσίασε δύο κορυφές. Η πρώτη κορυφή σε

μικρότερους χρόνους έκλουσης αντιστοιχούσε στο αστεροειδές συμπολυμερές και η δεύτερη κορυφή σε μεγαλύτερους όγκους έκλουσης αντιστοιχούσε στους βραχίονες που δεν συνδέθηκαν με το αστεροειδές συμπολυμερές όπως και στις προηγούμενες σειρές πολυμερών αυτής της Διδακτορικής Εργασίας. Τα χρωματογράφημα των «in-out» αστεροειδών συμπολυμερών ($D_{22.5}-b-B_{7.5}-star-B_{7.5}$ και $D_{22.5}-b-B_{7.5}-star-B_{7.5}-b-D_{22.5}$) παρουσίασαν και αυτά από δύο κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν στις ανάλογες κορυφές όπως του «arm-first» αστεροειδούς συμπολυμερούς. Τα MB των κύριων κορυφών των πέντε χρωματογραφήματων, από το ομοπολυμερές $D_{22.5}$ μέχρι και το «in-out» αστεροειδές συμπολυμερές, $D_{22.5}-b-B_{7.5}-star-B_{7.5}-b-D_{22.5}$, αυξάνονταν όπως και ήταν αναμενόμενο και παρατηρήθηκε προηγουμένως, υποδεικνύοντας τη συνολική αύξηση του πολυμερούς και ότι ο πολυμερισμός συνέχισε να είναι «ζωντανός» ακόμη και μετά από τα πέντε στάδια. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για όλα τα πλέγματα αυτής της ομάδας αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων.



Σχήμα 3.40. Χρωματογραφήματα GPC των διαλυτών πρόδρομων πολυμερών του αστεροειδούς συμπολυμερούς Πλέγματος 3, $[(DMAEMA_{22.5}-b-BzMA_{7.5})-star-(BzMA_{7.5}-b-DMAEMA_{22.5})]-network$ και των απωλειών του. Τα γράμματα D και B είναι περαιτέρω συντομογραφίες για τις μονάδες DMAEMA και BzMA, αντίστοιχα.

Πίνακας 3.17 MB και ΔΠMB των αμφιφιλικών αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA και των πρόδρομων μορίων τους.

Πλέγμα	Πολυμερές ¹	Θεωρητικό MW ²	Αποτελέσματα GPC		
			M _n	M _w /M _n	M _p
1	D ₃₀	4817	4800	1.06	5300
	D _{30-s}	*	25500	1.17	30400
	D _{30-s} -D ₃₀	*	26800	1.33	35500
2	B _{7.5}	1420	2100	1.08	2200
	B _{7.5-b} -D _{22.5}	4957	7000	1.05	7500
	B _{7.5-b} -D _{22.5-s}	*	39600	1.16	43900
	B _{7.5-b} -D _{22.5-s} -D _{22.5}	*	36500	1.38	62100
	B _{7.5-b} -D _{22.5-s} -D _{22.5-b} -B _{7.5}	*	44100	1.41	76800
3	D _{22.5}	3637	3500	1.06	3900
	D _{22.5-b} -B _{7.5}	4957	4700	1.05	5200
	D _{22.5-b} -B _{7.5-s}	*	8100	2.07	22600
	D _{22.5-b} -B _{7.5-s} -B _{7.5}	*	36700	1.16	45300
	D _{22.5-b} -B _{7.5-s} -B _{7.5-b} -D _{22.5}	*	47300	1.20	61400
4	D _{22.5-co} -B _{7.5}	4957	4900	1.07	5300
	D _{22.5-co} -B _{7.5-s}	*	28000	1.16	34400
	D _{22.5-co} -B _{7.5-s} -B _{7.5-co} -D _{22.5}	*	33000	1.27	45300
5	B ₁₅	2740	3000	1.09	3500
	B _{15-s}	*	48300	1.45	63300
	B _{15-s} -D ₄₅	*	92600	1.56	140100
6	B ₁₅	2740	2800	1.10	3300
	B _{15-b} -D ₁₅	4312	4800	1.25	7300
	B _{15-b} -D _{15-s}	*	60100	1.14	69400
	B _{15-b} -D _{15-s} -D ₃₀	*	88500	1.29	109700
7	B _{15-co} -D ₁₅	4312	5500	1.07	6000
	B _{15-co} -D _{15-s}	*	40400	1.16	46700
	B _{15-co} -D _{15-s} -D ₃₀	*	34000	1.37	69100

¹Το D και το B είναι συντομογραφίες των μονάδων DMAEMA και BzMA, αντίστοιχα.

²Συμπεριλαμβάνονται 100 g mol⁻¹ από τον εκκινητή που ενσωματώνονται στο πολυμερές.

*Δεν μπορεί να υπολογισθεί γιατί ο αριθμός των βραχιόνων των αστεροειδών πολυμερών δεν είναι γνωστός *a priori*.

Στον Πίνακα 3.17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα χαρακτηρισμού με GPC των πρόδρομων μορίων των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA καθώς και τα θεωρητικά προβλεπόμενα MB. Οι ΔΠMB όλων των γραμμικών πολυμερών ήταν χαμηλοί (≤ 1.25) αλλά τα M_n ήταν σχεδόν ίσα ή λίγο μεγαλύτερα από τα θεωρητικά προβλεπόμενα λόγω μερικής απενεργοποίησης του εκκινητή. Οι ΔΠMB των «arm-first» αστεροειδών πολυμερών ήταν χαμηλοί (≤ 1.45) με εξαίρεση το Πλέγμα 3, όπου υπήρχε επικάλυψη των κορυφών, του αστεροειδούς πολυμερούς και του γραμμικού πολυμερούς (μη προστιθέμενος βραχίονας). Τα «in-out» αστεροειδή πολυμερή παρουσίασαν ΔΠMB ικανοποιητικά μικρούς (≤ 1.56). Τα M_n των «in-out» αστεροειδών πολυμερών ήταν μεγαλύτερα από αυτά των αντίστοιχων «arm-first» αστεροειδών πολυμερών, εκτός από μερικές περιπτώσεις όπου παρουσιάστηκε αλληλεπικάλυψη κορυφών, αλλά αντίστοιχα M_p τα οποία παρουσιάζονται επίσης στον Πίνακα 3.17 αποδεικνύουν ότι μετά από την κάθε προσθήκη αντιδραστηρίου τα MB αυξάνουν, όπως ήταν αναμενόμενο.

3.2.4.3. Ποσοστό Μάζας, MB και Σύσταση των Απωλειών των Πλεγμάτων

Στον Πίνακα 3.18 παρουσιάζονται τα ποσοστά μάζας, τα MB, οι ΔΠMB και οι συστάσεις των απωλειών των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA όπως αυτά προσδιορίστηκαν από GPC και ^1H NMR. Όλα τα πλέγματα παρουσίασαν ποσοστά απωλειών μικρότερα ή ίσα με 16.6 %, με εξαίρεση τα πλέγματα [(D_{22.5}-b-B_{7.5})-star-(B_{7.5}-b-D_{22.5})]-network και (B₁₅-star-D₄₅)-network που παρουσίασαν μεγαλύτερα ποσοστά απωλειών, 19.2 % και 25 %, αντίστοιχα. Αυτή η οικογένεια αστεροειδών πλεγμάτων παρουσίασε λίγο μεγαλύτερα ποσοστά απωλειών από τις προηγούμενες οικογένειες πλεγμάτων. Αυτό οφείλεται σε μερικές περιπτώσεις στο μεγαλύτερο ΒΠ των βραχιόνων συγκριτικά με μερικές από τις προηγούμενες οικογένειες πλεγμάτων και στο μονομερές BzMA που είναι ένα μεγαλύτερο, πιο ογκώδες μονομερές και έτσι πολυμερίζεται δυσκολότερα από τα περισσότερα μονομερή των προηγούμενων οικογενειών των πλεγμάτων, με εξαίρεση ίσως το HEGMA.

Στον Πίνακα 3.18 μαζί με τα ποσοστά μάζας των απωλειών παρουσιάζονται και τα MB των μεγαλύτερων σε εμβαδό κορυφών στα αντίστοιχα χρωματογράφηματα GPC καθώς και η σύσταση των απωλειών. Από αυτά τα αποτελέσματα ήταν εφικτός ο προσδιορισμός του συνθετικού σταδίου όπου συνέβηκε η μεγαλύτερη απενεργοποίηση

του πολυμερισμού. Το μεγαλύτερο μέρος των απωλειών για όλα τα αστεροειδή πλέγματα DMAEMA – BzMA ήταν τα γραμμικά πρόδρομα πολυμερή, όπως παρατηρήθηκε από την GPC και επιβεβαιώθηκε από τη σύσταση των απωλειών η οποία ήταν πιο πλούσια στο μονομερές που χρησιμοποιήθηκε στα πρώτα στάδια του πολυμερισμού, σε συμφωνία με τις προηγούμενες μελέτες των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων. Από τον Πίνακα συμπεραίνεται ότι το λιγότερο «τέλειο» πλέγμα όπως φάνηκε και από το μεγάλο ποσοστό απωλειών είναι το Πλέγμα 5, (B₁₅-star-D₄₅)-network. Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτό το πλέγμα είναι το μοναδικό στο οποίο οι ελεύθεροι βραχίονες αποτελούνται μόνο από το μονομερές BzMA και είναι αυτοί που ενώνονται πρώτα για να δώσουν το αστεροειδές πολυμερές και έτσι αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των απωλειών. Αυτό συμφωνεί με την υπόθεση ότι το μονομερές αυτό πολυμερίζεται δυσκολότερα από τα περισσότερα μονομερή των προηγούμενων οικογενειών, κάτι που παρατηρήθηκε και πειραματικά, αφού η συγκεκριμένη σύνθεση του Πλέγματος 5 ήταν ιδιαίτερα δύσκολη και επαναλήφθηκε μερικές φορές έτσι ώστε να ληφθεί το επιθυμητό πλέγμα.

Πίνακας 3.18 Ποσοστιαία μάζα, MB, ΔΠΜΒ και σύσταση των απωλειών των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA.

Πλέγμα	Πολυμερές ¹	w/w % Απωλ.	Αποτελέσματα GPC			¹ H NMR
			M _n	M _w /M _n	M _p	% mol D
1	(D ₃₀ -s-D ₃₀)-network	11.2	5320	1.02	5670	100
2	[(B _{7.5} -b-D _{22.5})-s-(D _{22.5} -b-B _{7.5})]-network	13.4	7590	1.08	7970	60
3	[(D _{22.5} -b-B _{7.5})-s-(B _{7.5} -b-D _{22.5})]-network	19.2	5140	1.08	5500	82
4	[(D _{22.5} -co-B _{7.5})-s-(B _{7.5} -co-D _{22.5})]-network	12.8	4690	1.08	5330	74
5	(B ₁₅ -s-D ₄₅)-network	25.0	2890	1.10	3350	66
6	[(B ₁₅ -b-D ₁₅)-s-D ₃₀]-network	16.6	3050	1.23	3240	68
7	[(B ₁₅ -co-D ₁₅)-s-D ₃₀]-network	14.3	4790	1.12	5670	46

¹Το D και το B είναι περαιτέρω συντομογραφίες των μονάδων DMAEMA και BzMA, αντίστοιχα.

3.2.4.4. Βαθμοί Διόγκωσης

Στο Σχήμα 3.41 παρουσιάζονται ο ΒΔ και ο ΒΙ των αμφιφιλικών αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA σαν συνάρτηση του pH. Ο ΒΔ αυξάνεται όσο το pH μειώνεται όπως και ήταν αναμενόμενο και παρατηρήθηκε σε προηγούμενες μελέτες πλεγμάτων που περιείχαν το υδρόφιλο, ιονιζόμενο, μονομερές DMAEMA (Vamvakaki et al 2001, Vamvakaki και Patrickios 2002, Triftaridou et al 2002). Όπως προαναφέρθηκε, το μονομερές DMAEMA σε χαμηλά pH ιοντίζεται με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη διόγκωση του πλέγματος.

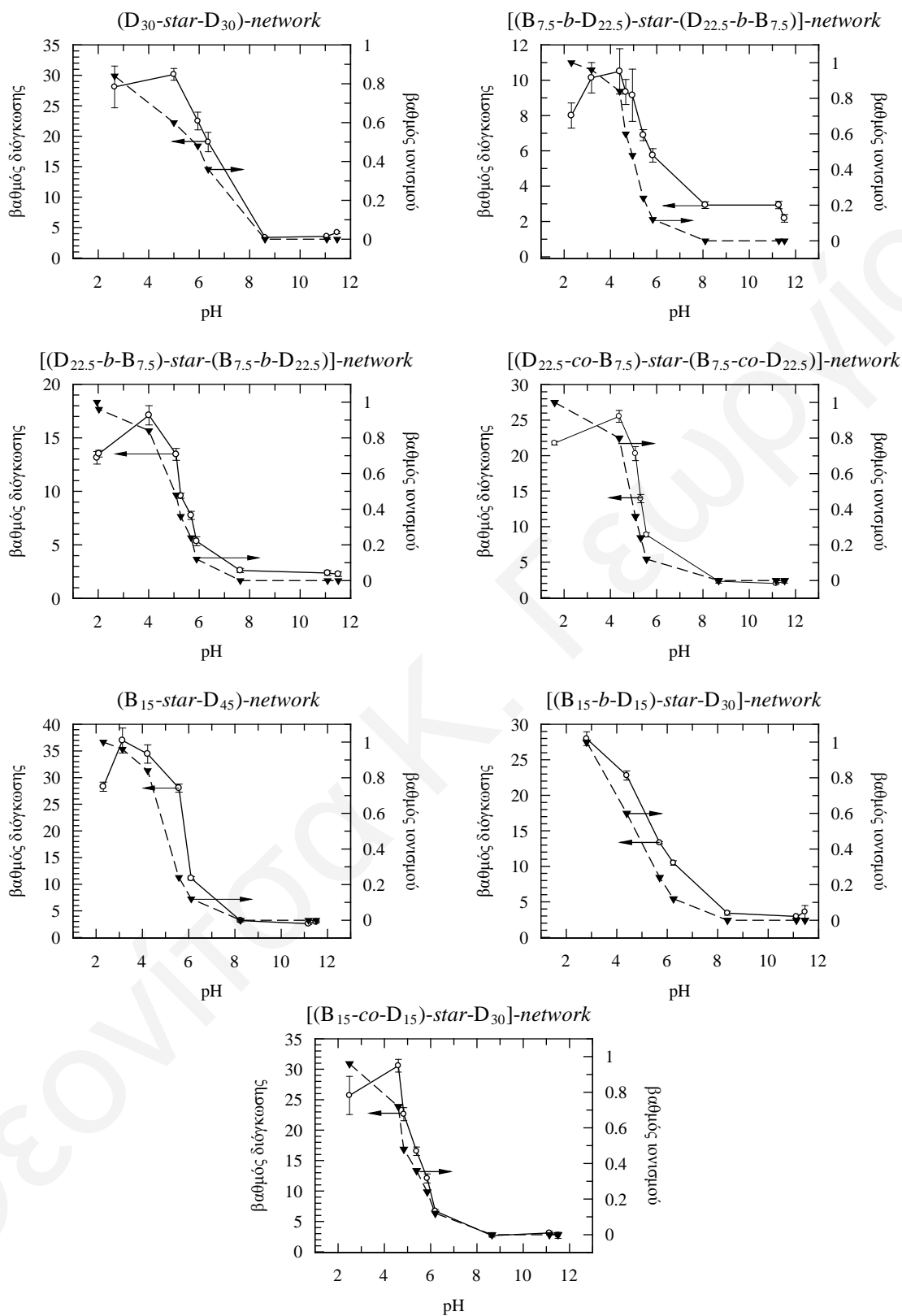
Όλα λοιπόν τα αστεροειδή πλέγματα παρουσίασαν αύξηση του ΒΔ με μείωση του pH. Αξιοσημείωτο είναι όμως το γεγονός ότι όλα τα αστεροειδή πλέγματα άρχισαν να διογκώνονται περίπου στην ίδια τιμή pH, κάτω από 5, με εξαίρεση το ομοπολυμερές πλέγμα του DMAEMA το οποίο άρχισε να διογκώνεται κάτω από pH 6. Αυτό είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες στις οποίες παρατηρήθηκε εξάρτηση του pH στο οποίο το πλέγμα άρχιζε να διογκώνεται από τη σύσταση του πλέγματος (Triftaridou et al 2002). Συγκεκριμένα, με αύξηση του πλέγματος σε υδρόφοβο μονομερές μειωνόταν το pH στο οποίο το πλέγμα άρχιζε να διογκώνεται καθώς και το pK , κάτι το οποίο θα συζητηθεί σε επόμενη παράγραφο.

Στο Σχήμα 3.42 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι ΒΔ σε ουδέτερο νερό και σε νερό χαμηλού pH που εξήχθησαν από το Σχήμα 3.41, καθώς και οι ΒΔ σε THF για όλα τα πλέγματα για καλύτερη σύγκριση μεταξύ τους.

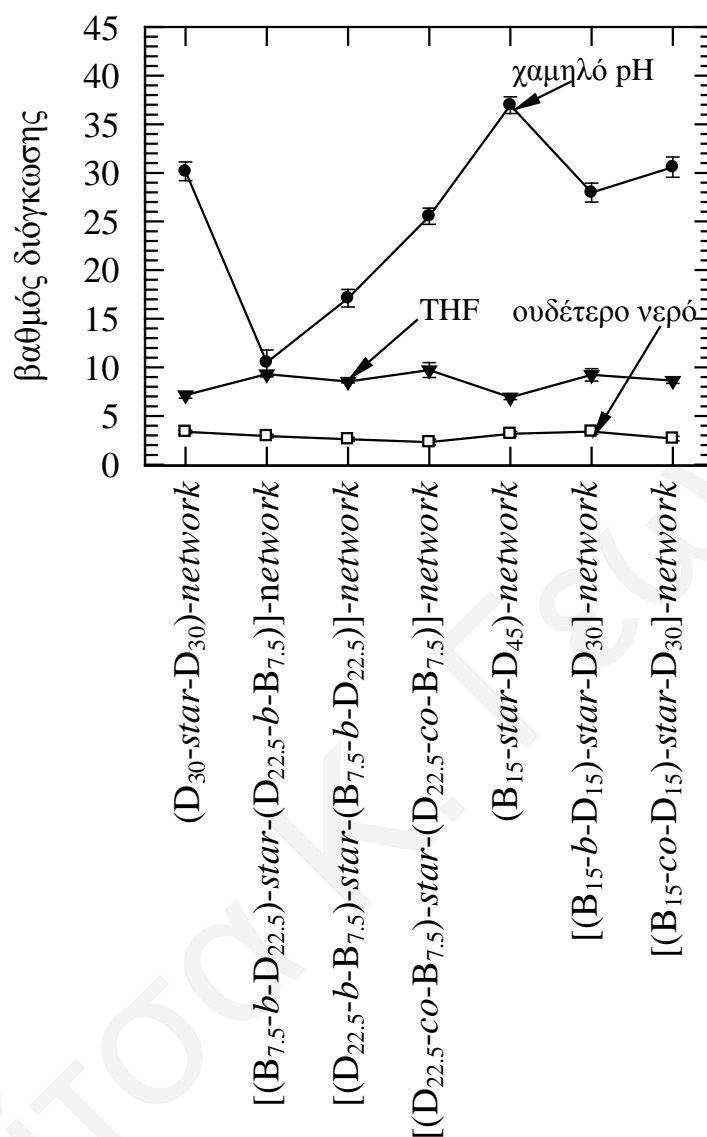
Οι ΒΔ σε νερό χαμηλού pH των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA κυμαίνονταν από ~ 11 ως ~38 και παρουσίασαν εξάρτηση από το μήκος της ελαστικής αλυσίδας, τη σύσταση του πλέγματος και την αρχιτεκτονική των αστεροειδών πλεγμάτων. Συγκεκριμένα, το Πλέγμα 5, (BzMA₁₅-star-DMAEMA₄₅)-network παρουσίασε το μεγαλύτερο ΒΔ σε χαμηλό pH, ~37, γιατί έχει το μεγαλύτερο ΒΠ (ίσο με 45) των ελαστικών αλυσίδων και γιατί οι αλυσίδες αυτές αποτελούνται από το υδρόφιλο και θετικά φορτισμένο σε αυτό το pH DMAEMA. Έτσι, λόγω απωστικών αλληλεπιδράσεων το πλέγμα διογκώνεται περισσότερο. Το Πλέγμα 1, το ομοπολυμερές του DMAEMA, (D₃₀-star-D₃₀)-network, παρουσίασε λίγο μικρότερο ΒΔ από το Πλέγμα

5 λόγω μικρότερου μήκους των ελαστικών αλυσίδων (BPI ίσος με 30), και λίγο

Θεονίτσα Κ. Γεωργίου



Σχήμα 3.41. Οι βαθμοί διόγκωσης και οι βαθμοί ιονισμού των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA σαν συνάρτηση του pH.



Σχήμα 3.42. Βαθμοί διόγκωσης των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA σε διάφορους διαλύτες συναρτήσει του τύπου του πολυμερικού πλέγματος.

μεγαλύτερο από τα Πλέγματα 6, [(B₁₅-b-D₁₅)-star-D₃₀]-network, και 7, [(B₁₅-co-D₁₅)-star-D₃₀]-network, τα οποία παρουσίασαν παρόμοιους ΒΔ γιατί αν και οι ελαστικές αλυσίδες αποτελούνταν από ομοπολυμερή του DMAEMA με ΒΠ ίσο με 30, οι ελεύθερες αλυσίδες περιείχαν και το υδρόφοβο μονομερές BzMA που εμπόδιζε τη διόγκωση του πλέγματος. Τα δύο αυτά ετεροβραχιονικά Πλέγματα 6 και 7 παρουσίασαν μεγαλύτερους

ΒΔ από το τυχαίο Πλέγμα 4, [(D_{22.5-co-B_{7.5}})-star-(D_{22.5-co-B_{7.5}})]-network, αν και είχαν τον ίδιο ΒΠ των ελαστικών αλυσίδων, λόγω της παρουσίας του μονομερούς ΒzMA σε αυτές τις αλυσίδες. Συγκρίνοντας όμως τα Πλέγματα 2, [(B_{7.5-b-D_{22.5}})-star-(D_{22.5-b-B_{7.5}})]-network, 3, [(D_{22.5-b-B_{7.5}})-star-(B_{7.5-b-D_{22.5}})]-network, και 4, [(D_{22.5-co-B_{7.5}})-star-(D_{22.5-co-B_{7.5}})]-network, τα οποία όλα περιείχαν ίδιο ποσοστό μονομερών και ΒΠ των ελαστικών και ελεύθερων αλυσίδων παρατηρήθηκε η εξάρτηση του ΒΔ από τη θέση των μονάδων των δύο μονομερών DMAEMA – ΒzMA. Συγκεκριμένα, το Πλέγμα 4, το οποίο είναι το τυχαίο, παρουσίασε μεγαλύτερο ΒΔ από τα άλλα δύο συμπολυμερικά Πλέγματα 2 και 3 του ίδιου ΒΠ και σύστασης των ελαστικών και ελεύθερων αλυσίδων, λόγω της τυχαίας κατανομής του ΒzMA που αποκλείει το μικροφασικό διαχωρισμό σε υδρόφιλες και υδρόφοβες περιοχές, και επομένως τη συρρίκνωση των αλυσίδων. Το αντίθετο συμβαίνει στα αδρομερή αστεροειδή Πλέγματα 2 και 3 όπου λαμβάνει χώρα μικροφασικός διαχωρισμός και συρρίκνωση των τμημάτων του ΒzMA. Μικρότεροι ΒΔ λόγω μικροφασικού διαχωρισμού είχαν παρατηρηθεί και σε προηγούμενη μελέτη αστεροειδών αμφιφιλικών πλεγμάτων (Vamvakaki και Patrickios 2002). Συγκρίνοντας τώρα τους ΒΔ των δυο αδρομερών αστεροειδών πλεγμάτων, το Πλέγμα 2 παρουσίασε μικρότερο ΒΔ από το Πλέγμα 3, για δύο πιθανούς λόγους. Ο πρώτος ήταν λόγω ευκολότερης και έτσι πιο εκτενούς συσσωμάτωσης του ΒzMA στο Πλέγμα 2 όπου το ΒzMA βρίσκεται στους δευτερεύοντες κόμβους (βλέπε Σχήμα 3.39), πιο καλό μικροφασικό διαχωρισμό και μικρότερο ΒΔ. Ο δεύτερος λόγος ήταν η παρουσία των μονάδων DMAEMA στα άκρα των ελεύθερων αλυσίδων στο Πλέγμα 3 που πιθανώς να προωθεί περισσότερο τη διόγκωση του πλέγματος.

Οι ΒΔ των συμπολυμερικών αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – ΒzMA σε ουδέτερο νερό ήταν σχεδόν οι ίδιοι για όλα τα πλέγματα και κυμάνθηκαν από 2.0 ως 2.9, δηλαδή κανένα από τα πλέγματα δεν διογκώθηκε σε ουδέτερο νερό. Αντίθετα, το ομοπολυμερικό πλέγμα του DMAEMA παρουσίασε μία μικρή διόγκωση με ΒΔ ίσο με 3.4, επειδή δεν περιέχει μονάδες ΒzMA. Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι το ΒzMA είναι υδρόφοβο και φυσικά μη συμβατό με το νερό, ενώ το DMAEMA, αν και υδρόφοβο σε υψηλά pH, τα αστεροειδή ομοπολυμερή του (όπως η σειρά πολυμερών που ανέφερα σε αυτή τη Διδακτορική Εργασία) διαλύονται αργά σε ουδέτερο νερό, άρα τα πλέγματά του μπορούν να διογκωθούν (έστω και σε μικρότερο βαθμό) σε νερό. Η παρουσία όμως

των κόμβων του διασταυρωτή EGDMA μειώνει την ικανότητα διόγκωσης του πλέγματος, επειδή το EGDMA είναι υδρόφοβο. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι αυτές οι τιμές των ΒΔ σε ουδέτερο νερό είναι κοντά σε τιμές παλαιότερης μελέτης αμφιφιλικών αστεροειδών πολυμερών περιεκτικότητας 50 % σε υδρόφοβο μονομερές (ΒΔ μεταξύ 1.5 και 2) (Vamvakaki και Patrickios, 2002) και ίσες με τις τιμές ΒΔ αμφιφιλικών πλεγμάτων βασισμένων σε γραμμικά τριαδρομερή πολυμερή ίδιας σύστασης υδρόφοβου μονομερούς με την παρούσα μελέτη (Triftaridou et al, 2002).

Οι τιμές ΒΔ των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA σε THF ήταν μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες τιμές των πλεγμάτων σε ουδέτερο νερό και κυμαίνονταν από 6.9 ως 9.7. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι και τα δύο μονομερή, BzMA και DMAEMA, είναι πιο συμβατά με το THF παρά με το ουδέτερο νερό. Το THF είναι ένας μη εκλεκτικός διαλύτης για τα δύο μονομερή, ενώ το ουδέτερο νερό αποτελεί εκλεκτικό διαλύτη αφού είναι μη διαλύτης για το BzMA, πράγμα που οδηγεί σε μικρότερη διόγκωση των πλεγμάτων στο νερό. Τα αμφιφιλικά αστεροειδή πλέγματα DMAEMA – MMA παρουσίασαν ΒΔ σε THF από 9.3 ως 11.6 (Vamvakaki και Patrickios, 2002), μεγαλύτερους από αυτούς των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA αυτής της μελέτης, λόγω του μεγαλύτερου ΒΠ των βραχιόνων, 50 έναντι 30.

3.2.4.5. Φαινόμενα pK

Στον Πίνακα 3.19 δίνονται τα pK των μονάδων DMAEMA των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA. Τα pK κυμάνθηκαν από 4.8 ως 5.5. Το ομοπολυμερές πλέγμα του DMAEMA, Πλέγμα 1, παρουσίασε το υψηλότερο pK , ίσο με 5.5, από τα υπόλοιπα συμπολυμερικά αμφιφιλικά αστεροειδή πλέγματα (4.8 ως 5.0), όπως ήταν αναμενόμενο. Η παρουσία των μονάδων του υδρόφοβου BzMA δυσκολεύει την πρωτονίωση των πλεγμάτων και έτσι το πλέγμα ιοντίζεται σε χαμηλότερο pH, επομένως το pK μειώνεται. Συγκεκριμένα, όπως προαναφέρθηκε, η αύξηση του υδρόφοβου συστατικού στο πλέγμα οδηγεί σε μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς και ενδυνάμωση των αλληλεπιδράσεων Coulomb καθιστώντας έτσι δυσκολότερο τον ιοντισμό των πλεγμάτων (Philippova et al 1997). Οι τιμές των pK δεν φάνηκε να επηρεάζονται από την αρχιτεκτονική των πλεγμάτων όπως παρατηρήθηκε για τα αμφιφιλικά αστεροειδή πολυμερικά DMAEMA – MMA) (Vamvakaki και Patrickios, 2002) και τα οποία

παρουσίασαν λίγο μεγαλύτερες τιμές pK . Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στο διαφορετικό ΒΠ των αλυσίδων αφού στα DMAEMA – MMA ήταν 50 ενώ σε αυτή τη μελέτη είναι 30 για τα περισσότερα πλέγματα, άρα είναι πιο υδρόφοβα (λόγω της παρουσίας μεγαλύτερου ποσοστού του υδρόφοβου διασταυρωτή) και έτσι πρωτονιώνονται δυσκολότερα ή ακόμη και στην εισαγωγή διαφορετικού υδρόφοβου μονομερούς.

Πίνακας 3.19 Τα φαινόμενα pK αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA.

Πλέγμα	Πολυμερές ¹	pK
1	$(D_{30}\text{-star-}D_{30})\text{-network}$	5.5
2	$[(B_{7.5}\text{-}b\text{-}D_{22.5})\text{-star-}(D_{22.5}\text{-}b\text{-}B_{7.5})]\text{-network}$	5.0
3	$[(D_{22.5}\text{-}b\text{-}B_{7.5})\text{-star-}(B_{7.5}\text{-}b\text{-}D_{22.5})]\text{-network}$	5.0
4	$[(D_{22.5}\text{-}co\text{-}B_{7.5})\text{-star-}(B_{7.5}\text{-}co\text{-}D_{22.5})]\text{-network}$	4.8
5	$(B_{15}\text{-star-}D_{45})\text{-network}$	5.0
6	$[(B_{15}\text{-}b\text{-}D_{15})\text{-star-}D_{30}]\text{-network}$	5.0
7	$[(B_{15}\text{-}co\text{-}D_{15})\text{-star-}D_{30}]\text{-network}$	5.0

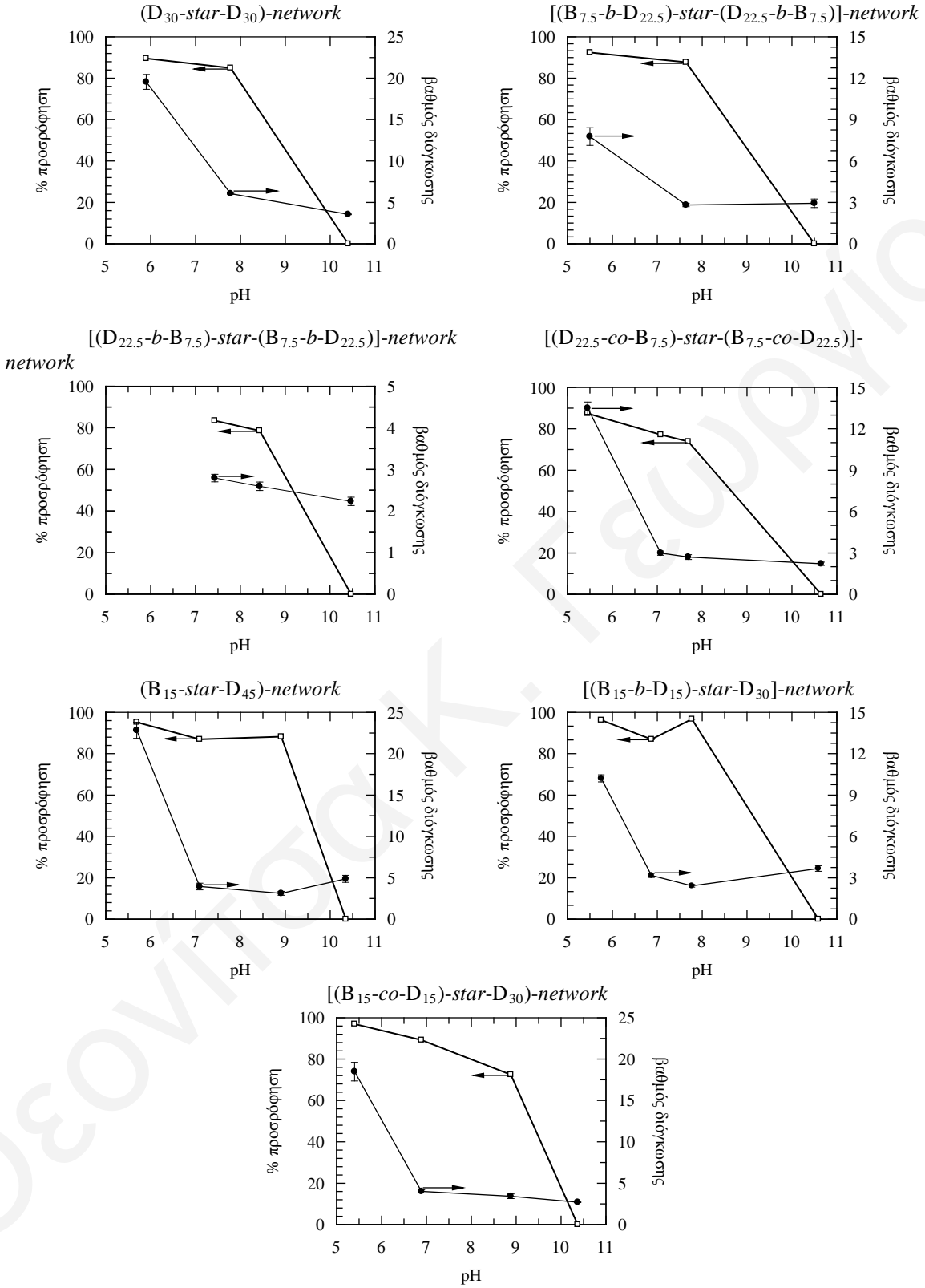
¹Το D και το B είναι περαιτέρω συντομογραφίες των μονάδων DMAEMA και BzMA, αντίστοιχα.

3.2.4.6. Συμπλοκοποίηση με DNA

Τα αμφιφιλικά αστεροειδή πολυμερικά πλέγματα DMAEMA – BzMA μελετήθηκαν και αυτά ως προς την ικανότητά τους να προσροφούν DNA. Στο Σχήμα 3.43 παρουσιάζονται τα ποσοστά προσρόφησης DNA και οι ΒΔ (στην παρουσία DNA) των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA σε τρία διαφορετικά pH.

Η συμπλοκοποίηση με το DNA φάνηκε ότι ευνοείται από την παρουσία ιοντισμένων μονάδων DMAEMA, όπως παρατηρήθηκε και στα αμφολυτικά αστεροειδή πολυμερή DMAEMA – MAA. Όταν το μονομερές DMAEMA ήταν θετικά φορτισμένο σε χαμηλά pH, κάτω από το pK , η προσρόφηση του DNA ήταν ποσοτική για όλα τα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Σχήμα 3.43. Τα ποσοστά προσρόφησης DNA και οι βαθμοί διόγκωσης των αστεροειδών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA παρουσία DNA σε τρία διαφορετικά pH.

πλέγματα, ανεξαρτήτως σύστασης και αρχιτεκτονικής. Συμπεραίνεται έτσι ότι η προσρόφηση του DNA είναι καθαρά ηλεκτροστατική, όπως ήταν το συμπέρασμα και για τα αστεροειδή πλέγματα DMAEMA-MAA.

Συγκρίνοντας τους ΒΔ των πλεγμάτων των DMAEMA – BzMA σε τρία διαφορετικά pH στην παρουσία DNA με τους αντίστοιχους ΒΔ σε καθαρό νερό, αυτοί κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα ή ήταν ελαφρώς μικρότεροι. Φαίνεται ότι η παρουσία του DNA επηρέασε λίγο τη διόγκωση των πλεγμάτων και συγκεκριμένα τη μείωσε αφού αντισταθμίζει λίγο τα θετικά φορτία των μονάδων του DMAEMA μειώνοντας έτσι τις απωστικές αλληλεπιδράσεις.

Συμπερασματικά, έγινε επιτυχημένη σύνθεση των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων DMAEMA – BzMA με GTP. Οι ΒΔ των πλεγμάτων DMAEMA – BzMA σε νερό παρουσίασαν ισχυρή εξάρτηση από το pH του διαλύτη. Επίσης οι ΒΔ σε νερό χαμηλού pH παρουσιάστηκαν να εξαρτώνται από την αρχιτεκτονική των πλεγμάτων σε αντίθεση με τους ΒΔ σε ουδέτερο νερό και σε THF. Όλα τα πλέγματα αυτής της οικογένειας μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να προσροφούν DNA και εξάχθηκε το συμπέρασμα ότι η προσρόφηση είναι καθαρά ηλεκτροστατική.

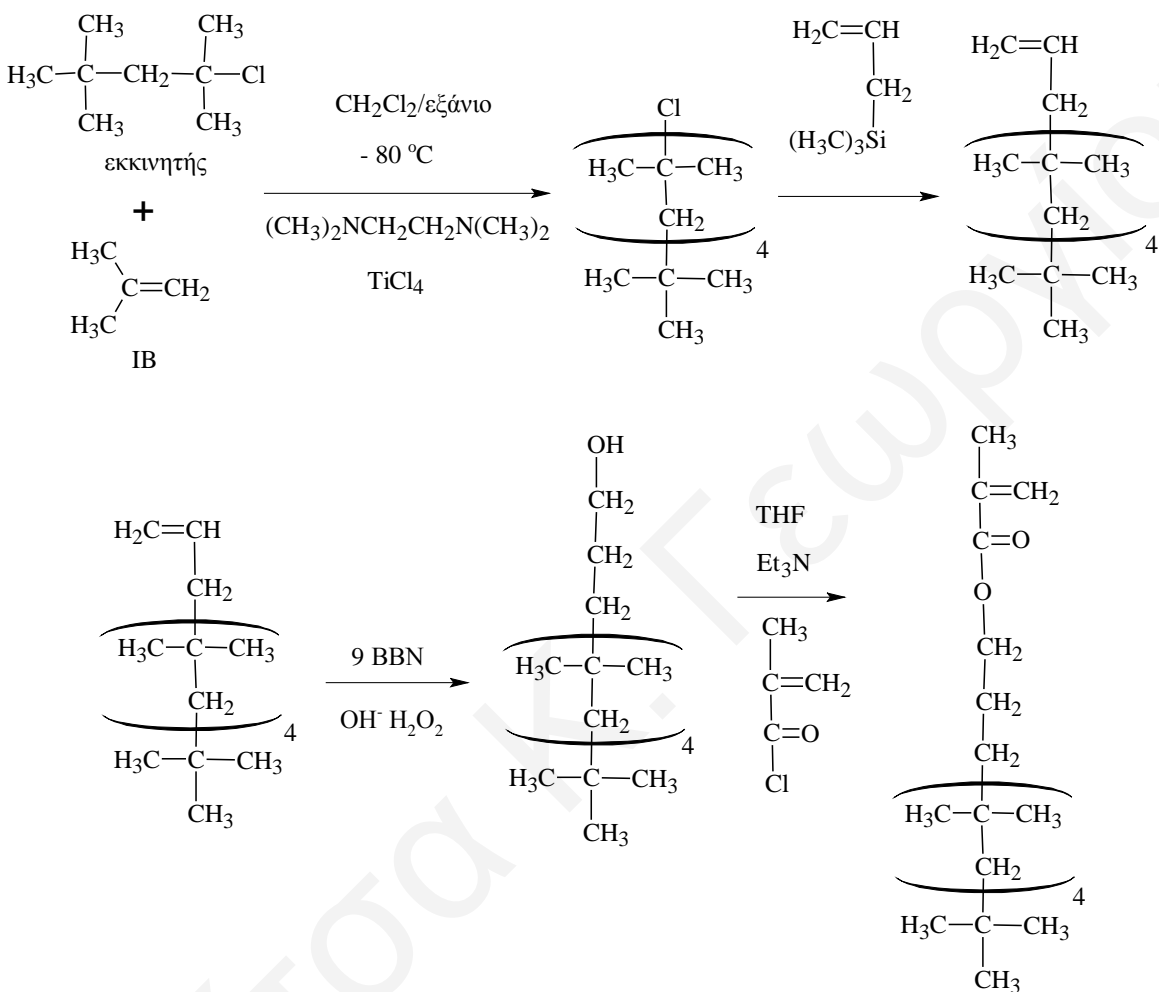
3.2.5. Πλέγματα Βασισμένα σε PIB

Όλα τα πλέγματα τα οποία περιγράφηκαν στις προηγούμενες παραγράφους αυτής της Διδακτορικής Διατριβής παρουσίασαν ένα μειονέκτημα: θρυμματίζονταν σε μικρά κομμάτια ~1 mm όταν διογκωθούν αρκετά. Για τα υδρόφοβα αστεροειδή πλέγματα MMA – BuMA η θραύση λαμβάνει χώρα σε καθαρό THF ενώ για τα αμφοφιλικά πλέγματα DEAEEMA – HEGMA και DMAEMA – BzMA σε νερό χαμηλού pH. Τα αμφολυτικά πλέγματα DMAEMA – MAA θρυμματίζονταν σε όλα τα pH, (θρυμματισμός κατά την υδρόλυση σε οξύ). Πρέπει να αναφερθεί ότι η θραύση των πλεγμάτων σε μικρότερα τεμάχια δεν είναι πρωτοφανές φαινόμενο, αλλά παρατηρείται συχνά στα πολυμεθακρυλικά πλέγματα (Vamvakaki et al 2001, Vamvakaki και Patrickios 2002, Triftaridou et al 2002, Demosthenous et al 2001). Για να βελτιωθούν οι μηχανικές ιδιότητες αυτών των πρότυπων πλεγμάτων που παρασκευάζονται με GTP απαιτείται ένα μονομερές με χαμηλό T_g το οποίο θα προσφέρει ελαστικότητα στο πλέγμα και κατ' επέκταση βελτιωμένες καλύτερες μηχανικές ιδιότητες (δεν θα θρυμματίζεται). Ένα μονομερές που χρησιμοποιείται πολύ στη σύνθεση πλεγμάτων και είναι γνωστό για τις ανώτερες μηχανικές του ιδιότητες είναι το IB. Το IB όμως δεν μπορεί να πολυμεριστεί με GTP και για αυτό πολυμερίστηκε αρχικά με QLCCP και μετά από μερικές αντιδράσεις τροποποίησης μετατράπηκε σε μεθακρυλικό πολυIB (PIBMA) για να μπορεί να πολυμεριστεί με GTP. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η μελέτη είναι η πρώτη αναφορά όπου αυτό το μακρομονομερές πολυμερίζεται με GTP καθώς επίσης και η πρώτη αναφορά που συνδυάζονται οι δύο αυτές ζωντανές μέθοδοι πολυμερισμού GTP και QLCCP.

3.2.5.1. Σύνθεση

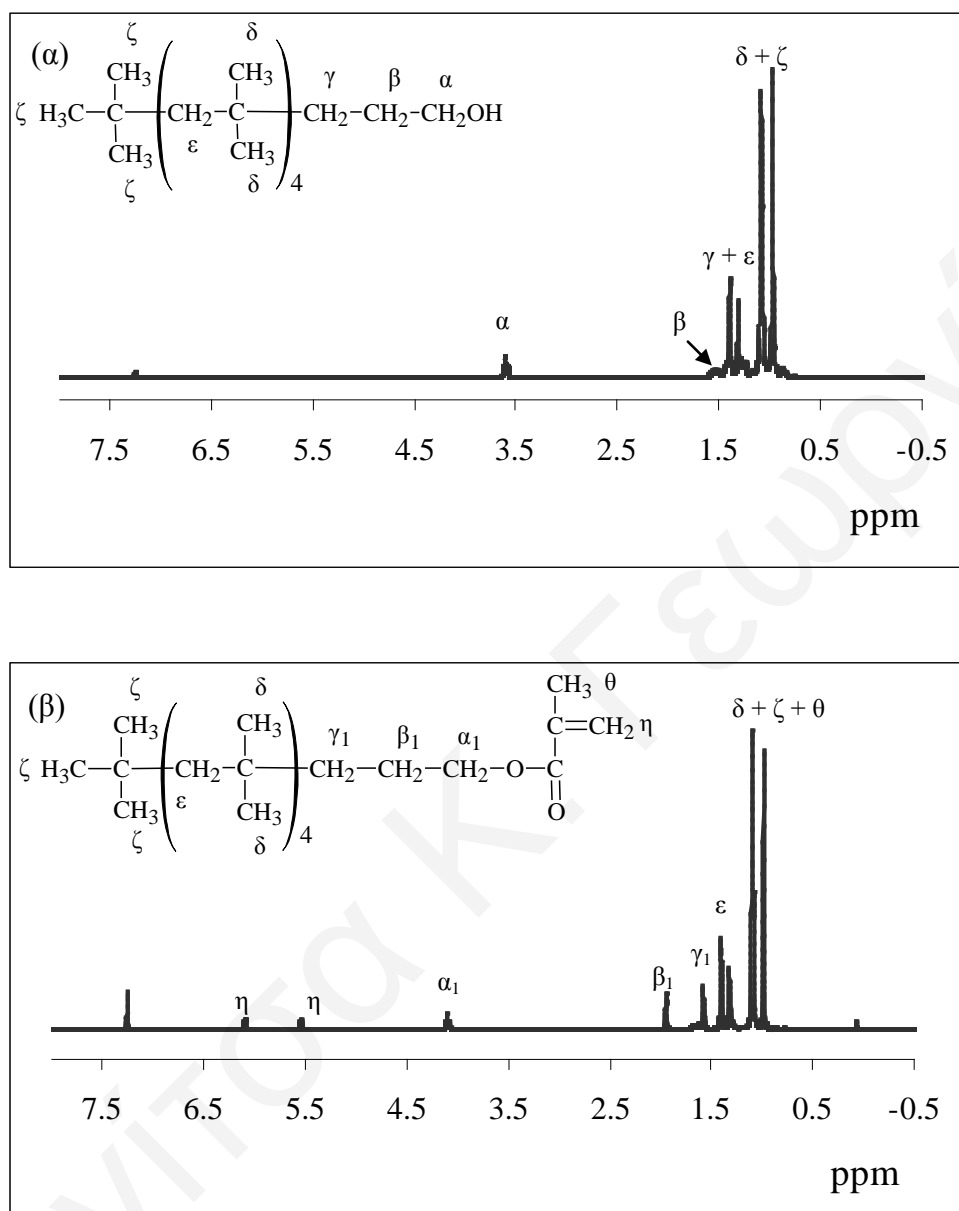
Όπως προαναφέρθηκε, η παρασκευή του PIBMA έγινε σε συνεργασία με την Ουγγρική Ακαδημία Επιστημών και συγκεκριμένα τον Καθηγητή Βέλα Ιβάν. Αρχικά, το αέριο IB πολυμερίστηκε με QLCCP (Kennedy και Ιβάν, 1992, Ιβάν και Kennedy, 1988) και παρασκευάστηκε έτσι PIB το οποίο μετά από αντιδράσεις υδροβορίωσης και οξείδωσης (Ιβάν et al, 1980, Kennedy και Hiza, 1983) μετατράπηκε στο PIBOH. Στη συνέχεια, με αντίδραση εστεροποίησης, αντιδρώντας το PIBOH με μεθακρυλοχλωρίδιο

μετατράπηκε σε PIBMA. Οι αντιδράσεις παρασκευής του PIBMA δίνονται στο Σχήμα 3.44.



Σχήμα 3.44. Αντιδράσεις παρασκευής του PIBMA.

Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι αν και η αντίδραση εστεροποίησης πραγματοποιείται σχετικά εύκολα, ο καθαρισμός του PIBMA ήταν μία αρκετά επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία. Για την παρακολούθηση της αντίδρασης, του καθαρισμού και την ταυτοποίηση των PIBOH και PIBMA χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία ^1H NMR. Τα φάσματα ^1H NMR των PIBOH και PIBMA παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.45. Και στα δύο φάσματα παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές του PIB, και, πιο συγκεκριμένα οι κορυφές δ, ε και ζ. Κατά την εστεροποίηση παρατηρήθηκε η μετατόπιση των κορυφών που αντιστοιχούν στα υδρογόνα κοντά στο υδροξύλιο που

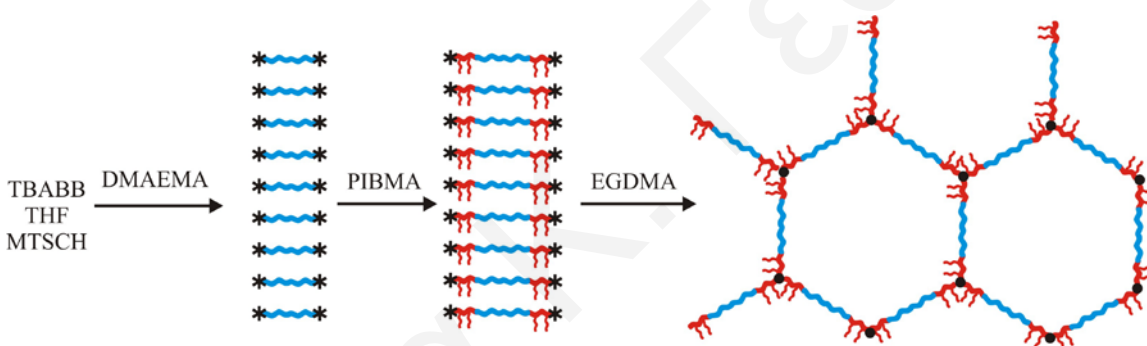


Σχήμα 3.45. Φάσματα ^1H NMR (α) του PIBOH και (β) του μακρομονομερούς PIBMA.

είναι οι κορυφές α και β στο Σχήμα 3.45. (α) σε μεγαλύτερα ppm, κορυφές α₁ και β₁ στο Σχήμα 3.45 (β) και η εμφάνιση καινούργιων κορυφών που αντιστοιχούν στα υδρογόνα του διπλού δεσμού της μεθακρυλικής ομάδας (Σχήμα 3.45 (β)): κορυφές η).

Πρέπει να σημειωθεί ότι έγιναν αρκετές προσπάθειες πολυμερισμού του PIBMA οι οποίες δεν ήταν όλες επιτυχημένες. Το πρώτο μακρομονομερές του PIBMA το οποίο

συντέθηκε με 10 μονάδες IB δεν κατέστη δυνατό να πολυμεριστεί με GTP, πρώτα γιατί ένα μέρος του πολυμερίστηκε από μόνο του με πολυμερισμό ελευθέρων ριζών και κατέστη πολύ δύσκολη η επεξεργασία του μονομερούς μετά από αυτό. Πιθανότατα επίσης το μονομερές αυτό ήταν πολύ μεγάλο και δύσκολο να πολυμεριστεί με GTP ή απλούστατα δεν ήταν αρκετά καθαρό. Μόνο το δεύτερο μακρομονομερές με 5 μονάδες IB, μέρος της παρασκευής του οποίου έχει αναφερθεί στο Πειραματικό Μέρος, κατέστη δυνατό να πολυμεριστεί με GTP. Τα αποτελέσματα που ακολουθούν αναφέρονται μόνο στις επιτυχημένες προσπάθειες πολυμερισμού. Στο πιο κάτω Σχήμα περιγράφεται η πρώτη επιτυχημένη προσπάθεια πολυμερισμού του PIBMA με GTP για την παρασκευή ενός αμφιφιλικού πλέγματος βασισμένου σε γραμμικά τριαδρομερή συμπολυμερή τύπου ABA.



Σχήμα 3.46. Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του πλέγματος (PIB_{2.6}-*b*-D₁₀-*b*-PIB_{2.6})-network. Οι μονάδες του DMAEMA συμβολίζονται με μπλε χρώμα, ενώ του PIBMA συμβολίζονται με κόκκινο χρώμα. Ο μαύρος κύκλος συμβολίζει τον υδρόφοβο πυρήνα από EGDMA και με μαύρο αστεράκι συμβολίζονται τα ενεργά κέντρα του πολυμερισμού.

3.2.5.2. Μοριακά Βάρη

Σε αυτή τη μελέτη, για να υπάρχει καλύτερος έλεγχος του πολυμερισμού GTP του PIBMA, σε κάθε προσπάθεια πολυμερισμού παρασκευάζονταν και πλέγματα είτε ομοπολυμερών του DMAEMA ή αδρομερών συμπολυμερών DMAEMA – MMA και συγκρίνονταν με τα συμπολυμερικά αμφιφιλικά πλέγματα DMAEMA – PIBMA. Τα

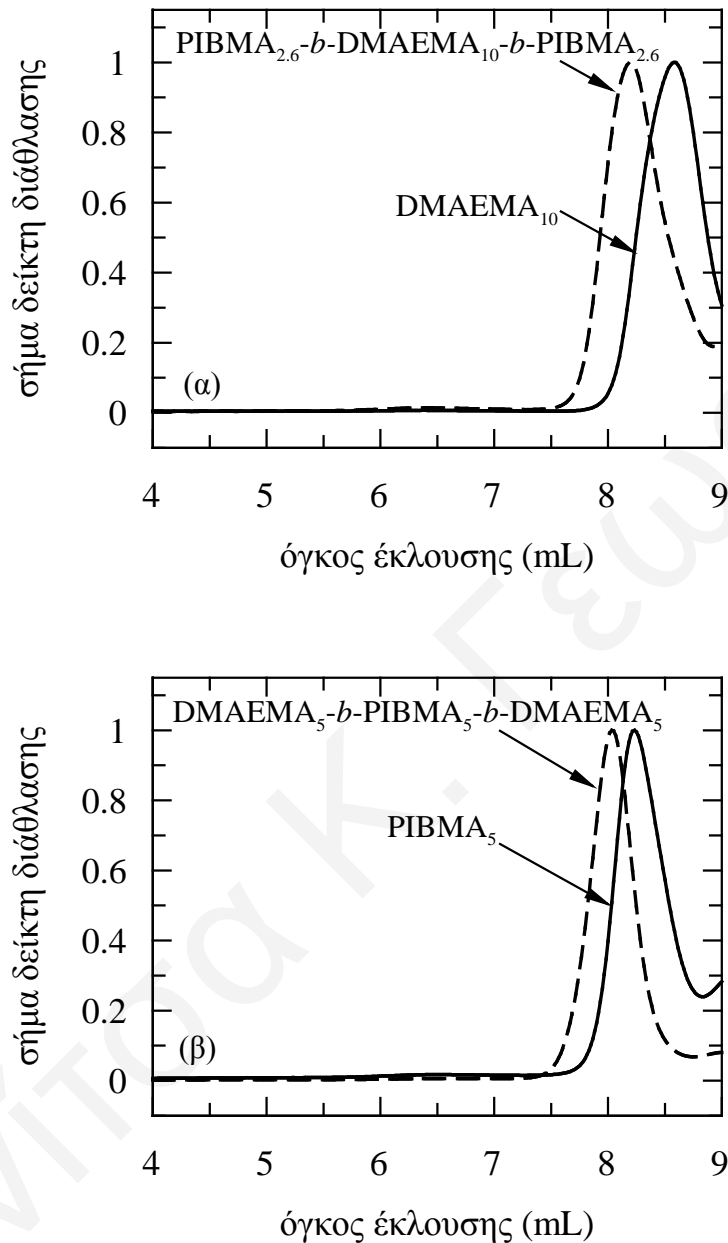
πρόδρομα μόρια όλων των αμφιφιλικών πολυμερικών πλεγμάτων που συντέθηκαν χαρακτηρίστηκαν ως προς τα MB τους και την KMB με GPC και τη σύσταση τους με ¹H NMR και τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 3.20. Ο Πίνακας καταγράφει τους υπολογισμούς που αφορούν τόσο τα πολυμερή που περιέχουν PIBMA όσο και αυτά που περιέχουν MMA καθώς και ενός ομοπολυμερούς του DMAEMA. Οι KMB όλων των πρόδρομων πολυμερών ήταν ικανοποιητικά στενές με ΔΠMB ≤ 1.36, ενώ τα M_n ήταν πάντα αρκετά κοντά αλλά μεγαλύτερα από τα θεωρητικά αναμενόμενα MB, υποδεικνύοντας μερική απενεργοποίηση του εκκινητή. Οι πειραματικά προσδιορισμένες συστάσεις σε DMAEMA των πρόδρομων πολυμερών των δύο αμφιφιλικών πλεγμάτων του PIBMA ήταν κοντά στις θεωρητικά αναμενόμενες, όπως και οι συστάσεις των αμφιφιλικών πλεγμάτων του MMA.

Πίνακας 3.20 MB, ΔΠMB, θεωρητικές και πειραματικές συστάσεις σε DMAEMA των πρόδρομων μορίων των πολυμερικών πλεγμάτων.

Πλ.	Πολυμερές ¹	Θεωρητικό MW ²	Αποτελέσματα GPC			% mol DMA	
			M _n	M _p	M _w /M _n	Θεωρητ.	¹ H NMR
1	DMA ₁₀	1768	2300	2700	1.29	-	-
	DMA ₅ - <i>b</i> -DMA ₁₀ - <i>b</i> -DMA ₅	3340	4600	4900	1.21	100	100
2	DMA ₁₀	1768	2000	2500	1.32	-	-
	PIB _{2.6} - <i>b</i> -D ₁₀ - <i>b</i> -PIB _{2.6}	3806	3900	4400	1.21	60	61
3	MMA ₁₀	1196	2300	2900	1.36	-	-
	DMA ₅ - <i>b</i> -MMA ₁₀ - <i>b</i> -DMA ₅	2768	5600	5700	1.19	50	43
4	PIB ₅	2546	3700	4500	1.14	-	-
	DMA ₅ - <i>b</i> -PIB ₅ - <i>b</i> -DMA ₅	4119	5800	6400	1.13	66	73
5	MMA ₂₆	2600	5200	5700	1.20	-	-
	DMA ₅ - <i>b</i> -MMA ₂₆ - <i>b</i> -DMA ₅	4172	7600	7800	1.22	28	27

¹Το DMA και το PIB είναι περαιτέρω συντομογραφίες των μονάδων DMAEMA και PIBMA, αντίστοιχα.

²Συμπεριλαμβάνονται 196 g mol⁻¹ από τον εκκινητή που ενσωματώνονται στο πολυμερές.



Σχήμα 3.47. Χρωματογραφήματα GPC για τα πρόδρομα μόρια των πλεγμάτων: (α) (PIBMA_{2.6}-b-DMAEMA₁₀-b-PIBMA_{2.6})-network και (β) (DMAEMA₅-b-PIBMA₅-b-DMAEMA₅)-network.

Το πιο σημαντικό αποτέλεσμα από το GPC δεν ήταν όμως τα MB ή οι κατανομές τους, αλλά η μαρτυρία ότι ο πολυμερισμός παρέμεινε ενεργός μετά το κάθε στάδιο, και ιδιαίτερα μετά από τον πολυμερισμό του μακρομονομερούς του PIBMA, και ότι

επιπλέον μονομερές ή διασταυρωτής μπορούν να προστεθούν. Όπως φαίνεται λοιπόν στα πιο κάτω χρωματογραφήματα GPC (Σχήμα 3.47), το PIBMA πολυμερίστηκε με επιτυχία και παρουσίασε ανάλογη συμπεριφορά με τα άλλα μεθακρυλικά μονομερή. Συγκεκριμένα, το PIBMA πολυμερίστηκε για να δώσει αρχικά ομοπολυμερές, που με την προσθήκη δεύτερου μονομερούς σχηματίστηκε ένα ABA τριαδρομερές συμπολυμερές (Πλέγμα 4: DMAEMA₅-b-PIBEMA₅-b-DMAEMA₅, Σχήμα 3.47.(β)) και επίσης πολυμερίστηκε δεύτερο, μετά από το DMAEMA, για να δώσει το αντίστροφο BAB τριαδρομερές συμπολυμερές (Πλέγμα 2: PIBMA_{2,6}-b-DMAEMA₁₀-b-PIBMA_{2,6}, Σχήμα 3.46(α)).

3.2.5.3. Ποσοστό Μάζας, MB και Σύσταση των Απωλειών του Πλέγματος

Στον Πίνακα 3.21 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα χαρακτηρισμού των απωλειών των πολυμερικών πλεγμάτων. Στην πρώτη στήλη αναγράφεται ο αριθμός του πλέγματος, στη δεύτερη ο χημικός του τύπος ενώ στην τρίτη το κατά μάζα % ποσοστό των απωλειών των πλεγμάτων. Ακολουθούν τα M_n και οι πολυδιασπορές των MB καθώς και η % mol σύσταση των απωλειών σε DMAEMA. Όλα τα πλέγματα παρουσίασαν

Πίνακας 3.21 Ποσοστιαία μάζα, MB, ΔΠMB και σύσταση των απωλειών των πολυμερικών πλεγμάτων.

Πλέγμα	Πολυμερές ¹	w/w %	Αποτελέσματα GPC		¹ H NMR
		Απωλ.	M_n	M_w/M_n	% mol D
1	(DMA ₅ -b-DMA ₁₀ -b-DMA ₅)-network	9.9	3700	1.33	100
2	(PIB _{2,6} -b-DMA ₁₀ -b-PIB _{2,6})- network	25.6	2800	1.27	85.9
3	(DMA ₅ -b-MMA ₁₀ -b-DMA ₅)- network	10.1	2600	1.38	7.0
4	(DMA ₅ -b-PIB ₅ -b-DMA ₅)- network	16.1	3800	1.15	36.4
5	(DMA ₅ -b-MMA ₂₆ -b-DMA ₅)- network	17.0	3800	1.33	6.4

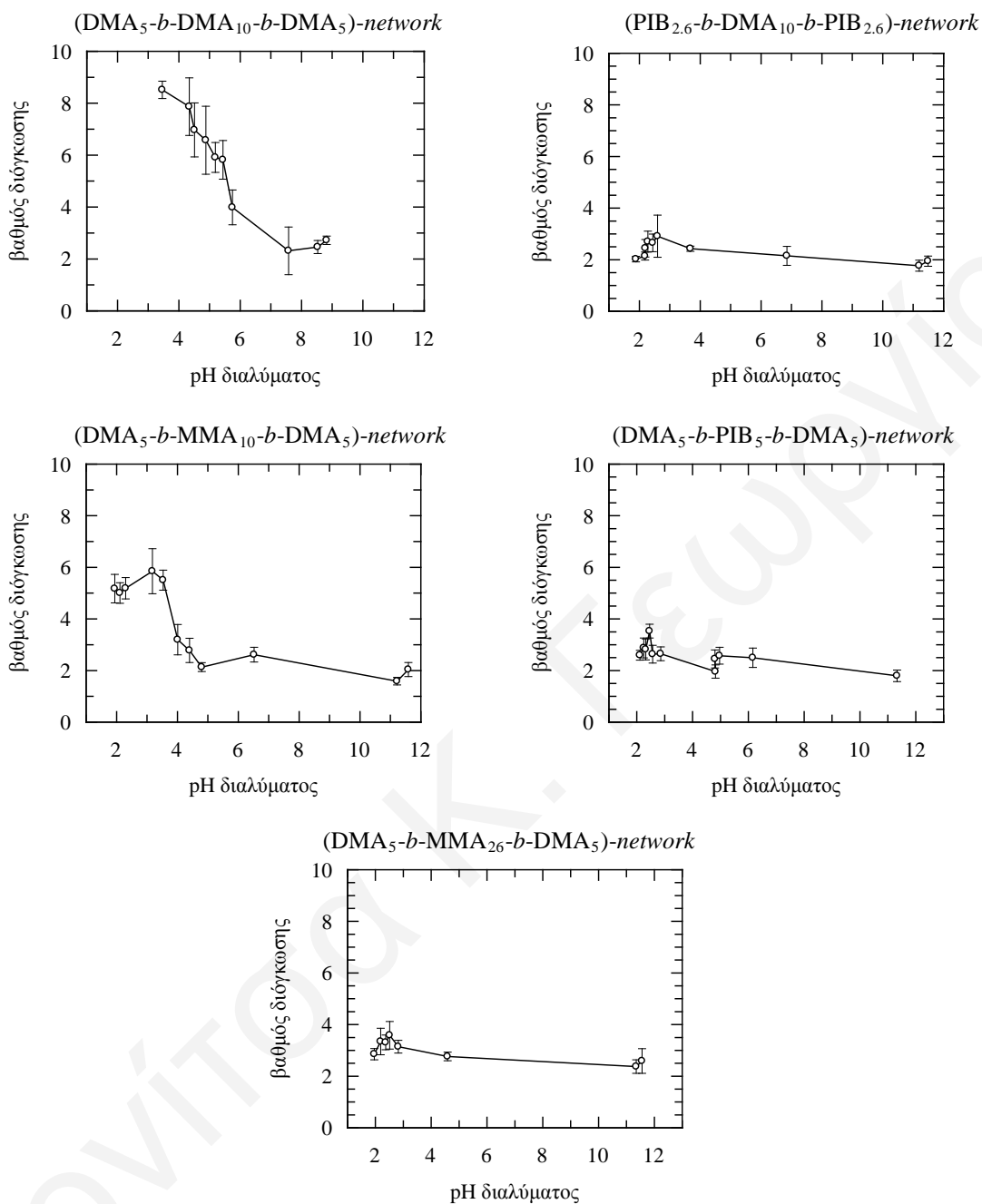
¹Το DMA και το PIB είναι περαιτέρω συντομογραφίες των μονάδων DMAEMA και PIBMA, αντίστοιχα.

απώλειες κάτω από 17 %, ποσοστό το οποίο είναι ικανοποιητικό, με εξαίρεση το πλέγμα 2: PIBMA_{2.6}-*b*-DMAEMA₁₀-*b*-PIBMA_{2.6}, το οποίο παρουσίασε 25.6 %. Αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι το μακρομονομερές PIBMA δεν προστέθηκε ικανοποιητικά στα πρόδρομα ομοπολυμερή του DMAEMA (όπως υποστηρίζεται και από τη μεγάλη σύσταση των απωλειών σε DMAEMA και το M_n που αντιστοιχεί στο πρόδρομο ομοπολυμερές του DMAEMA) και αυτό μπορεί να έγινε, είτε γιατί έγινε απενεργοποίηση των ομοπολυμερών του DMAEMA, είτε γιατί το PIBMA δεν αντιδρά τόσο καλά σαν δεύτερο μονομερές. Γενικά, όλες οι απώλειες φαίνεται να αποτελούνται περισσότερο από το μονομερές που προστέθηκε πρώτο, όπως ήταν αναμενόμενο.

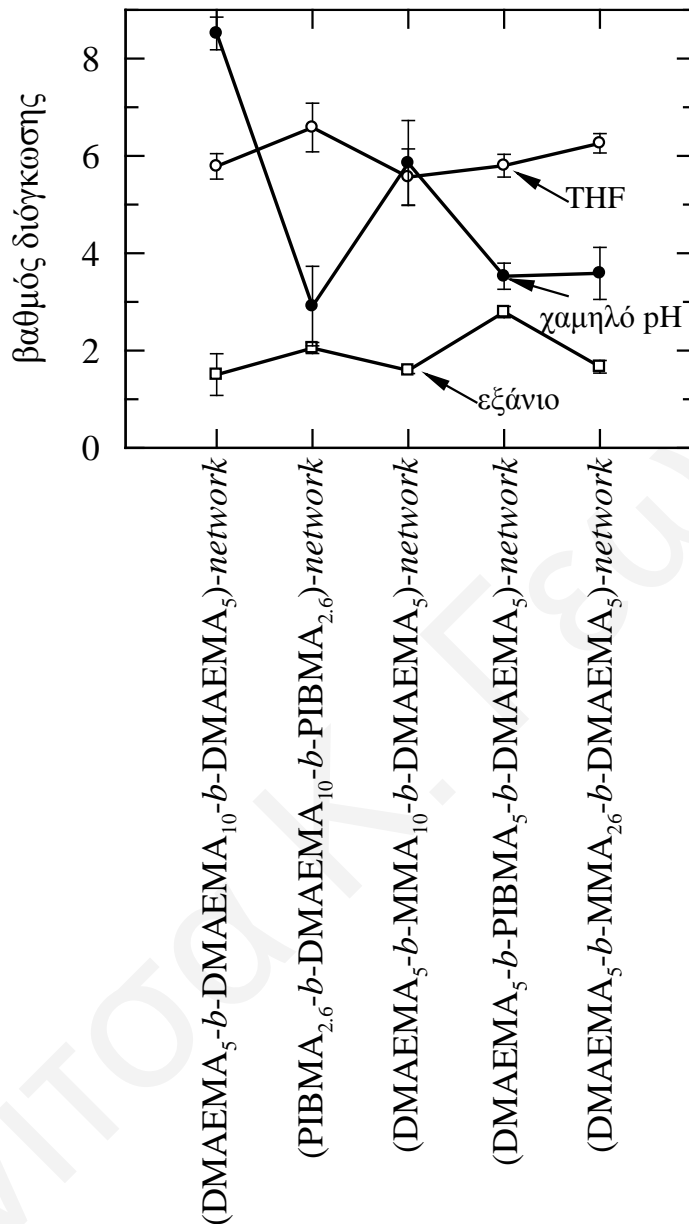
3.2.5.4. Βαθμοί Διόγκωσης

Όλα τα πολυμερικά πλέγματα χαρακτηρίστηκαν ως προς το ΒΔ σε διάφορους διαλύτες και συγκεκριμένα σε νερό, εξάνιο και THF. Οι ΒΔ σε νερό προσδιορίστηκαν σε σχέση με το pH του διαλύματος και παρουσιάζονται στα Σχήματα 3.48. Οι ΒΔ όλων των πλεγμάτων παρουσίασαν παρόμοια εξάρτηση από το pH του διαλύτη. Συγκεκριμένα οι ΒΔ σε χαμηλά pH ήταν μεγαλύτεροι λόγω της παρουσίας του υδρόφιλου ιονιζόμενου μονομερούς DMAEMA, όπως κήταν αναμενόμενο.

Στο Σχήμα 3.49 παρουσιάζονται οι ΒΔ για όλα τα πλέγματα σε τρεις διαλύτες: νερό χαμηλού pH, THF και εξάνιο. Όλα τα πλέγματα διογκώθηκαν περισσότερο σε THF από ό,τι στους άλλους δύο διαλύτες, με εξαίρεση το ομοπολυμερές του DMAEMA, αφού το THF αποτελεί καλό διαλύτη και για τα δύο μονομερή. Σε νερό χαμηλού pH διογκώθηκαν τα πλέγματα με το μεγαλύτερο ποσοστό του μονομερούς DMAEMA, (DMAEMA₅-*b*-DMAEMA₁₀-*b*-DMAEMA₅)-*network* και (DMAEMA₅-*b*-MMA₁₀-*b*-DMAEMA₅)-*network*, όπως ήταν αναμενόμενο. Σε εξάνιο όλα τα πλέγματα διογκώνονται λιγότερο από ό,τι στους άλλους δύο διαλύτες αφού το εξάνιο αποτελεί καλό διαλύτη μόνο για το PIBMA και κακό διαλύτη για τα μονομερή DMAEMA και MMA. Δύο σημαντικές παρατηρήσεις για αυτά τα διογκωμένα πλέγματα είναι ότι τα αμφιφιλικά πλέγματα δεν σπάνε σε νερό χαμηλού pH όπως το ομοπολυμερές πλέγμα του



Σχήμα 3.48. Οι ΒΔ σαν συνάρτηση του pH του διαλύματος για τα πλέγματα για το ομοπολυμερικό πλέγματος του DMAEMA, των δύο DMAEMA-PIBMA πλεγμάτων και των δύο DMAEMA - MMA πλεγμάτων. Το DMA και το PIB συμβολίζουν το DMAEMA και το PIBMA, αντίστοιχα.



Σχήμα 3.49 ΒΔ για του ομοπολυμερικού πλέγματος του DMAEMA, των δύο DMAEMA - PIBMA πλεγμάτων και των δύο DMAEMA - MMA πλεγμάτων σε εξάνιο, THF και σε νερό χαμηλού pH.

DMAEMA και ότι όλα τα πλέγματα διογκώνονται μέχρι θραύσης σε THF, με τα αμφιφιλικά πλέγματα των PIBMA - DMAEMA να σπάνε λιγότερο. Αυτό ενισχύει την

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

αρχική υπόθεση που έγινε σε αυτή τη μελέτη ότι η παρουσία του IB θα βελτίωνε τις μηχανικές ιδιότητες των πλεγμάτων.

Συνοψίζοντας, σε αυτό το τελευταίο μέρος της Διδακτορικής Διατριβής, έγινε κατορθωτό να πολυμεριστεί για πρώτη φορά το μακρομονομερές του PIBMA με GTP και συνδυάστηκαν για πρώτη φορά οι δύο μέθοδοι GTP και QLCCP για να δώσουν πρότυπα αμφιφιλικά πλέγματα PIBMA – DMAEMA, τα οποία φαίνεται να παρουσιάζουν βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Στη αυτή τη Διδακτορική Διατριβή συντέθηκαν και μελετήθηκαν υδατοδιαλυτά αστεροειδή πολυμερή και αστεροειδή συμπολυμερικά πλέγματα. Η σύνθεση έγινε με χρήση του «ζωντανού» πολυμερισμού GTP εκτός από μία περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε και ο QLCCP. Η μελέτη των αστεροειδών πολυμερών αφορούσε κυρίως την αξιολόγηση τους ως μεταφορείς DNA σε κύτταρα, ενώ ο χαρακτηρισμός των πλεγμάτων επικεντρώθηκε στον προσδιορισμό του βαθμού διόγκωσης τους σε διαφορετικά περιβάλλοντα.

Συντέθηκαν δύο οικογένειες αστεροειδών πολυμερών που αποτελούνται από τέσσερα αστεροειδή συμπολυμερή διαφόρων αρχιτεκτονικών, όπου η μία συνδυάζει τα υδρόφιλα μονομερή DMAEMA – HEGMA ενώ η άλλη συνδυάζει τα DMAEMA – MAA. Οι τέσσερις οικογένειες αστεροειδών πλεγμάτων αποτελούνται από τα ζεύγη μονομερών : (1) MMA – BuMA, (2) DEAEMA – HEGMA, (3) DMAEMA – MAA, και (4) DMAEMA – BzMA. Όλες οι πιο πάνω οικογένειες πολυμερών παρασκευάστηκαν με χρήση του GTP. Αξιοσημείωτο είναι ότι ο GTP παρέμεινε ζωντανός ακόμη και στις περιπτώσεις που η σύνθεση απαιτούσε έξι προσθήκες μονομερούς ή διασταυρωτή.

Σε μία περίπτωση χρησιμοποιήθηκε μία άλλη «ζωντανή» μέθοδος πολυμερισμού, ο QLCCP. Με τον QLCCP παρασκευάστηκε ένα ολιγομερές του IB το οποίο με τις κατάλληλες μετατροπές έγινε μεθακρυλικό μακρομονομερές που με τη σειρά του πολυμερίστηκε για πρώτη φορά με επιτυχία χρησιμοποιώντας τη μέθοδο GTP για να παρασκευαστούν αμφιφιλικά πλέγματα.

Τα MB όλων των αστεροειδών πολυμερών και των πρόδρομων μορίων τους καθώς και τα MB των πρόδρομων μορίων των πολυμερικών πλεγμάτων χαρακτηρίστηκαν με GPC. Φάνηκε ότι τα MB των γραμμικών πρόδρομων μορίων βρίσκονται σε συμφωνία με τα θεωρητικά αναμενόμενα MB. Οι ΔΠΜΒ για τα γραμμικά αυτά πρόδρομα πολυμερή στα οποία χρησιμοποιήθηκε ο μονοσθενής εκκινητής και ο δισθενής εκκινητής ήταν χαμηλοί, $\Delta\Pi\text{MB} \leq 1.15$ και $\Delta\Pi\text{MB} \leq 1.32$, αντίστοιχα. Τα MB

των αστεροειδών πολυμερών DMAEMA – HEGMA και DMAEMA – MAA ήταν από 11 έως 23 φορές μεγαλύτερα από τα MB των αντίστοιχων γραμμικών πρόδρομων πολυμερών, ενώ τα MB των πρόδρομων αστεροειδών πολυμερών των αστεροειδών πλεγμάτων ήταν από 2 έως 33 φορές μεγαλύτερα από τα MB των αντίστοιχων γραμμικών πρόδρομων πολυμερών, ανάλογα με τη συγκέντρωση του διαλύματος του πολυμερισμού και τα μονομερή που χρησιμοποιήθηκαν. Οι ΔΠΜΒ όλων των αστεροειδών πολυμερών και των πρόδρομων αστεροειδών πολυμερών κυμάνθηκαν από 1.17 έως 1.42, ικανοποιητικά χαμηλοί για αστεροειδή πολυμερή.

Τα αστεροειδή πολυμερή DMAEMA – HEGMA και DMAEMA – MAA χαρακτηρίστηκαν επίσης και με σκέδαση φωτός. Συγκεκριμένα, χαρακτηρίστηκαν με SLS και DLS και προσδιορίστηκαν τα απόλυτα μέσου βάρους MB (M_w) και η υδροδυναμική διάμετρος των πολυμερών σε νερό. Όλα τα αστεροειδή πολυμερή συσσωματώνονται στο νερό, αφού παρατηρήθηκαν στη DLS κορυφές διαμέτρων πολυμερών που αντιστοιχούν τόσο σε αστεροειδή πολυμερή όσο και στα συσσωματώματά τους, και στη SLS M_w που αντιστοιχούν σε συσσωματώματα αστεροειδών πολυμερών. Τα αστεροειδή αυτά πολυμερή χαρακτηρίστηκαν επίσης με νεφελομετρία, όπου σε καμία θερμοκρασία δεν παρατηρήθηκε καταβύθιση πολυμερούς στο νερό, καθώς και με τιτλοδοτήσεις, από τις οποίες προσδιορίστηκαν τα φαινόμενα pK των ιονιζόμενων μονάδων των αστεροειδών πολυμερών και κυμαίνονταν μεταξύ 6.9 και 7.2. Τέλος, χαρακτηρίστηκαν επίσης και με NMR και φάνηκε ότι η πειραματική σύσταση ήταν των αστεροειδών πολυμερών αρκετά κοντά στη θεωρητικά αναμενόμενη σύσταση.

Στη συνέχεια, οι τρεις οικογένειες αστεροειδών πολυμερών αξιολογήθηκαν σαν οχήματα μεταφοράς γενετικού υλικού στα κύτταρα σε σύγκριση με τον εμπορικά διαθέσιμο δενδριμερικό μεταφορέα SuperFect. Εκτός από τις δύο σειρές αστεροειδών συμπολυμερών που συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν σε αυτή τη Διδακτορική Διατριβή αξιολογήθηκαν και αστεροειδή ομοπολυμερή του DMAEMA διαφόρων MB. Τα κυριότερα αποτελέσματα των πειραμάτων της επιμόλυνσης ήταν τα εξής:

1. Η βιωσιμότητα των κυττάρων παρουσίασε μείωση με αύξηση του MB και της ποσότητας του αστεροειδούς πολυμερούς, ενώ παρέμεινε σταθερή με αύξηση της ποσότητας του DNA.
2. Η απόδοση επιμόλυνσης παρουσίασε μέγιστο με αύξηση του MB και της ποσότητας του αστεροειδούς πολυμερούς, ενώ παρουσίασε αύξηση με αύξηση της ποσότητας του DNA
3. Η συνολική απόδοση επιμόλυνσης παρουσίασε αύξηση μειώνοντας το MB και αυξάνοντας την ποσότητα του DNA, ενώ παρουσίασε μικρό μέγιστο με αύξηση της ποσότητας του αστεροειδούς πολυμερούς.
4. Η παρουσία των δύο συμμοномерών HEGMA και MAA μείωσε την τοξικότητα σε σύγκριση με αντίστοιχα ομοπολυμερή του DMAEMA, ενώ η απόδοση της επιμόλυνσης στις πλείστες περιπτώσεις μειώθηκε εκτός για δύο αστεροειδή συμπολυμερή DMAEMA – HEGMA και για ένα αστεροειδές συμπολυμερές DMAEMA – MAA όπου παραμένει περίπου στα ίδια επίπεδα.
5. Τα αστεροειδή πολυμερή με βάση το DMAEMA αποτελούν αποδοτικούς μεταφορείς γενετικού υλικού στα κύτταρα, αφού ένα αστεροειδές ομοπολυμερές DMAEMA και ένα αστεροειδές συμπολυμερές DMAEMA – HEGMA παρουσίασαν εξίσου ικανοποιητικά αποτελέσματα με το δαπανηρό εμπορικό μεταφορέα SuperFect.

Συμπερασματικά λοιπόν, τα αστεροειδή πολυμερή του DMAEMA θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν μεταφορείς γενετικού υλικού στα κύτταρα για να αντικαταστήσουν το εμπορικά διαθέσιμο μεταφορέα SuperFect. Για να πραγματοποιηθεί αυτό χρειάζονται να γίνουν μερικές βελτιώσεις για να μεγιστοποιηθεί η ικανότητα επιμόλυνσης των αστεροειδών πολυμερών:

1. Τα πολυμερή να καθαριστούν περαιτέρω με αποτέλεσμα να είναι ίσως λιγότερο τοξικά. Συγκεκριμένα θα μπορούσε να γίνεται λυοφυλίωση των πολυμερών.
2. Να γίνει η σύνθεση και η αξιολόγηση αστεροειδών συμπολυμερών διαφορετικών συστάσεων που να είναι βασισμένα στον καλύτερο συνδυασμό μονομερών (DMAEMA – HEGMA) και στην καλύτερη αρχιτεκτονική (αδρομερή αστεροειδή), για να προσδιοριστεί η επίδραση της σύστασης των μονομερών στην επιμόλυνση καθώς και στη βιωσιμότητα των κυττάρων.

3. Να γίνει προσπάθεια προσθήκης συγκεκριμένων ομάδων (targeting ligand) στα αστεροειδή πολυμερή του DMAEMA οι οποίες αναγνωρίζονται από τα κύτταρα για να αυξηθεί έτσι η ικανότητα επιμόλυνσης.
4. Τέλος, να γίνει συστηματική μελέτη της συμπλοκοποίησης των αστεροειδών πολυμερών του DMAEMA με το DNA και να γίνει προσπάθεια εξεύρεσης της σχέσης των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των συμπλόκων με την ικανότητα επιμόλυνσης τους.

Τα αστεροειδή πολυμερικά πλέγματα χαρακτηρίστηκαν ως προς την ικανότητά τους να απορροφούν διαλύτη και, συγκεκριμένα, ως προς το ΒΔ τους σε νερό και THF, σε μίγματα διαλυτών ή σε νερό διαφόρων pH. Συγκεκριμένα, τα αστεροειδή πολυμερικά πλέγματα MMA – BuMA χαρακτηρίστηκαν σε μίγματα εξανίου – THF, ενώ οι υπόλοιπες τρεις οικογένειες αστεροειδών πλεγμάτων χαρακτηρίστηκαν σε νερό διάφορων pH, όπου παρατηρήθηκαν τα εξής:

1. Οι ΒΔ των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων MMA – BuMA αυξάνονταν με αύξηση της περιεκτικότητας του διαλύτη σε THF.
2. Για τις τρεις οικογένειες αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων που περιείχαν ιονιζόμενο/α μονομερές/η οι ΒΔ αυξάνονταν στα pH όπου ένα από τα δύο μονομερή ήταν ιονισμένο, και, συγκεκριμένα, σε χαμηλά pH για τα αστεροειδή πολυμερικά πλέγματα DEAEMA – HEGMA και DMAEMA – BzMA και σε χαμηλά και υψηλά pH για τα αστεροειδή πολυμερικά πλέγματα DMAEMA – MAA.
3. Οι τρεις οικογένειες αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων των μονομερών DEAEMA – HEGMA, DMAEMA – BzMA και DMAEMA – MAA, οι οποίες είχαν την ιδιότητα να ιοντίζονται παρουσίασαν μεγαλύτερους ΒΔ ($12 < \text{B}\Delta < 50$ στην ιονισμένη τους κατάσταση) από τους ΒΔ των αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων MMA – BuMA σε 100% THF ($\text{B}\Delta < 12$), υποδεικνύοντας τον καθοριστικό ρόλο των φορτίων στη διόγκωση των πλεγμάτων.
4. Όταν τα πλέγματα βρίσκονταν στην πλήρως διογκωμένη τους κατάσταση (μέγιστο ΒΔ) ο ΒΔ τους παρουσίασε εξάρτηση από την αρχιτεκτονική των αστεροειδών πλεγμάτων, εκτός από τα διπλά υδρόφοβα αστεροειδή πλέγματα

- MMA – BuMA. Φαίνεται ότι οι πιο σημαντικές παράμετροι που επηρεάζουν τη διόγκωση όσο αφορά την αρχιτεκτονική είναι ο ΒΠ των ελαστικών αλυσίδων και κατ' επέκταση το ποσοστό του πλέγματος σε υδρόφοβο διασταυρωτή, ο ΒΠ των ελεύθερων αλυσίδων και η κατανομή των υδρόφοβων μονάδων στο πλέγμα.
5. Τα πλέγματα που βασίζονται σε γραμμικά ομοπολυμερή ή γραμμικά συμπολυμερή του DMAEMA (μη αστεροειδή πλέγματα) παρουσίασαν μικρότερους ΒΔ από τα αστεροειδή πολυμερικά πλέγματα λόγω της μη παρουσίας των ελαστικών αλυσίδων. Τα αμφιφιλικά πλέγματα του PIBMA παρουσιάζουν καλύτερες μηχανικές ιδιότητες από αντίστοιχα ομοπολυμερή πλέγματα του DMAEMA και αμφιφιλικά πολυμερικά πλέγματα DMAEMA – MMA.
 6. Για τα αστεροειδή πολυμερικά πλέγματα προσδιορίστηκαν επίσης οι απώλειές τους, οι οποίες κυμαίνονται από 3.5 έως 25 % και χαρακτηρίστηκαν με GPC και NMR. Οι απώλειες των πλεγμάτων οφείλονται στις περισσότερες περιπτώσεις στα γραμμικά πρόδρομα πολυμερή τα οποία δεν συνενώθηκαν σε αστεροειδές πολυμερές.
 7. Οι δύο από τις τέσσερις οικογένειες αστεροειδών πολυμερικών πλεγμάτων οι οποίες περιέχουν DMAEMA εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να προσροφούν DNA. Η προσρόφηση του DNA από τα πλέγματα είναι καθαρά ηλεκτροστατική αφού φάνηκε να επηρεάζεται αποκλειστικά από την παρουσία των μονάδων DMAEMA και από το εάν αυτές είναι ιονισμένες.

Συμπερασματικά, έγινε η σύνθεση και η συστηματική μελέτη των ΒΔ τεσσάρων οικογενειών αστεροειδών πολυμερών και προσπάθεια βελτίωσης των μηχανικών τους ιδιοτήτων με την προσθήκη του μονομερούς του IB στο πλέγμα.

Ως μελλοντική εργασία θα μπορούσε:

1. Να γίνει μελέτη του μικροφασικού διαχωρισμού των πλεγμάτων με τη χρησιμοποίηση των κατάλληλων τεχνικών π.χ. με DSC.
2. Τα αστεροειδή συμπολυμερικά πλέγματα να εξεταστούν ως βάση για καλλιέργεια κυττάρων όπως και τα αμφιφιλικά πλέγματα του PIB.
3. Να γίνει σύνθεση περαιτέρω αμφιφιλικών πλεγμάτων PIB διαφόρων ΒΠ και συστάσεων και εκτενέστερη μελέτη των μηχανικών τους ιδιοτήτων συγκριτικά με

- τα άλλα είδη πλεγμάτων που παρασκευάζονται από την ερευνητική Ομάδα Χημείας Πολυμερών του Πανεπιστημίου Κύπρου.
4. Να γίνει σύνθεση αμφιφιλικών πλεγμάτων PIB διαφόρων ΒΠ και συστάσεων όπου το PIB να βρίσκεται στην κύρια πολυμερική αλυσίδα βελτιώνοντας ίσως αποτελεσματικότερα τις μηχανικές ιδιότητες των πλεγμάτων, οι οποίες φυσικά θα μελετηθούν με χρήση των κατάλληλων μεθόδων π.χ. DMA. Η σύνθεση τέτοιων πλεγμάτων θα μπορούσε να γίνει με τη χρήση διμεθακρυλικού PIB το οποίο θα αντικαταστήσει το διασταυρωτή.
 5. Τέλος, να γίνει η σύνθεση καινούργιων μονομερών που πιστεύεται ότι μπορεί να παρουσιάσουν χαμηλό T_g . Συγκεκριμένα να γίνει η σύνθεση των μονομερών, ο πολυμερισμός τους με τη μέθοδο GTP και η μέτρηση του T_g των πολυμερών αυτών με DSC. Το μονομερές του οποίου τα πολυμερή θα παρουσιάσουν το χαμηλότερο T_g θα χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση πλεγμάτων των οποίων θα μελετηθούν οι μηχανικές τους ιδιότητες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Adriaensens, P.; Storme, L.; Carleer, R.; Gelan, J.; Du Prez, F. E. 'Comparative Morphological Study of Poly(dioxolane)/Poly(methyl methacrylate) Segmented Networks and Blends by ^{13}C Solid-state NMR and Thermal Analysis,' *Macromolecules* **2002**, *35*, 3965-3970.
2. Allcock, H. R.; Lampe, F.W. *Contemporary Polymer Chemistry*; 2nd Edition, Prentice Hall: New Jersey, 1990; (α) Ch. 4, p. 82-84, (β) Ch. 4, p. 89, (γ) Ch.15, p. 394-403.
3. Allen, A. J.; Kennedy, J. P. 'Amphiphilic Networks. XII: Synthesis and Characterization of Quaternized Amphiphilic Networks Derived from Polyisobutylene-*l*-Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate),' *Des. Mon. Polym.* **1999**, *2*, 29-52.
4. Barakat, I.; Dubois, P.; Grandfils, C.; Jérôme, R. 'Macromolecular Engineering of Polylactones and Polylactides. XXV. Synthesis and Characterization of Bioerodible Amphiphilic Networks and Their Use as Controlled Drug Delivery Systems,' *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **1999**, *37*, 2401-2411.
5. Blezer, R.; Lindhout, T.; Keszler, B.; Kennedy, J. P. 'Amphiphilic Networks. VIII. Reduced In-vitro Thromboresistance of Amphiphilic Networks,' *Polym. Bull.* **1995**, *34*, 101-107.
6. Bos, G. W.; Trullas-Jimeno, A.; Jiskoot, W.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E. 'Sterilization of Poly(dimethylamino) Ethyl Methacrylate-based Gene Transfer Complexes,' *Int. J. Pharm.* **2000**, *211*, 79-88.
7. Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Dernenex, B.; Behr, J.-P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7297-7301
8. Brandrup, J.; Immergut, E. H.; Grulke, E. A., Eds., *Polymer Handbook*; 4th ed., John Willey, New York, 1999.

9. Bromberg, L.; Temchenko, M.; Hatton, T. A. 'Dually Responsive Microgels from Polyether-modified Poly(acrylic acid): Swelling and Drug Loading,' *Langmuir* **2002**, *18*, 4944-4952.
10. Bruns, N.; Scherble, J.; Hartmann, L.; Thomann, R.; Iván, B.; Mulhaupt, R.; Tiller, J. C. 'Nanophase Separated Amphiphilic Conetwork Coatings and Membranes,' *Macromolecules* **2005**, *38*, 2431-2438.
11. Carrot, G.; Schmitt, B.; Lutz, P. 'Synthesis and Characterization of Amphiphilic Networks Obtained by Copolymerization of Poly(ethylene oxide) Macromonomers with Methyl methacrylate,' *Polym. Bull.* **1998**, *40*, 181-188.
12. Cherng, J.-Y.; Van de Wetering, P.; Talsma, H.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E. 'Effect of Size and Serum Proteins on Transfection Efficiency of Poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-Plasmid Nanoparticles,' *Pharm. Res.* **1996**, *13*, 1038-1042.
13. Cherng, J.-Y.; Van de Wetering, P.; Talsma, H.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E. 'Freeze-Drying of Poly(2-dimethylamino)ethyl Methacrylate)-Based Gene Delivery Systems,' *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 1838-1841.
14. Cherng, J.-Y.; Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M. E.; Jiskoot, W.; Talsma, H.; Zuidam, N. J.; Hennink, W. E.; Crommelin, D. J. A. 'Effect of DNA Topology on the Transfection Efficiency of Poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid Complexes,' *J. Controlled Release* **1999**, *60*, 343-353.
15. Cherng, J.-Y.; van de Wetering, P.; Talsma, H.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E. 'Stabilization of Polymer-Based Gene Delivery Systems,' *Int. J. Pharm.* **1999**, *183*, 25-28.
16. Cherng, J.-Y.; Talsma, H.; Verrijck, R.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E. 'The Effect of Formulation Parameters on the Size of Poly((2-Dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid Complexes,' *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1999**, *47*, 215-224.
17. Christova, D.; Velichkova, R.; Goethals, E. J.; Du Prez, F. E. 'Amphiphilic Segmented Polymer Networks Based on Poly(2-alkyl-2-oxazoline) and Poly(methyl methacrylate),' *Polymer* **2002**, *43*, 4585-4590.

18. Cloninger, M. J. 'Biological Applications of Dendrimers,' *Curr. Opinion Chem. Biol.* **2002**, *6*, 742-748.
19. De Smedt, S. C.; Demeester, J.; Hennink, W. E. 'Cationic Polymer Based Gene Delivery Systems,' *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 113-126.
20. Delerba, M.; Ebdon, J. R.; Rimmer, S. 'Preparation of Amphiphilic Networks by Diels-Alder Reactions Between Oligo(butyl methacrylate) with Furan End-groups and a Poly(ethylene oxide-co-acetylenedicarboxylate),' *Macromol. Rapid Commun.* **1997**, *18*, 723-728.
21. Demosthenous, E.; Hadjiyannakou, S. C.; Vamvakaki, M.; Patrickios C. S. 'Synthesis and Characterization of Polyampholytic Model Networks: Effects of Polymer Composition and Architecture,' *Macromolecules* **2002**, *35*, 2252-2260.
22. Deshpande, M. C.; Davies, M. C.; Garnett, M. C.; Williams, P. M.; Armitage, D.; Bailey, L.; Vamvakaki, M.; Armes, S. P.; Stolkin, S. 'The Effect of Poly(ethylene Glycol) Molecular Architecture on Cellular Interaction and Uptake of DNA Complexes,' *J. Controlled Release* **2004**, *97*, 143-156.
23. Dicker, I. B.; Cohen, G. M.; Farnham, W. B.; Hertler, W. R.; Laganis, E. D.; Sogah, D. Y. 'Oxyanions Catalyze Group Transfer Polymerization to Give Living Polymers,' *Macromolecules* **1990**, *23*, 4034-4041.
24. Dubruel, P.; Christiaens, B.; Vanloo, B.; Bracke, K.; Rosseneu, M.; Vandekerckhove, J.; Schacht, E. 'Physicochemical and Biological Evaluation of Cationic Polymethacrylates as Vectors for Gene Delivery,' *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, *18*, 211-220.
25. Dubruel, P.; Christiaens, B.; Rosseneu, M.; Vandekerckhove, J.; Grooten, J.; Goossens, V.; Schacht, E. 'Buffering Properties of Cationic Polymethacrylates are Not the Only Key to Successful Gene Delivery,' *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 379-388.
26. Du, J.; Ding, X.; Zheng, Z.; Peng, Y. 'Synthesis and Degradation of Intelligent Hydrogels Containing Polyacetal Segments,' *Eur. Polym. J.* **2002**, *38*, 1033-1037.
27. Du, J. Z.; Chen, Y. M. 'Star Polymer, PCL-PS Heteroarm Star Polymer by ATRP, and Core-carboxylated PS Star Polymer,' *Macromolecules* **2004**, *37*, 3588-3594.

28. Erdodi, G.; Iván, B. 'Novel Amphiphilic Conetworks Composed of Telechelic Poly(ethylene oxide) and Three-arm Star Polyisobutylene,' *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 959-962.
29. Erdodi, G.; Kennedy, J. P. 'Water-swollen Highly Oxygen Permeable Membranes: Analytical Technique and Syntheses,' *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2005**, *43*, 3491-3501.
30. Erdodi, G.; Kennedy, J. P. 'Ideal Tetrafunctional Amphiphilic PEG/PDMS Conetworks by a Dual-purpose Extender/Crosslinker. I. Synthesis,' *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2005**, *43*, 4953-4964.
31. Erdodi, G.; Kennedy, J. P. 'Ideal Tetrafunctional Amphiphilic PEG/PDMS Conetworks by a Dual-purpose Extender/Crosslinker. II. Characterization and Properties of Water-swollen Membranes,' *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2005**, *43*, 4965-4971.
32. Erdogan, T.; Ozyurek, Z.; Hizal, G.; Tunca, U. 'Facile Synthesis of AB(2)-type Miktoarm Star Polymers Through the Combination of Atom Transfer Radical Polymerization and Ring-opening Polymerization,' *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2004**, *42*, 2313-2320.
33. Feng, X. S.; Pan, C. Y. 'Synthesis and Characterization of Star Polymers Initiated By Hexafunctional Discotic Initiator Through Atom Transfer Radical Polymerization,' *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2001**, *39*, 2233-2243.
34. Flory, P. J. *Principles of Polymer Chemistry*; Cornell University Press: Ithaca, NY, 1953; p. 577.
35. Freitag, R. *Synthetic Polymers for Biotechnology and Medicine*; Landes Bioscience: Georgetown, Texas, 2003; Ch. 2, p. 19-37.
36. Friedman, T.; Felgner, P. L.; Blaese, R. M.; Ho, D. Y.; Sapolsky, R. M.; Mirsky, S.; Rennie, J. 'Making Gene Therapy Work,' *Sci. Am.* **1997**, June, 79-104.
37. Gao, H. F.; Tsarevsky, N. V.; Matyjaszewski, K. 'Synthesis of Degradable Miktoarm Star Copolymers via Atom Transfer Radical Polymerization,' *Macromolecules* **2005**, *38*, 5995-6004.

38. Georgiades, S. N.; Vamvakaki, M.; Patrickios, C. S. 'Synthesis and Characterization of Double-Hydrophilic Model Networks Based on Cross-linked Star Polymers of Poly(ethylene glycol) Methacrylate and Methacrylic Acid,' *Macromolecules* **2002**, *35*, 4903-4911.
39. Georgiou T. K.; Vamvakaki, M.; Patrickios, C. S. 'Microphase Separation Under Constraints: a Molecular Thermodynamic Theory for Polyelectrolytic Amphiphilic Model Networks in Water,' *Polymer* **2004**, *45*, 7341-7355.
40. Georgiou, T. K.; Vamvakaki, M.; Patrickios, C. S.; Yamasaki, E. N.; Phylactou, L. A. 'Nanoscopic Cationic Methacrylate Star Homopolymers: Synthesis by Group Transfer Polymerization, Characterization and Evaluation as Transfection Reagents,' *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 2221-2229.
41. Georgiou, T. K.; Vamvakaki, M.; Phylactou, L. A.; Patrickios, C. S. 'Synthesis, Characterization and Evaluation as Transfection Reagents of Double-Hydrophilic Star Copolymers: Effect of Star Architecture,' *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2990-2997.
42. Georgiou, T. K.; Patrickios, C. S. 'Synthesis, Characterization of Double-Hydrophobic Model Networks Based on Cross-linked Star Copolymers of *n*-Butyl Methacrylate and Methyl Methacrylate,' *Macromolecules* **2006**, *39*, 1560-1568.
43. Gitsov, I.; Zhu, C. 'Amphiphilic Hydrogels Constructed by Poly(ethylene glycol) and Shape-persistent Dendritic Fragments,' *Macromolecules* **2002**, *35*, 8418-8427.
44. Godbey, W. T.; Wu, K. K.; Mikos, A. G. 'Size Matters: Molecular Weight Affects the Efficiency of Poly(ethylenimine) as a Gene Delivery Vehicle,' *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *45*, 268-275.
45. Godbey, W. T.; Kenneth, K. W.; Mikos, A. G. 'Poly(ethylenimine) and its Role to Gene Delivery,' *J. Controlled Release* **1999**, *60*, 149-160.
46. Godbey, W. T.; Mikos, A. G. 'Recent Progress in Gene Delivery Using Non-viral Transfer Complexes,' *J. Controlled Release* **2001**, *71*, 115-125.

47. Guan, Y.; Zhang, W.; Wan, G.; Peng, Y. 'Polytetrahydrofuran Amphiphilic Networks. I. Synthesis and Characterization of Polytetrahydrofuran Acrylate Ditelechelic and Polyacrylamide-*l*-polytetrahydrofuran Networks,' *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2000**, *38*, 3812-3820.
48. Guan, Y.; Jiang, W.; Zhang, W.; Wan, G.; Peng, Y. 'Polytetrahydrofuran Amphiphilic Networks. IV. Swelling Behavior of Poly(acrylic acid)-*l*-polytetrahydrofuran and Poly(methacrylic acid)-*l*-polytetrahydrofuran Networks,' *J. Polym. Sci.: Part B: Polym. Phys.* **2001**, *39*, 1784-1790.
49. Guan, Y.; Jiang, W.; Zhang, W.; Wan, G.; Peng, Y. 'Polytetrahydrofuran Amphiphilic Networks. III. Synthesis and Characterization of pH-sensitive Poly(methacrylic acid)-*l*-polytetrahydrofuran Networks,' *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, *85*, 351-357.
50. Guan, Y.; Ding, X.; Zhang, W.; Wan, G.; Peng, Y. 'Polytetrahydrofuran Amphiphilic Networks. 5. Synthesis and Swelling Behavior of Thermosensitive Poly(N-isopropylacrylamide)-*l*-polytetrahydrofuran Networks,' *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, *203*, 900-908.
51. Guao, H.; Tsarevsky, N. V.; Matyjaszewski, K. 'Synthesis of Degradable Miktoarm Star Copolymers via Atom Transfer Radical Polymerization,' *Macromolecules* **2005**, *38*, 5995-6004.
52. Guo, Q.; Thomann, R.; Gronski, W.; Thurn-Albrecht, T. 'Phase Behavior, Crystallization, and Hierarchical Nanostructures in Self-organized Thermoset Blends of Epoxy Resin and Amphiphilic Poly(ethylene oxide)-*block*-poly(propylene oxide)-*block*-poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers,' *Macromolecules* **2002**, *35*, 3133-3144.
53. Hadjichristidis, N.; Pitsikalis, M.; Pispas, S.; Iatrou, H. 'Polymers with Complex Architecture by Living Anionic Polymerization,' *Chem Rev.* **2001**, *101*, 3747-3792.
54. Hadjikallis, G.; Hadjiyannakou, S. C.; Vamvakaki, M.; Patrickios, C. S. 'Synthesis and Aqueous Solution Characterization of Novel Diblock Polyampholytes Containing Imidazole,' *Polymer* **2002**, *43*, 7269-7273.

55. Hadjiyannakou, S. C.; Triftaridou, A. I.; Patrickios, C. S. 'Synthesis, Characterization and Evaluation of Amphiphilic Star Copolymeric Emulsifiers Based on Methoxy Hexa(ethylene glycol) Methacrylate and Benzyl methacrylate,' *Polymer* **2005**, *46*, 2433-2442.
56. Haigh, R.; Rimmer, S.; Fullwood, N. J. 'Synthesis and Properties of Amphiphilic Networks. 1: The Effect of Hydration and Polymer Composition on the Adhesion of Immunoglobulin-G to Poly(lauryl methacrylate-*stat*-glycerol methacrylate-*stat*-ethylene glycol dimethacrylate) Networks,' *Biomaterials* **2000**, *21*, 735-739.
57. Haigh, R.; Fullwood, N.; Rimmer, S. 'Synthesis and Properties of Amphiphilic Networks 2: A Differential Scanning Calorimetric Study of Poly(dodecyl methacrylate-*stat*-2,3propandiol-1-methacrylate-*stat*-ethandiol dimethacrylate) Networks and Adhesion and Spreading of Dermal Fibroblasts on These Materials,' *Biomaterials* **2002**, *23*, 3509-3516.
58. Heise, A.; Trollsas, M.; Magbitang, T.; Hedrick, J. L.; Frank, C. W.; Miller, R. D. 'Star Polymers with Alternating Arms from Miktofunctional Mu-initiators Using Consecutive Atom Transfer Polymerization and Ring-opening Polymerization,' *Macromolecules* **2001**, *34*, 2789-2804.
59. Hentze, H.-P.; Krämer, E.; Berton, B.; Förster, S.; Antonietti, M.; Dreja, M. 'Lyotropic Mesophases of Poly(ethylene oxide)-*b*-poly(butadiene) Diblock Copolymers and their Cross-linking to Generate Ordered Gels,' *Macromolecules* **1999**, *32*, 5803-5809.
60. Hertler, W. R. 'Catalyzed Process for Reacting Carboxylic Acids with Vinyl Ethers,' U.S. Patent 5,072,029, 1991.
61. Hiemenz, P. C. *Polymer Chemistry: The Basic Concepts*; Marcel Dekker: New York, 1984; (α) Ch. 1 p. 62-63, (β) Ch 10 p. 659-722.
62. Hiemenz, P. C.; Rajagopalan, R. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*; 3rd Edition, Marcel Dekker: New York, 1997; Ch 5, p. 236-242.
63. Hild, G.; Lamps, J. P. 'Anionic Functional Polymers, Triblock Copolymers and Model Networks Derived from 2,3-epoxypropyl Methacrylate,' *Polymer* **1995**, *36*, 4841-4850.

64. Hild, G.; Lamps, J. P. 'Diblock Copolymers, Triblock Copolymers and Model Networks Synthesized by Sequential Anionic Polymerization of Styrene and 2,3-epoxypropyl Methacrylate,' *Polymer* **1998**, *39*, 2637-2649.
65. Hild, G. 'Model Networks Based on 'Endlinking' Processes: Synthesis, Structure and Properties,' *Prog. Polym. Sci.* **1998**, *23*, 1019-1149.
66. Hillmyer, M. A.; Lipic, P. M.; Hadjuk, D. A.; Almdal, K.; Bates, F. S. 'Self-assembly and Polymerization of Epoxy Resin-Amphiphilic Block Copolymer Nanocomposites,' *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2749-2750.
67. Hinrichs, W. L. J.; Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M. E.; van de Wetering, P.; Hennink, W. E. 'Thermosensitive Polymers as Carriers for DNA Delivery,' *J. Controlled Release* **1999**, *60*, 249-259.
68. Hirao, A.; Kawasaki, K.; Higashihara, T. 'Precise Synthesis of Asymmetric Star-Shaped Polymers by Coupling Reactions of New Specially Designed Polymer Anions with Chain-end-functionalized Polystyrenes with Benzyl Bromide Moieties,' *Sci. Tech. Adv. Mater.* **2004**, *5*, 469-477.
69. Hong, K. L.; Wan, Y. N.; Mays, J. W. '1,3-Cyclohexanediene Polymers. 2. Near-monodisperse Star and Star-block Polymers on Poly(1,3-cyclohexanediene),' *Macromolecules* **2001**, *34*, 2482-2487.
70. Hudde, T.; Rayner S. A.; Comer, R. M.; Weber, M.; Isaacs, J. D.; Waldmann, H.; Larkin, D. F. P.; George, A. J. T. 'Activated Polyamidoamine Dendrimers, a Non-viral Vector for Gene Transfer to the Corneal Endothelium,' *Gene Therapy* **1999**, *6*, 939-943.
71. Isayeva, I. S.; Yankovski, S. A.; Kennedy, J. P. 'Novel Amphiphilic Membranes of Poly(N,N-dimethyl acrylamide) Crosslinked with Octa-methacrylate-telechelic Polyisobutylene,' *Polym. Bull.* **2002**, *48*, 475-482.
72. Isayeva, I. S.; Gent, A. N.; Kennedy, J. P. 'Synthesis and Burst Strength of Water-swollen Immunisolatory Tubules,' *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2002**, *40*, 2075-2084.

73. Iván, B.; Kennedy, J. P.; Chang, V. S. C. 'New Telechelic Polymer and Sequential Copolymers by Polyfunctional Initiator-transfer Agents (inifers). VII. Synthesis and Characterization of α,ω -di(hydroxyl) polyisobutylene,' *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **1980**, *18*, 3177-3191.
74. Iván, B.; Kennedy, J. P. 'Living Carbocationic Polymerization. XX. Synthesis of Allyl-telechelic Polyisobutylenes by One-pot Polymerization-functionalization,' *Polym. Mater. Sci. Eng.* **1988**, *58*, 869-872.
75. Iván, B.; Feldthusen, J.; Müller, A. H. E. 'Synthesis Strategies and Properties of Smart Amphiphilic Networks,' *Macromol. Symp.* **1996**, *102*, 81-90.
76. Jagur-Grodzinski, J. 'Biomedical Applications of Polymers 2001-2002,' *e-Polymers* **2003**, *12*, 1-37.
77. Jankova, K.; Bednarek, M.; Hvilsted, S. 'Star Polymers by ATRP of Styrene and Acrylates Employing Multifunctional Initiators,' *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2005**, *43*, 3748-3759.
78. Kanaoka, S.; Omura, T.; Sawamoto, M.; Higashimura, T. 'Star-shaped Polymers by Living Cationic Polymerization .3. Synthesis of Heteroarm Amphiphilic Star-shaped Polymers of Vinyl Ethers with Hydroxyl or Carboxyl Pendant Groups,' *Macromolecules* **1992**, *25*, 6407-6413.
79. Kennedy, J. P.; Hiza, M. 'New Telechelic Polymers and Sequential Co-polymers by Polyfunctional Initiator-transfer Agents (inifers). 24. Macromers by Carbocationic Polymerization. 4. Synthesis and Characterization of Polyisobutenyl Methacrylate Macromer and its Homopolymerization and Copolymerization with Methyl-Methacrylate,' *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **1983**, *21*, 1033-1044.
80. Kennedy, J. P.; Iván, B. '*Designed Polymers by Carbocationic Macromolecular Engineering: Theory and Practice*,' Hanser Publishers, New York, 1992.
81. Kennedy, J. P.; Fenyvesi, G.; Na, S.; Keszler, B.; Rosenthal, K. S. 'Synthesis and Characterization of Tubular Amphiphilic Networks with Controlled pore Dimensions for Insulin Delivery,' *Des. Mon. Polym.* **2000**, *3*, 113-122.

82. Kennedy, J. P.; Fenyvesi, G.; Levy, R. P.; Rosenthal, K. S. 'Amphiphilic Membranes with Controlled Mesh Dimensions for Insulin Delivery,' *Macromol. Symp.* **2001**, *172*, 56-66.
83. Keszler, B.; Fenyvesi, G.; Kennedy, J. P. 'Amphiphilic Networks. XIV. Synthesis and Characterization of Poly(*N,N*-dimethylacrylamide)-*l*-three-arm Star Polyisobutylene,' *Polym. Bull.* **2000**, *43*, 511-518.
84. Kim, J.-Y.; Song, S.-H.; Kim, D.-S.; Suh, K.-D. 'Synthesis of Novel Amphiphilic pH-sensitive Polyurethane Networks Through Water-in-oil Soap-free Emulsion Polymerization Process. I. Microstructural Differences and Swelling Behaviors,' *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *76*, 2115-2127.
85. Kim, J.-Y.; Song, S.-H.; Lee, J.-W.; Suh, K.-D. 'Synthesis of Novel Amphiphilic pH-sensitive Polyurethane Networks Through w/o Soap-free Emulsion Polymerization Process. II. Mechanical Property and Biphasic Swelling Behaviors,' *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, *79*, 621-630.
86. Kim, T.-I.; Seo, H. J.; Choi, J. S.; Jang, H.-S.; Baek, J.-U.; Kim, K.; Park, J.-S. 'PAMA-PEG-PAMAM: Novel Triblock Copolymer as a Biocompatible and Efficient Gene Delivery Carrier,' *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 2487-2492.
87. Kiserow, D.; Prochazka, K.; Ramireddy, C.; Tuzar, Z.; Munk, P.; Webber, S. E. 'Fluorimetric and Quasi-Elastic Light Scattering Study of the Solubilization of Nonpolar Low-Molar Mass Compounds into Water-Soluble Block-Copolymer Micelles,' *Macromolecules* **1992**, *25*, 461-469.
88. Kokufuta, E.; Wang, B.; Yoshida, R.; Khokhlov, A. R.; Hirata, M. 'Volume Phase Transition of Polyelectrolyte Gels with Different Charge Distributions,' *Macromolecules* **1998**, *31*, 6878-6884.
89. Kosonen, H.; Ruokolainen, J.; Nyholm, P.; Ikkala, O. 'Self-organized Cross-linked Phenolic Thermosets: Thermal and Dynamic Mechanical Properties of Novolac/block Copolymer Blends,' *Polymer* **2001**, *42*, 9481-9486.
90. Kurian, P.; Kennedy, J. P. 'Novel Tricontinuous Hydrophilic-lipophilic-oxyphilic Membranes: Synthesis and Characterization,' *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2002**, *40*, 1209-1217.

91. Kurian, P.; Kennedy, J. P. 'Novel Tricomponent Membranes Containing Poly(ethyleneglycol) / poly(pentamethylcyclopentasiloxane) / poly(dimethylsiloxane) Domains,' *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2002**, *40*, 3093-3102.
92. Kurisawa, M.; Yokoyama, M.; Okano, T. 'Transfection Efficiency Increases by Incorporating Hydrophobic Monomer Units Into Polymeric Gene Carriers,' *J. Controlled Release* **2000**, *68*, 1-8.
93. Kurisawa, M.; Yokoyama, M.; Okano, T. 'Gene Expression by Temperature With Thermo-Responsive Polymeric Gene Carriers,' *J. Controlled Release* **2000**, *69*, 127-137.
94. Lee, H. J.; Lee, K.; Choi, N. 'Controlled Anionic Synthesis of Star-shaped Polystyrene by the Incremental Addition of Divinylbenzene,' *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2005**, *43*, 870-878.
95. Lim, D. W.; Yeom, Y. I.; Park, T. G. 'Poly(DMAEMA-NVP)-*b*-PEG-galactose as Gene Delivery Vector for Hepatocytes,' *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11*, 688-695.
96. Lipic, P. M.; Bates, F. S.; Hillmyer, M. A. 'Nanostructured Thermosets from Self-assembled Amphiphilic Block Copolymer/Epoxy Resin Mixtures,' *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8963-8970.
97. Loizou, E.; Triftaridou, A. I.; Georgiou, T. K.; Vamvakaki, M.; Patrickios, C. S. 'Cationic Double-Hydrophilic Model Networks: Synthesis, Characterization, Modeling and Protein Adsorption Studies,' *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1150-1160.
98. Luo, D.; Havestick, K.; Belcheva, N.; Han, E.; Saltzman, W. M. 'Poly(ethylene glycol)-Conjugated PAMAM Dendrimer for Biocompatible High-Efficiency DNA Delivery,' *Macromolecules* **2002**, *35*, 3456-3462.
99. Luten, J.; van Steenis, J. H.; van Someren, R.; Kemmink, J.; Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M. E.; Koning, G. A.; Crommelin, D. J. A.; van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E. 'Water-soluble Biodegradable Cationic Polyphosphazenes for Gene Delivery,' *J. Controlled Release* **2003**, *89*, 483-497.

100. Matmour, R.; Lebreton, A.; Tsitsilianis, C.; Kallitsis, I.; Heroguez, V.; Gnanou, Y. 'Tri- and Tetracarbanionic Initiators by a Lithium/Halide Exchange Reaction: Application to Star-Polymer Synthesis,' *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 284-287.
101. McMurry J. *Οργανική Χημεία (μετάφραση)*; 1^η Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης: Ηράκλειο, 1998; Κεφ. 13, σελ. 559-569.
102. Merdan, T.; Kopeček, J.; Kissel, T. 'Prospects for Cationic Polymers in Gene and Oligonucleotide Therapy Against Cancer,' *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 715-758.
103. Mijovic, J.; Shen, M.; Sy, J. W.; Mondragon, I. 'Dynamics and Morphology in Nanostructured Thermoset Network/Block Copolymer Blends During Network Formation,' *Macromolecules* **2000**, *33*, 5235-5244.
104. Miyasaki, T.; Kaneko, T.; Gong, J. P.; Osada, Y.; Demura, M.; Suzuki, M. 'Water-induced Crystallization of Hydrogels,' *Langmuir* **2002**, *18*, 965-967.
105. Moschogianni, P.; Pispas, S.; Hadjichristidis, N. 'Multifunctional ATRP Initiators: Synthesis of Four-arm Homopolymers of Methyl Methacrylate and Craft Copolymers of Polystyrene and Poly(t-butyl methacrylate),' *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2001**, *39*, 650-655.
106. Osada, Y.; Ross-Murphy, S. B. 'Intelligent gels,' *Sci. Am.* **1993**, *268*(5), 82-87.
107. Pang, S.-W.; Park, H.-Y. ; Jang, Y.-S. ; Kim, W.-S.; Kim, J.-H. 'Effects of Charge Density and Particle Size of Poly(Styrene/(Dimethylamino)ethyl Methacrylate) Nanoparticle for Gene Delivery in 293 Cells,' *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2002**, *26*, 213-222.
108. Pantchev, I.; Velichkova, R.; Lakov, L.; Peshev, O.; Goethals, E. 'Amphiphilic Polyelectrolyte Networks Derived from 2-oxazolines,' *Polymer* **1998**, *39*, 7089-7097.
109. Park, D.; Keszler, B.; Galiatsatos, V.; Kennedy, J. P.; Ratner, B. D. 'Amphiphilic Networks. 9. Surface Characterization,' *Macromolecules* **1995**, *28*, 2595-2601.
110. Park, D.; Keszler, B.; Galiatsatos, V.; Kennedy, J. P. 'Amphiphilic Networks. XI. Mechanical Properties and Morphology,' *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *66*, 901-910.

111. Patrickios, C. S.; Hertler, W. R.; Abbott, N. L.; Hatton, T. A. 'Diblock, ABC Triblock, and Random Methacrylic Polyampholytes: Synthesis by Group Transfer Polymerization and Solution Behavior,' *Macromolecules* **1994**, *27*, 930-937.
112. Patrickios, C. S.; Georgiou, T. K. 'Covalent Amphiphilic Polymer Networks,' *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2003**, *8*, 76-85.
113. Petersen, H.; Kurath, K.; Martin, A. L.; Stolnik, S.; Roberts, C. J.; Davies, M. C.; Kissel, T. 'Star-Shaped Poly(ethylene glycol)-*block*-polyethylenimine Copolymers Enhance DNA Condensation of Low Molecular Weight Polyethylenimines,' *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 926-936.
114. Philippova, O. E.; Hourdet, D.; Audebert, R.; Khokhlov, A. R. 'pH-responsive Gels of Hydrophobically Modified Poly(acrylic acid),' *Macromolecules* **1997**, *30*, 8278-8285.
115. Piroton, S.; Muller, C.; Pantoustier, N.; Botteman, F.; Collinet, S.; Grandfils, C.; Dandrifosse, G.; Degée, P.; Dubois, P.; Raes, M. 'Enhancement of Transfection Efficiency Through Rapid and Noncovalent Post-PEGylation of Poly(Dimethylaminoethyl Methacrylate)/DNA Complexes,' *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 1471-1479.
116. Podual, K.; Doyle, F. J.; Peppas, N. A. 'Preparation and Dynamic Response of Cationic Copolymer Hydrogels Containing Glucose Oxidase,' *Polymer* **2000**, *41*, 3975-3983.
117. Podual, K.; Doyle, F. J.; Peppas, N. A. 'Glucose-sensitivity of Glucose Oxidase-Containing Cationic Copolymer Hydrogels Having Poly(ethylene glycol)grafts,' *J. Controlled Release* **2000**, *67*, 9-17.
118. Podual, K.; Doyle, F. J.; Peppas, N. A. 'Dynamic Behavior of Response of Glucose Oxidase-Containing Microparticles of Poly(ethylene glycol)-grafted-cationic Hydrogels in an Environment of Changing pH,' *Biomaterials* **2000**, *21*, 1439-1450.
119. Podual, K.; Peppas, N. A. 'Relaxation Behavior and Swelling-pH Master Curves of Poly[(diethylaminoethyl methacrylate)-graft-(ethylene glycol)] Hydrogels,' *Polym. Int.* **2005**, *54*, 581-593.

120. Rempp, P.; Merrill, E. W. *Polymer Synthesis*; 2nd rev. Edition, Hüthig u. Wepf: New York, 1991; (α) Ch 5, p.121-122, (β) Ch 6, p.144-162, (γ) Ch 7, p.173-175.
121. Rimmer, S.; Tattersall, P.; Ebdon, J. R.; Fullwood, N. 'New Strategies for the Synthesis of Amphiphilic Networks,' *React. Funct. Polym.* **1999**, *41*, 177-184.
122. Rimmer, S.; German, M. J.; Maughan, J.; Sun, Y.; Fullwood, N.; Ebdon, J.; MacNeil, S. 'Synthesis and Properties of Amphiphilic Networks 3: Preparation and Characterization of Block Conetworks of Poly(butyl methacrylate-block-(2,3 propandiol-1-methacrylate-stat-ethandiol dimethacrylate)),' *Biomaterials* **2005**, *26*, 2219-2230.
123. Roovers, J.; Zhou, L. L.; Toporowski, P. M.; Vanderzwan, M.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. 'Regular Star Polymers With 64 and 128 Arms - Models for Polymeric Micelles,' *Macromolecules* **1993**, *26*, 4324-4331.
124. Sahli, N.; Belbachir, M.; Lutz, P. J. 'Design and Properties of Degradable Networks Based on Free Radical Copolymerization of Poly(1,3-dioxolane) Macromonomers with Hydrophobic or Hydrophilic Comonomers in Water,' *Macromol. Chem. Phys.* **2005**, *206*, 1257-1270.
125. Scherble, J.; Thomann, R.; Iván, B.; Mülhaupt, R. 'Formation of CdS Nanoclusters in Phase-separated Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-*l*-polyisobutylene Amphiphilic Conetworks,' *J. Polym. Sci.: Part B: Polym. Phys.* **2001**, *39*, 1429-1436.
126. Shamlou, S.; Kennedy, J. P.; Levy, R. P. 'Amphiphilic Networks. 10. Diffusion of Glucose and Insulin (and Nondiffusion of Albumin) Through Amphiphilic Membranes,' *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *35*, 157-163.
127. Simmons, M. R.; Patrickios, C. S. 'Synthesis and Aqueous Solution Characterization of Catalytically Active Block Copolymers Containing Imidazole,' *Macromolecules* **1998**, *31*, 9075-9077.
128. Simmons, M. R.; Yamasaki, E. N.; Patrickios, C. S. 'Cationic Amphiphilic Model Networks: Synthesis by Group Transfer Polymerization and Characterization of the Aqueous Degree of Swelling,' *Macromolecules* **2000**, *33*, 3176-3179.

129. Simms, J. A. 'Methacrylate Star Synthesis by GTP,' *Rubber Chem. Technol.* **1991**, *64*, 139-151.
130. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, Timothy A. *Principles of Instrumental Analysis*; 5th Edition, Harcourt Brace & Company: Florida, 1998; Ch 23, p. 756-761.
131. Sogah, D. Y.; Hertler, W. R.; Webster, O. W.; Cohen, G. M. 'Group Transfer Polymerization - Polymerization of Acrylic-Monomers,' *Macromolecules* **1987**, *20*, 1473-1488.
132. Steinbrecht, K.; Bandermann, F. 'Bifunctional Initiators for Group-transfer Polymerization,' *Makromol. Chem.* **1989**, *190*, 2183-2191.
133. Süvegh, K.; Domján, A.; Vankó, G.; Iván, B.; Vértes, A. 'Free Volume and Swelling Dynamics of the Poly[(2-dimethylamino)ethyl methacrylate]-*l*-polyisobutylene Amphiphilic Network by Positron Annihilation Investigations,' *Macromolecules* **1998**, *31*, 7770-7775.
134. Switek, K. A.; Bates, F. S.; Hillmyer, M. A. 'Star Polymer Synthesis Using Hexafluoropropylene Oxide as an Efficient Multifunctional Coupling Agent,' *Macromolecules* **2004**, *37*, 6355-6361.
135. Takeda, N.; Nakamura, E.; Yokoyama, M.; Okano, T. 'Temperature-responsive Polymeric Carriers Incorporating Hydrophobic for Effective Transfection in Small Doses,' *J. Controlled Release* **2004**, *95*, 343-355.
136. Tanaka, T 'Gels,' *Sci. Am.* **1981**, *244*(1), 124-138.
137. Themistou, E.; Patrickios, C. S. 'Synthesis and Characterization of Star Polymers and Cross-Linked Star Polymer Model Networks Containing a Novel, Silicon-Based, Hydrolyzable Cross-Linker,' *Macromolecules* **2004**, *37*, 6734-6743.
138. Triftaridou, A. I.; Hadjiyannakou, S. C; Vamvakaki, M.; Patrickios, C. S. 'Synthesis, Characterization, and Modeling of Cationic Amphiphilic Model Hydrogels: Effects of Polymer Composition and Architecture,' *Macromolecules* **2002**, *35*, 2506-2513.

139. Triftaridou, A. I.; Vamvakaki, M.; Patrickios, C. S.; Stavrouli, N.; Tsitsilianis, C. 'Synthesis of Amphiphilic (ABC)_n Multiarm Star Triblock Terpolymers,' *Macromolecules* **2005**, *38*, 1021-1024.
140. Tsitsilianis, C.; Voulgaris, D. 'Poly(2-vinylpyridine)-based Star-shaped Polymers. Synthesis of Heteroarm star (A(n)B(n)) and Star Block (AB)(n) Copolymers,' *Macromol. Chem. Phys.* **1997**, *198*, 997-1007.
141. Tsitsilianis, C.; Voulgaris D. 'Hydrodynamic Dimensions of Heteroarm Star Copolymers by Size Exclusion Chromatography,' *Polymer* **2000**, *41*, 1607–1614.
142. Vamvakaki, M.; Armes, S. P.; Billingham, N. C. 'Synthesis of Water-Soluble Statistical Copolymers and Terpolymers Containing Pendent Oligo(Ethylene Glycol) Derivatives,' *Polymer* **1999**, *40*, 5161-5171.
143. Vamvakaki, M.; Hadjiyannakou, S. C.; Loizidou, E.; Patrickios C. S.; Armes, S. P.; Billingham, N. C. 'Synthesis and Characterization of Novel Networks with Nano-Engineered Structures: Cross-Linked Star Homopolymers,' *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 4738-4744.
144. Vamvakaki, M.; Patrickios, C. S. 'Polyelectrolytic Amphiphilic Model Networks in Water: A Molecular Thermodynamic Theory for their Microphase Separation,' *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 4979-4986.
145. Vamvakaki, M.; Patrickios C. S. 'Synthesis and Characterization of Electrolytic Amphiphilic Model Networks Based on Cross-linked Star Polymers: Effect of Star Architecture,' *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 1630-1638.
146. van de Wetering, P.; Cherng, J.-Y.; Talsma, H.; Hennink, W. E. 'Relation Between Transfection Efficiency and Cytotoxicity of Poly(2-Dimethylamino)ethyl Methacrylate)/Plasmid Complexes,' *J. Controlled Release* **1997**, *49*, 59-69.
147. van de Wetering, P.; Cherng, J.-Y.; Talsma, H.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E. '2-(Dimethylamino)ethyl Methacrylated Based (Co)Polymers as Gene Transfer Agents,' *J. Controlled Release* **1998**, *53*, 145-153.

148. van de Wetering, P.; Moret, E. E.; Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M. E.; van Steenbergen, M.J.; Hennink, W. E. 'Structure-Activity Relationships of Water-Soluble Cationic Methacrylate/Methacrylamide Polymers for Nonviral Gene Delivery,' *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10*, 589-597.
149. van de Wetering, P.; Moret, E. E.; Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M. E.; Hennink, W. E.; Storm, G. 'Comparative Transfection Studies of Human Ovarian Carcinoma Cells in vitro, ex vivo and in vivo with Poly(2-(dimethylamino)ethyl Methacrylate)-based Polyplexes,' *J. Gene Med.* **1999**, *1*, 156-165.
150. van de Wetering, P.; Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M. E.; van Steenbergen, M. J.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E. 'Copolymers of 2-(Dimethylamino)Ethyl Methacrylated with Ethoxytriethylene Glycol Methacrylate or *N*-Vinyl-Pyrrolidone as Gene Transfer Agents,' *J. Controlled Release* **2000**, *64*, 193-203.
151. van Dijk-Wolthuis, W. N. E.; van de Wetering, P.; Hinrichs, W. L. J.; Hofmeyer, L. J. F.; Liskamp, R. M. J.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E. 'A Versatile Method for the Conjugation of Proteins and Peptides to Poly[(2-dimethylamino) ethyl Methacrylate],' *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10*, 687-692.
152. van Krevelen, D. W. *Properties of Polymers*; 3rd ed., Elsevier: Amsterdam, 1990; p. 201.
153. van Stennis, J. H.; van Maarseveen, E. M.; Verbaan, F. J.; Verrijck, R.; Crommelin, D. J. A.; Storm, G.; Hennink, W. E. 'Preparation and Characterization of Folate-Targeted PEG-coated pDMAEMA-Based Polyplexes,' *J. Controlled Release* **2003**, *87*, 167-176.
154. Verbaan, F. J.; Oussoren, C.; van Dam, I. M.; Takakura, Y.; Hashida, M.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E.; Storm, G. 'The Fate of Poly(2-dimethyl amino ethyl)methacrylate-based Polyplexes After Intravenous Administration,' *Int. J. Pharm.* **2001**, *214*, 99-101.
155. Verbaan, F. J.; van Dam, I. M.; Takakura, Y.; Hashida, M.; Hennink, W. E.; Storm, G.; Oussoren, C. 'Intravenous Fate of Poly(2-dimethyl amino ethyl)methacrylate-based Polyplexes,' *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, *20*, 419-427.

156. Voet and Voet; *Biochemistry*; 2nd edition, John Wiley and Sons: U.S.A. 1995; p. 286-292.
157. Wakebayashi, D.; Nishiyama, N.; Itaka, K.; Miyata, K.; Yamasaki, Y.; Harada, A.; Koyama, H.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. 'Polyion Complex Micelles of pDNA with Acetal-poly(ethylene glycol)-poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) Block Copolymer as the Gene Carrier System: Physicochemical Properties of Micelles Relevant to Gene Transfection Efficacy,' *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 2128-2136.
158. Webster, O. W.; Hertler, W. R.; Sogah, D. Y.; Farnham, W. B.; RajanBabu, T. V. 'Group-Transfer Polymerization. 1. A New Concept for Addition Polymerization with Organo-silicon Initiators,' *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5706-5708.
159. Webster, O. W. 'Living Polymerization Methods,' *Science* **1991**, *251*, 887-893.
160. Webster, O. W. 'The Discovery and Commercialization of Group Transfer Polymerization,' *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2000**, *38*, 2855-2860.
161. Webster, O. W. 'Group Transfer Polymerization: Mechanism and Comparison With Other Methods for Controlled Polymerization of Acrylic Monomers,' *Adv. Polym. Sci.* **2004**, *167*, 1-34.
162. Wolfert, M. A.; Dash, P. R.; Nazarova, O.; Oupicky, D.; Seymour, L. W.; Smart, S.; Strohmalm J.; Ulbrich, K. 'Polyelectrolyte Vectors for Gene Delivery: Influence of Cationic Polymer on Biophysical Properties of Complexes Formed with DNA,' *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10*, 993-1004.
163. www.kscience.co.uk
164. Zheng, G. H.; Pan, C. H. 'Preparation of Star Polymers Based on Polystyrene or Polystyrene-b-N-isopropyl acrylamide and Divinylbenzene via Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization,' *Polymer* **2005**, *46*, 2802-2810.
165. Zhu, C.; Hard, C.; Lin, C. P.; Gitsov, I. 'Novel Materials for Bioanalytical and Biomedical Applications: Environmental Response and Binding/Release Capabilities of Amphiphilic Hydrogels Shape-persistent Dendritic Junctions,' *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2005**, *43*, 4017-4029.